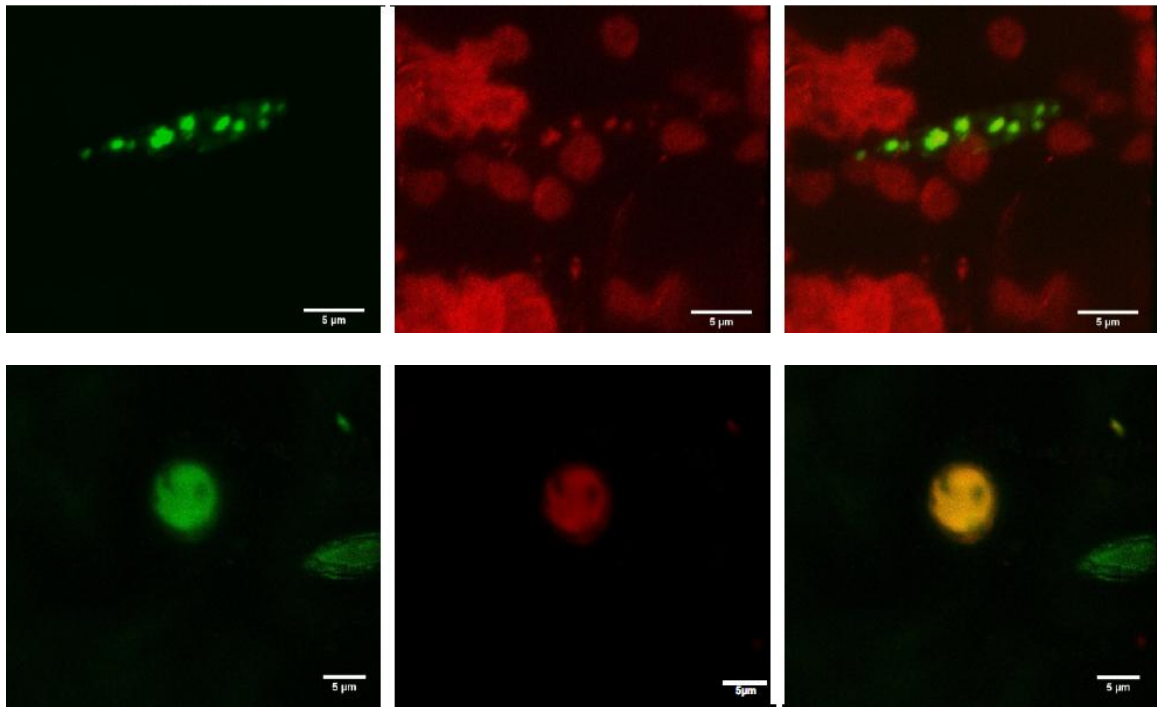


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΙΧΑΛΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ VIRP1

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Κ. ΚΑΛΑΝΤΙΔΗΣ, Αναπληρωτής καθηγητής

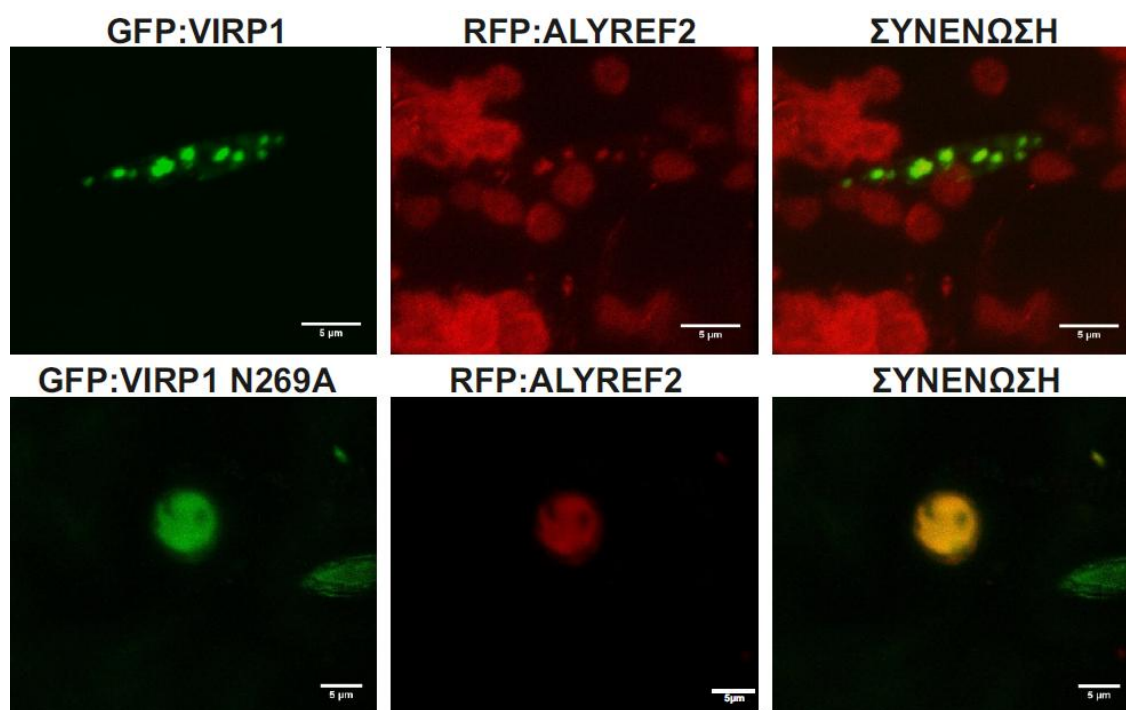
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2016

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΙΧΑΛΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ VIRP1

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



**Εικόνα 3.8.3. Συν-εντοπισμός της VIRP1 με την πρωτεΐνη ALYREF2.** Επάνω. Η αγρίου τύπου VIRP1 συν-εντοπίζεται απόλυτα με την ALYREF2. Κάτω. Το μετάλλαγμα N269Y VIRP1 συν-εντοπίζεται απόλυτα με την ALYREF2. Οι φωτογραφίες είναι με συνεστιακή μικροσκοπία (SP1 CLSM, Leica). **Αριστερά.** Φθορισμός της GFP:VIRP1 (εκπομπή 510-530nm). **Μέση.** Φθορισμός της RFP:ALYREF2 (εκπομπή 570-600nm). **Δεξιά.** Συνένωση των δύο φθορισμών. Κλίμακα 5μm.

Λέξεις-Κλειδιά: πρωτεΐνη, βρόμο-επικράτεια, ιοειδές, PSTVd

Τριμελής Επιτροπή  
Κ. Καλαντίδης, επιβλέπων αναπληρωτήςκαθηγητής  
Ε. Τσαγρή, επίκουρος καθηγήτρια, συνεξεταστής  
Κ. Κοτζαμπάσης, καθηγητής, συνεξεταστής

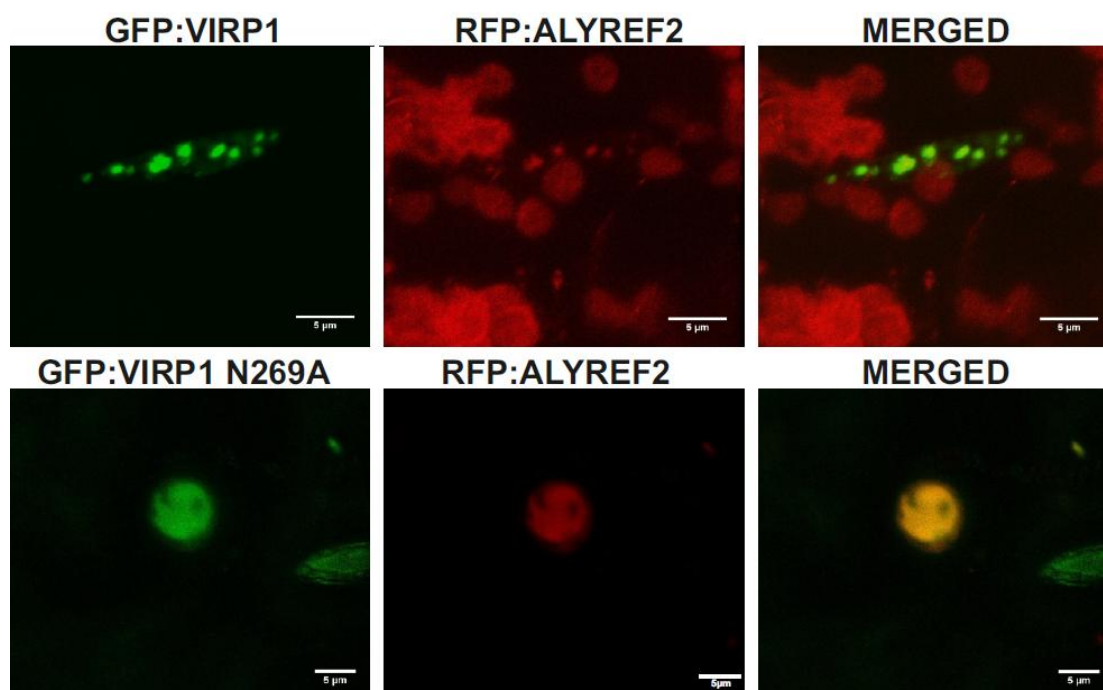
Ηράκλειο 2016

UNIVERSITY OF CRETE  
FACULTY OF SCIENCES  
SCHOOL OF BIOLOGY  
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY

MICHALOPOULOU VASSILIKI

FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE PROTEIN VIRP1

MASTER THESIS



**Figure 3.8.3. Co-localization of VIRP1 with ALYREF2 protein. First row. The wild type VIRP1 co-localizes perfectly with ALYREF2. Second row. The mutated N269Y GFP: VIRP1 co-localizes perfectly with ALYREF2.** The pictures are taken with confocal microscopy (SP1 CLSM, Leica). **Left.** Fluorescence of GFP (emission t 510-530 nm). **Middle.** Fluorescence of RFP (emission at 570-600 nm). **Right.** Merged picture. Bars: 5µm.

Keywords: protein, bromo-domain, viroid, PSTVd

Three-member Committee  
SUPERVISOR: Prof. K. Kalantidis  
CO-EXAMINER: Prof. E. Tsagris  
CO-EXAMINER: Prof. K. Kotzabasis

HERAKLION 2016

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, από τον Οκτώβριο του έτους 2014 έως το Δεκέμβριο του έτους 2015.

Θα ήθελα από τη θέση αυτή να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή Κρίτωνα Καλαντίδη για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την καθοδήγηση και στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Ακόμη, ένα ευχαριστώ στην Επίκουρη Καθηγήτρια Ευθυμία Τσαγρή και στον Καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση, που δέχθηκαν να είναι μέλη της τριμελούς μου επιτροπής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη του θέματος, διδάκτορα Κωνσταντίνα Κατσαρού, για την επίβλεψη και τη βοήθειά της και όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαίτερα τον Ιωάννη Βλατάκη, υποψήφιο διδάκτορα για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε μέχρι και το τέλος της διεξαγωγής της μεταπτυχιακής εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου, τη γιαγιά μου και τον παππού μου που με στήριξαν ψυχολογικά και οικονομικά σε αυτή την προσπάθεια.

Ηράκλειο, Ιανουάριος 2016

Μιχαλοπούλου Βασιλική

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή .....	3
1.1 Βρόμο-επικράτειες .....	3
1.1.1 Αναστολείς των βρόμο-επικρατειών. ....	6
1.2 Ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας ( <i>Potato spindle tuber viroid</i> , PSTVd).....	9
1.2.1 Πρωτεΐνες του ξενιστή που αλληλεπιδρούν με τα ιοειδή.....	11
1.3 Η VIRP1 πρωτεΐνη.....	11
1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	15
2. Υλικά και Μέθοδοι .....	16
2.1 Φυτικό υλικό.....	16
2.2 Μέθοδοι .....	16
2.2.1 Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων. ....	16
2.2.2 Δημιουργία κατασκευών των βρόμο-μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη SIVIRP1 και του amiRNA. ....	16
2.2.3 Δημιουργία των κατασκευών VIRP1-BiFC .....	17
2.2.4 Δημιουργία των κατασκευών VIRP1-CRISPR .....	18
2.2.5 Αγροεμποτισμός των C58C1 αγροβακτηρίων σε φυτά <i>Nicotiana benthamiana</i> . ....	18
2.2.6 Παρατήρηση στο μικροσκόπιο. ....	19
2.2.7 Εκχύλιση γενωμικού DNA (gDNA). ....	19
2.2.8 Εκχύλιση RNA μεγάλου μοριακού βάρους.....	19
2.2.9 Εκχύλιση πρωτεϊνών.....	19
2.2.10 Ανάλυση τύπου western των απομονωμένων πρωτεϊνών. ....	20
2.2.11 Ανάλυση τύπου northern με χρήση ραδιενεργά-σημασμένων ή DIG-σημασμένων αλληλουχιών.....	21
2.2.12 Ανάστροφη μεταγραφή RNA δειγμάτων (cDNA σύνθεση). ....	22
2.2.13 In vitro μεταγραφή του PSTVd RNA.....	22
2.2.14 Επιμόλυνση πρωτοπλαστών BY-2 κυττάρων με το PSTVd, με τη χρήση PEG. ....	23
2.2.15 Μετασηματισμός BY-2 κυττάρων με αγροβακτήρια (δημιουργία διαγονιδιακών κυτταρικών σειρών).....	23
2.2.16 Επίδραση των BY-2 κυττάρων με τους αναστολείς των βρόμο-επικρατειών. ....	23
2.2.17 Μέτρηση βιωσιμότητας των BY-2 κυττάρων, ύστερα από επίδραση με τους αναστολείς. ....	24
2.2.18 Μόλυνση <i>Arabidopsis thaliana</i> φυτών με το ιοειδές PSTVd.....	24
3. Αποτελέσματα.....	25
3.1 Φυλογενετικό δέντρο πρωτεϊνών με βρόμο-επικράτειες .....	25

3.2 Δημιουργία μεταλλάξεων στη βρόμο-επικράτεια της VIRP1. ....	27
3.3 Καταστολή της ενδογενούς πρωτεΐνης VIRP1 του φυτικού είδους <i>Nicotiana benthamiana</i> , με τη χρήση τεχνητού μικρού RNA. ....	30
3.4 Έκφραση των επιπέδων των μεταγράφων των βρόμο-μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης VIRP1. ...	34
3.5 Έκφραση των επιπέδων πρωτεΐνης της αγρίου τύπου και των βρόμο-μεταλλαγμάτων της VIRP1. ....	35
3.6 Μελέτη του πυρηνικού εντοπισμού της VIRP1 κατά τη συν-έκφραση του amiRNA. ....	36
3.7 Εντοπισμός της VIRP1 σε σταθερή έκφραση σε BY-2 κυτταρικές σειρές. ....	37
3.8 Συν-εντοπισμός της VIRP1 με πρωτεΐνες-δείκτες σε υπο-πυρηνικούς τόπους. ....	39
3.9 Δημιουργία κατασκευών για να διευκρινιστεί εάν η VIRP1 λειτουργεί ως μονομερές ή διμερές σύμπλοκο; .....	42
3.10 Λειτουργία των βρόμο-επικρατειών .....	43
3.11 Τα βρόμο-μεταλλάγματα της VIRP1 επηρεάζουν τη μόλυνση με το ιοειδές ή/και η μόλυνση επηρεάζει τον εντοπισμό της πρωτεΐνης; .....	45
3.12 Άλλα συστήματα μελέτης της πρωτεΐνης .....	48
3.12.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	48
3.12.2 CRISPR. ....	49
4. Συζήτηση .....	51
4.1 Φυλογενετική κατάταξη της VIRP1. ....	51
4.2 Μείωση της ενδογενής VIRP1 με τη χρήση του amiRNA. ....	51
4.3 Έκφραση της VIRP1 σε μεταγραφικό και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. ....	52
4.4 Η VIRP1 εντοπίζεται στα κεντρομερή κατά τη μίτωση και στις πυρηνικές κηλίδες των φυτικών κυττάρων. ....	53
4.5 Οι αναστολείς των βρόμο-επικρατειών JQ-1 και PFI-1 δεν επηρεάζουν τη λειτουργία της βρόμο-επικράτειας της VIRP1. ....	53
4.6 Η μόλυνση με το PSTVd φαίνεται να επηρεάζει τον πυρηνικό φαινότυπο της VIRP1. ....	54
4.7 Μολύνονται οι Flag:NbVIRP1 <i>Arabidopsis thaliana</i> με το PSTVd; .....	54
Περίληψη .....	56
Summary .....	57
Βιβλιογραφία .....	58
Ξενόγλωσση βιβλιογραφία .....	58
Ελληνόγλωσση βιβλιογραφία .....	62
Ηλεκτρονικές πηγές .....	62

# 1. Εισαγωγή

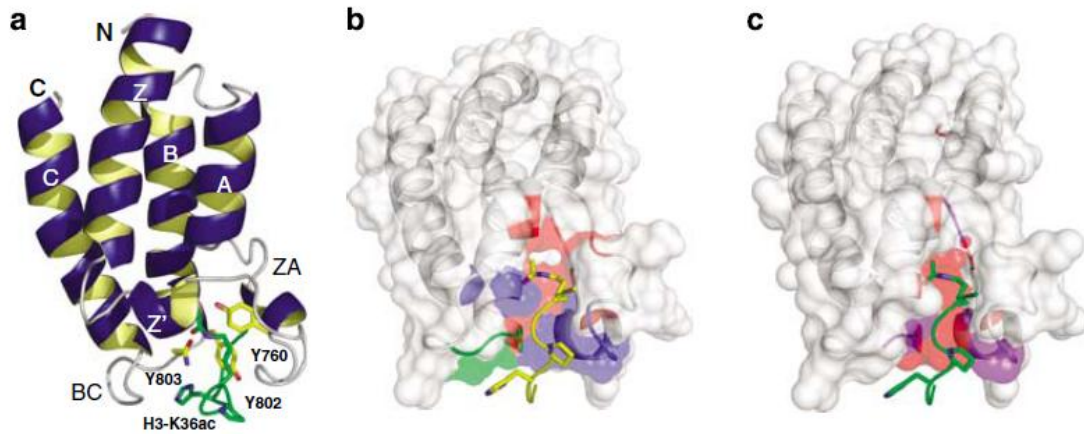
## 1.1 Βρόμο-επικράτειες

Οι βρόμο-επικράτειες (BromoDomains, BDs) είναι δομές με περίπου 110 αμινοξέα που εδράζονται σε πολλές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη χρωματίνη (Haynes *et al.*, 1992; Jeanmougin *et al.*, 1997; Brownell *et al.*, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996; Bannister and Kouzarides, 1996). Ο όρος “BD” προέρχεται από το όνομα μίας ρυθμιστικής πρωτεΐνης της *Drosophila melanogaster*, brahma. Αρχικά, ανακαλύφθηκαν ως ένα συστατικό των πρωτεϊνών που προσδένονται σε ιστόνες, αλλά τώρα γνωρίζουμε ότι, οι βρόμο-επικράτειες είναι συντηρημένα δομικά μοτίβα που αναγνωρίζουν και προσδένονται σε ακετυλιωμένες λυσίνες πρωτεϊνών (Protein Lysine-N<sup>ε</sup> Acetylation, PKA) (Dhalluin *et al.*, 1997; Zeng and Zhou, 2002; Sanchez and Zhou, 2009).

Η τρισδιάστατη δομή μίας βρόμο-επικράτειας πρώτα περιγράφηκε για την επικράτεια της ανθρώπινης πρωτεΐνης p/CAF (p300/CBP associated factor) (Dhalluin *et al.*, 1999) και στη συνέχεια περιγράφηκαν οι τρισδιάστατες δομές βρόμο-επικρατειών ιστονών ή άλλων μεταγραφικών πρωτεϊνών, είτε στην ελεύθερη μορφή τους, είτε συνδεδεμένες με πεπτίδια σε ακετυλιωμένες λυσίνες. Σε αυτές περιλαμβάνονται η ανθρώπινη μεταγραφική πρωτεΐνη TAFII250 (Jacobson *et al.*, 2000), η πρωτεΐνη GCN5 από τον άνθρωπο και το *Saccharomyces cerevisiae* (Hudson *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2000), η ανθρώπινη PCAF (Mujtaba *et al.*, 2002), ο ανθρώπινος συν-ενεργοποιητής CBP (CREB-binding protein) (Mujtaba *et al.*, 2004), η πρωτεΐνη BRD2 της ανθρώπινης οικογένειας BET (Bromodomains and Extra-Terminal domain) πρωτεϊνών (Nakamura *et al.*, 2007), ο ανθρώπινος μεταγραφικός παράγοντας BPTF (Bromodomain and PHD domain Transcription Factor) (Li *et al.*, 2006) και η ανθρώπινη πρωτεΐνη BRG1 (Brahma-related gene 1) του SWI/SNF συμπλόκου αναδιάταξης (Shen *et al.*, 2007).

Όλες αυτές οι πρωτεΐνες επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι οι βρόμο-επικράτειες υιοθετούν μία συντηρημένη δομική πτυχή μίας αριστερόχειρης δέσμης τεσσάρων ελίκων (aZ, aA, aB, aC), με τους ενδο-ελικοειδείς βρόχους ZA και BC να έχουν μεταβλητό μήκος και αλληλουχία και ότι οι τελευταίοι βρόχοι αποτελούν μία υδρόφοβη τσέπη που χρησιμεύει για τη σταθεροποίηση της δομής, όπως επίσης και για την αλληλεπίδραση με την ακετυλιωμένη λυσίνη πεπτιδίων (εικ. 1.1). Συν-κρυσταλλικές δομές με πεπτιδικά υποστρώματα έδειξαν ότι η ακετυλιωμένη λυσίνη αναγνωρίζεται από μία κεντρική υδροφοβική κοιλότητα και αγκυροβολείται με ένα υδρογονικό δεσμό με ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης (N), που είναι συντηρημένο στις περισσότερες BD-επικράτειες (Owen *et al.*, 2000). Ο δομικά ευέλικτος βρόχος ZA πιθανόν να καθορίζει τη δυναμική φύση της πρόσδεσης σε ακετυλιωμένες λυσίνες.

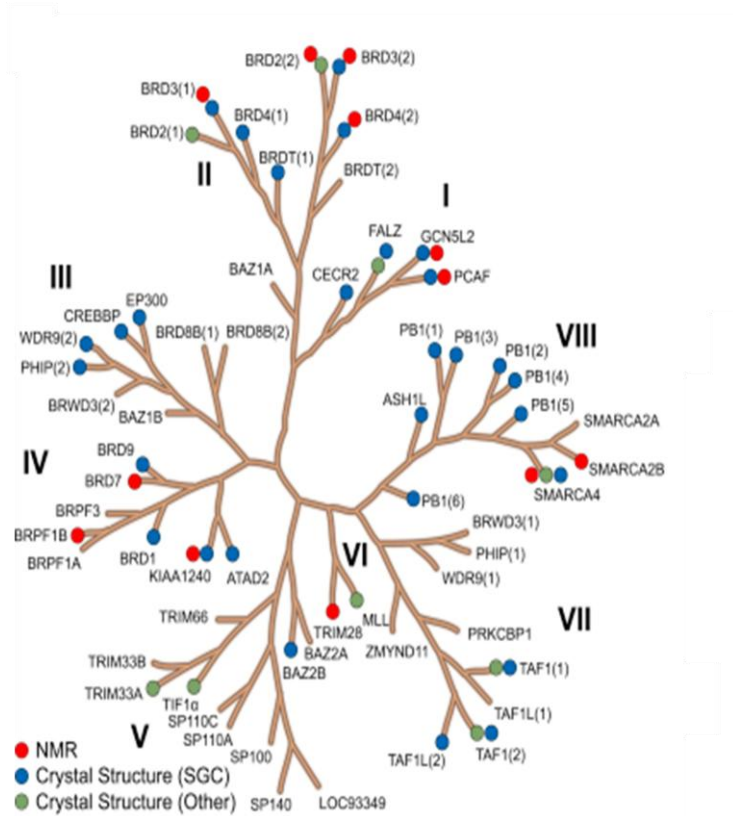
Ιδιαίτερα, τα δομικά χαρακτηριστικά της αναγνώρισης της ακετυλιωμένης λυσίνης από τη βρόμο-επικράτεια είναι σε έντονη αντίθεση με αυτά της πρόσδεσης της μεθυλιωμένης λυσίνης σε χρώμο-επικράτειες, όπου οι αλληλουχίες με μεθυλιωμένες λυσίνες σχηματίζουν ένα αντι-παράλληλο β-κλώνο με τη δομή β-βαρελιού της πρωτεΐνης με τη χρώμο-επικράτεια (Jacobs and Khorasanizadeh, 2002; Nielsen *et al.*, 2002). Η αρθρωτή δομή της βρόμο-επικράτειας με το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο να είναι τοποθετημένα μαζί στην ίδια πλευρά υποστηρίζει την ιδέα ότι οι βρόμο-επικράτειες λειτουργούν ως μία συντηρημένη δομική μονάδα για αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών και ότι παράλληλες ή πολλαπλές μονάδες βρόμο-επικρατειών μπορούν να τοποθετηθούν διαδοχικά σε μία χρωμοσωμική πρωτεΐνη για να εξυπηρετήσει παρόμοιες ή διαφορετικές λειτουργίες (Mujtaba S *et al.*, 2007).



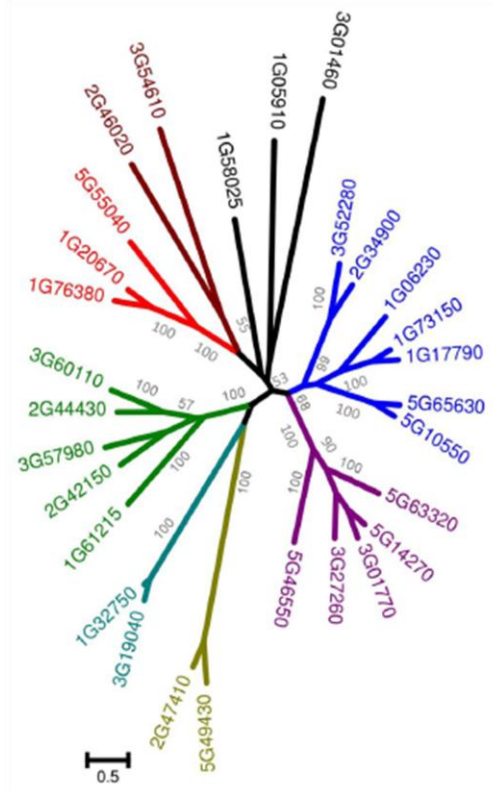
**Εικόνα 1.1. Δομή και αναγνώριση της ακετυλιωμένης λυσίνης της βρόμο-επικράτειας. (a).** Η τρισδιάστατη δομή της βρόμο-επικράτειας της PCAF πρωτεΐνης, που είναι συνδεδεμένη με την ακετυλιωμένη λυσίνη 36 της ιστόνης H3(H3-K36ac). **(b).** Ενοποιητικά χαρακτηριστικά της αναγνώρισης ιστονών σε ειδική θέση από τις βρόμο-επικράτειες, όπως απεικονίζεται από το PCAF/bromo-επικράτεια/H3-K36ac σύμπλοκο πεπτιδίων. Παρατηρούνται με κόκκινο, μπλε και πράσινο χρώμα αντίστοιχα τρεις κύριες θέσεις επαφής προσδετών όπου γίνεται η αναγνώριση της ακετυλιωμένης λυσίνης στα κατάλοιπα (Kac +/-1), και/ή (Kac +/-2) και στα κατάλοιπα (Kac +/-3). **(c).** Η τρισδιάστατη δομή της βρόμο-επικράτειας της PCAF πρωτεΐνης, συνδεδεμένης με το πεπτίδιο H3-K36ac, με πρωτεϊνικά κατάλοιπα χρωματισμένα ανάλογα με το βαθμό της συντήρησης αλληλουχίας στην οικογένεια των βρόμο-επικρατειών: κόκκινο, υψηλά συντηρημένο, μωβ, συντηρημένο και άσπρο, μη συντηρημένο. (Mujtaba S *et al.*, 2007).

Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί για τουλάχιστον 46 πρωτεΐνες με βρόμο-επικράτειες, εκ των οποίων η καθεμία περιέχει μία έως έξι βρόμο-επικράτειες και κατηγοριοποιούνται σε έξι κλάσεις (εικ. 1.2) (Filippakopoulos *et al.*, 2012) και το αντίστοιχο του *Saccharomyces cerevisiae* για εννιά βρόμο-πρωτεΐνες το ελάχιστο (Sanchez and Zhou, 2009). Στο φυτικό είδος *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν 29 βρόμο-πρωτεΐνες, που μπορούν να διαχωριστούν σε διαφορετικές ομάδες (εικ. 1.3). Στα φυτικά είδη, ο αριθμός αυτός μπορεί να ποικίλει σημαντικά, με τις πρωτεΐνες αυτές να περιέχουν μόνο μία βρόμο-επικράτεια, ενώ υπάρχει μόνο μία περίπτωση όπου μία πρωτεΐνη του είδους *Chlamydomonas reinhardtii*, ένα μονοκύτταρο πράσινο μικροφύκος περιέχει τρεις BD-επικράτειες (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER>) (Rao *et al.*, 2014).





Εικόνα 1.2. Φυλογενετικό δένδρο της οικογένειας των ανθρώπινων βρόμο-επικρατειών. Οι διαφορετικές οικογένειες έχουν ονομαστεί με λατινικούς αριθμούς (I-VIII). Οι δομές που έχουν καθοριστεί σε αυτήν την εργασία, μέσω NMR, ή με άλλες μεθόδους υποδεικνύονται με μπλε, κόκκινες και πράσινες κουκίδες αντίστοιχα (Filirrakoroulos *et al.*, 2012).



**Εικόνα 1.3. Φυλογενετική ανάλυση των BD-πρωτεϊνών του είδους *Arabidopsis thaliana*.** Οι διακριτές ομάδες (με περισσότερο από 50% τιμή bootstrap) χρωματίζονται διαφορετικά στο δένδρο. Οι αλληλουχίες στοιγήθηκαν με το πρόγραμμα MUSCLE και το δένδρο κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μεγαλύτερης πιθανότητας με 1000 bootstraps, με το MEGA5. Η κλίμακα υποδεικνύει τον αριθμό των υποκαταστάσεων ανά θέση (Rao *et al.*, 2014).

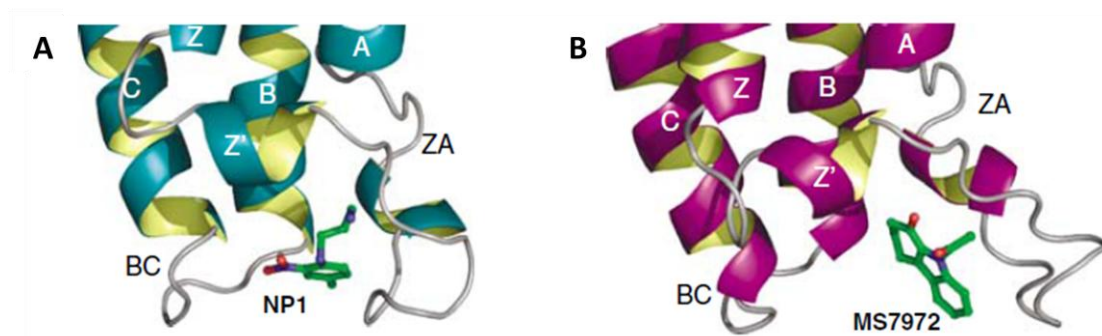
Μία ειδική ομάδα πρωτεϊνών με βρόμο-επικράτειες είναι η BET (Bromodomain and Extra Terminal domain) οικογένεια, που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μίας ( στα φυτά) ή δύο (σε ζώα/μύκητες) αμινοτελικές βρόμο-επικράτειες και μία φτωχά χαρακτηρισμένη εξω-τερματική επικράτεια (Extra-Terminal domain, ET). Η τελευταία έχει υποθεθεί ότι λειτουργεί ως μοτίβο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η ET-επικράτεια περιέχει τρεις διαφορετικές περιοχές: μια συντηρημένη NET επικράτεια (N-terminal ET), μία ενδιάμεση αλληλουχία και ένα καρβοξυτελικό μοτίβο, που ονομάζεται SEED και που συνήθως απουσιάζει από τα φυτικά είδη (Theofel *et al.*, 2014). Κύρια μέλη της οικογένειας αυτής είναι οι ανθρώπινες BRD2, BRD3, BRD4 και BRDT πρωτεΐνες (Zeng and Zhou, 2002).

Έτσι, μετά την ενσωμάτωση των BET πρωτεϊνών με την ακετυλιωμένη χρωματίνη, μέσω της βρόμο-επικράτειας, η ET-επικράτεια μπορεί να λειτουργεί ως διαμεσολαβητής για τον εντοπισμό διαφόρων συμπλόκων ή πρωτεϊνών με τη χρωματίνη. Οι BET πρωτεΐνες συνδέονται με τη χρωματίνη και με το βασικό μεταγραφικό μηχανισμό με σκοπό να ρυθμίσουν τη δομή της χρωματίνης και να επηρεάσουν τη μεταγραφή με ένα ανεξάρτητο από την αλληλουχία τρόπο (Florence and Faller, 2001; Florence and Faller, 2008). Στα θηλαστικά, η πρωτεΐνη BRD2 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση γονιδίων, για παράδειγμα μέσω πρόσδεσης και στρατολόγησης της πρωτεΐνης TBP στο κουτί TATA (TATA box binding protein, TBP) (Peng *et al.*, 2007). Επίσης, η ET-επικράτεια της πρωτεΐνης BRD4 ρυθμίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα μέσω πχ στρατολόγησης συγκεκριμένων παραγόντων στη χρωματίνη (Rahman *et al.*, 2011). Στη *Drosophila*, οι μέχρι σήμερα γνωστές BET πρωτεΐνες είναι η fs(1)h [female sterile (1) homeotic], που κωδικοποιεί για ένα πολυπαραγοντικό μεταγραφικό ρυθμιστή απαραίτητο στην εγκαθίδρυση και διατήρηση της κυτταρικής μοίρας (Kockmann *et al.*, 2013) και οι t-BRD-2 και t-BRD-3 που αλληλεπιδρούν με την t-BRD-1 πρωτεΐνη η οποία ελέγχει ελεγχόμενα τη γονιδιακή δραστηριότητα (Theofel *et al.*, 2014). Οι δύο τελευταίες πρωτεΐνες παρομοιάζουν τις φυτικές BET πρωτεΐνες, καθώς περιέχουν μόνο μία βρόμο-επικράτεια στο αμινοτελικό τους άκρο.

