

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΛΕΙΚΕΥΣΗΣ**

**“ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΩΝΤΩΝ  
ΜΕ PSTVd ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ”**

**Καραντεμής Κωνσταντίνος**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΤΣΑΓΡΗ ΕΥΘΥΜΙΑ**

*Στον Martin.....*

*The ending is just a beginner  
The closer you get to the meaning  
The sooner you'll know that you're dreaming.....  
And they'll tell you black is really white.....  
The moon is just the sun at night.....  
And when you walk in golden halls.....  
You get to keep the gold that falls.....  
It's heaven and hell, .....*  
*[adapted from Black Sabbath's (Heaven and) Hell]*

## ***ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ***

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας-Ιολογίας Φυτών απο τον Σεπτέμβρη του 2003 έως τον Φλεβάρη του 2005. Ολοκληρώνοντας αυτόν τον κύκλο σπουδών θα ήθελα να ευχαριστήσω την Dr Ευθυμία Τσαγρή για την αρμονική και καρποφόρα συνεργασία μας, για την ευκαιρία που μου έδωσε, για τις πάντα χρήσιμες και καίριες υποδείξεις της και για την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλε. Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του Dr Martin Tabler, το όραμα και ο τρόπος σκέψης του οποίου θα είναι πολύτιμος οδηγός στα μελλοντικά μου βήματα. Από την θέση αυτή θα ήθελα να κάνω ιδιαίτερη αναφορά στον Dr Νίκο Πανόπουλο που βοήθησε ουσιαστικά στο τελευταίο και πιο επίπονο στάδιο αυτής της προσπάθειας. Θα είμαι παντοτινά υπόχρεος στην Dr Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Καλλιόπη, η οποία στάθηκε πολύτιμος συμπαράστατης στην αρχή της προσπάθειας. Η συνεισφορά της και οι γνώσεις που απομύζησα κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο της ήταν ανεκτίμητες.

Αυτή η προσπάθεια μπορεί να μην είχε ποτέ ολοκληρωθεί χωρίς την αρωγή κάποιων ανθρώπων. Στην Τζωρτζακάκη Σεργία με την οποία ήμασταν άμεσοι συνεργάτες κατά την διάρκεια των δυο τελευταίων χρόνων χρωστάω ευγνωμοσύνη για τα άπειρα δείγματα της που χρησιμοποίησα για να συγκρίνω την πιστότητα των δικών μου δειγμάτων, την υπομονή της, τη ανοχή της, την συμπαράσταση της, τις πάντα ευθύβολες παρατηρήσεις της. Στον Dr Κρίτωνα Καλαντίδη με τον οποίο μοιραζόμαστε κοινό όραμα για τα μελλοντικά μας πειράματα αισθάνομαι υπόχρεος για την πολύπλευρη συνεισφορά του. Τα παρελθόντα και παρόντα μέλη του εργαστηρίου ήταν ανέκαθεν το στήριγμα μου. Ο Νίκος Βρεττός, ο Νίκος Δατσέρης, η Αραμπατζή Παναγιώτα αλλά και η Κωσταντίνα, η Edytka, η Dorota, ο Vensi με τον Vesko, ο Heiko, ο Ihab, η Αμαλία, ο Θανάσης, διάφορα περιστασιακά μέλη του εργαστηρίου όπως ο Χρήστος, η Μαρίνα, ο Παύλος, ο Άγγελος με τις εποικοδομητικές συζητήσεις, τις τεχνικές τους γνώσεις και την σε προσωπικό επίπεδο συμπαράσταση τους στάθηκαν φίλοι και συνεργάτες. Ο κατάλογος είναι ατελείωτος και ζήτω συγνώμη αν κάποιος παραλήφθηκε. Όλοι γνωρίζετε ότι το μυαλό του

Κώστα είναι τρύπιο. Δεν ξεχνάει όσους τον βοήθησαν αλλά δεν μπορεί να συγκρατήσει πολλές πληροφορίες...

Θα ήθελα να κάνω ιδιαίτερη αναφορά στους ανθρώπους των οποίων άμεσα ή έμμεσα είχα την επίβλεψη: τον Άρη τον Μοσχονά, τον Αντώνη τον Ταταράκη και τον Γιάννη τον Κωνσταντινίδη για την δημιουργική συνεργασία μας. Η συνεργασία μας με τον Dr Barth Tournier στα πρώτα στάδια της βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου της επαγόμενης από ιό γονιδιακής σίγησης ήταν εποικοδομητική και εκ του αποτελέσματος επιτυχημένη. Ευχαριστώ τον Μαυράκη Στέλιο για την άψογη φροντίδα που παρείχε στα φυτά μου.