### 1.1.1 Αναστολείς των βρόμο-επικρατειών.

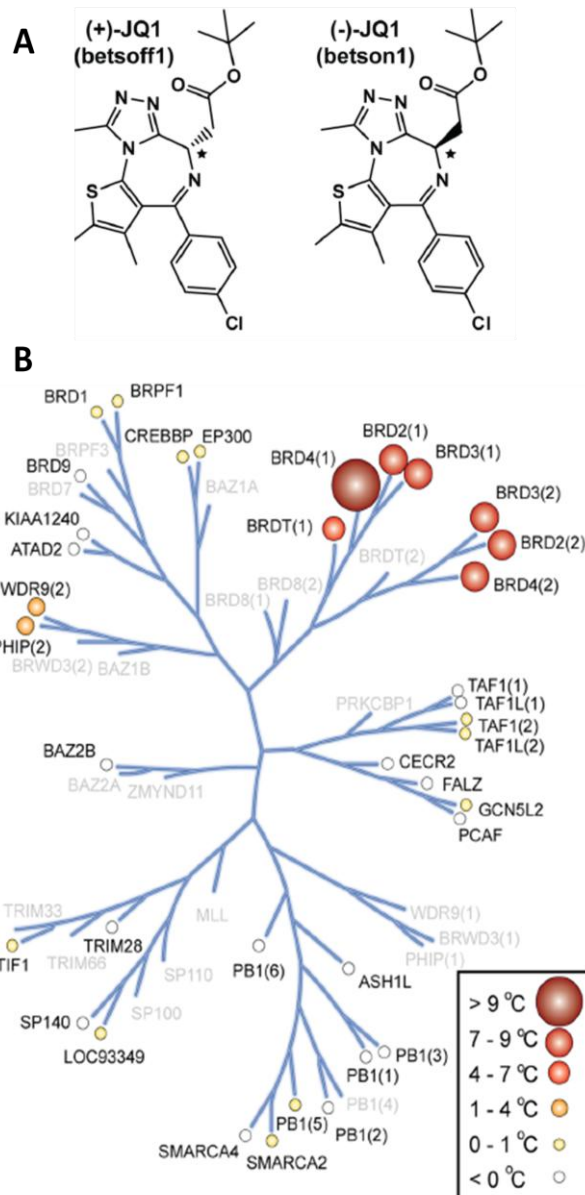
Η θέση πρόσδεσης της ακετυλιωμένης λυσίνης σε μία βρόμο-επικράτεια περιέχει μία προσηματισμένη δομική κοιλότητα μεταξύ των ZA και BC βρόχων, καθιστώντας την κατάλληλη για την πρόσδεση μικρών μορίων που μπλοκάρουν τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης με πρωτεΐνη. Χρησιμοποιώντας τις καθοδηγούμενες μεθόδους δομών, έχουν αναπτυχθεί μικρά χημικά μόρια-προσδέτες που φαίνεται να είναι ικανοί να μπλοκάρουν επιλεκτικά την BD-επικράτεια της πρωτεΐνης PCAF συνδεδεμένοι στον HIV-1 Tat στην ακετυλιωμένη λυσίνη 50 (Zheng *et al.*, 2005) ή στην BD-επικράτεια της πρωτεΐνης CBP συνδεδεμένοι στον ανθρώπινο νεοπλασματικό καταστολέα p53 στην ακετυλιωμένη λυσίνη 382 (Sachchidanand *et al.*, 2006). Η δομική ανάλυση αποκάλυψε ότι οι ειδικές ενώσεις NPI (N1-4-methyl-2-nitro-phenyl-propane-1,3-diamine) και MS7972 (9-acetyl-2,3,4,9-tetrahydro-carbazol-1-1) που αναστέλλουν αντίστοιχα τις PCAF και CBP πρωτεΐνες βρίσκονται στην είσοδο του θύλακα σύνδεσης της ακετυλιωμένης λυσίνης, αλληλεπιδρώντας με τα κατάλοιπα αμινοξέων στο βρόχο ZA της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Με τον τρόπο αυτό, αναστέλλουν την αλληλεπίδραση της BD-επικράτειας με τη βιολογική πρωτεΐνη-στόχο. Καθώς πολλά από τα κατάλοιπα

αμινοξέων στο βρόχο ZA που αλληλεπιδρούν με τις ενώσεις αυτές είναι μοναδικά στην BD-επικράτεια της PCAF ή της CBP αυτοί οι χημικοί προσδέτες είναι επιλεκτικοί (Mujtaba *et al.*, 2007).



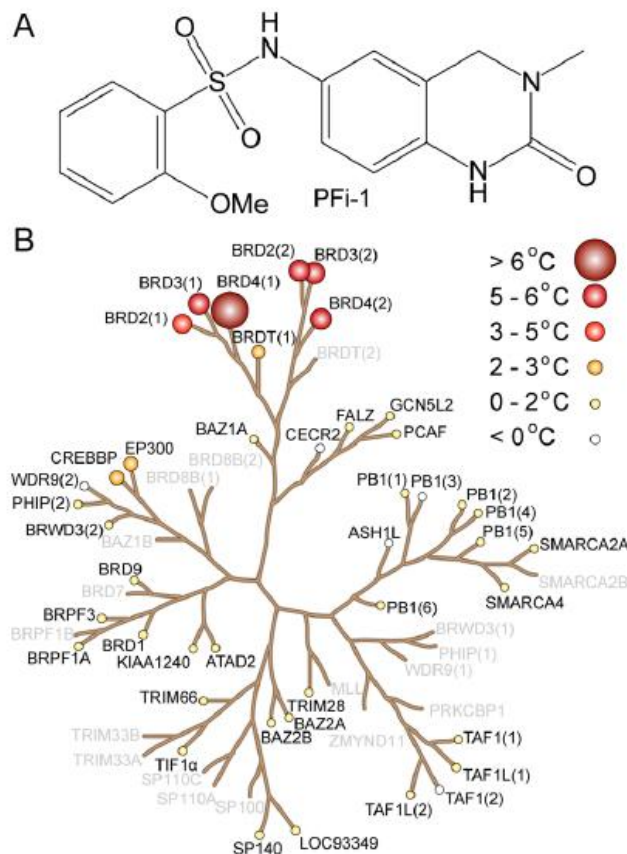
**Εικόνα 1.4.** Μικρά μόρια που ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις της bromo-επικράτειας με την ακετυλιωμένη λυσίνη πεπτιδίων. Το χημικό μόριο NP1 αναστέλλει επιλεκτικά την bromo-επικράτεια της πρωτεΐνης PCAF (A), ενώ αντίστοιχα το MS7972 της CBP (B). (Mujtaba *et al.*, 2007).

Τα μικρά μόρια αναστολείς των αλληλεπιδράσεων των bromo-επικρατειών υπόσχονται ως χρήσιμα θεραπευτικά ανθρώπινων ασθενειών (Filippakopoulos *et al.*, 2011; Hewings *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2011). Επιπλέον, σε εργασία των Filippakopoulos P. και συνεργατών (2010) αναπτύχθηκαν βιοχημικές πλατφόρμες για την ταυτοποίηση νέων αναστολέων bromo-επικρατειών. Έτσι, συνάγοντας σχέσεις δομής-δραστηριότητας που προέρχονται επίσης από τη μοριακή μοντελοποίηση υποψηφίων προσδετών εντός του θύλακα σύνδεσης της κρυσταλλικής δομής της πρώτης BD-επικράτειας της πρωτεΐνης BRD4, κατασκευάσανε ένα πρωτότυπο συνδέτη, το JQ1 (εικ. 1.5). Ο JQ1 αναστολέας είναι ένας κυτταρό-διαπερατός προσδέτης που προσδέεται ανταγωνιστικά σε BD-επικράτειες και συγκεκριμένα με την ανθρώπινη BRD4. Η πρωτεΐνη αυτή έχει παρατηρηθεί σε ένα γενετικά καθορισμένο, ανίατο υπο-τύπο ανθρώπινου πλακώδους καρκινώματος. Ανταγωνιστική πρόσδεση του JQ1 εκτοπίζει τη συγχώνευση της ογκοπρωτεΐνης από τη χρωματίνη, προκαλώντας αντι-πολλαπλασιαστικά αποτελέσματα σε BRD4-εξαρτώμενες κυτταρικές σειρές και σε μοντέλα ξеноμοσχέματος που προέρχονται από ασθενείς.



**Εικόνα 1.5. Δομή και επιλεκτικότητα του JQ1 αναστολέα.** **A.** Δομή των δύο στερεο-ισομερών. Το στερεοκέντρο στον έκτο άνθρακα (C6) υποδεικνύεται με αστερίσκο (\*). **B.** Αξιολόγηση της επιλεκτικότητας του αναστολέα, χρησιμοποιώντας διαφορική σάρωση φθορομετρίας (Differential Scanning Fluorimetry, DSF). Παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μεταβολών της θερμοκρασίας ( $\Delta T_m^{obs}$ ) σε βαθμούς κελσίου ( $^{\circ}C$ ) κατά την πρόσδεση με 10 $\mu$ M (+)-JQ1. Οι αλλαγές της θερμοκρασίας αντιπροσωπεύονται από σφαίρες, όπως αναφέρεται στη λεζάντα. Οι πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν έχουν επισημανθεί και οι πρωτεΐνες που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα εκλεκτικότητας φαίνονται με γκρι. Το (-) JQ1 δεν αποκάλυψε καμία σημαντική μετατόπιση στη θερμοκρασία σε οποιαδήποτε από τις BD-επικράτειες που ελέγχθηκαν (Filirrakopoulos *et al.*, 2010).

Επίσης, παρόμοια με τον JQ1, ο PFI-1 είναι ένας αναστολέας των BET βρόμο-επικρατειών που επιδεικνύει ανασταλτική δραστηριότητα στις πρωτεΐνες BRD2 και BRD4 (εικ. 1.6). Συν-κρυσταλλικές δομές έδειξαν ότι ο PFI-1 δρα ως μιμητής αναστολέας των ακετυλιωμένων λυσινών (Kac), καταλαμβάνοντας αποτελεσματικά τη θέση δέσμευσης Kac των πρωτεϊνών BRD2 και BRD4. Έτσι, έχει αντι-πολλαπλασιαστικά αποτελέσματα σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές και καταργεί αποτελεσματικά την ανάπτυξη κλώνων. Η έκθεση των ευαίσθητων κυτταρικών σειρών στον αναστολέα αυτό διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1, μειώνει την έκφραση του MYC γονιδίου, όπως επίσης και την επαγωγή της απόπτωσης, ενώ επάγει και τη διαφοροποίηση των πρωτογενών λευχαιμικών βλαστών (Pikaud *et al.*, 2013).



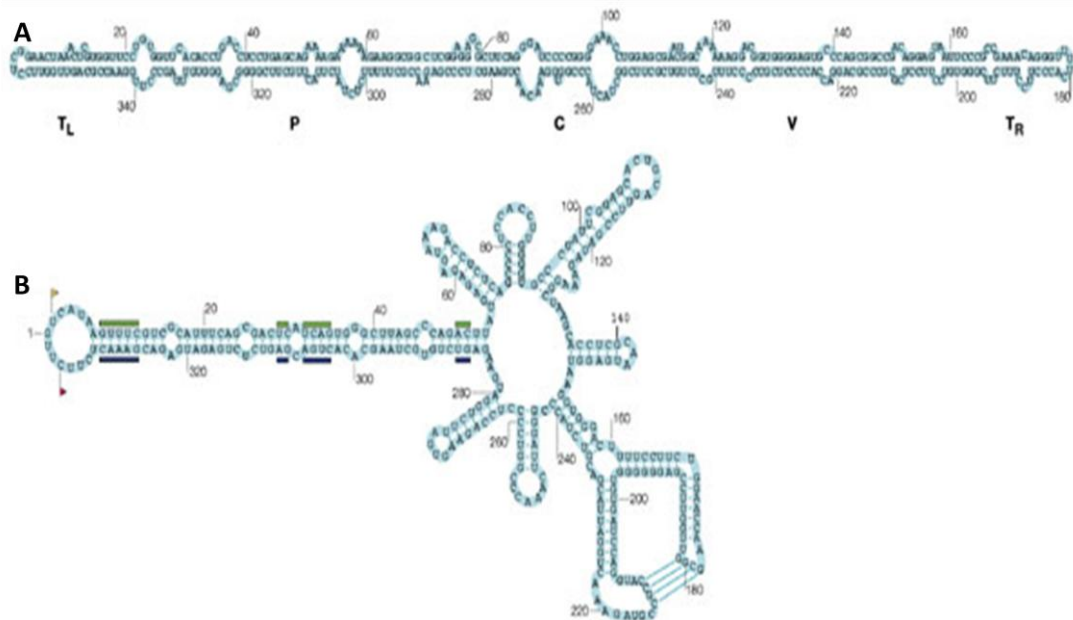
**Εικόνα 1.6. Δομή και εκλεκτικότητα του PFI-1. Α.** Χημική δομή του PFI-1. **Β.** Δεδομένα ελέγχου της επιλεκτικότητας του PFI-1, χρησιμοποιώντας δοκιμασίες μετατόπισης θερμοκρασίας. Οι ελεγμένοι στόχοι είναι επισημασμένοι με έντονα γράμματα. Οι μετατοπίσεις στη θερμοκρασία υποδεικνύονται με κόκκινο γεμισμένο κύκλο, με αυξανόμενη ακτίνα για μεγαλύτερες τιμές Tm, όπως φαίνεται και στο σχήμα (Pikaud *et al.*, 2013).

## 1.2 Ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd).

Τα ιοειδή είναι οι μικρότεροι γνωστοί μολυσματικοί παράγοντες. Το γονιδίωμά τους αποτελείται από ένα κυκλικό, μονόκλωνο ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA) 206- 401 νουκλεοτιδίων. Παρόλο που δεν κωδικοποιούν για καμία πρωτεΐνη, προκαλούν ασθένειες σε πολλά είδη φυτών (Flores *et al.*, 2005a). Με βάση βιοχημικές, βιολογικές και δομικές ιδιότητες, τα ιοειδή έχουν ομαδοποιηθεί σε δύο οικογένειες, τις *Pospiviroidae* και *Avsunviroidae*, οι οποίες περιλαμβάνουν είδη ιοειδών που αντιγράφονται στον πυρήνα και στο χλωροπλάστη, αντίστοιχα (Flores *et al.*, 2005b). Η αντιγραφή και των δύο ομάδων των ιοειδών προχωράει μέσω ενδιάμεσων RNA συμπληρωματικής πολικότητας (+/-). Έτσι, όλες οι γενετικές λειτουργίες του αντιγράφου του ιοειδούς, όπως η εισαγωγή στα κύτταρα και η κυκλοφορία, η αναπαραγωγή, η εξειδίκευση του ξενιστή και η παθογένεια, πρέπει να κωδικοποιούνται στην αλληλουχία του RNA και η προκύπτουσα δευτερεύουσα δομή πιστεύεται ότι παρέχει ειδικά σήματα για πρωτεϊνικούς παράγοντες του ξενιστή. Η προβλεπόμενη δευτερεύουσα δομή των περισσότερων ιοειδών είναι μία ραβδοειδή δομή με πέντε δομικές επικράτειες και μία ασυνήθιστα υψηλή περιεκτικότητα σε βάσεις γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C) (Keese and Symons, 1985) (εικ. 1.7). Παρά το απλό γονιδίωμα των ιοειδών και την εκτεταμένη γνώση της δομής και των επικρατειών τους, λίγα είναι γνωστά για τους παράγοντες του ξενιστή που αλληλεπιδρούν με αυτά τα διαρθρωτικά στοιχεία.

Το ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd), που ανήκει στην οικογένεια *Pospiviroidae*, έχει ιδιαίτερη ιστορική σημασία διότι ήταν το πρώτο ιοειδές που ταυτοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε όταν η αιτιολογία της ασθένειας ατράκτωσης των κονδύλων διερευνάτο (Diener, 2001) (εικ.1.8). Παρά το στενό φάσμα των φυσικών ξενιστών, που εκτός από την

πατάτα περιλαμβάνονται και η ντομάτα (Puchta *et al.*, 1990; Elliot *et al.*, 2001; Verhoeven *et al.*, 2004), το αβοκάντο (Querci *et al.*, 1995) και το πεπόνι-πεπίνο (perino melon) (Shamloul *et al.*, 1997), το ιοειδές έχει μεταδοθεί πειραματικά σε ένα ευρύ φάσμα ξενιστών, σε τουλάχιστον 156 είδη σε 12 οικογένειες (Diener, 1979). Το PSTVd αντιγράφεται στον πυρήνα και συσσωρεύεται τελικά στον πυρηνίσκο, ως ένα κυκλικό μονόκλωνο μόριο, το οποίο ορίζεται ως θετικής πολικότητας μόριο (+strand PSTVd) (Sanger, 1987).



Nature Reviews | Microbiology

**Εικόνα 1.7.** Απεικόνιση της ραβδοειδούς δομής του ιοειδούς PSTVd. Α. Η πιο σταθερή θερμοδυναμικά δευτερογενή δομή του PSTVd. Παρατηρούνται οι πέντε δομικές/ λειτουργικές επικράτειες του ιοειδούς: T<sub>L</sub>, αριστερή ακραία επικράτεια, P, επικράτεια παθογένειας, C, κεντρική συντηρημένη περιοχή, V, μεταβλητή επικράτεια και T<sub>R</sub>, ακραία δεξιά επικράτεια (Diener, 2003).



**Εικόνα 1.8.** Συμπτώματα της ασθένειας ατράκτων των κονδύλων με βαθιούς οφθαλμούς. Ποικιλία Russet Burbank (η δεξιά πατάτα είναι υγιής). (Barnett and Sherwood, 2009).

Η αναστολή της αντιγραφής του ιοειδούς με  $\alpha$ -αμανιτίνη υποδεικνύει ότι τα θετικής και αρνητικής πολικότητας μόρια RNA του ιοειδούς πιθανόν συντίθενται από τη DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση II (PolII) (Rackwitz *et al.*, 1981; Schindler and Muhlbach, 1992). Αυτό το ένζυμο μπορεί ακόμα να δεχθεί ως εκμαγείο το RNA του ιοειδούς και να το “μεταγράψει” *in vitro*, αρχίζοντας τη σύνθεση από συγκεκριμένα σημεία του κυκλικού θετικής πολικότητας μορίου RNA του PSTVd (Tablet and Tsagris, 1990; Fels *et al.*, 2001). Επιπλέον, η αντιγραφή του λαμβάνει χώρα μέσω ενός κυλιόμενου μηχανισμού-κυκλικού τύπου, σε ένα ασύμμετρο μονοπάτι όπου τα θετικής πολικότητας μόρια RNA μεταγράφονται σε γραμμικά πολυμερικά αρνητικής πολικότητας μόρια, τα οποία τότε ενεργούν ως εκμαγεία για τη δημιουργία των γραμμικών θετικής πολικότητας πολυμερικών μορίων (Daros *et al.*, 1994; Branch *et al.*, 1988).

Το RNA μόριο του ιοειδούς βρίσκεται στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων, αν και μορφές αντιγράφων του βρίσκονται και στο φλοιώμα. Επίσης, το ιοειδές εισβάλλει στα κορυφαία φύλλα του φυτού-ξενιστή, αλλά όχι στα φύλλα της βάσης και περιορίζεται στον αγγειακό ιστό των φύλλων μετάβασης κορυφής-βάσης (Zhu *et al.*, 2001). Ακόμη, δεν εντοπίζεται σε μερικά ανθικά όργανα, όπως ανθήρες και ωοθήκες.

### 1.2.1 Πρωτεΐνες του ξενιστή που αλληλεπιδρούν με τα ιοειδή.

Ορισμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα ιοειδούς-ξενιστή έχουν περιγραφεί, ωστόσο όμως η σημασία ή η λειτουργία των περισσότερων από αυτά για τον βιολογικό κύκλο και την παθογένεια του ιοειδούς δεν είναι ακόμα γνωστή. Το ιοειδές έχει δειχθεί ότι χρησιμοποιεί την DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση II για τη σύνθεση των θετικής και αρνητικής πολικότητας κλώνων της (Rackwitz *et al.*, 1981; Schindler and Muhlbach, 1992), όπως επίσης και την DNA λιγάση I για την κυκλοποίηση του μορίου της και ανακατευθύνει αυτά τα ένζυμα να λειτουργούν σε εκμαγεία RNA και υποστρώματα, αντίστοιχα (Nohales *et al.*, 2012).

Σε μία εργασία των Hiddinga και συνεργατών (1988), περιγράφηκε μία πρωτεΐνη του ξενιστή μεγέθους 68 kDa που πιθανόν αλληλεπιδρά με τα ιοειδή και της οποίας η φωσφορυλίωση εξαρτάται από την παρουσία του PSTVd. Το 2002, δύο χλωροπλαστικές πρωτεΐνες του αβοκάντο βρέθηκαν ότι αλληλεπιδρούν με το ιοειδές του ηλιοεγκαύματος του αβοκάντο (*Avocado sun blotch viroid*, ASBV) και μία από αυτές εμπλέκεται στην ωρίμανση του ιοειδούς (Daros and Flores, 2002).

Δύο ερευνητικές ομάδες απέδειξαν ανεξάρτητα την αλληλεπίδραση μεταξύ του ιοειδούς του νανισμού του λυκίσκου (*Hop stunt viroid*, HSVd) και μίας πρωτεΐνης του φλοιώματος, την PP2, μία άφθονη λεκτίνη που υπάρχει στα εκκρίματα του φλοιώματος (Gomez and Pallas, 2001; Owens *et al.*, 2001). Προτάθηκε ότι αυτή η πρωτεΐνη, αν και δεν εμφανίζει ειδική αλληλουχία πρόσδεσης στο RNA, μπορεί να εμπλέκεται στη μεταφορά των ιοειδών και ενδεχομένως άλλων RNAs.

Σε μία διαδικασία διαλογής πρωτεϊνών που προσδένονται σε RNA, απομονώθηκε μία πρωτεΐνη της ντομάτας που προσδένεται στο PSTVd και αλληλεπιδρά ειδικά μαζί του (Martinez de Alba *et al.*, 2003).

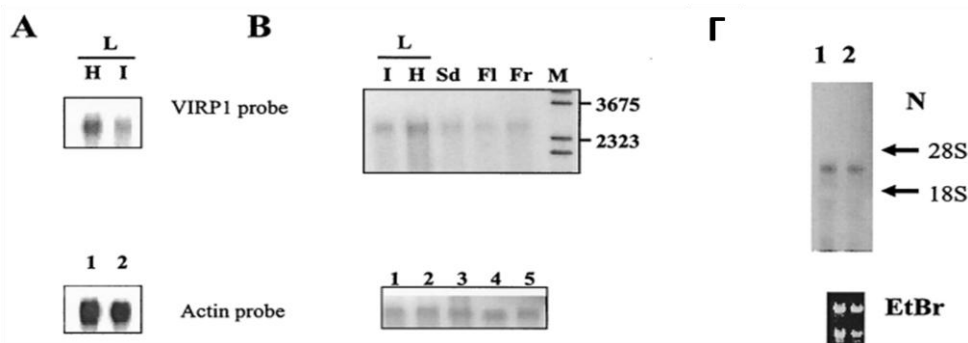
### 1.3 Η VIRP1 πρωτεΐνη

Η κωδικοποιούσα πρωτεΐνη της ντομάτας (*Solanum lycopersicum* Viroid Containing Protein 1, Sl VIRP1), που ανακαλύφθηκε, αποτελείται από 602 αμινοξέα και έχει μέγεθος 65,586 kDa. Η VIRP1 περιέχει ορισμένες λειτουργικές επικράτειες, όπως φαίνεται στον πίνακα 1.1 (Martinez de Alba, 2000). Η πρωτεΐνη περιέχει επίσης μία βρόμο-επικράτεια (bromodomain, BD), μεγέθους 80 αμινοξέων, πλούσια σε αρωματικά αμινοξέα. Σε ολόκληρη την αλληλουχία της δεν παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα με τις άλλες BD-πρωτεΐνες των θηλαστικών BRM (Tamkun *et al.*, 1992), FSH (Haynes *et al.*, 1989), RING3 (Beck *et al.*, 1992) και SNF2 (Laurent *et al.*, 1992), αλλά σε κάθε περίπτωση η

ομοιότητα περιορίζεται στην βρόμο-επικράτεια (Martinez de Alba *et al.*, 2003). Η πρωτεΐνη εκφράζεται σε διάφορους ιστούς, όπως στα άνθη (πέταλα και σέπαλα, εικ.1.9Γ), στα φρούτα, στους σπόρους και στα φύλλα (εικ. 1.9B), ενώ σε μόλυνση με το ιοειδές η έκφραση του μεταγράφου μειώνεται στο μισό σε σχέση με τα υγιή φυτά (εικ. 1.9A) (Martinez de Alba *et al.*, 2003).

**Πίνακας 1.1 Λειτουργικές επικράτειες της πρωτεΐνης VIRP1 της ντομάτας (Martinez de Alba. 2000).**

<b>Επικράτειες</b>	<b>Θέση</b>
Πλούσια σε αμινοξέα προλίνης	322-404
Πλούσια σε αμινοξέα σερίνης	566-595
Πιθανές θέσεις αμιδίωσης	302-305
Θέσεις φωσφορυλίωσης	146,156 (cAMP- και cGMP-εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες) 8,68,85,159,250,461,503,511,581,583,591,593 (Κινάσες κασεΐνης II) 145,159,238,339,479 (Πρωτεϊνική κινάση C) 79 (Κινάση τυροσίνης)
Θέσεις N-μυριστοϋλίωσης	18,19,22,89,93,132,176,179,237,315,561,562,563,564,565,578
Θέσεις N-γλυκοσυλίωσης	10,337,347,516
Θέση πρόσδεσης ATP/GTP	21-28
Διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού	328-345



**Εικόνα 1.9.** Έκφραση κατά τη μόλυνση και σε διάφορους ιστούς του μεταγράφου της πρωτεΐνης VIRP1 στην ντομάτα. Τα μετάγραφα RNA απομονώθηκαν από 100μg ολικού RNA και διαχωρίστηκαν κατά μέγεθος σε 1% gel αγαρόζης-φορμαδεΰδης (A, Γ) ή αγαρόζης-θειοκυανίου (B). Το RNA στυπώθηκε και υβριδοποιήθηκε με ένα  $\alpha$ - $^{32}$ P-επισημασμένο RNA, συμπληρωματικό της VIRP1 (0,7kb). **A.** Ανάλυση τύπου Northern των RNAs υγιών (αριστερά) και μολυσμένων με PSTVd (δεξιά) φύλλων. Το ίδιο στύπωμα υβριδοποιήθηκε στη συνέχεια με ραδιενεργά σηματοδοτημένο μετάγραφο ακτίνης, για έλεγχο της φόρτωσης των δειγμάτων (λωρίδες 1 και 2, αντίστοιχα). **B.** Ανάλυση τύπου Northern των RNAs από διάφορους ιστούς. Οι πολύ-(A) ουρές των μεταγράφων από φύλλα [L, μολυσμένα (I) και υγιή (H)], σπόρους (Sd), άνθη (Fl) και καρπούς (Fr) υβριδοποιήθηκαν με συμπληρωματικό RNA της VIRP1. M: DNA δείκτης μοριακού βάρους. **Γ.** Ανάλυση τύπου Northern από ολικό RNA από πέταλα (λωρίδα 1) και σέπαλα (λωρίδα 2) μολυσμένων φυτών, υβριδοποιημένων με DNA της VIRP1. Η ισοφόρτωση επιβεβαιώθηκε από τα 28S και 18S ριβοσωμικά RNAs κατά τη χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (Martinez de Alba *et al.*, 2003).

Η πρωτεΐνη της ντομάτας αλληλεπιδρά και προσδέεται ειδικά με το RNA του PSTVd και μάλιστα με ένα τρόπο που εξαρτάται από την αλληλουχία, όπως αποκαλύφθηκε με τρεις διαφορετικές μεθόδους:



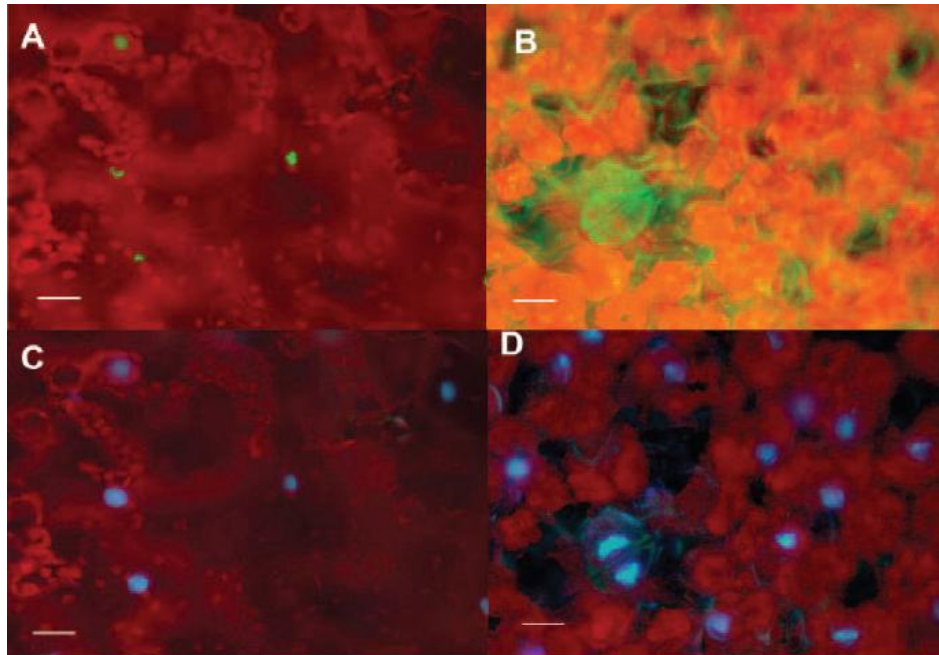
δοκιμασίες ανόρθωσης πλάκας (plaque lift assay), πείραμα τύπου Northwestern και EMSA για το ιοειδές και τη VIRP1Δ (το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης από τα 1091 έως 2403 νουκλεοτίδια, που έχει ακόμα ικανότητα πρόσδεσης στο ιοειδές). Στη συνέχεια, επιβεβαιώθηκε και *in vivo*, με πειράματα συν-κατακρήμνισης (IP) και με το σύστημα υβριδοποίησης τριών RNAs στο *Saccharomyces cerevisiae* (yeast three-hybrid system), ότι το ριβονουκλεϊκό οξύ του ιοειδούς και η πρωτεΐνη της ντομάτας σχηματίζουν ένα σύμπλοκο (Martinez de Alba *et al.*, 2003; Maniataki *et al.*, 2003). Συγκεκριμένα, η ακραία δεξιά επικράτεια στην αλληλουχία του PSTVd είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του ιοειδούς με την VIRP1 και για την αναγνώριση αυτή είναι σημαντικό το μοτίβο AGG/CCUUC (Maniataki *et al.*, 2003).

Στη συνέχεια, σε εργασία των Kalantidis και συνεργατών (2007) βρέθηκαν ορθόλογα γονίδια σε διάφορα είδη της οικογένειας *Solanaceae* (*Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana benthamiana* και *Nicotiana tabacum*), που επιβεβαιώθηκαν με αναλύσεις τύπου Western και τύπου Northern. Ανάλυση των αλληλουχιών φανέρωσε δύο γονίδια στα είδη *Nicotiana tabacum* και *Nicotiana benthamiana* και ένα γονίδιο για τα είδη *Solanum lycopersicum* ποικιλία "Rentita" και *Solanum tuberosum*. Αναλύθηκε η ομοιότητα τόσο σε νουκλεοτιδικό, όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο και παρατίθεται στον πίνακα 1.2.

Όπως και στην περίπτωση της ντομάτας, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης VIRP1 του είδους *Nicotiana benthamiana* και του PSTVd, *in vitro* και *in vivo* (Kalantidis *et al.*, 2007). Επίσης, διαπιστώθηκε ο πυρηνικός εντοπισμός της πρωτεΐνης τόσο σε υγιή, όσο και σε μολυσμένα με το ιοειδές φύλλα (εικ. 1.10). Στην ίδια εργασία, παρατηρήθηκε ότι η υπερ-έκφραση της VIRP1 σε φυτά *Nicotiana tabacum* και *Nicotiana benthamiana* δεν επηρεάζει την μολυσματικότητα του ιοειδούς ή τη συμπτωματολογία των ειδών αυτών, αλλά σε φυτά *N. tabacum* με καταστολή της VIRP1, δεν ανιχνεύεται το ριβονουκλεϊκό οξύ του PSTVd, συμπεραίνοντας ότι το ιοειδές δεν μπορεί να αναπαραχθεί σε αυτά τα φυτά. Το ίδιο επιβεβαιώθηκε και σε πρωτοπλάστες φυτών *N. benthamiana* που υπο-εκφράζουν την πρωτεΐνη.

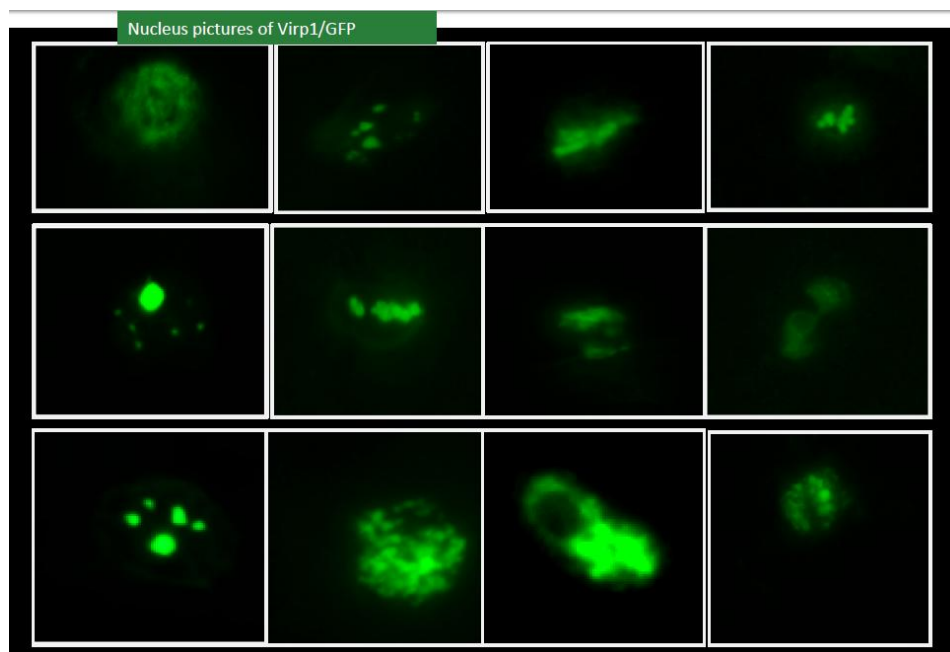
**Πίνακας 1.2.** Ομοιότητα σε νουκλεοτιδικό επίπεδο των ορθόλογων γονιδίων σε διάφορα είδη *Solanaceae* (Kalantidis *et al.*, 2007).

	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Nicotiana tabacum</i>	-			
<i>Nicotiana benthamiana</i>	94-97%	-		
<i>Solanum lycopersicum</i>	87-88%	87-88%	-	
<i>Solanum tuberosum</i>	88-89%	88-89%	96%	-

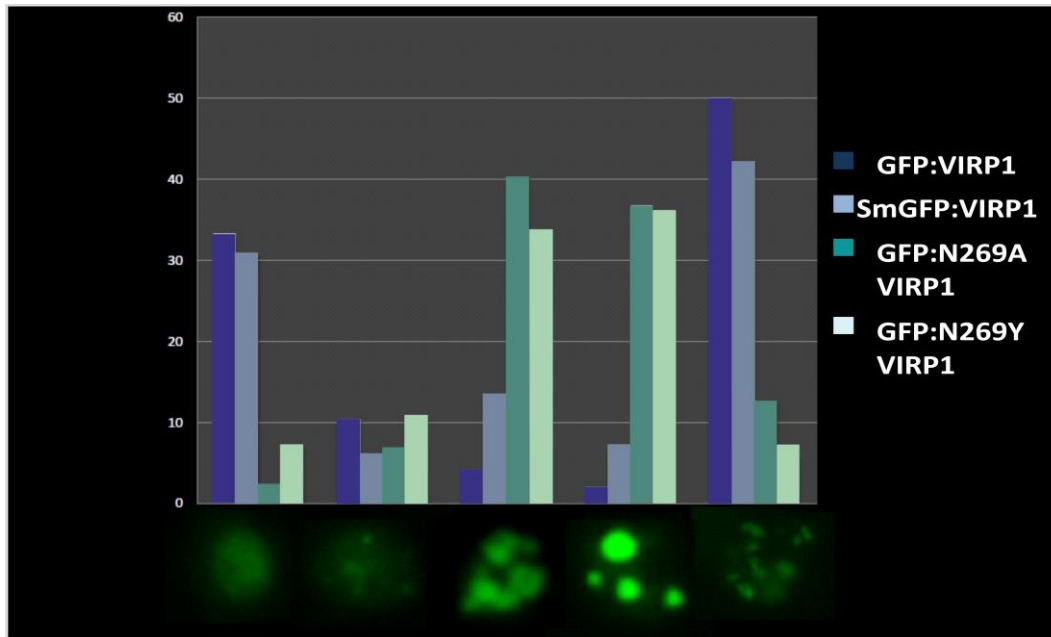


**Εικόνα 1.10. Η GFP:VIRP1 εντοπίζεται στον πυρήνα.** Η περιοχή του φύλλου αγρο-εμποτίστηκε με την κατασκευή GFP:VIRP1. **A,B.** Ο φθορισμός της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (Green Fluorescent Protein, GFP) αποκαλύπτει ότι η συνηγμένη πρωτεΐνη εντοπίζεται στον πυρήνα (A), σε αντίθεση με τη μη συνηγμένη GFP, η οποία βρίσκεται σε όλο το κύτταρο (B). **C,D.** Ίδιες περιοχές, όπως στα A και B, αντίστοιχα, όπου φαίνεται ο φθορισμός της χρωστικής DAPI. Το κόκκινο φόντο οφείλεται στο φυσικό φθορισμό της χλωροφύλλης. Κλίμακα: 25μm.

Επίσης, η πρωτεΐνη VIRP1 εντοπίζεται στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων (Kalantidis *et al.*, 2007), και μάλιστα παρουσιάζει διάφορους φαινοτύπους (εικ.1.11). Πιο συγκεκριμένα, η αγρίου τύπου και τα διάφορα μεταλλάγματα της πρωτεΐνης παρουσιάζουν διάφορους φαινοτύπους (εικ. 1.12) (Διπλωματική Εργασία Μαρίας Ηλιοπούλου).



**Εικόνα 1.11. Απεικόνιση διαφόρων φαινοτύπων της πυρηνικής πρωτεΐνης VIRP1.** Οι φωτογραφίες έχουν παρθεί με συνεστιακή μικροσκοπία (CLSM SP1, Leica). Μεγέθυνση 63x.



**Εικόνα 1.12.** Ποσοτικοποίηση των κυρίαρχων φαινοτύπων της αγρίου τύπου και του κάθε μεταλλάγματος της VIRP1. Οι εικόνες έχουν παρθεί με μικροσκόπιο φθορισμού. Μεγέθυνση 60x.

#### 1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Παρόλα αυτά παραμένει αδιευκρίνιστος ο βιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης στα φυτικά κύτταρα, αλλά και ποιος είναι ακριβώς ο ρόλος της σε σχέση με τη μόλυνση με το ιοειδές. Έτσι, λοιπόν, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί ο βιολογικός ρόλος της φυτικής πρωτεΐνης VIRP1 στα φυτικά κύτταρα του είδους *Nicotiana benthamiana*, καθώς επίσης να διευκρινιστεί ποιος είναι ο ακριβής ρόλος της στα φυτικά κύτταρα κατά τη μόλυνση με το ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (PSTVd). Πιο συγκεκριμένα, εξετάζεται ο ακριβής πυρηνικός εντοπισμός της πρωτεΐνης, ούτως ώστε να διευκρινιστεί σε ποιες φυσιολογικές διαδικασίες μπορεί να παίρνει μέρος, σε σχέση με το που εδράζεται, καθώς επίσης και εάν η βρόμο-επικράτεια που φέρει στο μόριό της είναι η υπεύθυνη για τη μόλυνση/ βιολογικό κύκλο του ιοειδούς.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Φυτικό υλικό

Για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Nicotiana benthamiana*, που έχουν μεγαλώσει στο θερμοκήπιο. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν τα φυτικά κύτταρα καπνού, BY-2 τα οποία είναι μία κυτταρική σειρά, χωρίς χλωροφύλλη, με γρήγορη ανάπτυξη (έως και 100 φορές μέσα σε χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας). Σε καλλιέργειες εναιωρήματος κυττάρων κάθε ένα από τα κύτταρα αιωρείται ανεξάρτητα ή σε βραχείς αλυσίδες (Nagata *et al.*, 1992).

### 2.2 Μέθοδοι

#### 2.2.1 Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων.

Για την κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων, επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία (NCBI, Pubmed) οι διάφορες πρωτεϊνικές αλληλουχίες, είτε ολόκληρες οι πρωτεΐνες (εικ. 3.1.1), είτε μόνο οι αλληλουχίες των βρόμο-επικρατειών (εικ.3.1.2) και αυτές υπεβλήθησαν σε στοίχιση στο πρόγραμμα BioEdit. Για να προχωρήσουμε στην κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων, θα πρέπει όλες οι στοιχισμένες πρωτεΐνες να έχουν τουλάχιστον ένα κοινό αμινοξύ, επομένως πρωτεΐνες που δεν έχουν κανένα αμινοξύ όμοιο, αφαιρούνται από τη λίστα. Στη συνέχεια, το αρχείο αυτό χρησιμοποιείται για την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου στο πρόγραμμα MEGA 6.

#### 2.2.2 Δημιουργία κατασκευών των βρόμο-μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη SIVIRP1 και του amiRNA.

Για τη δημιουργία του βρόμο-μεταλλάγματος V275F-SIVIRP1 χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένοι εκκινητές (Minotech, V275F3 FWD, REV), που περιέχουν τις μεταλλάξεις που φαίνονται στον πίνακα 2.2.2.1. Συγκεκριμένα, η γουανίνη (G) στη θέση 822 υποκαθίσταται από θυμίνη (T), ενώ δημιουργούνται και τρεις σιωπηλές μεταλλάξεις στις θέσεις 803 (θυμίνη σε κυτοσίνη), 806 (κυτοσίνη σε θυμίνη) και 809 (θυμίνη σε κυτοσίνη), για το λόγο που θα εξηγηθεί στην επόμενη παράγραφο. Οι μεταλλάξεις επιτεύχθηκαν μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που περιέχουν τις μεταλλάξεις σε συγκέντρωση 0,2μM και 100ng υποστρώματος DNA, 0,5 U KaraHiFi πολυμεράσης, 0,25mM dNTPs και 1x διαλύματος KaraHiFi. Οι συνθήκες της PCR φαίνονται στον πίνακα 2.2.2.1. Μετά τη θετική διαγνωστική πέψη (εικ. 3.2.5), το πλασμίδιο με την κλωνοποιημένη αλληλουχία V275F-SIVIRP1 στάλθηκε για αλληλούχιση στην εταιρία Macrogen, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πάλι εκκινητή (πιν. 2.2.2.2) όπου επιβεβαιώθηκε η σωστή αλληλουχία.

Πίνακας 2.2.2.1. Απεικόνιση των συνθηκών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, κατά την οποία κλωνοποιήθηκε το βρόμο-μετάλλαγμα V275F-VIRP1.

Συνθήκες	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια (λεπτά)	Κύκλοι
Αρχική μετουσίωση	98	5:00	1
Μετουσίωση	98	0:40	25
Αναδιάταξη	50	0:30	
Πολυμερισμός	72	8:00	
Τελικός πολυμερισμός	72	5:00	1

**Πίνακας 2.2.2.2. Απεικόνιση των εκκινητών που περιέχουν τις μεταλλάξεις στην αλληλουχία της SIVIRP1.** Με κόκκινο παρατηρούνται οι σιωπηλές μεταλλάξεις, ενώ με μπλε παρατηρείται η μετάλλαξη υποκατάστασης της βαλίνης (V) σε φαινυλαλανίνη (F).

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')
V275F3 FWD	T AAT GCC TTG TTG TAC <b>AAT CCC</b> AAA ACA GAT CAA <b>TTT</b> AAT GCG TTC GCT G
V275F3 REV	C AGC GAA CGC ATT AAA <b>TTG</b> ATC TGT TTT <b>GGG ATT</b> <b>GTA</b> CAA CAA GGC ATT A
VIRP-seq	GCG ACC CAT GGA TTT GGG GAC GG

Ακόμη, από προηγούμενη πτυχιακή εργασία στο εργαστήριο (Μαρία Ηλιοπούλου), δημιουργήθηκε ένα τεχνητό μικρό-RNA (amiRNA), το οποίο θα αναγνωρίζει και στοχεύει την ενδογενή πρωτεΐνη VIRP1 του είδους *Nicotiana benthamiana*. Η κατασκευή ξεκίνησε από τη Μαρία Ηλιοπούλου και το amiRNA κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pGEM (Διπλωματική εργασία Μαρίας Ηλιοπούλου). Στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής, κλωνοποίησα το amiRNA από το πλασμίδιο αυτό στο φορέα pART7 και ακολούθως στον pART27, που είναι κατάλληλος φορέας να μετασχηματιστεί σε αγροβακτήρια και να ακολουθήσει αγροεμποτισμός στα φυτά.

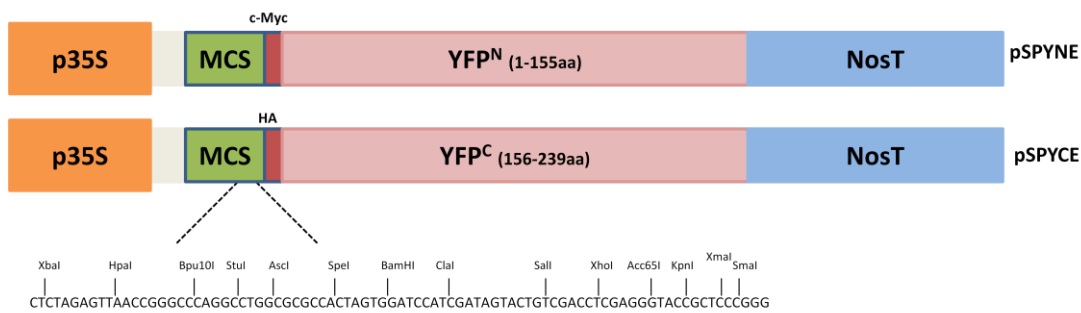
Επομένως, δημιουργήθηκαν κάποιες σιωπηλές μεταλλάξεις στο μέταλλαγμα V275F, ούτως ώστε να μην αναγνωρίζεται από το amiRNA και να συνεχίζεται να εκφράζεται.

### 2.2.3 Δημιουργία των κατασκευών VIRP1-BiFC

Για να ελεγχθεί εάν η VIRP1 λειτουργεί ως μονομερές ή διμερές σύμπλοκο, δημιουργήθηκαν οι κατασκευές VIRP1-BiFC. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pSPYNE και pSPYCE, που περιέχουν το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης YFP, αντίστοιχα και στα οποία κλωνοποιήθηκε η VIRP1 της *Nicotiana benthamiana*. Για το λόγο αυτό, το γονίδιο ενισχύθηκε μέσω PCR με ειδικούς εκκινητές, που περιέχουν άκρα με συγκεκριμένη αλληλουχία περιοριστικών ενζύμων (πιν.2.2.3.1), *XbaI* στο αμινοτελικό της άκρο και *SpeI* στο καρβοξυτελικό της άκρο, ούτως ώστε να κλωνοποιηθεί στην πολλαπλή περιοχή κλωνοποίησης των πλασμιδίων pSPYNE και pSPYCE (εικ. 2.2.3.1).

**Πίνακας 2.2.3.1. Απεικόνιση των εκκινητών που περιέχουν την αλληλουχία των περιοριστικών ενζύμων *XbaI* (κόκκινο) και *SpeI* (μπλε), για την κλωνοποίηση της NbVIRP1 στα πλασμίδια BiFC.**

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')
<b>BiFC- XbaI_VIRP1 fwd</b>	CA <b>TCT AGA</b> ATG GCA TCC GCC GTC TTA
<b>VIRP1-BiFC rev</b>	GCG <b>ACT AGT</b> AGA GTG TGC ATC ATC
<b>VIRP1-qPCR-Rev</b>	TGT ACG AGG CGA CGT TGT AG
<b>Cterm_NbVIRP1- F</b>	GAT GAT GAA CCA GCC ACC CA



Εικόνα 2.2.3.1. Απεικόνιση της πολλαπλής περιοχής κλωνοποίησης των πλασμιδίων pSPYNE και pSPYCE. Η αλληλουχία της NbVIRP1 κλωνοποιείται μεταξύ των XbaI και SpeI περιοριστικών θέσεων.

Μετά την κλωνοποίηση και τις θετικές διαγνωστικές πέψεις (εικ.3.10.1), τα κλωνοποιημένα πλασμίδια στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρία Cemia, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές, που θα “διαβάσουν” αριστερά προς το αμινοτελικό τμήμα την πρωτεΐνη (VIRP1-qPCR-Rev ) και δεξιά προς το καρβοξυτελικό τμήμα την πρωτεΐνη (Cterm\_NbVIRP1-F).

## 2.2.4 Δημιουργία των κατασκευών VIRP1-CRISPR

Για τη δημιουργία των κατασκευών VIRP1-CRISPR, ο Ιωάννης Βλατάκης βρήκε και σχεδίασε τις αλληλουχίες sgRNAs της VIRP1, που θα καταστέλλουν μοναδικά την πρωτεΐνη και όχι άλλα γονίδια-στόχους και που ταυτόχρονα θα περιέχουν τα στοιχεία που απαιτεί η Cas9 για να κόψει την αλληλουχία-στόχο (πχ. την αλληλουχία NGG πριν την αλληλουχία sgRNA).

Στη συνέχεια, η κλωνοποίηση των ενθεμάτων του υποκινητή AtU6p και του sgRNA της VIRP1, επιτεύχθηκε δημιουργώντας άκρα BsaI στην αλληλουχία sgRNA της VIRP1 με PCR, χρησιμοποιώντας ειδικούς υποκινητές με τα άκρα αυτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των ενθεμάτων αυτών στο πλασμίδιο pICH86966 (εικ. 3.13.2.1) και μετά τη θετική διαγνωστική πέψη (εικ. 3.13.2.2), τα πλασμίδια στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρία Macrogen, όπου επιβεβαιώθηκε ότι είναι σωστά κλωνοποιημένα.

## 2.2.5 Αγροεμποτισμός των C58C1 αγροβακτηρίων σε φυτά *Nicotiana benthamiana*.

Για να εκφράσουμε παροδικά μία πρωτεΐνη, το πλασμίδιο που περιέχει την πρωτεΐνη μετασχηματίζεται σε C58C1 αγροβακτήρια και ακολουθεί αγροεμποτισμός των βακτηρίων αυτών στα φυτά.

Συγκεκριμένα, την προηγούμενη ημέρα επωάζεται 5 ml καλλιέργειας όλο το βράδυ σε συνεχή ανάδευση, στους 28°C. Την επόμενη ημέρα, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται και το ίζημα επωάζεται για 1 μέχρι 3 ώρες στο διάλυμα MMA, που περιέχει 1x MS salts, 10mM MES pH 5.8 και 200uM ακετοσυριγγόνη. Μετά το πέρας της επώασης, ακολουθούν τρεις πλύσεις με 10mM MgCl<sub>2</sub> και το διάλυμα είναι έτοιμο να αγροεμποτιστεί στα φυτά, στην κατάλληλη συγκέντρωση απορρόφησης (OD) που θέλουμε. Η πρωτεΐνη VIRP1 αγροεμποτίστηκε σε OD=0,3. Ο αγροεμποτισμός πραγματοποιείται με τη βοήθεια μικρής σύριγγας (συνήθως 1ml), αφού κάνουμε μία μικρή οπή στο κάτω μέρος του φύλλου.

### 2.2.6 Παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

Για την παρατήρηση στο μικροσκόπιο (συνεστιακή μικροσκοπία ή μικροσκόπιο φθορισμού), οι διάφορες κατασκευές εκφράστηκαν παροδικά μέσω αγροεμποτισμού (VIRP1<sub>OD=0,3</sub>, Πρωτεΐνες-δείκτες<sub>OD=0,3</sub>) και στη συνέχεια, την τρίτη μέρα κόπηκε μία μικρή επιφάνεια φύλλου (1cm\*1cm) και τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα μαζί με γλυκερόλη για παρατήρηση. Τα μικροσκόπια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα SP1 CLSM (Leica), SP8 CLSM (Leica) και οπτικό μικροσκόπιο.

### 2.2.7 Εκχύλιση γενωμικού DNA (gDNA).

Κατά την απομόνωση γενωμικού DNA, 2 φυλλικοί δίσκοι τοποθετούνται σε ένα erpendorf σωλήνα, όπου προστίθενται 300ul CTAB διαλύματος (2% CTAB, 100mM Tris pH=8.0, 20mM EDTA, 1,4 M NaCl και 1% PVP-MW=40.000) και επωάζονται στους 65°C για 10-15 λεπτά, με ενδιάμεσες αναδεύσεις (vortex). Στη συνέχεια, προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και τα δείγματα αναποδογυρίζονται για να ανακατευθούν (όχι vortex) και φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά, 12000 στροφές. Στο υπερκείμενο προστίθεται 1/10 του όγκου οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa) και 2,5 όγκοι ισοπροπανόλης και τα δείγματα αναποδογυρίζονται και φυγοκεντρώνονται για 20-30 λεπτά, 12000 στροφές. Ακολουθεί πλύσιμο με 70% αιθανόλη και τέλος το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και διαλύεται σε όγκο 50ul αποστειρωμένο νερό.

### 2.2.8 Εκχύλιση RNA μεγάλου μοριακού βάρους.

Για κάθε 100 mg λειοτριβημένου ιστού προστίθεται 1 ml διαλύματος Trizol (το οποίο το φτιάχνουμε χρησιμοποιώντας 380 ml φαινόλη, pH=7.0, 94,528 gr guanidine thiocyanate (MW: 118.16), 30,448 gr ammonium thiocyanate (MW: 76.12), 0,1 M οξικό οξύ, pH=5.2 και 50 ml γλυκερόλη, για τελικό όγκο διαλύματος 1 L) και αναδεύεται έντονα (vortex). Μετά από πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά, στις 125000 στροφές, στους 4°C και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα Eppendorf. Στη συνέχεια, προστίθενται 200 ul χλωροφορμίου και μετά από 5-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έντονες αναδεύσεις στο ενδιάμεσο, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στις 125000 στροφές, στους 4°C και το υπερκείμενο μεταφέρεται πάλι σε νέο σωλήνα erpendorf. Ακολουθεί η κατακρήμιση του RNA με 250 ul υψηλών αλάτων και 250 ul ισοπροπανόλης σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στις 125000 στροφές, στους 4°C και πλύση με 70% αιθανόλη. Τα δείγματα RNA αφήνονται να στεγνώσουν και διαλύονται σε κατάλληλη ποσότητα αποστειρωμένου νερού (~30 ul).

### 2.2.9 Εκχύλιση πρωτεϊνών.

Για την εκχύλιση της πρωτεΐνης VIRP1, ακολουθήθηκαν διάφορα πρωτόκολλα: i) ολικής απομόνωσης πρωτεϊνών, ii) διαχωρισμού πυρήνων από κυτταρόπλασμα, με/χωρίς κατεργασία με υπερήχους (iii).

#### (i) Ολική απομόνωση πρωτεϊνών.

Για κάθε 200 mg λειοτριβημένου ιστού προσθέτουμε 1 ml διαλύματος εκχύλισης, σύστασης 100 mM Tris, pH=8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% γλυκερόλης, 1 mM DTT, 10 ug/ul PMSF, 0,1% v/v Tween-20 και 10 ug/ul διαλύματος αναστολέων πρωτεϊνών. Τα δείγματα αναδεύονται έντονα (vortex) και ακολούθως φυγοκεντρώνονται για 30 λεπτά, στα 12000 g, στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και φυλάσσεται στους -20°C.

### **(ii) Διαχωρισμός πυρήνων από κυτταρόπλασμα και απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών.**

Ο διαχωρισμός των πυρήνων από κυτταρόπλασμα έγινε σύμφωνα με τους Staiger και συνεργατών (1991).

Ακόμη, δοκιμάστηκε και ένα άλλο πρωτόκολλο, όπου σε 100 mg λειοτριβημένου ιστού προσθέτουμε 500  $\mu$ l διαλύματος λύσης (20 mM Tris-HCl pH=7.4, 25% γλυκερόλη, 20 mM KCl, 2 mM EDTA, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM PMSF και 250mM σουκρόζη) και ομογενοποιούμε το μίγμα με ελαφρά ανάδευση. Στη συνέχεια, το δείγμα φιλτράρεται μέσα από ένα φίλτρο πλέγματος νάιλον διαμέτρου 70 $\mu$ m και φυγοκεντρείται σε 1500 g, στους 4°C, για 10 λεπτά, με σκοπό να ιζηματοποιηθούν οι πυρήνες. Σε αυτούς, προστίθεται 1 ml διαλύματος NRBT (20 mM Tris-HCl pH=7.4, 25% γλυκερόλη, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> και 0,2% Triton-X 100) και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 1500 g, στους 4°C, για 10 λεπτά. Επαναλαμβάνουμε δύο φορές ακόμα και στη συνέχεια, στο ίζημα προστίθεται 1 ml διαλύματος NRB (20 mM Tris-HCl pH=7.4, 25% γλυκερόλη και 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>). Οι πυρηνικές πρωτεΐνες φυγοκεντρώνονται σε 1500 g, στους 4°C, για 10 λεπτά και τέλος, επαναδιαλύουμε τους πυρήνες σε 100  $\mu$ l διαλύματος λύσης. Εάν οι πρωτεΐνες δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως, τότε διαλύονται σε διάλυμα NSB (20 mM Tris-HCl pH=7.4, 25% γλυκερόλη, 7,55 gr/50 ml σουκρόζη και 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>).

### **(iii) Κατεργασία με υπερήχους.**

Μετά την ολική εκχύλιση πρωτεϊνών ή την απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε και κατεργασία με υπερήχους. Συγκεκριμένα, τα δείγματα πρωτεϊνών τοποθετούνται μέσα σε πάγο και υπόκεινται στην κατεργασία με υπερήχους για 15 δευτερόλεπτα, για 4 φορές, με ενδιάμεσο διάλειμμα ενός λεπτού.

## **2.2.10 Ανάλυση τύπου western των απομονωμένων πρωτεϊνών.**

Οι πρωτεΐνες φορτώνονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, κατάλληλης συγκέντρωσης ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης (μεγαλύτερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες αναλύονται σε μικρότερης συγκέντρωσης πήκτωμα πολυακρυλαμίδης) και το οποίο αποτελείται από το κατώτερο πήκτωμα διαχωρισμού και το ανώτερο πήκτωμα συσσώρευσης. Για την πρωτεΐνη VIRP1, φτιάχνουμε πήκτωμα διαχωρισμού πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8% (8% πολυακρυλαμίδη, 0,375 M Tris-HCl pH=8.8, 0,1% APS, 0,1% SDS και 0,0005% v/v TEMED) και πήκτωμα συσσώρευσης πολυακρυλαμίδης 5% (5% πολυακρυλαμίδη, 0,125 M Tris-HCl pH=6.8, 0,1% APS, 0,1% SDS και 0,001% TEMED). Το πήκτωμα ηλεκτροφορεύεται σε συσκευή BioRad Mini-Protean, σε σταθερή τάση 100 V, μαζί με πρωτεϊνικό δείκτη γνωστού μεγέθους (Nippon Genetics FastGene<sup>R</sup> triple coloured prestained protein ladder) και σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x running buffer-SDS PAGE και στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης PROTRAN διαμέτρου πόρων 0,2  $\mu$ m σε συσκευή μεταφοράς (BioRad) σε σταθερά 300 mA για 90 λεπτά.

Στη συνέχεια, ακολουθεί η χρώση κατά Ponceau και η ανάλυση τύπου western, όπου χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συνθήκες: 3-5% διάλυμα αποκλεισμού με αποβουτυρωμένο γάλα ή πρωτεΐνη BSA, πρώτο αντίσωμα rabbit anti-GFP (Sicgen 1:1000 +1% BSA, Anaspec 1:1000 + 1% BSA, Minotech 1:1000 +1% BSA), 3 πλύσεις με TBS ή TBST (TBS + 0,1% v/v Tween-20) για 5 ή 10 λεπτά, δεύτερο αντίσωμα anti-rabbit 1:10000 +1% BSA ή αποβουτυρωμένο γάλα και τέλος 3 πλύσεις με TBS ή TBST (TBS + 0,1% v/v Tween-20) για 5 ή 10 λεπτά. Ακολουθεί η προσθήκη υποστρώματος χημειοφωταύγειας ECL (ThermoFischer Scientific) στη μεμβράνη, η οποία μετά από 5 λεπτά μπαίνει σε κασέτα εμφάνισης με φιλμ και το φιλμ εμφανίζεται σε ανάλογο χρόνο σε σχέση με την αφθονία της πρωτεΐνης στα κύτταρα και τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάλυση.



### 2.2.11 Ανάλυση τύπου northern με χρήση ραδιενεργά-σημασμένων ή DIG-σημασμένων αλληλουχιών.

Για την ανάλυση τύπου northern, τα δείγματα RNA, στα οποία έχει προστεθεί 1x χρωστική βρωμοφαινόλης, φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης ανάλογα με το μέγεθος που θα αναλυθεί (για το amiRNA σε 1% και για το PSTVd σε 1,4%) και 1x MOPS διάλυμα, φορμαλδεΰδη και 1mg/ml βρωμιούχο αιθίδιο, αφού πρώτα έβρασαν για πέντε λεπτά και ακολούθως ψύχθηκαν για τρία λεπτά, ούτως ώστε να αποδιαταχθούν. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης Owl EasyCast™ B2 (ThermoScientific), όπου προστέθηκε διάλυμα ηλεκτροφόρησης σύστασης 1x MOPS και φορμαλδεΰδης και σε σταθερή τάση 100V. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης (λίγο πριν η βρωμοφαινόλη εξέλθει από τα πηγάδια), τα δείγματα RNA μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (NYTRAN), διαμέτρου πόρων 0,45um, χρησιμοποιώντας αυτοσχέδια κατασκευή μεταφοράς. Ουσιαστικά, τοποθετούμε κάθετα σε ένα γυάλινο πυρέξ, που περιέχει 10x διαλύματος SSC, ένα γυαλί (20x20) όπου πάνω τοποθετούμε μία μεμβράνη Whatman (20x30), που εμβαπτίζεται μέσα στο διάλυμα με τη μεγαλύτερή της πλευρά. Πάνω από τη μεμβράνη τοποθετούμε κατά σειρά: μία μεμβράνη Whatman (20x20), που έχει εμποτιστεί σε διάλυμα 10x SSC, το πήκτωμα με τα πηγάδια να κοιτάνε τη μεμβράνη, εμποτισμένο για τουλάχιστον 15 λεπτά σε διάλυμα 10x SSC, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (σε διαστάσεις όσο και το gel), εμποτισμένη σε διάλυμα 2x SSC και τρεις μεμβράνες Whatman (σε διαστάσεις όσες και το πήκτωμα), εμποτισμένες σε διάλυμα 2x SSC. Στη συνέχεια, σφραγίζουμε με νάιλον μεμβράνη γύρω-γύρω το πήκτωμα, ούτως ώστε να μην περνάει αέρας καθόλου. Πάνω από τα χαρτιά Whatman, τοποθετούμε απορροφητικά χαρτιά. Η διαδικασία της μεταφοράς γίνεται για τουλάχιστον 6 ώρες και συνήθως γίνεται όλο το βράδυ.

Την επόμενη ημέρα, η μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει καλά και στη συνέχεια σταθεροποιούνται τα δείγματα, μέσω διασταυρωτής σύνδεσης (cross-linking) στα 1200 μJoules. Ακολουθεί χρώση της μεμβράνης με methylene blue 0,03% σε 3 M CH<sub>3</sub>COONa και η ανάλυση τύπου northern, είτε με χρήση ραδιενέργειας, είτε με DIG.

#### (i) Χρήση ραδιενεργά σημασμένων αλληλουχιών.

Η μεμβράνη αφού διαβρεχτεί με 25 mM φωσφορικό νάτριο, τοποθετείται σε κύλινδρο υβριδοποίησης, όπου προστίθεται το διάλυμα προ-υβριδισμού, που περιέχει 0,25 M φωσφορικό νάτριο, pH 6.8, 7% SDS, 1x διάλυμα Denhardt's και 0,25 mg/ml t-RNAs και επωάζεται για μία ώρα στους 65°C. Ταυτόχρονα με τον προ-υβριδισμό της μεμβράνης, ενισχύεται η αλληλουχία, που θα υβριδοποιηθεί στη μεμβράνη, με 0,01 mM dATP, dTTP, dGTP, 0,06 μg/ul τυχαίους εκκινητές, 2,5x διάλυμα Klenow, 20 U Klenow πολυμεράσης και τέλος 5 μl ραδιενεργού <sup>32</sup>P-dCTP [18,5MBq (500 μCi)] στους 37°C για μία ώρα. Μετά το πέρας της μίας ώρας, η ραδιενεργή αντίδραση φυγοκεντρείται σε μία κολώνα (BioRad) για δύο λεπτά στις 2700 στροφές (rpm), αφού πρώτα έχουν φυγοκεντρηθεί στην κολώνα 700ul Sephadex G25 (δύο λεπτά, 2700rpm). Στη συνέχεια, η ραδιενεργή αντίδραση αφήνεται να βράσει για πέντε λεπτά και ακολούθως ψύχεται για τρία λεπτά και τέλος προστίθεται στον κύλινδρο υβριδοποίησης, μαζί με το διάλυμα προ-υβριδισμού (65°C).

Την επόμενη ημέρα, ακολουθούν οι διαδοχικές πλύσεις με 40 mM φωσφορικό νάτριο και 5% SDS, 40 mM φωσφορικό νάτριο και 1% SDS για 15 λεπτά η κάθε μία και μία γρήγορη πλύση με 25 mM φωσφορικό νάτριο. Η μεμβράνη τοποθετείται σε νάιλον μεμβράνη και ακολούθως μπαίνει σε μία κασέτα εμφάνισης μαζί με φιλμ εμφάνισης (KODAC), το οποίο εμφανίζεται ανάλογα με το πόσους χτύπους στο λεπτό χτυπάει η μεμβράνη.

#### (ii) Χρήση DIG σημασμένων αλληλουχιών.

Με τη μέθοδο αυτή, παράγονται RNA αλληλουχίες, στις οποίες έχουν ενσωματωθεί νουκλεοτίδια διοξυγενίνης-UTP (digoxigenin-UTP, DIG-UTP). Συγκεκριμένα, το DNA που πρόκειται να μεταγραφεί

κλωνοποιείται μέσα σε μία θέση πολυσύνδεσης σε κατάλληλους φορείς μεταγραφής (πχ. pSPT 18 ή 19), που περιέχουν εκκινητές για τις RNA πολυμεράσες SP6 και T7. Το παρακείμενο εκμαγείο DNA γίνεται γραμμικό σε μία κατάλληλη θέση και οι RNA πολυμεράσες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μεταγράφων. Κάθε 20 έως 25 νουκλεοτίδια του νεοσυντιθέμενου RNA ενσωματώνεται ένα νουκλεοτίδιο DIG-UTP. Δεδομένου ότι, η συγκέντρωση νουκλεοτιδίων δε γίνεται περιοριστική στην πρότυπη αντίδραση μεταγραφής, αυτή η αντίδραση μπορεί να δημιουργήσει μεγάλες ποσότητες από σημασμένο RNA.

Έτσι, η μεμβράνη μετά τη χρώση με methylene blue, πλένεται γρήγορα με 2x SSC και τοποθετείται σε κύλινδρο υβριδοποίησης μαζί με το διάλυμα προ-υβριδισμού, σύστασης 5x SSC, 1% SDS, 1x Denhart's διαλύματος, 0,25 mg/ml t-RNAs και 25% φορμαμίδης και επωάζεται για μία ώρα στους 65°C. Στη συνέχεια, προστίθενται 50 ng του DIG-UTP PSTVd ανιχνευτή, αφού πρώτα βράσει για πέντε λεπτά και ακολούθως ψυχθεί για 3 λεπτά και επωάζεται με τη μεμβράνη όλο το βράδυ (ή τουλάχιστον για 6 ώρες) στους 65°C.

Την επόμενη ημέρα, αφαιρείται το διάλυμα υβριδισμού (το οποίο χρησιμοποιείται 2-3 φορές και διατηρείται στους -20°C) και ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις με 2x SSC για 5 λεπτά, 2x SSC και 0,2% SDS για 30 λεπτά, 2x SSC και 0,2% SDS για 30 λεπτά, 2x SSC και 0,2% SDS για 15 λεπτά και τέλος 2x SSC για 10 λεπτά (65°C). Ακολουθούν πλύσεις με το διάλυμα ξεπλύματος για 10 λεπτά (1x μαλαϊκό οξύ και 0,3% v/v Tween-20) και με το ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού για 30 λεπτά (1x μαλαϊκό οξύ, 0,3% v/v Tween-20 και 3% αποβουτυρωμένο γάλα). Στη συνέχεια, στο τελευταίο διάλυμα προστίθεται το αντίσωμα Anti-Digoxigenin-AP (από πρόβατο) (Sigma Aldrich) σε αραιώση 1/20000 και επωάζεται 30-60 λεπτά. Ακολουθούν δύο πλύσεις με το διάλυμα ξεπλύματος για 15 λεπτά, μία πλύση με 1x μαλαϊκό οξύ για 10 λεπτά και μία επώαση με το διάλυμα ανίχνευσης (0,1 M Tris-HCl pH=9.5, 0,1 M NaCl) για 10 λεπτά. Τέλος, προστίθεται το υπόστρωμα χημειοφωταύγειας CDP-Star (Sigma-Aldrich) και ένα φιλμ και ακολουθεί η εμφάνιση.

### **2.2.12 Ανάστροφη μεταγραφή RNA δειγμάτων (cDNA σύνθεση).**

Η σύνθεση των cDNA δειγμάτων έγινε με τη χρήση της M-MLV ανάστροφης μεταγραφάσης (Invitrogen, ThermoFischer Scientific), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας.

### **2.2.13 In vitro μεταγραφή του PSTVd RNA.**

Για να μεταγραφεί in vitro, το (+) πολικότητας μόριο RNA του PSTVd, πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδίου pBSKdNb με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI και στη συνέχεια, τα γραμμικά μόρια φορτώθηκαν σε 0,8% gel αγαρόζης και το DNA ανακτήθηκε από το gel με kit (Macherey-Nagel). Στη συνέχεια, ακολούθησε η in vitro μεταγραφή χρησιμοποιώντας 1 ug του DNA, 1x διάλυμα μεταγραφής (HT Biotechnology), 0,1 M DTT (HT Biotechnology), 1,5 mM rNTPs 20 U RNase OUT και 100 U T3 ανάστροφης μεταγραφάσης.

#### **2.2.14 Επιμόλυνση πρωτοπλαστών BY-2 κυττάρων με το PSTVd, με τη χρήση PEG.**

Τα κύτταρα BY-2 υπόκεινται σε πέψη με ένζυμα κυτταρινασών (2%) και macherozyme (1%) (PhytoTechnology Laboratories) για 3-4 ώρες (μέχρις ότου παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο οι πρωτοπλάστες) στους 27°C, σε σκοτάδι και 70 στροφές. Στη συνέχεια, ρυθμίζεται ο όγκος των πρωτοπλαστών σε  $2-3 \times 10^6$ / ml με το διάλυμα σύστασης 0,45 M μαννιτόλης, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> και 0,14 gr / 200 ml MES pH=5.7. Ακολουθεί πλύση των απομονωμένων πρωτοπλαστών με 1 ml διαλύματος W5 (154 mM NaCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl και 25 mM MES pH=5.7) και επώαση στους 4°C για 30 λεπτά. Οι πρωτοπλάστες φυγοκεντρώνονται στη συνέχεια σε 60g για 5 λεπτά και επαναδιαλύονται σε 1 ml διαλύματος MMG (0,4 M μαννιτόλη και 15 mM MgCl<sub>2</sub>). Στο διάλυμα προστίθεται ανάλογη ποσότητα με το (+) πολικότητα RNA του PSTVd (50 ug) (που έχει μεταγραφεί in vitro, ενότητα 2.2.12) και μετά από 5 λεπτά στους 4°C, προστίθεται 1,1 ml διαλύματος PEG (40% v/v PEG MW=4000, 0,8M μαννιτόλη και 0,1 M CaCl<sub>2</sub>). Τα δείγματα παραμένουν στους 4°C για 12 λεπτά και ακολούθως προστίθενται 4,4 ml διαλύματος W5 πολύ αργά. Μετά τη φυγοκέντρωση σε 1000 στροφές για 10 λεπτά, ακολουθεί πλύση με 1 ml W5 και το ίζημα επαναδιαλύεται σε μέσο επώασης (BY-2 MS, σύστασης 4,3 gr/ 1L μακροστοιχείων, 0,1 gr/ 1L μικροστοιχείων, 0,012/ 1L βιταμινών, 0,1 gr/ 1L μυο-ινοσιτόλης, 0,1% v/v θειαμίνης, 0,5% v/v 2,4-D και 30 gr/ 1L σουκρόζης, pH=5.7-5.8) και επωάζεται στο σκοτάδι για 3 μέρες, 27°C, σε 130 στροφές ανάδευσης.

#### **2.2.15 Μετασηματισμός BY-2 κυττάρων με αγροβακτήρια (δημιουργία διαγονιδιακών κυτταρικών σειρών).**

Η καλλιέργεια αγροβακτηρίων στελέχους AGL-1, που περιέχει το πλασμίδιο με το γονίδιο με το οποίο θέλουμε να μετασηματίσουμε τα BY-2 κύτταρα, επωάζεται όλο το βράδυ στους 28°C σε διάλυμα LB (και μαζί με το αντιβιοτικό επιλογής καναμυκίνη). Την επόμενη ημέρα, σε 4 ml BY-2 κυττάρων, που μεγαλώνουν για τρεις μέρες σε νέο καλλιεργητικό μέσο, προστίθενται 4 ul ακετοσυριγκόνης (20 mM σε αιθανόλη). Με μία γυάλινη πιπέτα όγκου 10 ml, δημιουργούνται σπές στα κύτταρα και στη συνέχεια, προστίθενται 75 ul (μεγάλης ανάπτυξης) ή 100 ul (μικρής ανάπτυξης) καλλιέργειας αγροβακτηρίων και το μίγμα επωάζεται για δύο ημέρες στους 28°C, χωρίς ανάδευση. Την τέταρτη ημέρα, στο κάθε μίγμα αγροβακτηρίων-BY-2 κυττάρων προστίθενται 10 ml BY-2 MS μαζί με 75 ug/ml σεφοταξίμη και φυγοκεντρείται σε 1000 στροφές, για 4 λεπτά. Επαναλαμβάνονται οι πλύσεις δύο φορές ακόμη και τέλος, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 2 ml BY-2 MS μαζί με 75 ug/ml σεφοταξίμη, τα οποία επιστρώνονται σε πιάτο-petri που περιέχει 1x MS Modified Medium pH=5.8, 75 ug/ml σεφοταξίμη και 50 ug/ml καναμυκίνη. Τα κύτταρα επωάζονται στους 28°C για 2-3 εβδομάδες, εφόσον σχηματιστούν κάλλοι. Από ένα μοναδικό κάλλο, προκύπτει μία διαγονιδιακή κυτταρική σειρά BY-2.

#### **2.2.16 Επίδραση των BY-2 κυττάρων με τους αναστολείς των βρόμο-επικρατειών.**

Σε BY-2 κύτταρα, τα οποία έχουν μεγαλώσει για τρεις ημέρες σε φρέσκο καλλιεργητικό μέσο, προστίθενται οι αναστολείς JQ-1 και PFI-1, σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις, καθώς επίσης και μάρτυρας μόνο με το DMSO, στο οποίο είναι διαλυμένοι οι αναστολείς (πιν. 2.2.15.1). Πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις και τρεις βιολογικές επαναλήψεις των επιδράσεων. Οι χημικές ουσίες αυτές είναι κυτταρο-διαπερατές, επομένως δε χρειάζεται να δημιουργηθούν πρωτοπλάστες και η επίδραση γίνεται κατευθείαν στα κύτταρα.

**Πίνακας 2.2.15.1** Απεικόνιση διαφόρων συγκεντρώσεων επιδράσεων των αναστολέων JQ-1 και PFI-1 που πραγματοποιήθηκαν σε BY-2 κύτταρα.

Συγκέντρωση JQ-1	Συγκέντρωση PFI-1
DMSO (μάρτυρας ελέγχου)	DMSO (μάρτυρας ελέγχου)
0,1 uM	0,5 uM
0,5 uM	1 uM
10 uM	5 uM
20 uM	10 uM
	25 uM

### 2.2.17 Μέτρηση βιωσιμότητας των BY-2 κυττάρων, ύστερα από επίδραση με τους αναστολείς.

Μετά από επίδραση μίας ημέρας με τους αναστολείς JQ-1 και PFI-1, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων, με χρώση Trypan blue, η οποία δεν μπορεί να εισέλθει στα ζωντανά κύτταρα που έχουν άθικτες μεμβράνες, παρά μόνο στα νεκρά κύτταρα και επομένως αποτελεί μία μέθοδο αποκλεισμού χρώσης.

Από το διάλυμα των κυττάρων που έχουν υποστεί την επίδραση (αλλά και κυττάρων χωρίς επίδραση) λαμβάνω 50 ul και προσθέτω 20 ul της χρωστικής Trypan blue. Στο οπτικό μικροσκόπιο παρατηρώ και καταγράφω το ποσοστό των νεκρών και ζωντανών κυττάρων (ο ελάχιστος αριθμός κυττάρων που καταγράφονται είναι 100 σε κάθε δείγμα). Επίσης, επειδή η χρωστική μετά από λίγο χρόνο είναι τοξική για τα κύτταρα, η χρώση γίνεται ακριβώς πριν την παρατήρηση σε άμεσο χρόνο.

### 2.2.18 Μόλυνση *Arabidopsis thaliana* φυτών με το ιοειδές PSTVd.

Πραγματοποιήθηκε μόλυνση διαγονιδιακών Flag:NbVIRP1 και αγρίου τύπου *A.thaliana* φυτών με το PSTVd, με τρεις τρόπους.

#### (i) Μόλυνση με μολυσμένο ιστό.

Χρησιμοποιήθηκε μολυσμένος ιστός, που ήταν φυλαγμένος στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , με τον οποίο τρίψαμε τα κάτω φύλλα των φυτών, αφού πρώτα τα τρίψαμε με τη σκόνη καρβίδιο του πυριτίου (Carborundum, SiC), η οποία δημιουργεί οπές στα φύλλα και διευκολύνει την είσοδο του ιοειδούς.

#### (ii) Μόλυνση με το ριβονουκλεϊκό οξύ του ιοειδούς

Χρησιμοποιήθηκε RNA του ιοειδούς που συντέθηκε *in vitro* (όπως αναλύεται στην ενότητα 2.2.13) και η μόλυνση έγινε με τον ίδιο τρόπο όπως προηγουμένως.

#### (iii) Μόλυνση μέσω αγροεμποτισμού

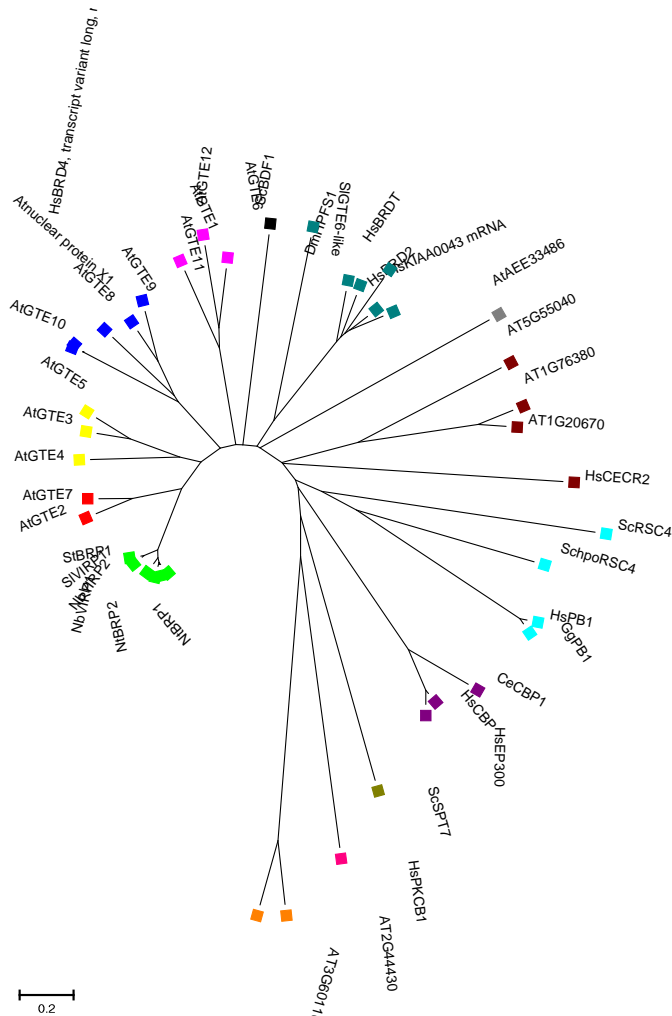
Χρησιμοποιήθηκε καλλιέργεια αγροβακτηρίων C58C1, που περιέχουν το πλασμίδιο με το RNA του ιοειδούς. Η μόλυνση έγινε με αγροεμποτισμό (OD=0,1), όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.5.

### 3. Αποτελέσματα

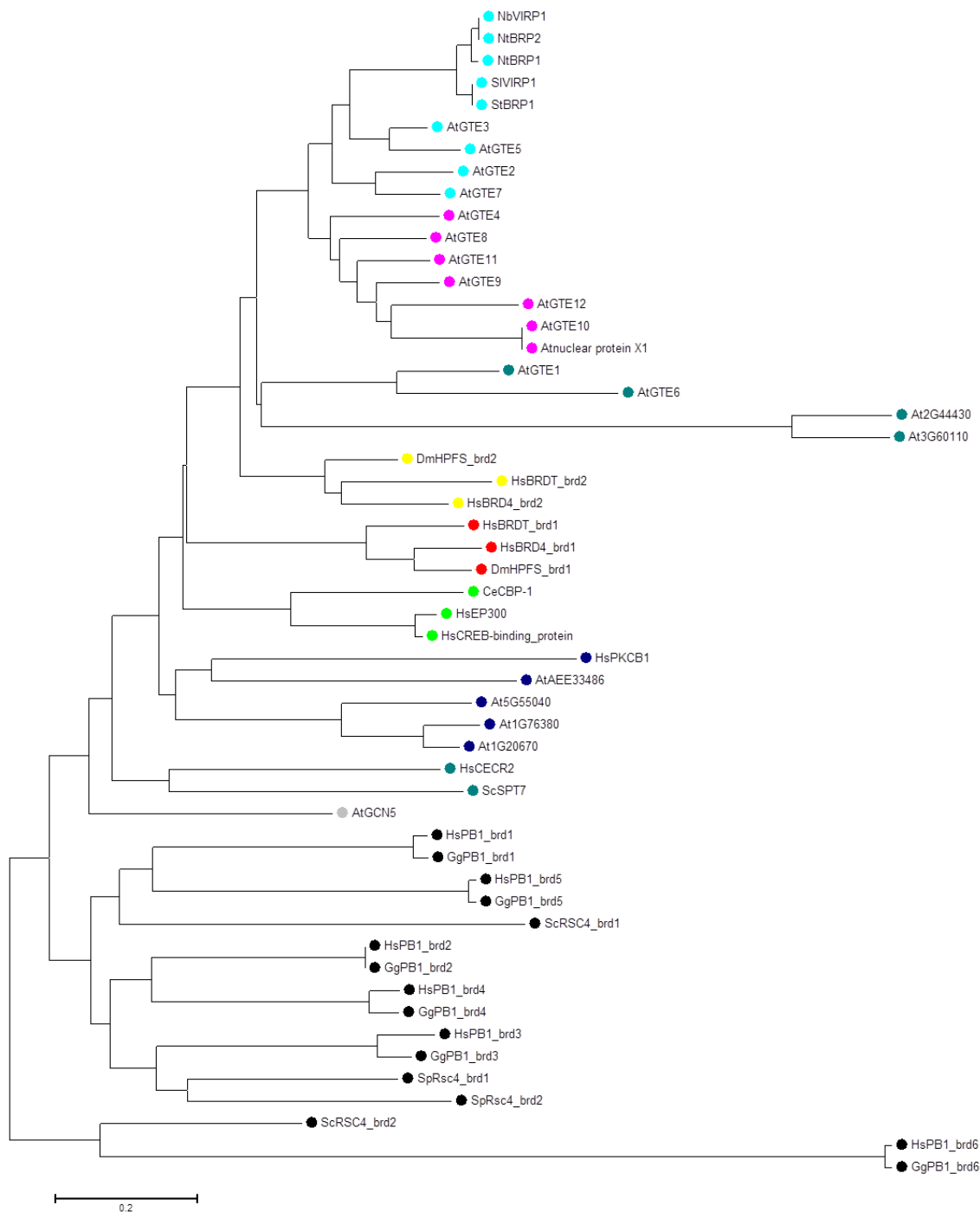
#### 3.1 Φυλογενετικό δέντρο πρωτεϊνών με βρόμο-επικράτειες

Με σκοπό την εύρεση του βιολογικού ρόλου της φυτικής πρωτεΐνης VIRP1, πρωτεΐνες από διαφορετικά βασιλεία (Φυτά, Ζώα, Μύκητες) που περιέχουν επικράτειες βρόμο στοιχήθηκαν σε επίπεδο αμινοξέων με τη χρήση του προγράμματος BioEdit με την VIRP1 διαφόρων ειδών της οικογένειας *Solanaceae* (*Nicotiana benthamiana*, *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana tabacum* και *Solanum tuberosum*). Στη συνέχεια κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Neighbor-Joining tree. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1.1, η πρωτεΐνη VIRP1 των διαφόρων ειδών *Solanaceae* βρίσκονται σε ένα ξεχωριστό κλάδο, μαζί με τις πρωτεΐνες GTE2, GTE7, GTE3, GTE4 και GTE5, που περιέχουν επίσης βρόμο-επικράτειες, του είδους *Arabidopsis thaliana*.

Παράλληλα, δημιουργήθηκε ένα φυλογενετικό δέντρο μόνο με τις βρόμο-επικράτειες αυτών των πρωτεϊνών, που αναφέρονται στην εικόνα 3.1.2, με σκοπό να δούμε τις φυλογενετικές σχέσεις μόνο μεταξύ των επικρατειών αυτών.



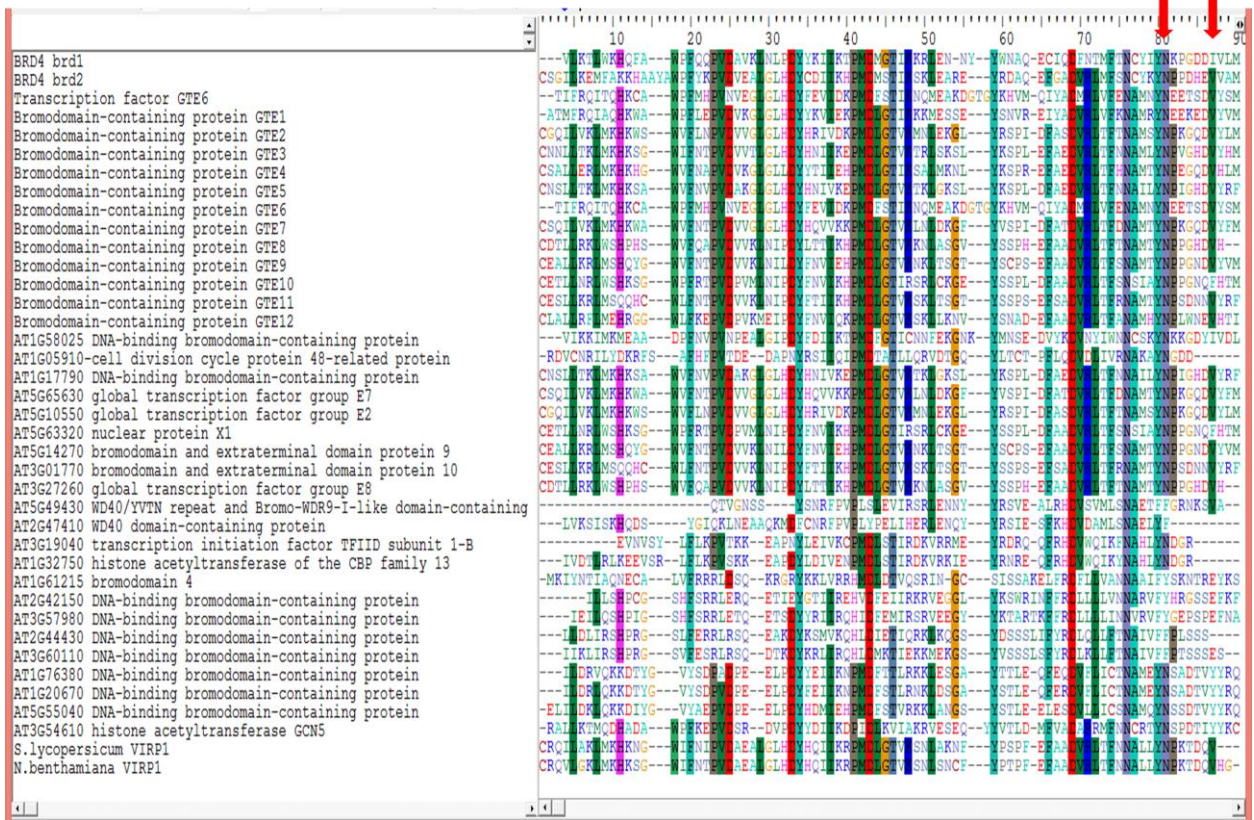
**Εικόνα 3.2.1 Φυλογενετικό δέντρο πρωτεϊνών διαφόρων ταξινομικών βασιλείων με βρόμο-επικράτειες.** Η εξελικτική ιστορία προέκυψε με τη μέθοδο της γειτονικής σύνδεσης (Neighbor-Joining) (Saitou and Nei, 1987). Απεικονίζεται το βέλτιστο δέντρο με το άθροισμα του μήκους των κλάδων= 20,11924660. Το δέντρο είναι σχεδιασμένο υπό κλίμακα, με μήκη κλάδων στις ίδιες μονάδες με εκείνες των εξελικτικών αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να συνταχθεί το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διόρθωσης Poisson (Zuckerandl and Pauling, 1965) και είναι στις μονάδες του αριθμού των υποκαταστάσεων αμινοξέων ανά περιοχή. Η ανάλυση περιλαμβάνει 41 πρωτεΐνες και διεξήχθη στο MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).



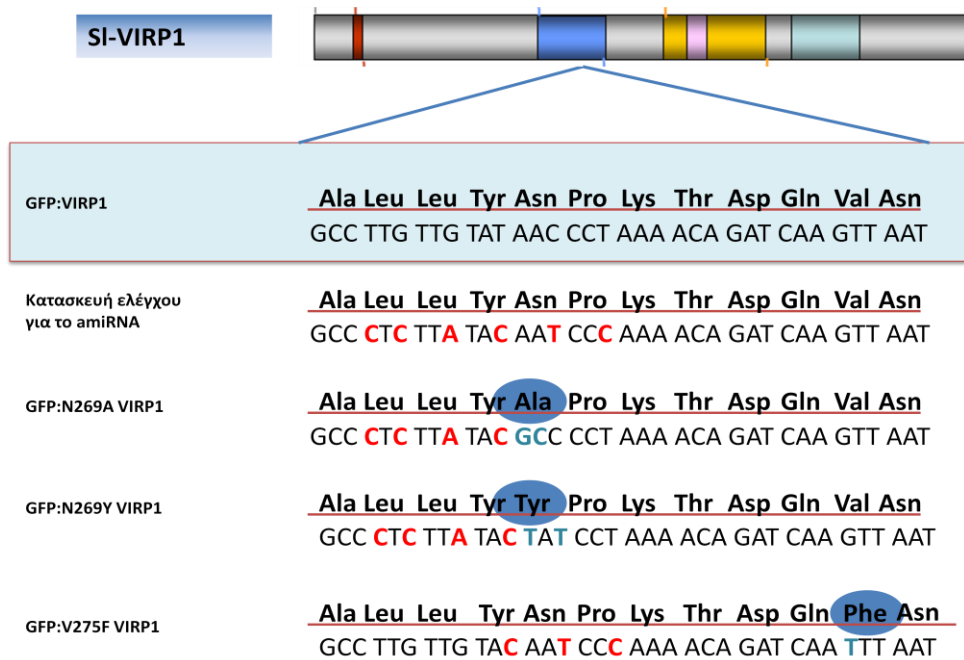
**Εικόνα 3.1.2.** Φυλογενετικό δέντρο βρόμο-επικρατειών των πρωτεϊνών που αναφέρονται στην εικόνα 3.1. Η εξελικτική ιστορία προέκυψε με τη μέθοδο της γειτονικής σύνδεσης (Neighbor-Joining) (Saitou and Nei, 1987). Απεικονίζεται το βέλτιστο δέντρο με το άθροισμα του μήκους των κλάδων=13,74432484 . Το δέντρο είναι σχεδιασμένο υπό κλίμακα, με μήκη κλάδων στις ίδιες μονάδες με εκείνες των εξελικτικών αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να συνταχθεί το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διόρθωσης Poisson (Zuckerandl and Pauling, 1965). και είναι στις μονάδες του αριθμού των υποκαταστάσεων αμινοξέων ανά περιοχή. Η ανάλυση περιλαμβάνει 53 αμινοξικές αλληλουχίες και διεξήχθη στο MEGA6 (Tamura *et al.*,2013).

### 3.2 Δημιουργία μεταλλάξεων στη βρόμο-επικράτεια της VIRP1.

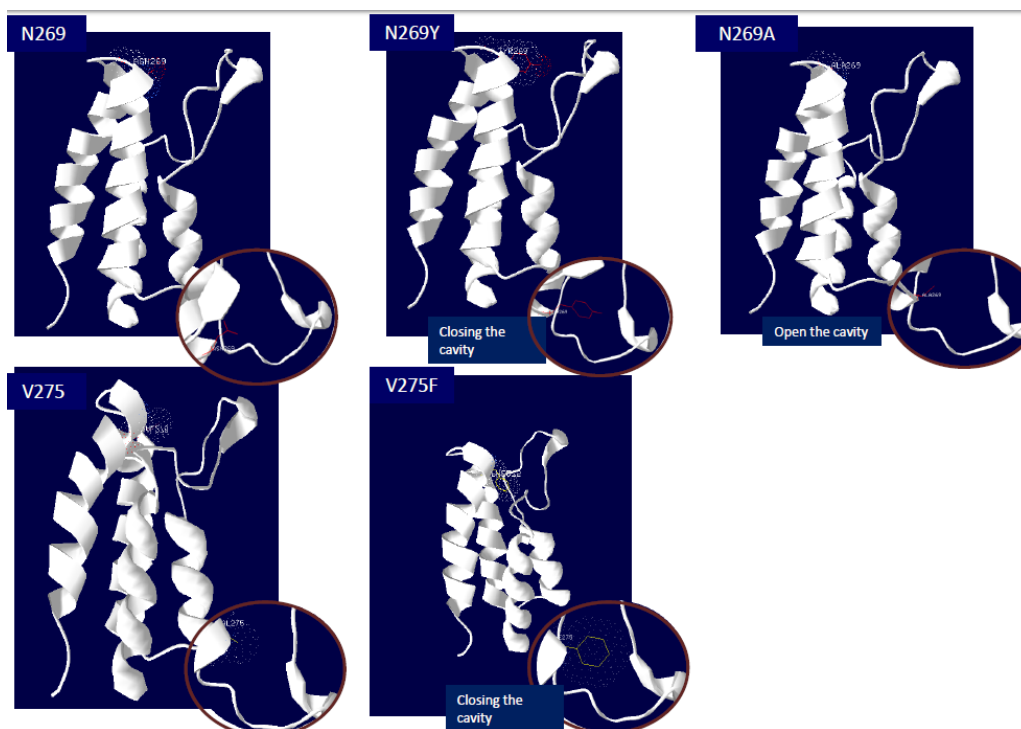
Κατά τη διερεύνηση του ρόλου της πρωτεΐνης VIRP1 στα φυτικά κύτταρα, επιλέχθηκαν να δημιουργηθούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις στη βρόμο-επικράτεια, ούτως ώστε να κατασταλεί η λειτουργία της επικράτειας αυτής, χωρίς να αλλάξει η διαμόρφωση της πρωτεΐνης στο χώρο. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, επιλέχθηκαν δύο αμινοξέα, τα οποία είναι αρκετά συντηρημένα στις περισσότερες πρωτεΐνες φυτών και θηλαστικών (εικ. 3.2.1) και έγιναν τρεις υποκαταστάσεις, με στόχο να ανοίξει ή να κλείσει η κοιλότητα, που σχηματίζεται μεταξύ των BC και ZA λούπων, που είναι υπεύθυνη για τη λειτουργία της επικράτειας (εικ.3.2.3). Έτσι, δημιουργήθηκαν οι υποκαταστάσεις από ασπαραγίνη σε αλανίνη (N269A) και σε τυροσίνη (N269Y) και από βαλίνη σε φαινυλαλανίνη (V275F) (εικ. 3.2.2). Οι δύο σημειακές μεταλλάξεις δημιουργήθηκαν σε προηγούμενη δουλειά στο εργαστήριο (N269A και N269Y) (Διπλωματική Εργασία Μαρίας Ηλιοπούλου) και η τρίτη στα πλαίσια της παρούσας εργασίας (εικ.3.2.4, εικ.3.2.5).



Εικόνα 3.2.1. Στοίχιση των βρόμο επικρατειών των φυτικών πρωτεϊνών και της BRD4 των θηλαστικών. Με χρώματα παρατηρούνται τα συντηρημένα αμινοξέα κατά τη στοίχιση με το BioEdit ( threshold 39%). Με τα κόκκινα βέλη απεικονίζονται τα αμινοξέα που υποκαταστάθηκαν.

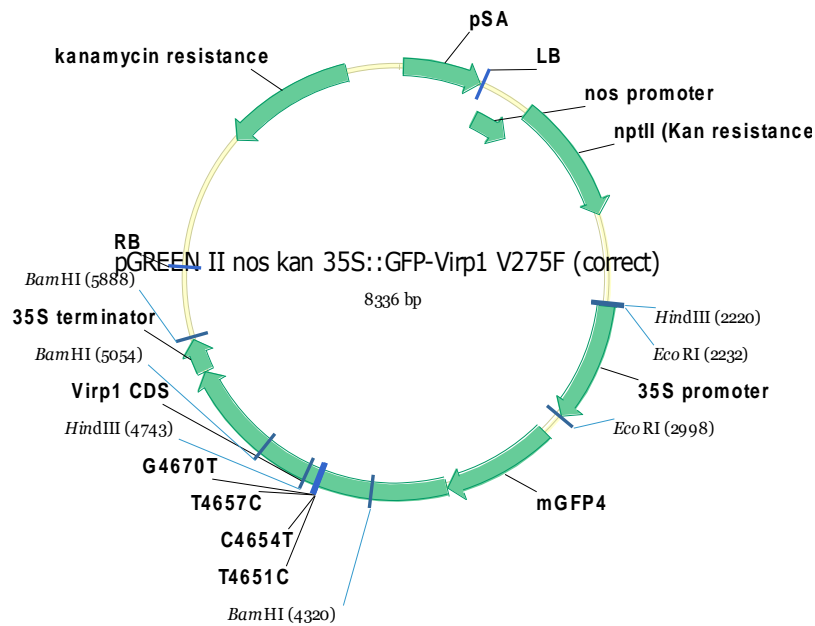


Εικόνα 3.2.2. Οι σημειακές μεταλλάξεις που οδηγούν σε υποκατάσταση αμινοξέως. Με μπλε έντονα γράμματα φαίνονται τα νουκλεοτίδια που μεταλλάχθηκαν, ενώ με κόκκινα έντονα γράμματα φαίνονται σιωπηλές μεταλλάξεις, που θα εξηγηθούν στην επόμενη ενότητα.

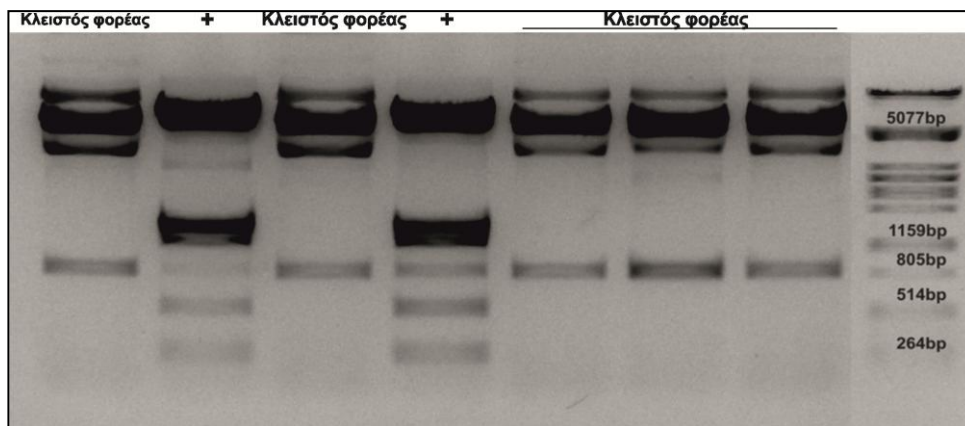


Εικόνα 3.2.3. Απεικόνιση της κοιλότητας μετά από τις σημειακές μεταλλάξεις. Με την υποκατάσταση του αμινοξέως ασπαραγίνη (N269) σε τυροσίνη (Y) ή του αμινοξέως βαλίνη (V275) σε φαινυλαλανίνη (F) κλείνει η κοιλότητα που φέρει την ενεργότητα της επικράτειας, ενώ το αντίθετο συμβαίνει όταν το αμινοξύ ασπαραγίνη (N269) υποκαθίσταται από αλανίνη (A). Η πρόβλεψη έγινε με τη χρήση του προγράμματος Swiss pdb viewer 4.1.0. (Διπλωματική εργασία, Μαρία Ηλιοπούλου)





Εικόνα 3.2.4. Απεικόνιση του πλασμιδιακού χάρτη της κατασκευής V275F VIRP1. Κατασκευή με το Vector NTI.



Εικόνα 3.2.5. Απεικόνιση των θετικών αποικιών *E.coli* που φέρουν το πλασμίδιο με τη σημειακή μετάλλαξη GFP:SI-VIRP1-V275F. Κατά την διαγνωστική πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI/NcoI οι θετικές αποικίες εμφανίζουν προφίλ μπαντών μεγέθους 5.581, 1.187, 834 και 508 νουκλεοτιδικές βάσεις, ενώ οι αποικίες με ανεστραμμένο το ένθεμα 4.865, 1.224, 1.187, 834 και 226 βάσεις και τέλος οι αποικίες χωρίς ένθεμα (κλειστός φορέας) 4.979 και 834 βάσεις.

Η κλωνοποίηση της κατασκευής GFP:VIRP1 V275F πραγματοποιήθηκε με επιτυχία, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2.5.

### 3.3 Καταστολή της ενδογενούς πρωτεΐνης VIRP1 του φυτικού είδους *Nicotiana benthamiana*, με τη χρήση τεχνητού μικρού RNA.

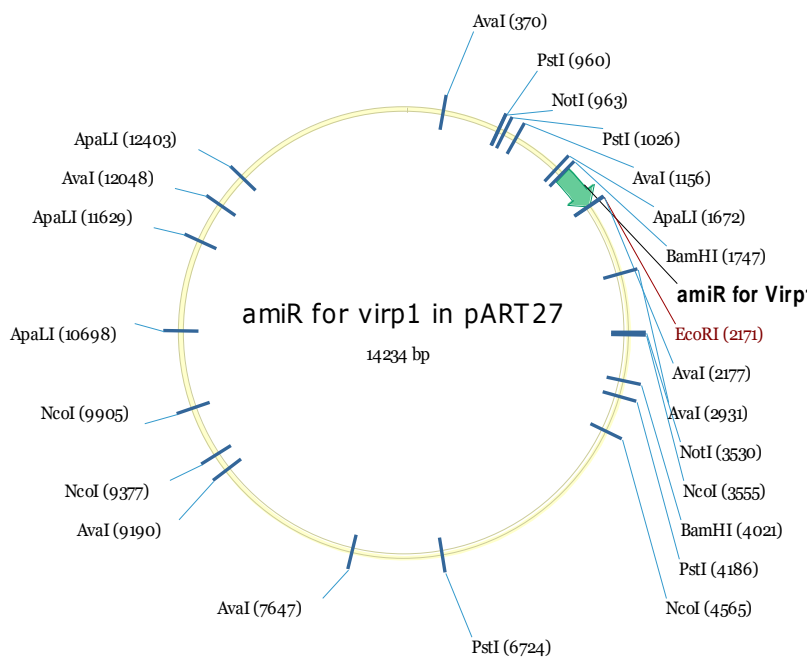
Κατασκευάστηκε ένα τεχνητό μικρό RNA (artificial microRNA, amiRNA) που στοχεύει την ενδογενή πρωτεΐνη VIRP1 του είδους *Nicotiana benthamiana*, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.2.2, με σκοπό να κατασταλεί η έκφραση της ενδογενούς πρωτεΐνης και έτσι να ανιχνεύεται μόνο το προϊόν της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, όταν υπερ-εκφράζεται.

Η κατασκευή του τεχνητού μικρού RNA έγινε με τη χρήση του προγράμματος WMD3 και ουσιαστικά χρησιμοποιεί το προς στόχευση γονίδιο και σχεδιάζει αλληλουχίες μήκους 21 νουκλεοτιδίων, λαμβάνοντας υπόψη κατά το σχεδιασμό τον οργανισμό από τον οποίο προέρχεται το προς στόχευση γονίδιο (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το amiRNA σχεδιάστηκε χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων από το είδος *Arabidopsis thaliana* και *Nicotiana sylvestris*, καθώς δεν υπήρξαν αποτελέσματα όταν χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* και *Solanum lycopersicum*. Η κατασκευή του amiRNA έγινε από την Μάρω Ηλιοπούλου κατά τη διπλωματική της εργασία σε φορέα pGEM και επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση και στη συνέχεια στην παρούσα εργασία κλωνοποιήθηκε το amiRNA από το φορέα αυτό στο φορέα pART7 και pART27 (εικ.3.3.1, εικ.3.3.2), για να εκφραστεί στα φυτά μέσω αγροεμποτισμού.

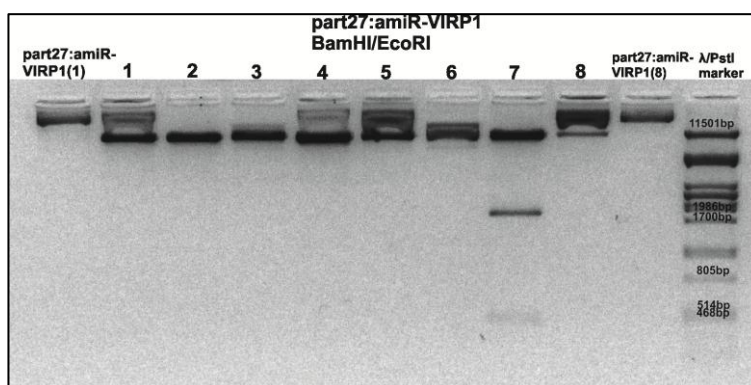
Επίσης, για να εξασφαλιστεί ότι το amiRNA θα στοχεύει μόνο την ενδογενή πρωτεΐνη και όχι τις βρόμο μεταλλάξεις, κατά την κλωνοποίηση τους εισάχθηκαν κάποιες σιωπηλές μεταλλάξεις (πιν.3.3.1, εικ. 3.2.2).

**Πίνακας 3.3.1** Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της αγρίου τύπου πρωτεΐνης και των βρόμο μεταλλαγών. Με έντονα γράμματα φαίνονται οι σιωπηλές μεταλλάξεις και με πλάγια γράμματα οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε υποκατάσταση αμινοξέως.

	<b>Νουκλεοτιδική αλληλουχία</b>
<b>Αγρίου τύπου VIRP1</b>	GCC TTG TTG TAT AAC CCT AAA ACA GAT CAA GTT AAT
<b>Κατασκευή ελέγχου του amiRNA</b>	GCC CTC TTA TAC AAT CCC AAA ACA GAT CAA GTT AAT
<b>N269A VIRP1</b>	GCC CTC TTA TAC <b>GCC</b> CCT AAA ACA GAT CAA GTT AAT
<b>N269Y VIRP1</b>	GCC CTC TTA TAC <b>TAT</b> CCT AAA ACA GAT CAA GTT AAT
<b>V275F VIRP1</b>	GCC TTG TTG TAC AAT CCC AAA ACA GAT CAA <b>TTT</b> AAT

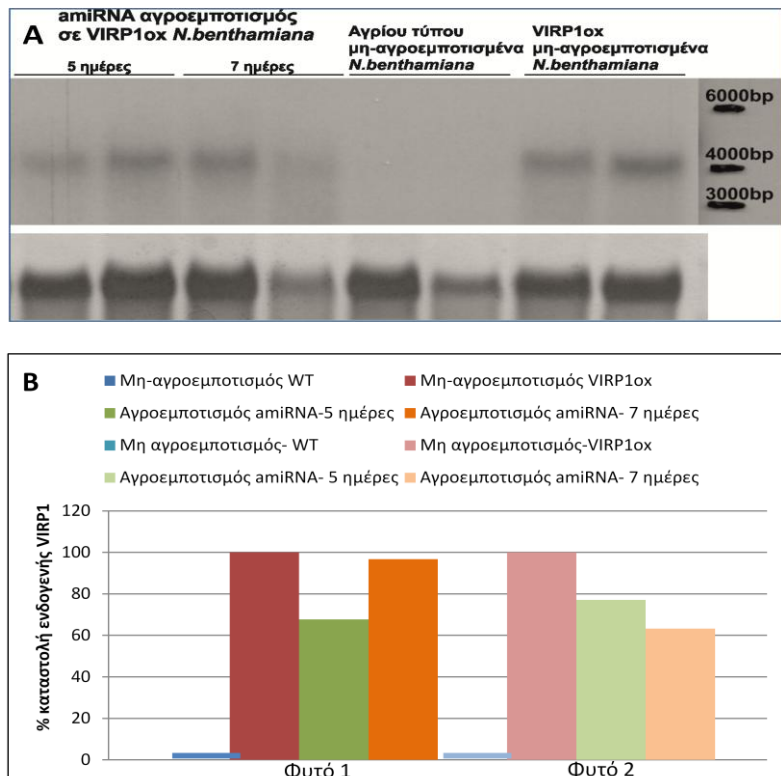


Εικόνα 3.3.1. Απεικόνιση του πλασμιδιακού χάρτη της κατασκευής amiRNA. Κατασκευή με το Vector NTI.



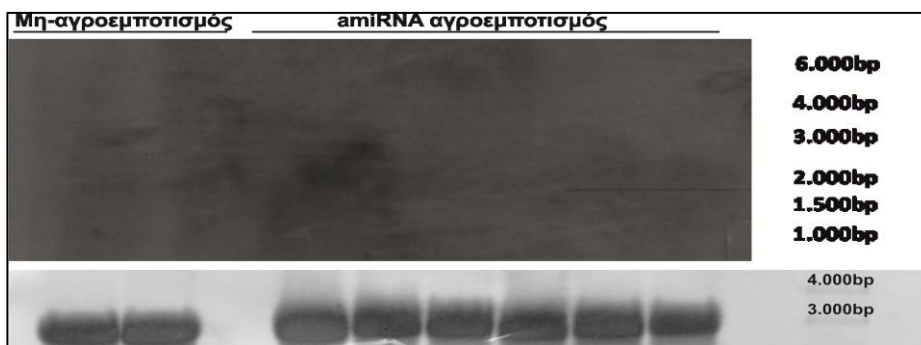
Εικόνα 3.3.2. Απεικόνιση της θετικής αποικίας *E.coli* που φέρει το πλασμίδιο με το amiRNA. Κατά την διαγνωστική πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI/EcoRI η θετική αποικία εμφανίζει προφίλ μπαντών μεγέθους 11.960, 1.850 και 424 νουκλεοτιδικές βάσεις, ενώ οι αποικίες χωρίς ένθεμα (κλειστός φορέας) 11.667 βάσεις (γραμμικό πλασμίδιο).

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η ενδογενής NbVIRP1 όντως καταστέλλεται από το amiRNA, το πλασμίδιο εκφράστηκε σε αγροβακτήρια στελέχους C58C1 και στη συνέχεια ακολούθησε αγροεμποτισμός φυτών *N. benthamiana* που υπερ-εκφράζουν τη VIRP1 (διαγονιδιακή σειρά X1/13) με τα στελέχη αυτά, ούτως ώστε να εκφραστεί παροδικά η κατασκευή, καθώς επίσης και με στελέχη C58C1 που εκφράζουν το πλασμίδιο με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), για θετικό έλεγχο στο ίδιο φύλλο. Η δειγματοληψία έγινε μετά από 5 και 7 ημέρες και ακολούθησε εκχύλιση RNA και ανάλυση κατά Northern. Παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης κατά 20% περίπου (εικ. 3.3.3,A,B).



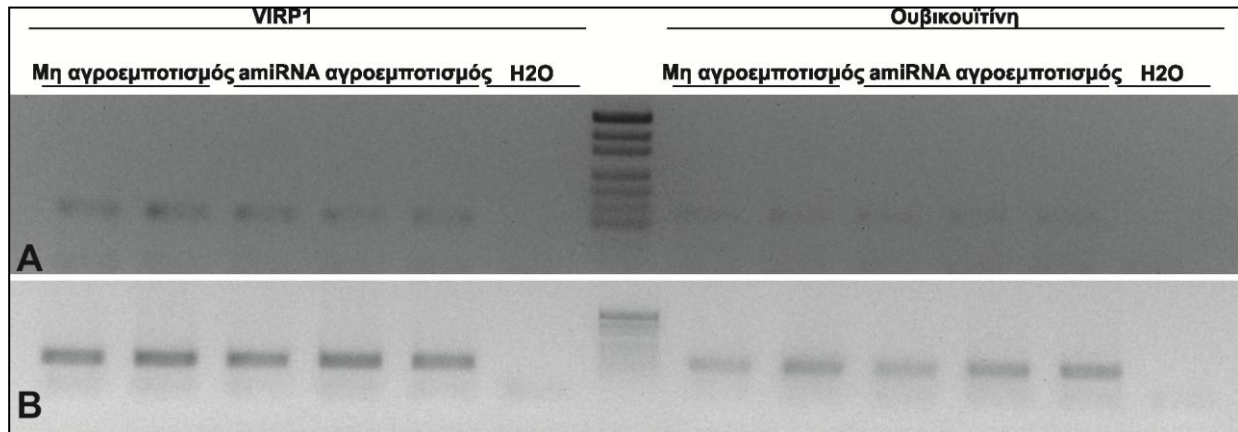
**Εικόνα 3.3.3.** Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης **VIRP1** από φυτά που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη. **A.** Ανάλυση κατά Northern των επιπέδων έκφρασης της VIRP1 μετά από έκφραση του amiRNA για 5 και 7 ημέρες (επάνω μέρος). Έγινε κανονικοποίηση των μεταγράφων της πρωτεΐνης με τη χρώση methylene blue (κάτω μέρος). **B.** Ποσοτικοποίηση των επιπέδων των μεταγράφων της VIRP1, μετά από κανονικοποίηση, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Quantity One 4.4.1 της BioRad.

Στα φυτά Χ1/13 η μείωση παρατηρείται μετά από 5-7 ημέρες καθώς είναι φυτά που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη, ενώ σε φυτά αγρίου τύπου περιμένουμε η μείωση να παρατηρείται σε λιγότερες μέρες. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε αγροεμπτισμός του amiRNA και σε φυτά *N. benthamiana* αγρίου τύπου, ούτως ώστε να προσδιοριστεί ο χρόνος που χρειάζεται για να κατασταλεί η ενδογενής πρωτεΐνη. Έγινε δειγματοληψία μετά από 3 ημέρες έκφρασης του amiRNA, έγινε εκχύλιση RNA και ανάλυση κατά Northern. Ο υβριδισμός με τη ραδιενεργά σημασμένη VIRP1 πιθανόν δεν πραγματοποιήθηκε σωστά και δεν υπάρχει σήμα έκφρασης (εικ. 3.3.4).



**Εικόνα 3.3.4.** Ανάλυση κατά Northern των επιπέδων έκφρασης της VIRP1 μετά από έκφραση του amiRNA για 3 ημέρες (πάνω μέρος) και χρώση με methylene blue (κάτω μέρος).

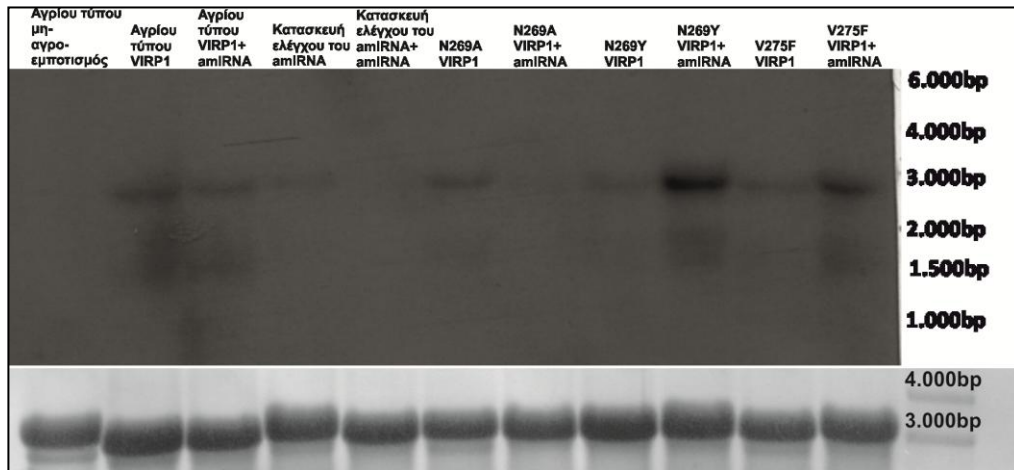
Εφόσον δεν υπήρχε σήμα έκφρασης στην ανάλυση τύπου Northern, ακολούθησε ανάστροφη μεταγραφή και ημι-ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενδογενή πρωτεΐνη και μία πρωτεΐνη ελέγχου (ουβικουΐτινη) στους 24 και 30 κύκλους (εικ. 3.3.5).



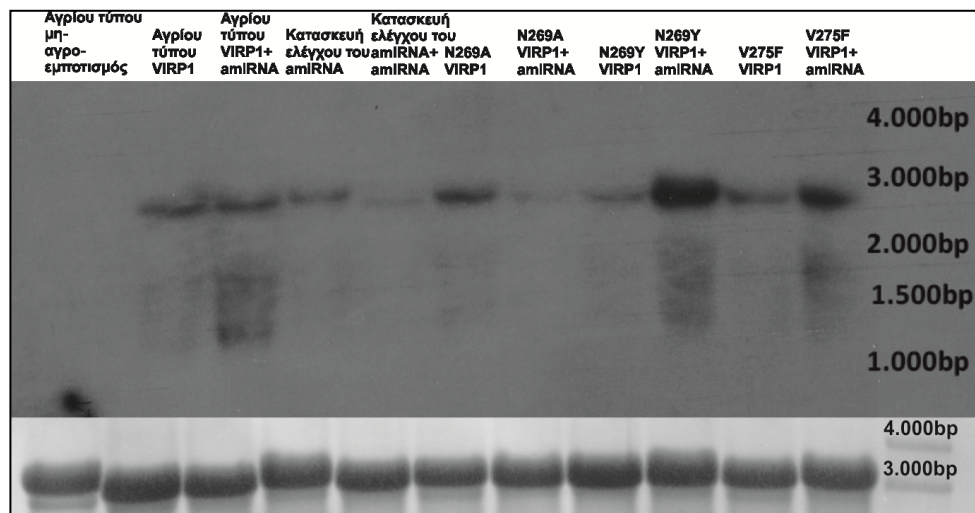
**Εικόνα 3.3.5.** Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης της ενδογενούς **VIRP1** από αγρίου τύπου φυτά *Nicotiana benthamiana*. Πραγματοποιήθηκε ανάστροφη μεταγραφή και ημι-ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο **VIRP1** (αριστερά **A, B**) και το γονίδιο ουβικουΐτινης (γονίδιο σταθερής έκφρασης με το οποίο έγινε η κανονικοποίηση, δεξιά **A, B**). **A.** 26 κύκλοι αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. **B.** 30 κύκλοι αλυσιδωτής αντίδρασης.

### 3.4 Έκφραση των επιπέδων των μεταγράφων των βρόμο-μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης VIRP1.

Μετά την κλωνοποίηση των διαφόρων βρόμο-μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης VIRP1, έγινε ανάλυση της έκφρασής τους σε επίπεδο μεταγράφων. Τα μεταλλάγματα εκφράστηκαν παροδικά σε νεαρά φύλλα αγρίου τύπου *N. benthamiana* φυτών με αγροεντοπισμό και μετά από 3 ημέρες έγινε συλλογή ιστού και ανάλυση κατά Northern, χρησιμοποιώντας ως ραδιενεργό ιχνηθέτη αλληλουχία της VIRP1 πρωτεΐνης (εικ.3.4.1) και τη GFP πρωτεΐνη (εικ.3.4.2).



Εικόνα 3.4.1. Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης VIRP1 και των διαφόρων βρόμο-μεταλλαγμάτων σε επίπεδο μεταγράφων από φυτά αγρίου τύπου. Ανάλυση κατά Northern των επιπέδων έκφρασης της VIRP1 μετά από έκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης και των διαφόρων μεταλλαγμάτων με ή χωρίς συνέκφραση του amiRNA για 3 ημέρες. Κανονικοποίηση με τη χρώση methylene blue.



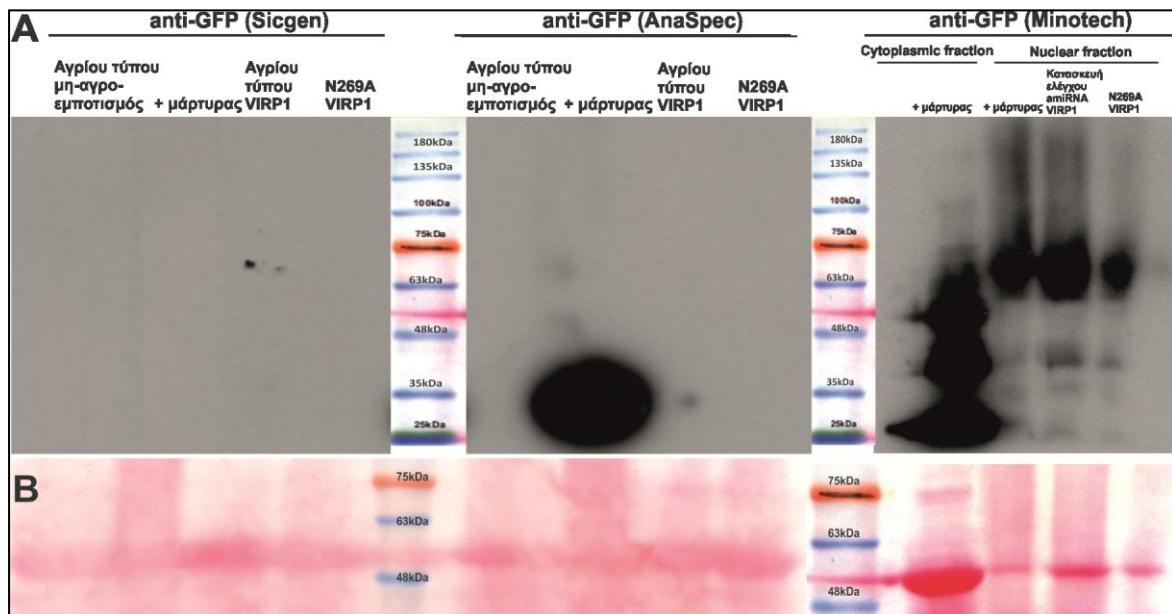
Εικόνα 3.4.2. Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης GFP:VIRP1 και των διαφόρων βρόμο-μεταλλαγμάτων σε επίπεδο μεταγράφων από φυτά αγρίου τύπου. Ανάλυση κατά Northern των επιπέδων έκφρασης της GFP μετά από έκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης και των διαφόρων μεταλλαγμάτων με ή χωρίς συνέκφραση του amiRNA για 3 ημέρες. Κανονικοποίηση με τη χρώση methylene blue.

Από τις διαφορές στην ποσότητα παρατηρείται ότι ο αγροεντοπισμός δεν είναι όμοιος σε όλα τα διάφορα μεταλλάγματα. Επίσης, δεν είναι τόσο επιτυχής καθώς τα επίπεδα έκφρασης, ειδικά της GFP πρωτεΐνης, θα έπρεπε να είναι μεγαλύτερα στις 3 μέρες. Παρόλα αυτά, παρατηρείται πως τα διάφορα μετάγραφα εκφράζονται και οι κατασκευές GFP:VIRP1 είναι άθικτες.

### 3.5 Έκφραση των επιπέδων πρωτεΐνης της αγρίου τύπου και των βρόμο-μεταλλαγμάτων της VIRP1.

Μετά την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της αγρίου τύπου και των διαφόρων μεταλλαγμάτων της VIRP1 σε επίπεδο μεταγράφων, έγινε προσπάθεια να αναλυθούν τα επίπεδα έκφρασής τους και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ούτως ώστε να διαπιστωθεί εάν οι κατασκευές είναι όντως λειτουργικές και σε επίπεδο πρωτεΐνης.

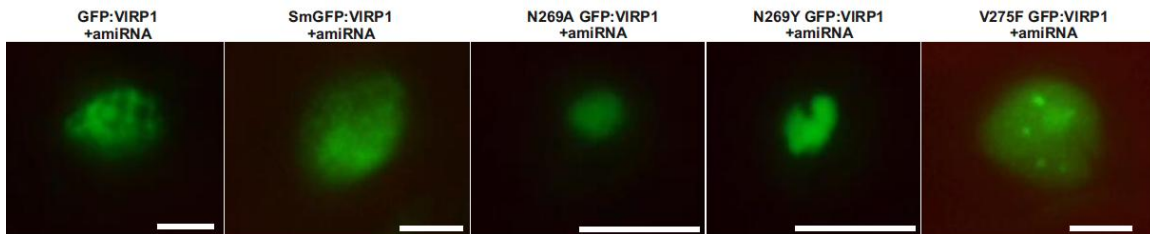
Έγιναν αρκετές προσπάθειες να ανιχνευθεί η πρωτεΐνη, τόσο σε επίπεδο πρωτεϊνικής εκχύλισης, όσο και σε επίπεδο ανάλυσης με ανοσοαποτύπωση τύπου Western. Εκτός από ολική εκχύλιση, διαχωρίστηκαν πυρήνες από κυτταρόπλασμα, ούτως ώστε να αυξηθεί το σήμα της έκφρασης, καθώς η VIRP1 δεν εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα φυτικά κύτταρα. Επίσης, δοκιμάστηκε να γίνει λύση των φυτικών κυττάρων μετά από κατεργασία με υπερήχους, στην περίπτωση που η πρωτεΐνη σχηματίζει συσσωματώματα. Κατά την ανάλυση τύπου Western, δοκιμάστηκαν διαφορετικά πρωτόκολλα αρχικά με πιο αυστηρές συνθήκες και άλλοτε με πιο χαλαρές. Ακόμη, δοκιμάστηκαν διαφορετικά πρώτα αντισώματα anti-GFP (Anaspec, Sicgen και Minotech). Στην εικόνα 3.5.1 απεικονίζονται διάφορες συνθήκες έκφρασης της πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, δεν επιτεύχθηκε η ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης.



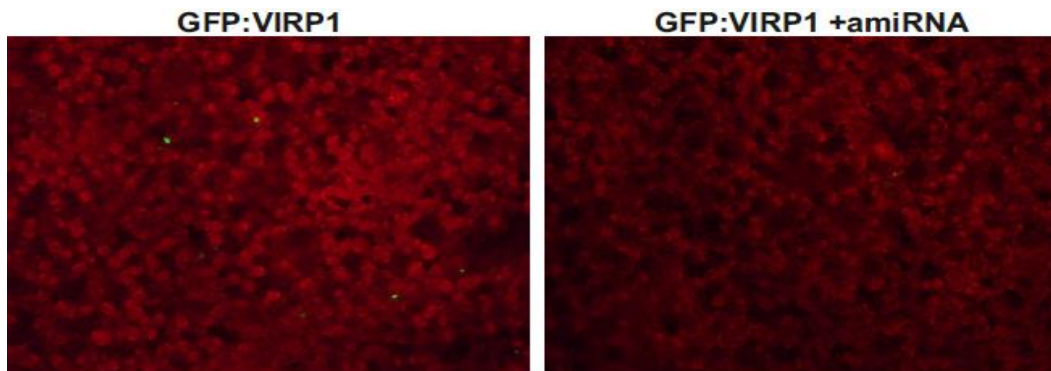
Εικόνα 3.5.1. Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης VIRP1 και των διαφόρων βρόμο-μεταλλαγμάτων σε επίπεδο πρωτεΐνης από φυτά αγρίου τύπου. **A.** Ανάλυση τύπου Western των επιπέδων έκφρασης της VIRP1 μετά από έκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης και των διαφόρων μεταλλαγμάτων για 3 ημέρες. **B.** Κανονικοποίηση με τη χρώση Ponceau.

### 3.6 Μελέτη του πυρηνικού εντοπισμού της VIRP1 κατά τη συν-έκφραση του amiRNA.

Κατά την συν-έκφραση του τεχνητού μικρού RNA (amiRNA) με την αγρίου τύπου και τα διάφορα μεταλλάγματα της VIRP1, εξετάστηκε εάν αλλάζει ο εντοπισμός της πρωτεΐνης. Σε μικροσκοπία φθορισμού φαίνεται ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται στον πυρήνα και επομένως δεν αλλάζει ο εντοπισμός της (εικ.3.6.1). Επίσης, παρατηρείται και μειωμένη έκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, όταν συν-εκφράζεται με το τεχνητό μικρό RNA, παρά όταν εκφράζεται μόνη της (εικ. 3.6.2).



Εικόνα 3.6.1. Απεικόνιση του εντοπισμού της αγρίου τύπου και των διαφόρων μεταλλαγμάτων της VIRP1, μετά από συν-έκφραση με το amiRNA. Οι εικόνες είναι με μικροσκόπιο φθορισμού. Μεγέθυνση 60x.

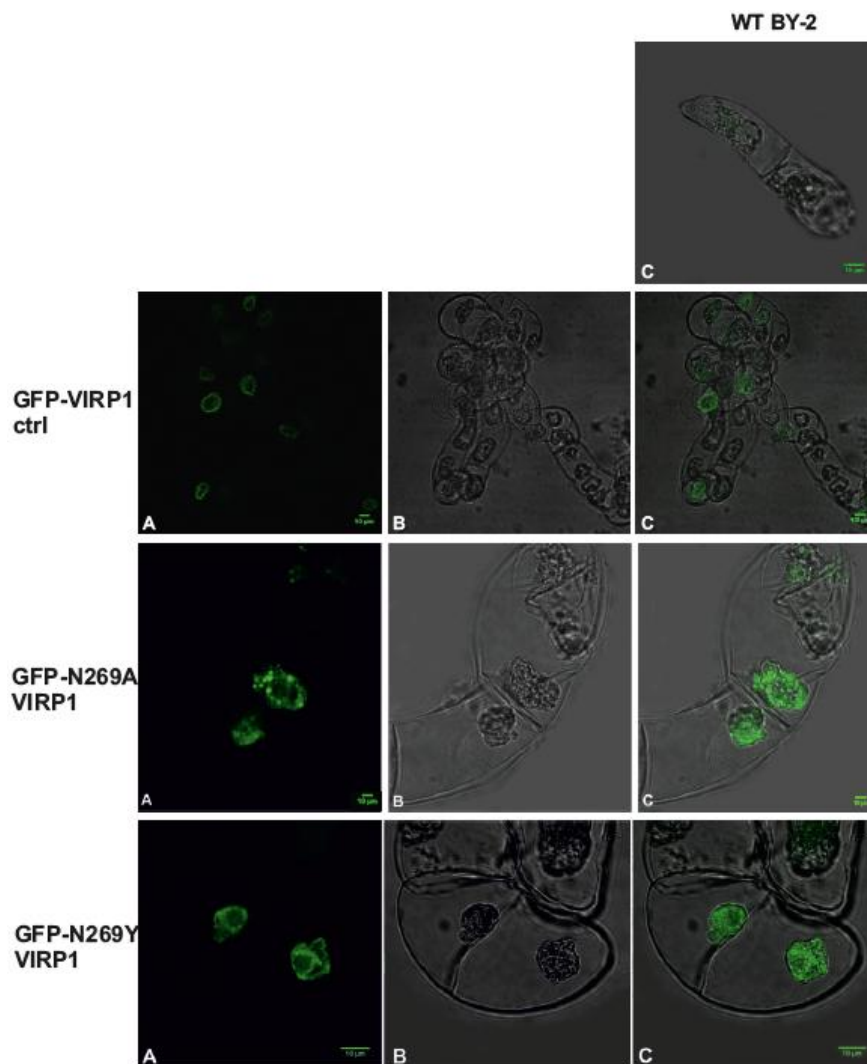


Εικόνα 3.6.2. Απεικόνιση της έκφρασης της αγρίου τύπου πρωτεΐνης. Παρατηρείται αυξημένη έκφραση της VIRP1, όταν εκφράζεται μόνη της (αριστερά), σε σχέση με όταν συν-εκφράζεται με το τεχνητό μικρό RNA (δεξιά). Οι εικόνες είναι με μικροσκόπιο φθορισμού. Μεγέθυνση 20x.

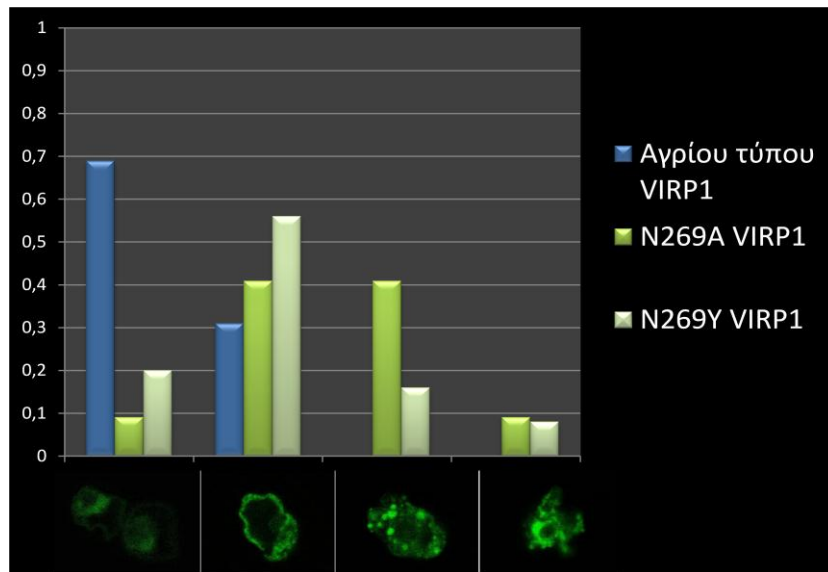


### 3.7 Εντοπισμός της VIRP1 σε σταθερή έκφραση σε BY-2 κυτταρικές σειρές.

Για να διευκρινιστεί εάν η VIRP1 όντως δημιουργεί συγκεκριμένους πυρηνικούς φαινοτύπους, που απεικονίστηκαν προηγουμένως (εικ. 1.11, 1.12) δημιουργήθηκαν κυτταρικές σειρές BY-2 με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη και τα διάφορα βρόμο-μεταλλάγματα, που εκφράζουν σταθερά τη VIRP1. Σε σταθερή έκφραση της πρωτεΐνης δεν παρατηρείται αλλαγή στον εντοπισμό των μεταλλαγμάτων και των συγκεκριμένων φαινοτύπων που αναπτύσσουν, εκτός από το μετάλλαγμα N269Y που αντιπροσωπεύεται από ένα πιο διάχυτο φαινότυπο σε σχέση με την παροδική έκφραση όπου παρατηρούνται πιο μεγάλες κηλίδες. (εικ.3.7.1, εικ. 3.7.2).



**Εικόνα 3.7.1.** Απεικόνιση των κυτταρικών σειρών που αναπτύχθηκαν. Παρατηρείται ελάχιστος αυτό-φθορισμός των αγρίου τύπου BY-2 κυτάρων (πάνω C), σε σχέση με τις διαγονιδιακές κυτταρικές σειρές (κάτω σειρές). **A.** Φθορισμός της GFP:VIRP1. **B.** Οπτική εικόνα των διαγονιδιακών κυττάρων. **C.** Εικόνα συνένωσης A και B. Οι εικόνες έχουν παρθεί με συνεστιακή μικροσκοπία (SP8 CLSM, Leica). Κλίμακα 10μm. Μεγέθυνση 63x.



**Εικόνα 3.7.2. Μέτρηση των φαινοτύπων της αγρίου τύπου και N269A και N269Y πυρηνικής VIRP1 των διαγονιδιακών BY-2 κυττάρων.** Παρατηρούνται τέσσερις κύριοι φαινότυποι και τα αντίστοιχα ποσοστά της κάθε κατασκευής. Μετρήθηκαν 29 κύτταρα αγρίου τύπου, 22 N269A και 25 N269Y BY-2. Οι φωτογραφίες έχουν παρθεί με συνεστιακή μικροσκοπία (SP8 CLSM, Leica). Μεγέθυνση 63x.

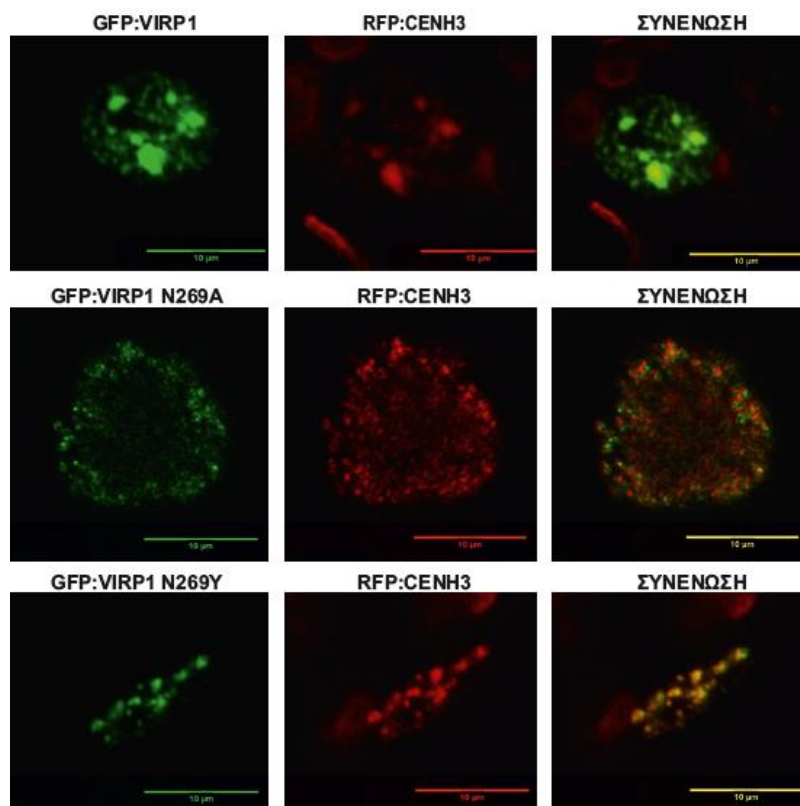
### 3.8 Συν-εντοπισμός της VIRP1 με πρωτεΐνες-δείκτες σε υπο-πυρηνικούς τόπους.

Η VIRP1 είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη, παρόλα αυτά δεν είναι γνωστό σε ποιο ή ποια ακριβώς υπο-πυρηνικά διαμερίσματα βρίσκεται η πρωτεΐνη. Για το λόγο αυτό, η VIRP1 εκφράστηκε μαζί με κάποιες πρωτεΐνες-δείκτες συγκεκριμένων πυρηνικών διαμερισμάτων σε νεαρά φύλλα αγρίου τύπου *Nicotiana benthamiana* φυτών (Πίν. 3.8.1)

**Πίνακας 3.8.1.** Πρωτεΐνες-δείκτες συγκεκριμένων υπο-πυρηνικών διαμερισμάτων.

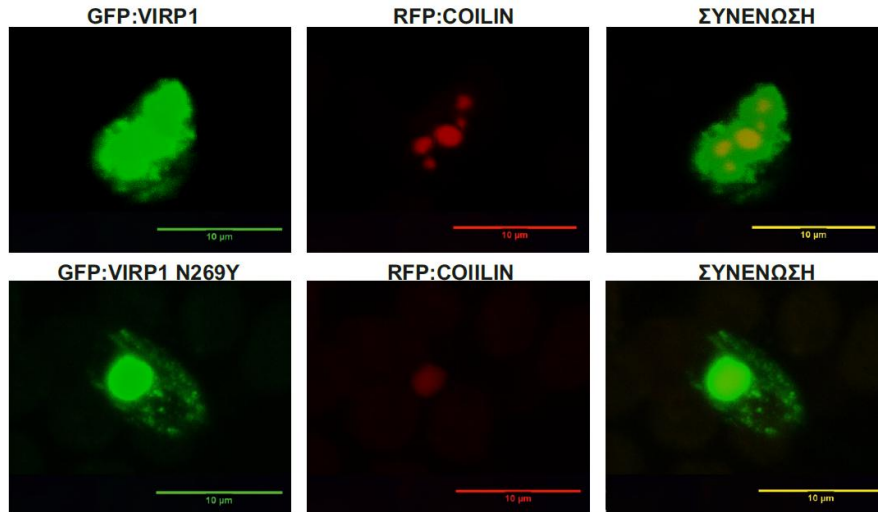
Πρωτεΐνες-Δείκτες	Υπο-πυρηνικός εντοπισμός
Centromeric H3 (CENH3)	Νουκλεοσώματα λειτουργικών κεντρομερών κατά τη μείωση και τη μίτωση
Coilin	Cajal σώματα (Ogg and Lamond, 2002)
ALY/REF export factor 2 (ALYREF2)	Πυρηνικές κηλίδες, κυτταρόπλασμα (UniProtKB/Swiss-Prot)
SRM160	Πυρηνική μήτρα, πυρηνικές κηλίδες (UniProtKB/Swiss-Prot)

Κατά τη μίτωση και μείωση των κυττάρων, η κανονική ιστόνη 3 αντικαθίσταται από την κεντρομερή ιστόνη H3 (CENH3) στα νουκλεοσώματα των φυσιολογικών κεντρομερών (Dunemann *et al.*, 2014). Η αγρίου τύπου VIRP1 φαίνεται ότι συν-εντοπίζεται με την CENH3 στα κεντρομερή των νουκλεοσωμάτων, ενώ τα μεταλλάγματα N269A και N269Y δε συνεντοπίζονται, παρά μόνο σε ένα μικρό βαθμό (εικ.3.8.1).



**Εικόνα 3.8.1.** Συν-εντοπισμός της VIRP1 με την κεντρομερή ιστόνη H3 (CENH3). **Επάνω.** Η αγρίου τύπου VIRP1 συν-εντοπίζεται απόλυτα με την CenH3. **Μέση.** Το μετάλλαγμα N269A VIRP1 δε συν-εντοπίζεται στο μεγαλύτερο μέρος με την CenH3. **Κάτω.** Το μετάλλαγμα N269Y VIRP1 συν-εντοπίζεται απόλυτα με την CenH3. Οι φωτογραφίες είναι με συνεστιακή μικροσκοπία (SP1 CLSM, Leica). **Αριστερά.** Φθορισμός της GFP:VIRP1 (εκπομπή 510-530nm). **Μέση.** Φθορισμός της RFP:CENH3 (εκπομπή 570-600nm). **Δεξιά.** Συνένωση των δύο φθορισμών. Κλίμακα 10μm. Μεγέθυνση 63x.

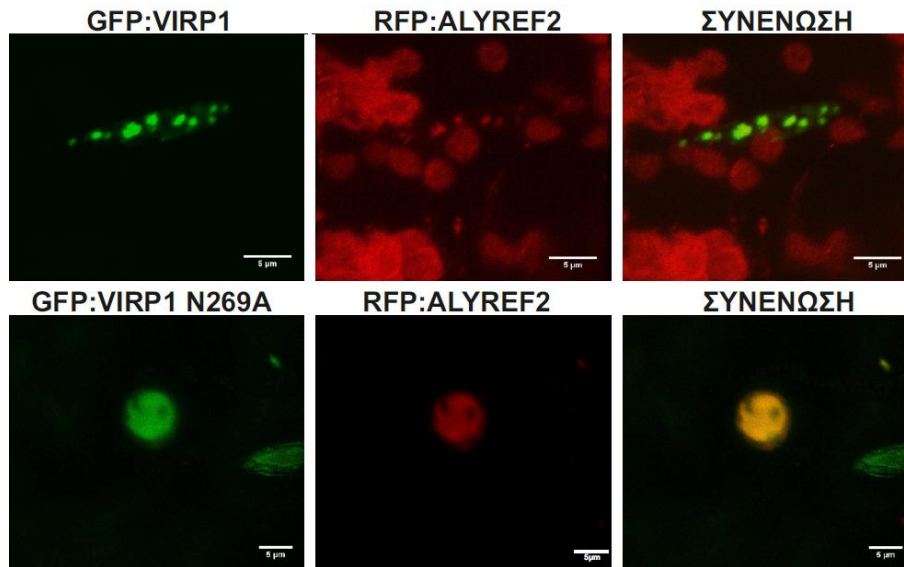
Η πρωτεΐνη COILIN βρίσκεται στα Cajal σώματα, τα οποία είναι άφθονα σε κύτταρα που εμφανίζουν υψηλή μεταγραφική δραστηριότητα. Είναι δυναμικές δομές που απαντούν σε κυτταρικές, περιβαλλοντικές και αλλαγές στα επίπεδα σύνθεσης RNA νουκλεϊκών οξέων, αλλά και συναρμολόγησης των ριβονουκλεοπρωτεϊνών (Ogg and Lamond, 2002). Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.8.2, η VIRP1 δε συν-εντοπίζεται με την COILIN παρά μόνο σε ένα πολύ μικρό μέρος της.



**Εικόνα 3.8.2. Η VIRP1 δε συν-εντοπίζεται με την πρωτεΐνη COILIN.** Η COILIN εκφράζεται σε ένα μέρος μόνο όπου εκφράζεται η αγρίου τύπου VIRP1 (επάνω) και το μετάλλαγμα N269Y VIRP1 (κάτω), και επομένως δεν υπάρχει συν-εντοπισμός των δυο πρωτεϊνών. Οι φωτογραφίες είναι με συνεστιακή μικροσκοπία (SP1 CLSM, Leica). **Αριστερά.** Φθορισμός της GFP:VIRP1 (εκπομπή 510-530nm). **Μέση.** Φθορισμός της RFP:COILIN (εκπομπή 570-600nm). **Δεξιά.** Συνένωση των δύο φθορισμών. Κλίμακα 10μm. Μεγέθυνση 63x.

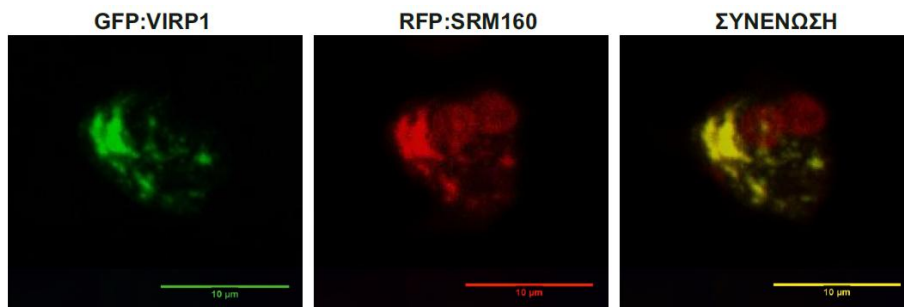
Η ALY/REF2 είναι μία θερμοσταθερή, πυρηνική πρωτεΐνη που λειτουργεί ως μοριακή βοηθός. Πιστεύεται ότι ρυθμίζει το διμερισμό μεταγραφικών παραγόντων που περιέχουν βασικά μοτίβα φερμουάρ λευκίνης, την πρόσδεση του DNA και της μεταγραφικής δραστηριότητας των βασικών περιοχών- φερμουάρ λευκίνης (bZIP) πρωτεϊνών (RefSeq, Ιούλιος 2008). Εντοπίζεται στις πυρηνικές κηλίδες (nuclear speckles) και γύρω από αυτές (perispeckles), όπου πιστεύεται ότι συμβαίνει ο σχηματισμός του TREX συμπλέγματος. Οι πυρηνικές κηλίδες είναι υπο-πυρηνικές δομές, πλούσιες σε παράγοντες ματίσματος προ-αγγελιοφόρων μεταγράφων και εντοπίζονται στις περιοχές του νουκλεοπλάσματος μεταξύ της χρωματίνης στα κύτταρα των θηλαστικών (Lamond and Spector, 2003). Είναι δυναμικές δομές και τα πρωτεϊνικά συστατικά και τα συμπλέγματα RNA-πρωτεΐνης της μπορούν να μεταβαίνουν συνεχώς μεταξύ των κηλίδων και άλλων πυρηνικών περιοχών, συμπεριλαμβανομένου και ενεργών θέσεων μεταγραφής. Ως εκ τούτου, οι πυρηνικές κηλίδες θεωρούνται περιοχές αποθήκευσης και συναρμολόγησης, που προμηθεύουν παράγοντες ματίσματος σε ενεργές θέσεις της μεταγραφής. Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση, τα ενεργώς μεταγραφικά κύτταρα έχουν μικρότερες και περισσότερες κηλίδες, ενώ η αναστολή της μεταγραφής ή του ματίσματος οδηγεί στη συσσώρευση παραγόντων του ματίσματος και άρα μεγαλύτερες κηλίδες (Reddy *et al.*, 2012).

Επίσης, η πρωτεΐνη ALY/REF2 “ταξιδεύει” και στο κυτταρόπλασμα ως μέρος του συμπλέγματος διασταύρωσης εξωνίου (EJC), συνδεδεμένο με τα μετάγραφα RNAs (UniProtKB/Swiss-Prot). Με συνεστιακή μικροσκοπία φαίνεται ότι η ALYREF2 συν-εντοπίζεται απόλυτα με την υπό μελέτη πρωτεΐνη (εικ. 3.8.3).



**Εικόνα 3.8.3. Συν-εντοπισμός της VIRP1 με την πρωτεΐνη ALYREF2.** **Επάνω.** Η αγρίου τύπου VIRP1 συν-εντοπίζεται απόλυτα με την ALYREF2. **Κάτω.** Το μετάλλαγμα N269Y VIRP1 συν-εντοπίζεται απόλυτα με την ALYREF2. Οι φωτογραφίες είναι με συνεστιακή μικροσκοπία (SP1 CLSM, Leica). **Αριστερά.** Φθορισμός της GFP:VIRP1 (εκπομπή 510-530nm). **Μέση.** Φθορισμός της RFP:ALYREF2 (εκπομπή 570-600nm). **Δεξιά.** Συνένωση των δύο φθορισμών. Κλίμακα 5μm. Μεγέθυνση 63x.

Η πρωτεΐνη SRM160 είναι μέρος του πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος ριβονουκλεοπρωτεϊνών που συμμετέχουν σε πολλές εκδηλώσεις επεξεργασίας των προ-αγγελιοφόρων μεταγράφων (pre-mRNAs). Προωθεί τη συστατική και την εξαρτώμενη από ενισχυτές (ESE) ενεργοποίηση του ματίσματος, γεφυρώνοντας ειδικές αλληλουχίες (πρωτεΐνες της οικογένειας SR, όπως SFRS4, SFRS5 και TRA2B/SFRS10) με βασικούς παράγοντες μικρών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών σωματιδίων (όπως τα SNRP70 και SNRPA1) των σωματίων συναρμογής (UniProtKB/Swiss-Prot). Η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται στην πυρηνική μήτρα και στις πυρηνικές κηλίδες και φαίνεται ότι συν-εντοπίζεται με την αγρίου τύπου VIRP1 (εικ.3.8.4).



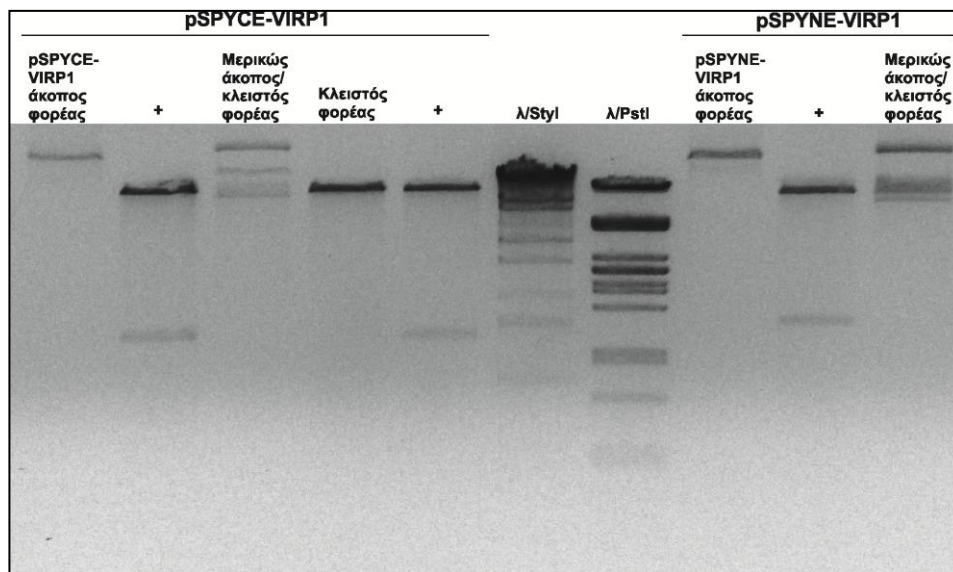
**Εικόνα 3.8.4. Συν-εντοπισμός της αγρίου τύπου VIRP1 με την πρωτεΐνη SRM160.** Οι φωτογραφίες είναι με συνεστιακή μικροσκοπία (SP1 CLSM, Leica). **Αριστερά.** Φθορισμός της GFP:VIRP1 (εκπομπή 510-530nm). **Μέση.** Φθορισμός της RFP:SRM160 (εκπομπή 570-600nm). **Δεξιά.** Συνένωση των δύο φθορισμών. Τα κόκκινα που φαίνονται στη μεσαία και δεξιά εικόνα είναι χλωροπλάστες, που διεγείρονται στο μήκος κύματος της RFP, εξαιτίας της χλωροφύλλης που περιέχουν. Κλίμακα 10μm. Μεγέθυνση 63x.

### 3.9 Δημιουργία κατασκευών για να διευκρινιστεί εάν η VIRP1 λειτουργεί ως μονομερές ή διμερές σύμπλοκο;

Οι πυρηνικοί φαινότυποι της πρωτεΐνης, που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο, εφόσον δεν οφείλονται στο γεγονός ότι τα κύτταρα βρίσκονται σε διαφορετική φάση του κυτταρικού κύκλου, είναι πιθανό αρκετά μόρια πρωτεΐνης να συγκεντρώνονται στο συγκεκριμένο σημείο. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκε ένα πείραμα συμπληρωματικού διμοριακού φθορισμού (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC).

Πιο συγκεκριμένα, το αμινοτελικό τμήμα της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (YFP), το οποίο είναι συνδεδεμένο με την μία υπό εξέταση πρωτεΐνη θα έρθει κοντά με το καρβοξυτελικό τμήμα της YFP, που είναι συνδεδεμένο με την άλλη υπό εξέταση πρωτεΐνη και επομένως θα υπάρξει φθορισμός. Στη δική μας περίπτωση, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση της NbVIRP1 με το αμινοτελικό τμήμα της YFP (1-465 νουκλεοτίδια) και με το καρβοξυτελικό τμήμα της YFP (466-720 νουκλεοτίδια), προκειμένου να διευκρινιστεί εάν η πρωτεΐνη λειτουργεί ως μονομερές ή διμερές σύμπλοκο.

Η κλωνοποίηση βασίστηκε σε φορείς κλωνοποίησης από την εργασία των Walter M. και συνεργατών (2004) και των Mathioudakis M.M. και συνεργατών (2012) που μας δόθηκαν από το εργαστήριο του Λιβιεράτου (MAICH, Chania, Greece) και περιγράφεται στην ενότητα 2.2.3. Οι θετικές αποικίες ελέγχθηκαν με πέψεις περιορισμού (εικ. 3.9.1).



**Εικόνα 3.9.1.** Απεικόνιση της θετικής αποικίας *E.coli* που φέρει τα πλασμίδια με τα pSPYNE-VIRP1 και pSPYCE-VIRP1. Κατά την διαγνωστική πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI η θετική αποικία pSPYNE-VIRP1 εμφανίζει προφίλ μπαντών μεγέθους 13.169 και 1503 νουκλεοτιδικές βάσεις, ενώ οι αποικίες με ανεστραμμένο το ένθεμα 12.846 και 1.826 βάσεις και ο κλειστός φορέας 14.672 βάσεις. Οι θετικές αποικίες pSPYCE-VIRP1 εμφανίζουν προφίλ μπαντών μεγέθους 13.169 και 1.290 βάσεις, οι αποικίες με ανεστραμμένο το ένθεμα 12.846 και 1.613 βάσεις, ενώ ο κλειστός φορέας 14.459 βάσεις.

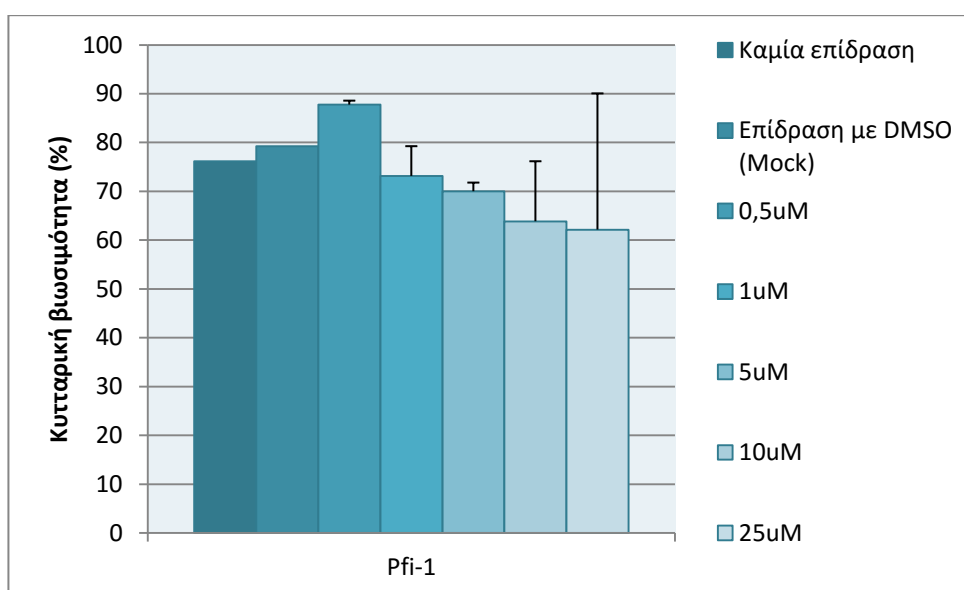
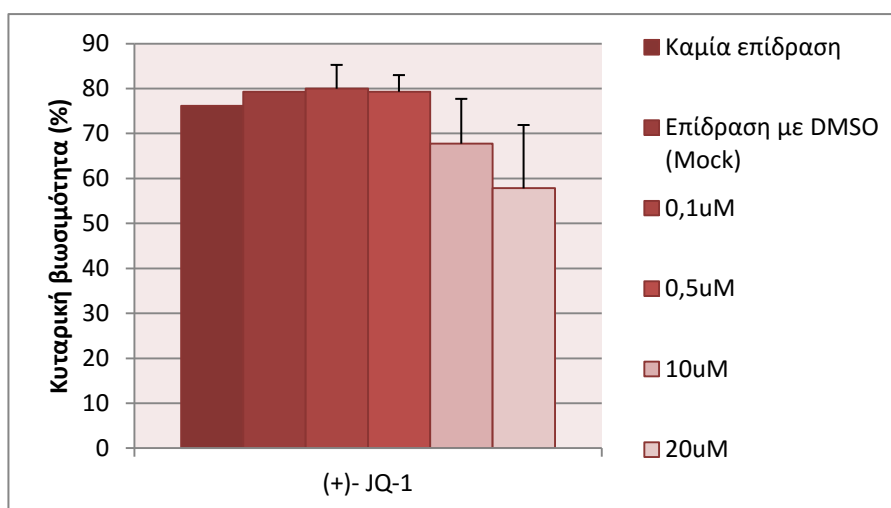
Μετά τη δημιουργία των κατασκευών, οι φορείς με το ένθεμα στάλθηκαν για αλληλούχιση, και παράλληλα πραγματοποιήθηκαν κάποια αρχικά πειράματα αγροεντοπισμού με συνδυασμούς των κατασκευών (πιν. 3.9.1). Παρόλα αυτά, όταν ήρθαν τα αποτελέσματα της αλληλούχισης φαινόταν ότι δεν είχε μπει το σωστό ένθεμα, ενώ με blast φάνηκε ότι μπήκε μία αλληλουχία της *N. benthamiana* αλλά όχι η VIRP1. Επομένως πραγματοποιήθηκε ξανά η κλωνοποίηση από την αρχή και στάλθηκε ξανά για αλληλούχιση, αλλά αυτή τη φορά το διάβασμα ήταν χαμηλής ποιότητας. Επομένως, μέχρι το πέρας του μεταπτυχιακού μου, δεν υπήρχε χρόνος να αποσαφηνιστεί εάν η πρωτεΐνη λειτουργεί ως μονομερές ή διμερές.

**Πίνακας 3.9.1.** Οι συνδυασμοί αγροεμπιοτισμού για να διεκρινιστεί εάν η VIRP1 λειτουργεί ως μονομερές ή διμερές σύμπλοκο.

Συνδυασμοί αγροεμπιοτισμού	Αναμενόμενο αποτέλεσμα
pSPYNE + pSPYCE	(-) μάρτυρας, όχι φθορισμός
pSPYNE-VIRP1 + pSPYCE	(-) μάρτυρας, όχι φθορισμός
pSPYNE + pSPYCE-VIRP1	(-) μάρτυρας, όχι φθορισμός
pSPYNE-VIRP1 + pSPYCE-VIRP1	Δείγμα υπό εξέταση, Μονομερές: όχι φθορισμός Διμερές: φθορισμός

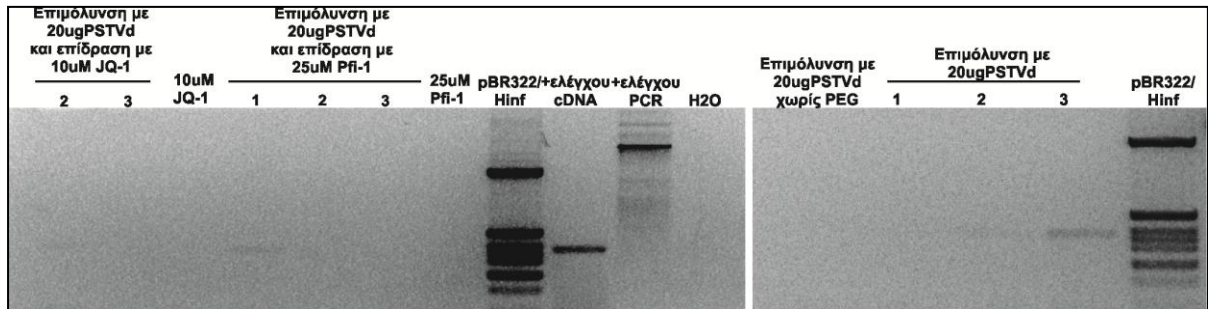
### 3.10 Λειτουργία των βρόμο-επικρατειών

Θέλοντας να εξεταστεί η λειτουργία των βρόμο-επικρατειών, πραγματοποιήθηκε επίδραση των BY-2 αγρίου τύπου κυττάρων με τους γνωστούς στα θηλαστικά αναστολείς της επικράτειας, (+) - JQ-1 και Pfi-1. Χρησιμοποιήθηκαν αρκετές διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις των δύο αναστολών και μετρήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων αυτών με χρώση Trypan blue (εικ.3.10.1). Δεν παρατηρήθηκε νέκρωση των κυττάρων, παρά μόνο σε μικρό ποσοστό.



**Εικόνα 3.10.1. Απεικόνιση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από επίδραση με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις των (+)- JQ-1 και Pfi-1.** Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Trypan blue. Μέτρηση τουλάχιστον 400 κυττάρων για κάθε συγκέντρωση στο οπτικό μικροσκόπιο.

Ακόμη, για να διευκρινιστεί εάν η βρόμο-επικράτεια είναι η απαραίτητη για τη μόλυνση με το ιοειδές PSTVd, πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση των κυττάρων με το ιοειδές και παράλληλα επίδραση με μία επιλεγμένη συγκέντρωση αναστολέων. Ακολούθησε απομόνωση ριβονουκλεϊκού οξέος και ανάστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (εικ.3.10.2). Η επιμόλυνση με το ιοειδές ήταν επιτυχής (εικ. 3.10.2 δεξιά 2 και 3), ενώ κατά την παράλληλη επιμόλυνση και ταυτόχρονη επίδραση με τους αναστολείς η ζώνη του ριβονουκλεϊκού οξέος του ιοειδούς (359 βάσεις) δε φαίνεται να εξαφανίζεται και επομένως τα κύτταρα μολύνονται κανονικά (εικ.3.10.2 αριστερά).

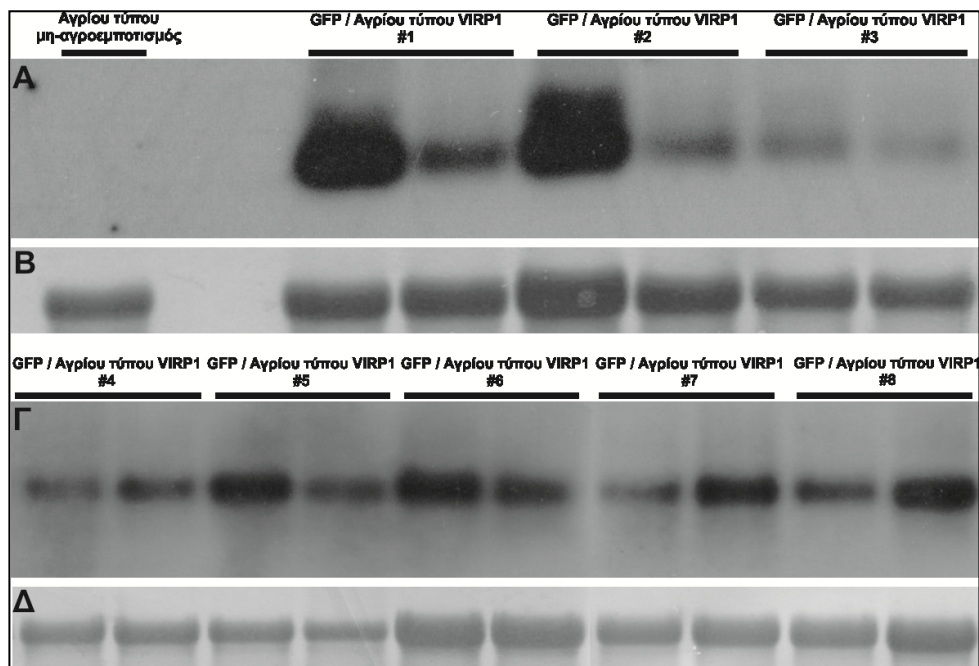


**Εικόνα 3.10.2. Απεικόνιση της επίδρασης με τους αναστολείς των βρόμο-επικρατειών στην επιμόλυνση με το ιοειδές PSTVd.**

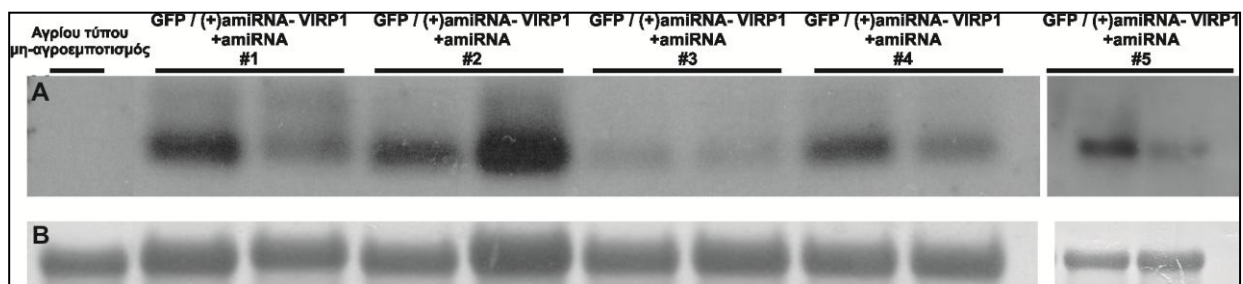


### 3.11 Τα βρόμο-μεταλλάγματα της VIRP1 επηρεάζουν τη μόλυνση με το ιοειδές ή/και η μόλυνση επηρεάζει τον εντοπισμό της πρωτεΐνης;

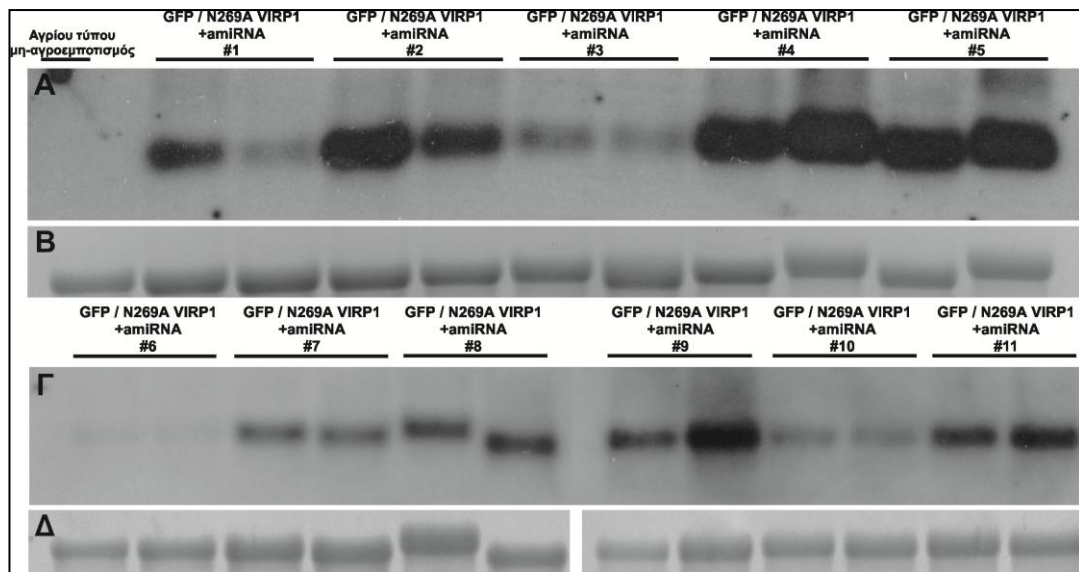
Είναι γνωστό ότι σε σταθερή υπό-έκφραση της VIRP1 το ιοειδές PSTVd δεν καταφέρνει να μολύνει τα φυτά αυτά (Kalantidis *et al.*, 2007). Θέλοντας να ανακαλύψουμε τι γίνεται σε μία ήδη επικρατούσα μόλυνση, πραγματοποιήθηκε αγροεμποτισμός της αγρίου τύπου και των βρόμο-μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης σε νεαρά φύλλα *Nicotiana benthamiana*, τα οποία ήταν ήδη μολυσμένα με το ιοειδές τρεις εβδομάδες. Ο αγροεμποτισμός έγινε στο μισό μέρος του φύλλου, ενώ στο άλλο μισό έγινε αγροεμποτισμός με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) που δεν επηρεάζει τη μόλυνση, ούτως ώστε να μετρηθεί το ποσοστό της μόλυνσης του φύλλου αυτού και αν υπάρχει κάποια αλλαγή με την VIRP1 (εικ.3.11.1, 3.11.2, 3.11.3, 3.11.4, 3.11.5, 3.11.6, 3.11.7). Δεν παρατηρείται σταθερή τάση στην αυξομείωση της μόλυνσης μετά από παροδική έκφραση για τρεις ημέρες των μεταλλαγμάτων N269A, N269Y και V275F, καθώς επίσης και της κατασκευής ελέγχου του amiRNA και επομένως δεν μπορούμε να συνάγουμε κάποιο συμπέρασμα.



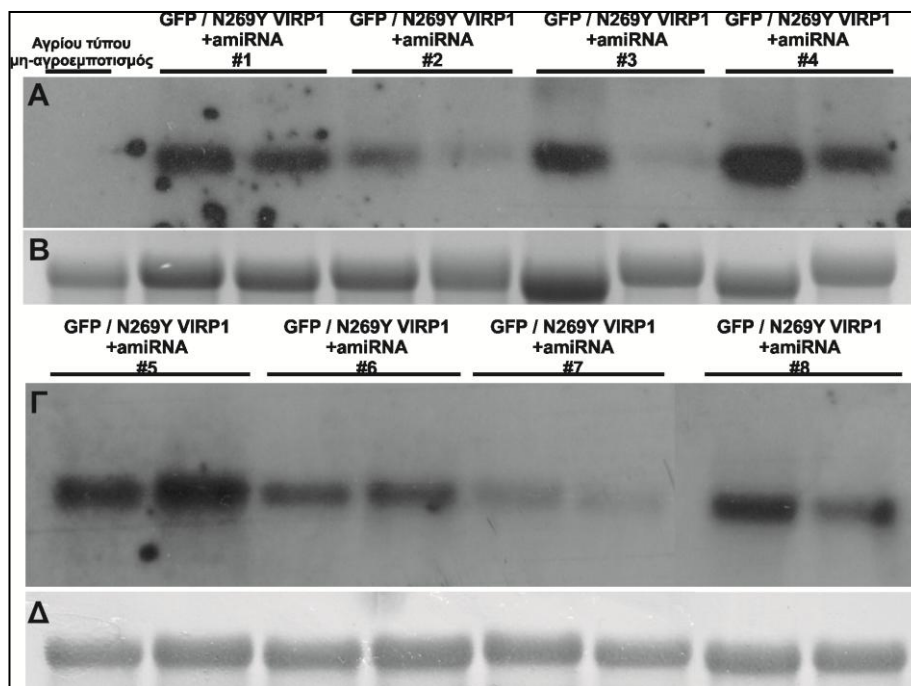
Εικόνα 3.11.1. Απεικόνιση των επιπέδων της μόλυνσης με το PSTVd μετά από αγροεμποτισμό με την αγρίου τύπου VIRP1 στις τρεις εβδομάδες μόλυνσης σε φυτά αγρίου τύπου. Α, Γ. Ανάλυση κατά Northern των επιπέδων μόλυνσης με το ριβονουκλεϊκό οξύ του PSTVd (+ RNA). Β, Δ. Κανονικοποίηση με τη χρώση methylene blue. Πραγματοποιήθηκαν 8 επαναλήψεις, τεχνικές και βιολογικές (#1,2,3 και #4,5,6,7,8).



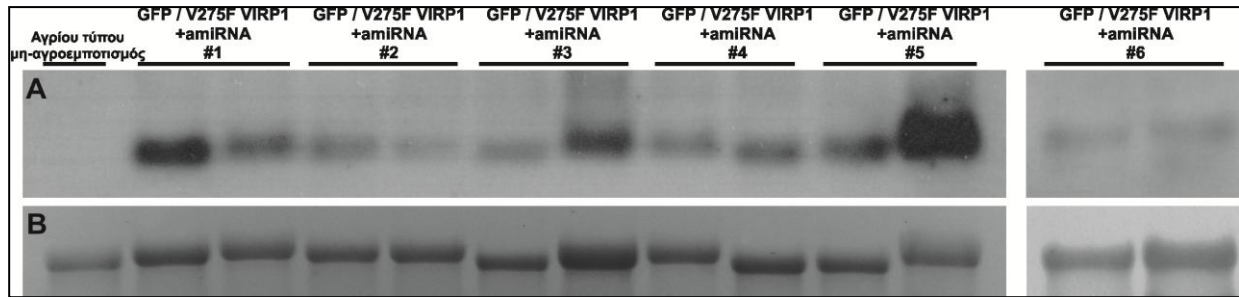
Εικόνα 3.11.2. Απεικόνιση των επιπέδων της μόλυνσης με το PSTVd μετά από συν-αγροεμποτισμό της κατασκευής ελέγχου του amiRNA VIRP1 μαζί με το amiRNA στις τρεις εβδομάδες μόλυνσης σε φυτά αγρίου τύπου. Α. Ανάλυση κατά Northern των επιπέδων μόλυνσης με το ριβονουκλεϊκό οξύ του PSTVd (+ RNA). Β. Κανονικοποίηση με τη χρώση methylene blue. Πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις, τεχνικές και βιολογικές (#1,2,3,4 και #5).



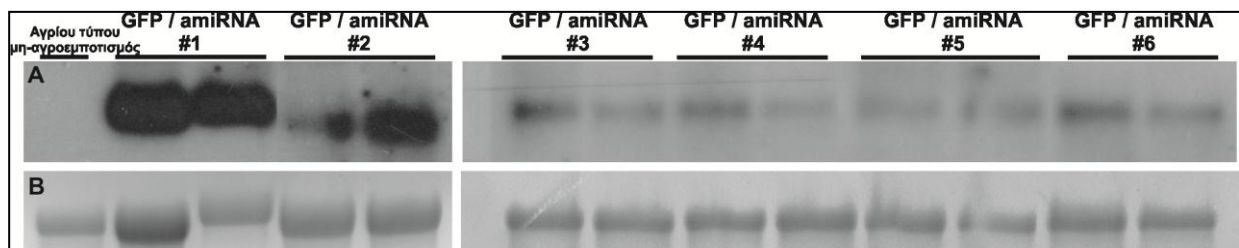
Εικόνα 3.11.3. Απεικόνιση των επιπέδων της μόλυνσης με το PSTVd μετά από συν-αγροεμπότισμό της N269A VIRP1 μαζί με το amiRNA στις τρεις εβδομάδες μόλυνσης σε φυτά αγρίου τύπου. Α, Γ. Ανάλυση κατά Northern των επιπέδων μόλυνσης με το ριβονουκλεϊκό οξύ του PSTVd (+ RNA). Β, Δ. Κανονικοποίηση με τη χρώση methylene blue. Πραγματοποιήθηκαν έντεκα επαναλήψεις, τεχνικές και βιολογικές (#1,2,3,4,5 και #6,7,8,9,10,11).



Εικόνα 3.11.4. Απεικόνιση των επιπέδων της μόλυνσης με το PSTVd μετά από συν-αγροεμπότισμό της N269Y VIRP1 μαζί με το amiRNA στις τρεις εβδομάδες μόλυνσης σε φυτά αγρίου τύπου. Α, Γ. Ανάλυση κατά Northern των επιπέδων μόλυνσης με το ριβονουκλεϊκό οξύ του PSTVd (+ RNA). Β, Δ. Κανονικοποίηση με τη χρώση methylene blue. Πραγματοποιήθηκαν οχτώ επαναλήψεις, τεχνικές και βιολογικές (#1,2,3,4, και #5,6,7,8).

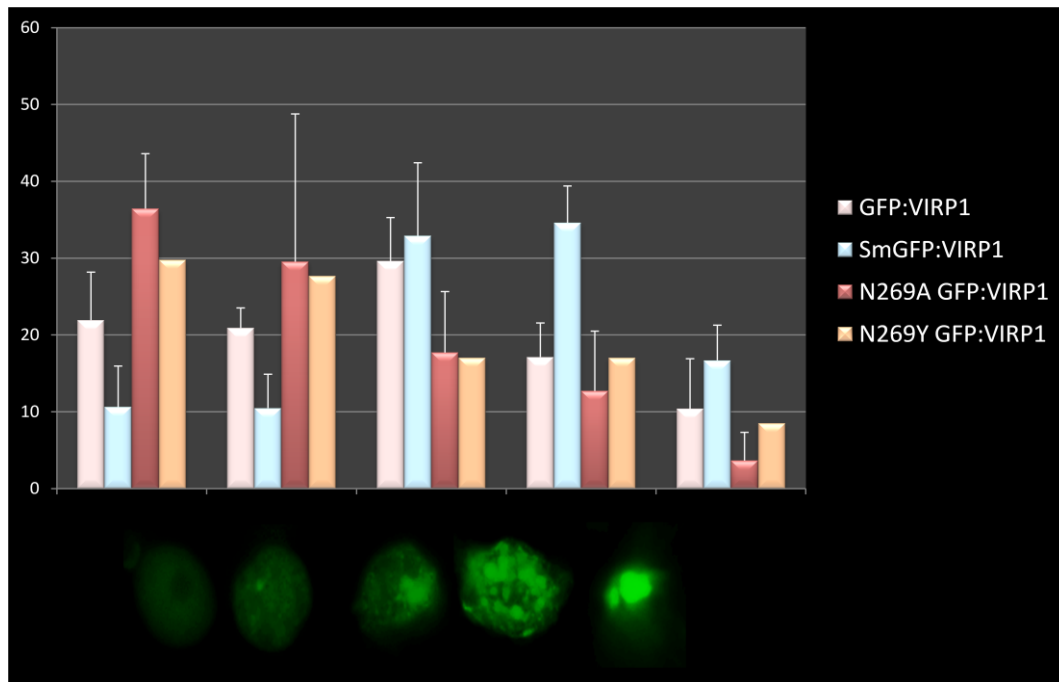


**Εικόνα 3.11.5.** Απεικόνιση των επιπέδων της μόλυνσης με το PSTVd μετά από συν-αγροεμπότισμό της V275F VIRP1 μαζί με το amiRNA στις τρεις εβδομάδες μόλυνσης σε φυτά αγρίου τύπου. **A.** Ανάλυση κατά Northern των επιπέδων μόλυνσης με το ριβονουκλεϊκό οξύ του PSTVd (+ RNA). **B.** Κανονικοποίηση με τη χρώση methylene blue. Πραγματοποιήθηκαν έξι επαναλήψεις, τεχνικές και βιολογικές (#1,2,3,4,5 και #6).



**Εικόνα 3.11.6.** Απεικόνιση των επιπέδων της μόλυνσης με το PSTVd μετά από αγροεμπότισμό του amiRNA στις τρεις εβδομάδες μόλυνσης σε φυτά αγρίου τύπου. **A.** Ανάλυση κατά Northern των επιπέδων μόλυνσης με το ριβονουκλεϊκό οξύ του PSTVd (+ RNA). **B.** Κανονικοποίηση με τη χρώση methylene blue. Πραγματοποιήθηκαν έξι επαναλήψεις, τεχνικές και βιολογικές (#1,2 και #3,4,5,6).

Από την άλλη πλευρά εξετάστηκε εάν η μόλυνση τριών εβδομάδων με το ιοειδές σε φυτά αγρίου τύπου *N. benthamiana* επηρεάζει τον εντοπισμό και τους συγκεκριμένους φαινοτύπους της πρωτεΐνης και των μεταλλαγμάτων της. Όπως φαίνεται από την εικόνα 3.11.7, παρατηρείται αλλαγή στο φαινότυπο της αγρίου τύπου πρωτεΐνης που από διάχυτο φαινότυπο, αποκτά έναν πιο “spotty” πυρηνικό φαινότυπο μετά τη μόλυνση. Παρόμοια, και τα βρόμο-μεταλλάγματα N269A και N269Y μετά τη μόλυνση με το ιοειδές αποκτούν έναν πιο διάχυτο φαινότυπο.

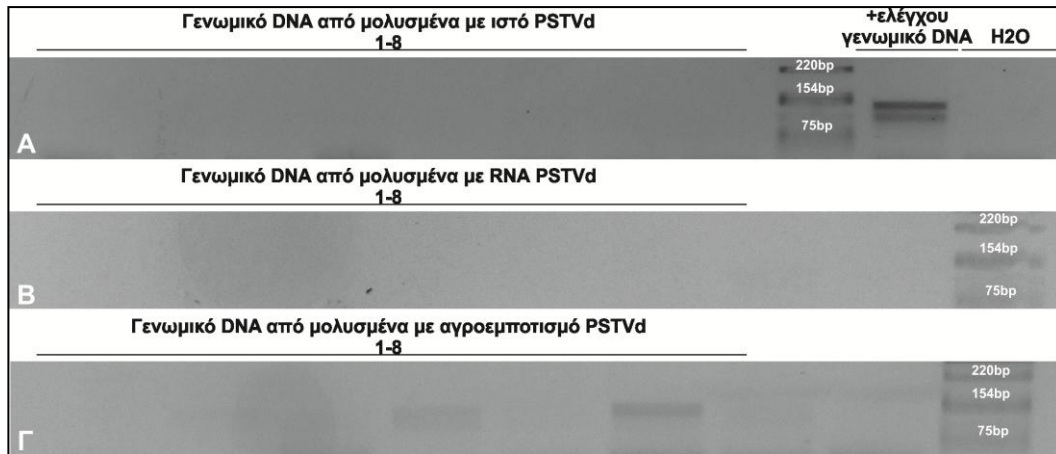


Εικόνα 3.11.7. Ποσοτικοποίηση των κυρίαρχων φαινοτύπων της αγρίου τύπου και του κάθε μεταλλάγματος της VIRP1, μετά από τρεις εβδομάδες μόλυνση με το PSTVd. Οι εικόνες είναι με μικροσκόπιο φθορισμού. Μεγέθυνση 60x.

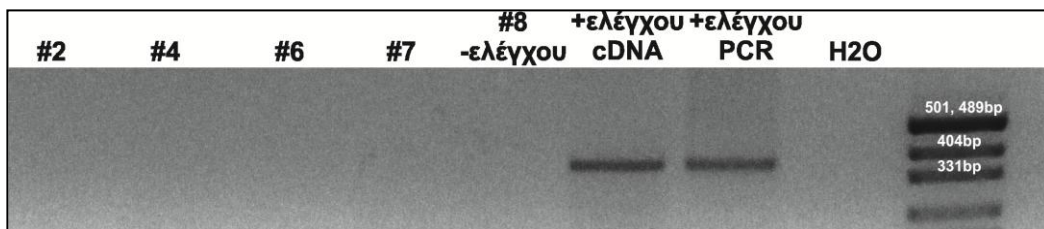
### 3.12 Άλλα συστήματα μελέτης της πρωτεΐνης

#### 3.12.1 *Arabidopsis thaliana*.

Όπως ισχύει για το είδος *N. benthamiana*, όπου η VIRP1 είναι αναγκαίος και ικανός παράγοντας για να υπάρχει μόλυνση με το PSTVd, θέλαμε να εξετάσουμε εάν συμβαίνει το ίδιο στο είδος *A. thaliana*. Έτσι, δημιουργήθηκαν σε προηγούμενη εργασία στο εργαστήριο (Διπλωματική εργασία Μαρίας Ηλιοπούλου) διαγονιδιακά φυτά Flag: NbVIRP1, καθώς δεν υπάρχει το γονίδιο VIRP1 στο γονιδίωμα του φυτού. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε εάν στα φυτά αυτά μπορεί να ανιχνευθεί η μόλυνση με το ιοειδές. Πραγματοποιήθηκαν τρεις τρόποι μόλυνσης, χρησιμοποιώντας μολυσμένο ιστό, το ριβονουκλεϊκό οξύ του ιοειδούς και με αγροεμποτισμό. Παράλληλα με τη μόλυνση πραγματοποιήθηκε και ανίχνευση των διαγονιδιακών φυτών F3 γενιάς, καθώς στην προηγούμενη εργασία δεν είχε γίνει θετική επιλογή με το αντιβιοτικό επιλογής, ούτε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το ένθεμα, παρά μόνο για την F1 γενιά. Επομένως, αρχικά όπως φαίνεται στην εικόνα 3.12.1.1 ανιχνεύθηκαν τρία διαγονιδιακά φυτά, τα οποία στη συνέχεια εξετάστηκαν για το αν είναι μολυσμένα με το ιοειδές (εικ. 3.12.1.2).



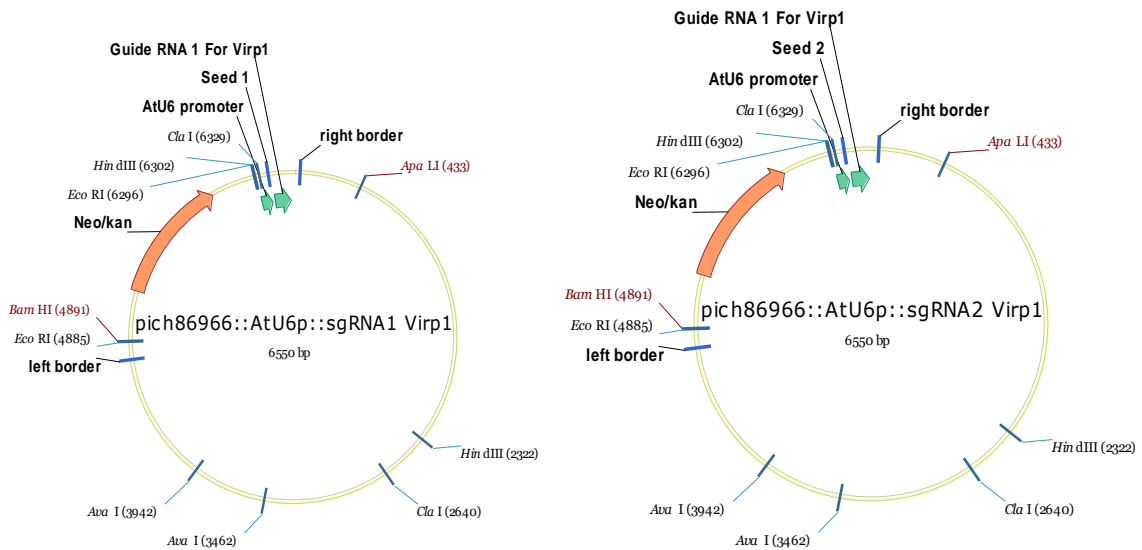
Εικόνα 3.12.1.1. Απεικόνιση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης γενωμικού DNA *Arabidopsis thaliana* για το ένθεμα Flag: 35S:NbVIRP1 (ανίχνευση ζώνης 140 νουκλεοτιδίων). Α. Τα φυτά έχουν μολυνθεί με μολυσμένο ιστό του ιοειδούς PSTVd. Β. Τα φυτά έχουν μολυνθεί με ριβονουκλεϊκό οξύ του ιοειδούς PSTVd. Γ. Τα φυτά έχουν μολυνθεί με αγροεμπότισμό φορέα που φέρει το ιοειδές.



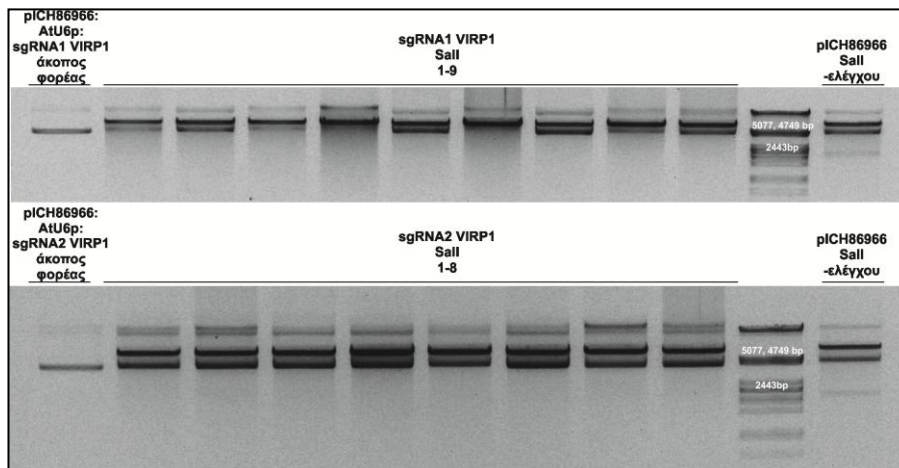
Εικόνα 3.12.1.2. Απεικόνιση ανάστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για το ριβονουκλεϊκό οξύ του ιοειδούς PSTVd από διαγονιδιακά φυτά Flag: 35S: NbVIRP1 *Arabidopsis thaliana* (ανίχνευση ζώνης 359 νουκλεοτιδίων). Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε μέσω αγροεμπότισμού.

### 3.12.2 CRISPR.

Θέλοντας να έχουμε ένα καλύτερο σύστημα καταστολής της ενδογενούς πρωτεΐνης και να μελετηθεί έτσι ο βιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης, σχεδιάστηκαν από τον Βλατάκη Ιωάννη και δημιουργήθηκαν κατασκευές CRISPR/Cas9 για την πρωτεΐνη NbVIRP1 με δύο αλληλουχίες-οδηγούς, ούτως ώστε να δημιουργηθούν φυτά, από τον Μαλλιαράκη Δημήτριο, που θα καταστέλλουν πλήρως την πρωτεΐνη (εικ. 3.12.2.1). Η κλωνοποίηση της αλληλουχίας του υποκινητή AtU6r μαζί με την αλληλουχία του μονού-οδηγού RNA (single-guide RNA, sgRNA) και την αλληλουχία-κορμού (backbone sequence) πραγματοποιήθηκε με το περιοριστικό ένζυμο BsaI, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.17. Στην εικόνα 3.12.2.2 παρατηρούνται οι θετικές διαγνωστικές πέψεις δημιουργίας των κατασκευών.



Εικόνα 3.12.2.1. Απεικόνιση του πλασμιδιακού χάρτη της κατασκευής sgRNA1 VIRP1(αριστερά) και sgRNA2 VIRP1 (δεξιά). Κατασκευή με το Vector NTI.



Εικόνα 3.12.2.2. Απεικόνιση της θετικής αποικίας *E.coli* που φέρει το πλασμίδιο με τα sgRNA1 και sgRNA2-VIRP1. Κατά την διαγνωστική πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Sall οι θετικές αποικίες εμφανίζουν προφίλ μπαντών μεγέθους 6550 νουκλεοτιδικές βάσεις (γραμμικό πλασμίδιο), ενώ οι αποικίες χωρίς ένθεμα (κλειστός φορέας) 4.635 και 2.297 βάσεις.

## 4. Συζήτηση

### 4.1 Φυλογενετική κατάταξη της VIRP1.

Η VIRP1, όπως ήταν αναμενόμενο, βρίσκεται πιο κοντά φυλογενετικά με τις ορθόλογες πρωτεΐνες των ειδών *Solanaceae*, καθώς επίσης και με τις πρωτεΐνες GTE2 και GTE7 του είδους *Arabidopsis thaliana*. Εάν συγκρίνουμε τα δύο φυλογενετικά δένδρα, στην εικόνα 3.1.1 και 3.1.2, θα δούμε ότι σχηματίζονται οι ίδιες φυλογενετικά ομάδες είτε εάν στοιχηθούν ολόκληρες οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών μαζί, είτε μόνο οι αλληλουχίες των βρόμο-επικρατειών, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η ομοιότητα των πρωτεϊνών περιορίζεται κυρίως σε αυτήν την επικράτεια και όχι σε άλλα λειτουργικά στοιχεία (De Alba *et al.*, 2003). Επίσης, παρατηρείται και στα δύο δένδρα ότι στον ίδιον μεγάλο κλάδο συνευρίσκονται η υπό μελέτη πρωτεΐνη με πρωτεΐνες των ζώων, όπως η HPFS1 (Homeotic Protein Female Sterile 1) της *Drosophila melanogaster* και η ανθρώπινη BRD4 (BRoDomain-containing protein 4). Είναι γνωστό ότι και οι δύο πρωτεΐνες είναι ρυθμιστές της μεταγραφής, με την HPFS1 να αποτελεί θετικό και αρνητικό ρυθμιστή της μεταγραφής (Bisgrove *et al.*, 2007; Florence and Faller, 2008) και με την BRD4 πιθανόν να εμπλέκεται στη στόχευση της χρωματίνης μέσω της ET-επικρατειάς της (Rahman *et al.*, 2011).

### 4.2 Μείωση της ενδογενής VIRP1 με τη χρήση του amiRNA.

Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση του τεχνητού μικρού RNA (amiRNA), ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητά του για το αν καταστέλλει την ενδογενή πρωτεΐνη και σε τι ποσοστό. Όπως παρατηρήθηκε στην εικόνα 3.3.3, μετά την πάροδο πέντε και επτά ημερών μετά τον αγροεμποτισμό με το amiRNA, είναι εμφανής η μείωση της ενδογενής πρωτεΐνης, αλλά δεν είναι επαρκής για να πραγματοποιηθεί αλληλεπικάλυψη της ενδογενής αγρίου τύπου από τα βρόμο-μεταλλάγματα. Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήθηκαν για αυτό το πείραμα φυτά που υπερ-εκφράζουν την VIRP1 (σειρά X1/13), είναι ότι η VIRP1 δεν είναι μία άφθονη στα κύτταρα πρωτεΐνη. Αυτός είναι ένας πιθανός λόγος, που στην εικόνα 3.3.4 δεν παρατηρείται σήμα έκφρασης της ενδογενής πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό, και για να διαπιστωθεί εάν όντως υπάρχει μείωση στις τρεις ημέρες αγροεμποτισμού με το amiRNA σε φυτά αγρίου τύπου, πραγματοποιήθηκε μία ανάστροφη μεταγραφή και ημι-ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τμήμα της ενδογενής πρωτεΐνης. Δεν παρατηρείται μείωση των επιπέδων της ενδογενής πρωτεΐνης (εικ. 3.3.5). Παρόλα αυτά, όμως, ακόμα υπάρχει περίπτωση η κατασκευή του τεχνητού μικρού RNA όντως να στοχεύει την ενδογενή πρωτεΐνη και να την κόβει με τη βοήθεια του μηχανισμού σίγησης, αλλά θα μπορούσε να μην ανιχνευθεί μείωση στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης, καθώς τη στιγμή που γίνεται η δειγματοληψία μπορεί το τμήμα εκείνο που ανιχνεύεται με ημι-ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (ανάλογα ποιους εκκινητές χρησιμοποιούμε και ποιο κομμάτι πολλαπλασιάζεται) να μην έχει τεμαχιστεί και επομένως να μην εμφανίζεται μείωση, όπως και στη δική μας περίπτωση. Επίσης, εάν όντως η VIRP1 καταστέλλεται κατά 20%, το ποσοστό αυτό δεν είναι ικανό για να φανεί η μείωση σε μία ημι-ποσοτική PCR.

Μία ένδειξη της μείωσης της ενδογενής πρωτεΐνης με άμεση παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού παρατηρείται στην εικόνα 3.6.2, όπου όταν γίνεται αγροεμποτισμός της αγρίου τύπου πρωτεΐνης μαζί με το amiRNA παρατηρείται μικρότερη έκφραση της GFP:VIRP1, σε σχέση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη μόνο (χωρίς το amiRNA). Παρόλα αυτά, είναι αναγκαίο να επαναληφθεί μία ανάλυση τύπου northern, χρησιμοποιώντας μεγαλύτερη ποσότητα ολικού RNA, καθώς έτσι θα φανεί πραγματικά εάν υπάρχει μείωση στο μετάγραφο της ενδογενής πρωτεΐνης.

Ακόμη, εξετάστηκε στο μικροσκόπιο εάν παρατηρείται αλλαγή στον πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης, μετά την έκφραση και του amiRNA. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.6.1, η VIRP1 εντοπίζεται στον πυρήνα και επομένως δεν έχει καταστραφεί το σήμα πυρηνικού εντοπισμού. Παρόλα αυτά μετά τη

μόλυνση με το ιοειδές με τις μετρήσεις που έγιναν (εικ. 3.7.2), παρατηρείται για το μετάλλαγμα N269Y της πρωτεΐνης ένας πιο διάχυτος πυρηνικός φαινότυπος, σε σχέση με τις πιο έντονες κηλίδες που σχηματίζει κατά την παροδική έκφραση (εικ. 3.6.2). Αν αφαιρέσουμε την πιθανότητα στατιστικού λάθους, καθώς τα κύτταρα που μετρήθηκαν ήταν μόνο 25, αυτό που μπορεί να εξηγήσει το φαινότυπο αυτό είναι ότι κατά την παροδική έκφραση της πρωτεΐνης στα φύλλα, τα κύτταρα που παρατηρούνται δεν είναι απολύτως συγχρονισμένα και επομένως η διαφορά που βλέπουμε να είναι εξαιτίας διαφορετικής φάσης του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, οι κυτταρικές σειρές BY-2 είναι κύτταρα του φυτικού είδους *Nicotiana tabacum* και όχι *N.benthamiana*, όπου έχουν γίνει τα υπόλοιπα πειράματα παροδικής έκφρασης, επομένως η διαφορά αυτή μπορεί να αντανάκλα το διαφορετικό, αν και πολύ συγγενικό, φυτικό είδος. Για να αποσαφηνιστεί εάν οφείλεται σε αυτό το τελευταίο γεγονός, πρέπει να συγκριθεί ο φαινότυπος των BY-2 κυττάρων (σταθερή έκφραση) με την παροδική έκφραση σε φύλλα *N.tabacum*.

### 4.3 Έκφραση της VIRP1 σε μεταγραφικό και σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

Η αγρίου τύπου πρωτεΐνη και τα διάφορα μεταλλάγματά της εκφράζονται επιτυχώς σε επίπεδο μεταγράφων, όπως φαίνεται στις εικόνες 3.4.1 και 3.4.2. Βέβαια, ο αγροεμποτισμός δε θεωρείται 100% επιτυχημένος, καθώς με την παροδική έκφραση μέσω αγροεμποτισμού αναμένονται υψηλότερα ποσοστά έκφρασης και μάλιστα σε λιγότερες μέρες εμφάνισης της ραδιενεργής μεμβράνης ακρυλαμίδης. Επίσης, παρατηρούνται ανομοιότητες μεταξύ των διαφόρων κατασκευών, αντανάκλωντας τη διαφορετική απορροφητικότητα των φύλλων, κάτι που ενισχύει την άποψη ότι ο αγροεμποτισμός δεν είναι πετυχημένος. Στην περίπτωση, όμως εδώ αυτό που μας ενδιαφέρει είναι να δούμε ότι οι κατασκευές GFP:VIRP1 (είτε της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, είτε των μεταλλαγμάτων της) είναι άθικτες και εκφράζονται σε μεταγραφικό επίπεδο.

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε σε πρωτεϊνικό επίπεδο να δούμε εάν εκφράζονται στο σωστό μοριακό βάρος οι διάφορες κατασκευές. Παρά τις πολλές προσπάθειες και τις αλλαγές που έκανα δεν κατάφερα να δω την πρωτεΐνη (εικ. 3.5.1). Παρόλα αυτά, επειδή πριν τη συλλογή του αγροεμποτισμένου ιστού πάντα ο ιστός ελεγχόταν στο μικροσκόπιο φθορισμού για την ύπαρξη φθορισμού στους πυρήνες των αγροεμποτισμένων κυττάρων, η πρωτεΐνη πιθανόν εκφράζεται σωστά και πρέπει να γίνουν πάλι προσπάθειες να την εντοπίσουμε με ανοσοαποτύπωση τύπου Western.



#### **4.4 Η VIRP1 εντοπίζεται στα κεντρομερή κατά τη μίτωση και στις πυρηνικές κηλίδες των φυτικών κυττάρων.**

Κατά το συν-εντοπισμό της πρωτεΐνης με διάφορους πρωτεϊνικούς-δείκτες υπο-πυρηνικών διαμερισμάτων, η πρωτεΐνη βρέθηκε ότι εντοπίζεται σε περιοχές με υψηλή μεταγραφική δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα, η αγρίου τύπου πρωτεΐνη και το μετάλλαγμα N269Y συν-εντοπίζονται απόλυτα με την κεντρομερή ιστόνη 3, στα κεντρομερή κατά τη μίτωση (εικ.3.9.1). Αντίθετα, παρατηρείται ότι το N269A μετάλλαγμα δεν εντοπίζεται στα κεντρομερή. Καθώς ήταν αναμενόμενο για πρωτεΐνες που περιέχουν βρόμο-επικράτειες, έτσι και η VIRP1 είναι λογικό να εντοπίζεται στα κεντρομερή κατά τη μίτωση των φυτικών κυττάρων με το βρόμο-μετάλλαγμα N269A μάλλον να επηρεάζει αρκετά την επικράτεια αυτή, ούτως ώστε να οδηγεί στο μη-εντοπισμό της στις περιοχές αυτές.

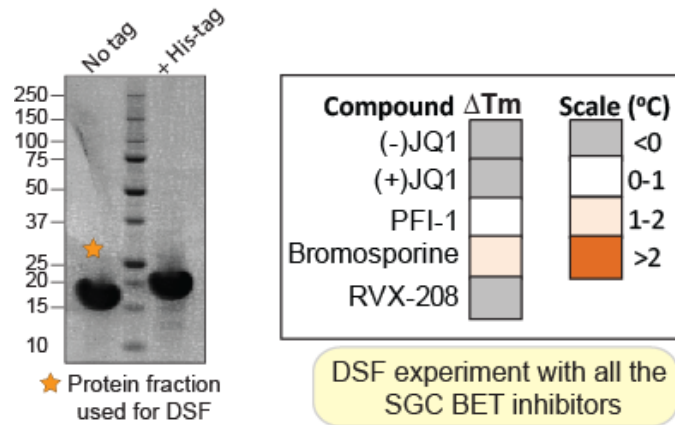
Ακόμη, βρέθηκε η πρωτεΐνη και το N269Y μετάλλαγμά της να εντοπίζονται στις πυρηνικές κηλίδες, ονομαζόμενες και αλλιώς κοκκώδη συμπλέγματα μεταξύ της χρωματίνης (interchromatin granule clusters) (εικ.3.9.2). Οι περιοχές αυτές είναι εμπλουτισμένες σε παράγοντες ματίσματος πρώιμων αγγελιοφόρων RNAs και βρίσκονται στις περιοχές μεταξύ της χρωματίνης στο πυρηνόπλασμα των κυττάρων των θηλαστικών (Spector and Lamond, 2011). Στα φυτικά κύτταρα, ο πυρηνικός χώρος διαμερισματοποιείται από πυρηνικά σώματα (nuclear bodies), που είναι δυναμικές αλλά σχετικά σταθερές δομές, αποτελούμενες από πρωτεΐνες και RNAs χωρίς οριοθετημένες μεμβράνες (Reddy *et al.*, 2012). Πιθανόν, λοιπόν, η VIRP1 να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες ματίσματος ή ακόμη και να αποτελεί πρωτεΐνη των σωμάτων αυτών. Ισχυροποιώντας αυτήν την άποψη, στην εικόνα 3.9.4 παρατηρείται ότι η VIRP1 συν-εντοπίζεται με την πρωτεΐνη SRM160, μία ακόμη πρωτεΐνη που εντοπίζεται στις πυρηνικές κηλίδες.

#### **4.5 Οι αναστολείς των βρόμο-επικρατειών JQ-1 και PFI-1 δεν επηρεάζουν τη λειτουργία της βρόμο-επικράτειας της VIRP1.**

Τα μικρά χημικά μόρια JQ-1 και PFI-1 είναι ειδικοί αναστολείς της βρόμο-επικράτειας πολλών πρωτεϊνών, που ανήκουν στην BET οικογένεια, συμπεριλαμβανομένου και της πρωτεΐνης των θηλαστικών, BRD4 (Filippakopoulos *et al.*, 2010; Pikaud *et al.*, 2013). Καθώς και η VIRP1 ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών αυτών και η τρισδιάστατη δομή της βρόμο-επικράτειάς της είναι παρόμοια με αυτή της BRD4, πραγματοποιήθηκε επίδραση στα κύτταρα BY-2 με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις των αναστολέων αυτών και μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητάς τους. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.11.1, δεν παρατηρείται αυξημένη θνησιμότητα των κυττάρων αυτών, ακόμα και μετά από πολύ υψηλές συγκεντρώσεις των αναστολέων. Έτσι, λοιπόν, συμπεραίνουμε ότι οι αναστολείς αυτοί δεν έχουν επίπτωση στη λειτουργικότητα των βρόμο-επικρατειών των πρωτεϊνών που υπάρχουν στα BY-2 κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου και του ορθόλογου προς τη NbVIRP1 γονιδίου, NtBRP1 (εικ. 3.1.2). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς τα διαγονιδιακά φυτά *N. tabacum* και *N. benthamiana* (RNAi) που έχουν μειωμένη έκφραση της VIRP1 δεν παρουσιάζουν κάποιο φαινότυπο και επομένως, η πρωτεΐνη αυτή δεν περιμέναμε να έχει επίπτωση στη θνησιμότητα των BY-2 κυττάρων (Kalantidis *et al.*, 2007).

Σε συνεργασία με το εργαστήριο του Δρ Φιλίππακόπουλου και της μετα-διδασκτορικής ερευνήτριάς του Sarah Picaud, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και επιτυχής έκφραση της βρόμο-επικράτειας της SIVIRP1 με την ετικέτα ιστιδίνης (His tag) (εικ. 4.5.1 αριστερά) και στη συνέχεια εξετάστηκε με διαφορική σάρωση φθορομετρίας (Differential Scanning Fluorimetry, DSF) εάν κάποια μόρια που αναστέλλουν βρόμο-επικράτειες πρωτεϊνών θηλαστικών, αναστέλλει και τη βρόμο-επικράτεια της VIRP1. Παρατηρήθηκε, λοιπόν, ότι κανένας αναστολέας δεν έχει σημαντική επίπτωση στην επικράτεια της πρωτεΐνης (εικ.4.5.1 δεξιά), κάτι το οποίο βρίσκεται σε συνάφεια με τη μικρή θνησιμότητα των BY-

2 κυττάρων ύστερα από επίδραση με τους αναστολείς JQ-1 και PFI-1. Στην περίπτωση που παρατηρούνταν μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, τότε οι αναστολείς αυτοί θα επηρέαζαν μία άλλη πρωτεΐνη του καπνού και όχι την BRP1, όπως φαίνεται από την εικόνα 4.5.1. Έτσι, λοιπόν, η λειτουργία της βρόμο-επικράτειας της VIRP1 είναι διαφορετική από την αντίστοιχη των ανθρώπινων BET πρωτεϊνών, αφήνοντας αναπάντητο το ερώτημα ποια είναι η λειτουργία της επικράτειας της πρωτεΐνης αυτής.



**Εικόνα 4.5.1.** Αριστερά: Επιτυχής έκφραση της His:SVIRP1. Δεξιά: Δεν παρατηρείται πρόσδεση των αναστολέων στη βρόμο-επικράτεια της VIRP1. Sarad Pikaud, Panagis Filippakopoulos lab, Structural Genomics Consortium, University of Oxford.

#### 4.6 Η μόλυνση με το PSTVd φαίνεται να επηρεάζει τον πυρηνικό φαινότυπο της VIRP1.

Κατά την παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού, φαίνεται ότι η μόλυνση τριών εβδομάδων με το ιοειδές δεν επηρεάζει τον εντοπισμό της VIRP1, αλλά συγκεκριμένα οι πυρήνες των μεταλλαγμάτων N269A και N269Y από πιο εντοπισμένοι σε συγκεκριμένα σημεία ('spotty') παρατηρούνται πιο διάχυτοι, ενώ και η GFP:VIRP1 αποκτά έναν πιο εντοπισμένο πυρηνικό φαινότυπο, σε σχέση με τον διάχυτο που παρουσιάζει σε μη μολυσμένα φυτά *N.benthamiana*. (εικ. 3.11.7). Στη συνέχεια θέλαμε να δούμε εάν συμβαίνει και το αντίθετο, εάν δηλαδή οι βρόμο-μεταλλάξεις της πρωτεΐνης επηρεάζουν την ήδη εγκαθιδρυμένη μόλυνση. Παρατηρούνται μη-στατιστικά σημαντικές διαφορές στη μόλυνση του PSTVd, με μόνη εξαίρεση όταν υπερ-εκφράζεται η κατασκευή SmGFP:VIRP1 μαζί με το amiRNA, όπου παρατηρείται μείωση της μόλυνσης (εικ. 3.11.2). Παρόλα αυτά, δεν μπορούμε να συνάγουμε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα στην περίπτωση της υπερέκφρασης των υπόλοιπων κατασκευών, καθώς τα αποτελέσματα εμφανίζουν μεγάλη τάση (πότε μείωση, πότε αύξηση) (εικ. 3.11.1, 3.11.3, 3.11.4, 3.11.5, 3.11.6). Επίσης, δεν έχει γίνει μεγάλη καταστολή της ενδογενούς πρωτεΐνης μέσω του amiRNA, ούτως ώστε να υπάρχει καλή αντικατάσταση της ενδογενούς αγρίου τύπου πρωτεΐνης με τη μεταλλαγμένη της μορφή και επομένως να υπάρχει ένα καθαρό αποτέλεσμα.

#### 4.7 Μολύνονται οι Flag:NbVIRP1 *Arabidopsis thaliana* με το PSTVd;

Μέχρις στιγμής δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία καμία ένδειξη ότι, το είδος *Arabidopsis thaliana* έχει μολυνθεί από ιοειδή. Παρόλα αυτά, σε εργασία των Daros και Flores (2014), αναφέρθηκαν η θέσπιση και οι ιδιότητες ενός συστήματος βασισμένου στο είδος *A.thaliana* για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων ιοειδούς με ξενιστή. Στην εργασία τους δείχνουν ότι, όταν το ιοειδές του νανισμού του λυκίσκου (*Hop stunt viroid*, HSVd) εισάγεται διαγονιδιακά στην *A.thaliana*, το ιοειδές αυτό, και πολύ πιθανό και άλλα ιοειδή της ίδιας οικογένειας, είναι ικανά να παράγουν τα τυπικά ενδιάμεσα και τα τελικά προϊόντα αντιγραφής. Ωστόσο, με αγροεμποτισμό, τα ιοειδή δεν μπορούσαν να εξαπλωθούν συστηματικά. Έτσι, λοιπόν, η μολυσματικότητα μερικών ιοειδών στο φυτικό είδος αυτό μπορεί να περιορίζεται από ανεπάρκειες στην κίνηση ή στο να επιτευχθεί ένα επίπεδο συσσώρευσης πάνω από ένα ελάχιστο όριο (Daros and Flores, 2014).

Για το λόγο αυτό, θεωρήσαμε σημαντικό να εξετάσουμε εάν οι διαγονιδιακές *Arabidopsis*, που θα εκφράζουν σταθερά το γονίδιο NbVIRP1, μπορούν να μολυνθούν από το PSTVd. Αν και το είδος περιέχει αρκετές πρωτεΐνες με βρόμο-επικράτειες (εικ.3.1.1, Rao *et al.*, 2014), η VIRP1 μπορεί να δώσει μία ώθηση για να αυξηθεί το ιοειδές σε επίπεδο συσσώρευσης ικανό να μολύνει συστηματικά το είδος. Σύμφωνα με την εικόνα 3.13.1.2, δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για το ότι η *A.thaliana* δε μολύνθηκε από το ιοειδές, καθώς στα φυτά αυτά η μόλυνση έγινε με αγροεμποτισμό με το στέλεχος C58C1, το οποίο δεν έχει μεγάλη ικανότητα μετασηματισμού (0,76-1,57%) (Ghedira *et al.*, 2013), ενώ είναι απαραίτητος ένας θετικός μάρτυρας (πχ GFP). Επομένως, πρέπει να βρεθούν ξανά θετικά διαγονιδιακά φυτά και στη συνέχεια, να γίνει μόλυνση με μολυσμένο ιστό ή το ριβονουκλεϊκό οξύ του ιοειδούς (μαζί με ένα θετικό μάρτυρα) και στη συνέχεια να εξεταστεί εάν ανιχνεύεται το PSTVd.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΙΧΑΛΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ VIRP1

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Περίληψη**

Οι βρόμο-επικράτειες υπάρχουν σε διάφορες πυρηνικές πρωτεΐνες και στρατολογούν ενδιάμεσα μόρια, που λειτουργούν ως μεταγραφικοί ρυθμιστές και ένζυμα-τροποποιητές της χρωματίνης. Η δυσλειτουργία μίας πρωτεΐνης, που περιέχει βρόμο-επικράτεια έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη καρκίνου. Πρόσφατα, οι πρωτεΐνες της οικογένειας BET, όπως η BRD4, έχουν αποκτήσει μεγάλη προσοχή μετά την ανάπτυξη ισχυρών αναστολέων των βρόμο-επικρατειών. Η επικράτεια αυτή είναι μία συντηρημένη περιοχή των 110 αμινοξέων περίπου, που σχηματίζει 4 α-έλικες και 2 βρόχους (ZA και BC), με τους τελευταίους να είναι ικανούς για τη δέσμευση καταλοίπων ακετυλιωμένης λυσίνης ιστονών και άλλων πρωτεϊνών. Σε μία προσπάθεια να αναγνωριστούν οι απαραίτητοι παράγοντες του ξενιστή που αλληλεπιδρούν με το ιοειδές PSTVd, ανακαλύφθηκε η πρωτεΐνη VIRP1. Η πρωτεΐνη αυτή είναι η πρώτη φυτική πρωτεΐνη με βρόμο-επικράτεια, που έχει αναφερθεί ότι συνδέεται με RNA και έχει έναν ουσιαστικό ρόλο στη μόλυσματικότητα του ιοειδούς, καθώς σε φυτά που υπο-εκφράζουν την VIRP1 δεν μπορεί να εγκαθιδρυθεί η αντιγραφή του PSTVd. Παρόλα αυτά, ο ρόλος της VIRP1 παραμένει αδιευκρίνιστος κι έτσι στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι να κατανοηθεί ο φυσιολογικός της ρόλος στα φυτά, αλλά και ο ρόλος της σε σχέση με το ιοειδές. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις σε συντηρημένα αμινοξέα της βρόμο-επικράτειας, ικανά να επηρεάσουν την κοιλότητα μεταξύ των βρόχων, που είναι υπεύθυνη για τη λειτουργικότητα της επικράτειας, είτε ανοίγοντάς την (N269A), είτε κλείνοντάς την (N269Y, V275F). Παράχθηκε επίσης ένα τεχνητό μικρό RNA (amiRNA), με σκοπό να στοχευθεί η ενδογενής VIRP1 του φυτού-μοντέλου *Nicotiana benthamiana* και δημιουργήθηκαν και διαγονιδιακές κυτταρικές σειρές BY-2 (*Nicotiana tabacum*) με τις μεταλλάξεις της βρόμο-επικράτειας. Σε έρευνα του υπό-πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης, βρέθηκε ότι η VIRP1 εντοπίζεται στις πυρηνικές κηλίδες, περιοχές του πυρήνα πλούσια με παράγοντες ματίσματος, ενώ μόνο η αγρίου-τύπου VIRP1 εντοπίζεται και στα κεντρομερή κατά τη μίτωση. Ακόμη, παρά το γεγονός ότι η βρόμο-επικράτεια της VIRP1 παρουσιάζει τα ίδια χαρακτηριστικά με τις αντίστοιχες των θηλαστικών, παρατηρήθηκε ότι δεν προσδένει κανένα γνωστό αναστολέα τους.

**UNIVERSITY OF CRETE**  
**FACULTY OF SCIENCES**  
**SCHOOL OF BIOLOGY**  
**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY**

**MICHALOPOULOU VASSILIKI**

**FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE PROTEIN VIRP1**

**MASTER THESIS**

## **Summary**

Bromodomains are present in diverse nuclear proteins, functioning as recruiting intermediates for transcriptional regulators and chromatin-modifying enzymes. Dysfunction of a bromodomain-containing protein has been associated with the development of cancer. Recently, the BET (bromo and extraterminal) proteins, such as Brd4, have gained much attention after the development of potent bromodomain inhibitors. The bromodomain is a conserved region of 110 amino acids that forms 4  $\alpha$ -helices and 2 loops (ZA and BC), the latter capable of binding acetyl-lysine residues in histones and other proteins. In an effort identifying the essential hosts' factors for PSTVd (Potato Spindle Tuber Viroid) interaction, Virp1 has been identified. It is the first plant bromodomain protein reported to bind RNA and has an essential role in PSTVd infectivity, as in Virp1-suppressed plants PSTVd replication cannot be established. Nevertheless, the role of Virp1 has not yet been elucidated and so the objective of this master thesis is to understand its physiological role in plants, as well as its role in relation to the viroid. For this reason, we conducted point mutations in conserved amino acids of the domain, capable of influencing the cavity responsible for the activity of the domain either by closing (N269Y, V275F) or by enlarging it (N269A). There have been produced an artificial miRNA (amiRNA) in order to target endogenous Virp1 of the plant model *Nicotiana benthamiana*, as also bromo-domain mutated BY-2 (*Nicotiana tabacum*) cell lines were established. When investigating the sub-nuclear localization of the protein, it was found that VIRP1 localizes in nuclear speckles, areas rich in splicing factors, while only the wild-type protein has been detected in the centromeres during mitosis. Further, although the bromo-domain of VIRP1 presents the same features to those of mammals ones, it was observed that it does not bind to any known inhibitor.

# Βιβλιογραφία

## Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

Bannister AJ and Kouzarides T. **1996**. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*. **384**: 641–643.

Beck S, Hanson I, Kelly A, Pappin DJ and Trowsdale J. **1992**. A homologue of the *Drosophila* female sterile homeotic (*fsh*) gene in the class II region of the human MHC. *DNA Sequence*. **2**:203–210.

Bisgrove DA, Mahmoudi T, Heinklein P and Verdin E. **2007**. Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *PNAS*. **104**: 13690-13695.

Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY and Allis CD. **1996**. *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*. **84**: 843–851.

Chung CW, Coste H, White JH, Mirguet O, Wilde J, Gosmini LR, Delves C, Magny MS, Woodward R, Hughes AS, Boursier VE, Flynn H, Bouillot MA, Bamborough P, Brusq GJM, Gellibert JF, Jones JE, Riou MA, Homes P, Martin LS, Uings JI, Toum J, Clement AC, Boullay AB, Grimley LR, Blandel MF, Prinjha KR, Lee K, Kirilovsky J and Nicodeme E. **2011**. Discovery and characterization of small molecule inhibitors of the BET family bromodomains. *Journal of Medicinal Chemistry*. **54(11)**: 3827-3838.

Daros JA and Flores R. **2002**. A chloroplast protein binds a viroid RNA in vivo and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *The EMBO Journal*. **21**:749–759.

Daros JA and Flores R. **2014**. *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *PNAS*. **101(17)**: 6793-6797.

Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK and Zhou MM. **1999**. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*. **399**: 491-496.

Diener TO. **1979**. Viroid and Viroid Disease. John Wiley and Sons Inc., New York, NY, USA.

Diener TO. **2001**. The viroid: biological oddity or evolutionary fossil? *Advances in Virus Research*. **57**: 137-184.

Diener TO. **2003**. Discovering viroids- a personal perspective. *Nature Reviews Microbiology*. **1**: 75-80.

Dunemann F, Schrader O, Budahn H and Houben A. **2014**. Characterization of centromeric histone H3 (CENH3) variants in cultivated and wild carrots (*Daucus sp.*) *PLoS ONE*. **9(6)**: e98504.

Elliot DR, Alexander BJR, Smales TE, Tang Z and Clover GRG. **2001**. First report of Potato spindle tuber viroid in tomato in New Zealand. *Plant Disease*. **85**: 1027.

Filippakopoulos P, Picaud S, Mangos M, Keates T, Lambert JP, Barsyte-Lovejoy D, Felletar I, Volkmer R, Muller S, Pawson T, Gingras AC, Arrowsmith CH and Knapp S. **2012**. Histone Recognition and Large-Scale Structural Analysis of the Human Bromodomain Family. *Cell*. **149(1)**: 214–231.

Fels A, Hu K and Riesner D. **2001**. Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts predominantly at two specific sites. *Nucleic Acids Research*. **29**:4589–4597.

Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, Morse EM, Keates T, Hickman TT, Felletar I, Philpott M, Munro S, McKeown MR, Wang Y, Christie AL, West N, Cameron MJ, Schwartz B, Heightman TD, La Thanque N, French CA, Wiest O, Kung AL, Knapp S and Bradner JE. **2010**. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*. **468(7327)**: 1067–1073.

Florence B and Faller DV. **2001**. You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Frontiers in Bioscience*. **6**: D1008-1018.

Florence B and Faller DV. **2008**. *Drosophila* female sterile (1) homeotic is a multifunctional transcriptional regulator that is modulated by Ras signaling. *Developmental Dynamics*. **237**: 554-564.

Flores R, Hernández C, Martínez de Alba E, Daròs JA, DiSerio F. **2005a**. Viroids and viroid–host interactions. *Annual Review of Phytopathology*. **43**: 117-139.

Flores R, Randles JW, Owens RA, Bar-Joseph M, Diener TO. **2005b**. Viroids. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball AL. (eds). *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 1145-1159. Elsevier/Academic Press, London, UK.

Ghedira R, De Buck S, Nolf J and Depicker A. **2013**. The efficiency of *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation is determined not only by the *Agrobacterium* strain used but also by the physiology and the ecotype of the dipped plant. *Molecular Plant Microbe Interactome*. **26(7)**: 823-832.

Gomez G and Pallas V. **2001**. Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **14**:910–913.

Haynes SR, Dollard C, Winston F, Beck S, Trowsdale J and Dawid IB. **1992**. The bromodomain: A conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Research*. **20**: 2603–2603.

Haynes SR, Mozer BA, Bhatia-Dey N and Dawid IB. **1989**. The *Drosophila* fsh locus, a maternal effect homeotic gene, encodes apparent membrane proteins. *Developmental Biology*. **134**:246–257.

Hewings DS, Wang M, Philpott M, Fedorov O, Uttarkar S, Filippakopoulos P, Picaud S, Vuppusetty C, Marsden B, Knapp S, Conway JS and Heightman DT. **2011**. 3,5-Dimethylisoxazoles act as acetyl-lysine-mimetic bromodomain ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1-30.

Hudson BP, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ and Wright PE. **2000**. Solution structure and acetyl-lysine binding activity of the GCN5 bromodomain. *Journal of Molecular Biology*. **304**: 355–370.

Jacobs SA and Khorasanizadeh S. **2002**. Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science*. **295**: 2080–2083.

Jacobson RH, Ladurner AG, King DS and Tjian R. **2000**. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science*. **288**: 1422–1425.

Jeanmougin F, Wurtz JM, Douarin BL, Chambon P and Losson R. **1997**. The bromodomain revisited. *Trends in Biochemical Sciences*. **22**: 151–153.

Kalantidis K, Denti MA, Tzortzakaki S, Marinou E, Tabler M and Tsagris M. **2007**. Virp1 is a host protein with a major role in Potato spindle tuber viroid infection in *Nicotiana* plants. *Journal of Virology*. **81**: 12872–12880.

Keese P and Symons RH. **1985**. Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *PNAS*. **82**:4582–4586.

Knockmann T, Gerstung M, Schlumpf T, Xhinzhou Z, Hess D, Beerenwinkel N, Beisel C and Paro R. **2013**. The BET protein FSH functionally interacts with ASH1 to orchestrate global gene activity in *Drosophila*. *Genome Biology*. **14**: R18.

Lamond AI and Spector DL. **2003**. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature Reviews*. **4**: 605-612.

Laurent BC, Yang X and Carlson M. **1992**. An essential *Saccharomyces cerevisiae* gene homologous to *SNF2* encodes a helicase-related protein in a new family. *Molecular and Cell Biology*. **12**:1893–1902.

- Li H, Ilin S, Wang W, Duncan EM, Wysocka J, Allis CD and Patel DJ. **2006**. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature*. **442**: 91–95.
- Maniataki E, Martinez de Alba AE, Sagesser R, Tabler M and Tsagris M. **2003**. Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein VirP1. *RNA*. **9**:346–354.
- Martinez de Alba AE. **2000**. Ph.D. dissertation. Universidad del Pais Vasco, Bilbao, Spain.
- Martinez De Alba AE, Sagesser R, Tabler M and Tsagris M. **2003**. A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds *Potato spindle tuber viroid* RNA in vitro and in vivo. *Journal of Virology*. **77(17)**: 9685-9694.
- Mathioudakis MM, Veiga R, Ghita M, Tsikou D, Medina V, Canto T, Makris AM, Livieratos IC. **2012**. Pepino mosaic virus capsid protein interacts with a tomato heat shock protein cognate 70. *Virus Research*. **163**: 28-39.
- Mujtaba S, He Y, Zeng L, Farooq A, Carlson JE, Ott M, Verdin E and Zhou MM. **2002**. Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Molecular Cell*. **9**: 575–586.
- Mujtaba S, He Y, Zeng L, Yan S, Plotnikova O, Sachchidanand, Sanchez R, Zeleznik-Le JN, Ronai Z and Zhou MM. **2004**. Structural mechanism of the bromodomain of the coactivator CBP in p53 transcriptional activation. *Molecular Cell*. **13**: 251–263.
- Mujtaba S, Zeng L and Zhou MM. **2007**. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene*. **26**: 5521-5527.
- Nakamura Y, Umehara T, Nakano K, Jang MK, Shirouzu M, Morita S, Uda-Tochio H, Hamana H, Terada T, Adachi N, Matsumoto T, Tanaka A, Horikoshi M, Ozato K, Padmanabhan B and Yokohama S. **2007**. Crystal structure of the human BRD2 bromodomain: Insights into dimerization and recognition of acetylated histone h4. *The Journal of Biological Chemistry*. **282**: 4193–4201.
- Nagata T, Nemoto Y and Hasezawa S. **1992**. Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology*. **132**: 1-30.
- Nielsen PR, Nietlispach D, Mott HR, Callaghan J, Bannister A, Kouzarides T, Murzin AG, Murzina NV and Laue ED. **2002**. Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature*. **416**: 103–107.
- Nohales MA, Flores R and Daros JA. **2012**. Viroid RNA redirects host DNA ligase I to act as an RNA ligase. *PNAS*. **109(34)**: 13805-13810.
- Ogg SC. and Lamond AI. **2002**. Cajal bodies and coilin - moving towards function. *Journal of Cell Biology*. **159**:17-21.
- Ogryzko VV, Schiltz OL, Russanova V, Howard BH and Nakatani Y. **1996**. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. **87**: 953–959.
- Owen DJ, Ornaghi P, Yang JC, Lowe N, Evans PR, Ballario P, Neuhaus D, Filetici P and Travers AA. **2000**. The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *The EMBO Journal*. **19**: 6141–6149.
- Owens RA, Blackburn M and Ding B. **2001**. Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Molecular Plant-Microbe Interactome*. **14**: 905–909.
- Owens RA and Verhoeven JTJ. **2009**. Potato spindle tuber. *The plant health instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0804-01.
- Peng J, Dong W, Chen L, Zou T, Qi Y et al. **2007**. Brd2 is a TBP-associated protein and recruits TBP into E2F-1 transcriptional complex in response to serum stimulation. *Molecular and Cell Biochemistry*. **294**: 45-54.
- Pikaud S, Da Costa D, Thanasopoulou A, Filippakopoulos P, Fish PV, Philpott M, Fedorov O, Brennan P, Bunnage ME, Owen DR, Bradner JE, Tanriere P, O’Sullivan B, Muller S, Schwaller J, Stankovic T and Knapp S. **2013**. PFI-1-A highly selective protein interaction inhibitor targeting BET bromodomains. *Cancer Research*. **73(11)**: 3336-3346.



Puchta H, Herold T, Verhoeven K, Roenhorst A, Ramm K, Schmidt-Putcha W and Sanger HL. **1990**. A new strain of potato spindle tuber viroid (PSTVd-N) exhibits major sequence differences as compared to all other PSTVd strains sequenced so far. *Plant Molecular Biology* **15**: 509-511.

Querci M, Owens RA, Vargas C and Salazar LF. **1995**. Detection of Potato spindle tuber viroid in avocado growing in Peru. *Plant Disease*. **79**: 196-202.

Rackwitz R, Rohde W and Sanger HL. **1981**. DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature*. **291**:297–301.

Rahman S, Sowa ME, Ottinger M, Smith JA, Shi Y, Harper JW and Howley PM. **2011**. The BRD4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3. *Molecular and Cell Biology*. **31**: 2641-2652.

Reddy ASN, Day IS, Gohring J and Barta A. **2012**. Localization and dynamics of nuclear speckles in plants. *Plant Physiology*. **158(1)**: 67-77.

Saitou N. and Nei M. **1987**. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**:406-425.

Sanchez R and Zhou MM. **2009**. The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. **12**: 659–665.

Sanger HL. **1987**. Viroid function: viroid replication, p. 117–166. In T. O. Diener (ed.), The viroids. Plenum Press, Inc., New York, N.Y.

Schindler IM and Muhlbach HP. **1992**. Involvement of nuclear DNA dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Science*. **84**:221–229.

Shamloul AM, Hadidi A, Zhu SF, Singh RP and Sagredo B. **1997**. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology* **19**: 89-96.

Shen W, Xu C, Huang W, Zhang J, Carlson JE, Tu X, Wu J and Shi Y. **2007**. Solution structure of human Brg1 bromodomain and its specific binding to acetylated histone tails. *Biochemistry*. **46**: 2100–2110.

Staiger D, Becker F, Schell J, Koncz C and Palme K. **1991**. Purification of tobacco nuclear proteins binding to a CACGTG motif of the chalcone synthase promoter by DNA affinity chromatography. *European Journal of Biochemistry*. **199**: 519-527.

Tabler M and Tsagris M. **1990**. Viroid replication mechanisms, p. 185– 205. In R. S. Fraser (ed.), Recognition and response in plant virus interactions, vol. H41. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Tamkun J W, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC and Kennison JA. **1992**. brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell*. **68**:561–572.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. **2013**. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.

Theofel I, Bartkuhn M, Hundertmark T, Boettger T, Gartner SMK, Leser K, Awe S, Schipper M, Renkawitz-Pohl R and Rathke C. **2014**. tBRD1 selectively controls gene activity in the *Drosophila* testis and interacts with two new members of the bromodomain and extra-terminal (BET) family. *PLoS ONE*. **9(9)**: 108267.

Verhoeven JTJ, Jansen CCC, Willemsen TM, Kox LFF, Owens RA and Roenhorst JW. **2004**. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 823-831.

Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, Nake C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K, Kudla J. **2004**. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal*. **40(3)**: 428-438.

Zeng L and Zhou MM. **2002**. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Letters*. **513**: 124–128.

Zhu Y, Qi Y, Xun Y, Owens R and Ding B. **2002**. Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. *Plant Physiology*. **130**:138–146.

Zuckermandl E. and Pauling L. **1965**. Evolutionary divergence and convergence in proteins. Edited in *Evolving Genes and Proteins* by V. Bryson and H.J. Vogel, pp. 97-166. Academic Press, New York.

### **Ελληνόγλωσση βιβλιογραφία**

Ηλιοπούλου Μ. **2014**. Διπλωματική εργασία με θέμα: <<Μελέτη της πρωτεΐνης VIRP1>>. Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

### **Ηλεκτρονικές πηγές**

<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>