Κάποιοι άνθρωποι δεν συμμετείχαν άμεσα στην προσπάθεια μου αλλά ήταν πάντα εκεί όταν τους χρειάστηκα. Ο Γιάννης Δελλής, ο Κώστας Πασχαλίδης, ο Δημήτρης ο Γιακουμάκης, ο Νικόλας ο Πριμικίριος. Ουσιαστικοί συμπαραστάτες αν και δεν είχαν εμπλοκή στο πειραματικό σκέλος ήταν ο Παπαδάκης Γιώργος, ο Σαρρής Παναγιώτης, η Μπαστάκη Μαρίνα αλλά και ο Χρήστος Ξένος, η Dr Νατάσσα Ταμπακάκη, η Δώρα και η Χρύσα, η Σπυριδούλα Χαρόβα. Πάλι ένας ατελείωτος κατάλογος. Τους ευχαριστώ όλους για την συνεισφορά τους στην επίλυση καθημερινών τεχνικών προβλημάτων. Χωρίς την στήριξη τους θα είχα προ καιρού εγκαταλείψει. Η σύντομη αλλά ουσιαστική συνεργασία μου με τον Dr Γιάννη Παπανικολάου στάθηκε η πιο επιδραστική των τελευταίων έξι χρόνων της εργαστηριακής μου παρουσίας.

Τόσοι πολλοί άνθρωποι σε κάποια φάση συμμετέχουν με τον ένα ή τον άλλο τρόπο στην ολοκλήρωση μιας προσπάθειας! Τους ευχαριστώ όλους και τους υπόσχομαι ότι θα συνεχίσω να προσπαθώ να τους το ανταποδώσω στο μέλλον. Όλοι ξέρουν που έχουν προσφέρει στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.....

## Περίληψη

Τα ιοειδή είναι μικρά παθογόνα γυμνά μονόκλιωνα κυκλικά RNA μόρια χωρίς την ικανότητα να κωδικοποιούν για καμία πρωτεΐνη αλλά με την ικανότητα να διπλασιάζονται και σε πολλές περιπτώσεις δημιουργούν συμπτώματα σε μια πλειάδα φυτικών συστημάτων. Πίσω από την επιφανειακή απλότητα στην δομή τους βρίσκεται συγκαλυμμένο ένα εξαιρετικά πολύπλοκο σύστημα αλληλεπιδράσεων με θεμελιώδεις μηχανισμούς του ξενιστή και πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες. Η μελέτη των ιοειδών βοήθησε στο παρελθόν και θα συνεχίσει να βοηθήσει στο μέλλον στην αποκρυπτογράφηση θεμελιωδών κυτταρικών μηχανισμών όπως την RNA μεσολαβούμενη αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης, την νουκλεοκυττοπλασμική επικοινωνία, την διασυστηματική μεταφορά RNA μορίων, τον μηχανισμό της siRNA μεσολαβούμενης γονιδιακής σίγησης. Η αποσαφήνιση της λειτουργικής εξειδίκευσης του ριβονουκλειικού σκελετού των ιοειδών και των αλληλεπιδράσεων του με πρωτεΐνες του ξενιστή έχει πρωταρχική σημασία στην διαλεύκανση των σχέσεων παθογόνου-ξενιστή αλλά και των ενδοκυτταρικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην διαδικασία. Στα πλαίσια της προσπάθειας αυτής, προηγούμενες εργασίες από μέλη του εργαστηρίου αυτού βοήθησαν στην απομόνωση και τον βιοχημικό χαρακτηρισμό αλληλεπιδρώντων με ιοειδή πρωτεϊνών αλλά και του πιθανού ρόλου τους στον κύκλο ζωής του συγκεκριμένου παθογόνου. Στην παρούσα εργασία συντελείται μια προσπάθεια να ερευνηθεί η λειτουργική εξειδίκευση των αλληλεπιδρώντων με ιοειδές πρωτεϊνών και ο φυσιολογικός τους ρόλος στο φυτικό κύτταρο παρουσία ή απουσία του παθογόνου και παρουσιάζονται ενδείξεις για τον φυσιολογικό ρόλο της Virp1 στον κύκλο ζωής του φυτικού κυττάρου.

**Δομικά μοτίβα του PSTVd που σχετίζονται ή τροποποιούν την ικανότητα πολλαπλασιασμού του.** Το PSTVd είναι ένα παθογόνο, μονόκλωνο κυκλικό RNA μόριο περίπου 350 νουκλεοτιδίων χωρίς ικανότητα να κωδικοποιεί για καμία πρωτεΐνη (δεν εμφανίζει κάποιο ανιχνεύσιμο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο) που ανήκει στην οικογένεια Pospiriviridae των διπλασιαζόμενων στον πυρήνα ιοειδών (Tablet and Tsagris, 2004). Το PSTVd εμφανίζει μολυσματικότητα σε περίπου 160 φυτικά είδη κυρίως της οικογένειας των Solanaceae (Singh, 1973) ενώ στο εύρος ξενιστών δεν συνυπολογίζονται είδη στα οποία, ενώ εμφανίζεται ικανότητα αυτόνομου διπλασιασμού, περιοριστικός φραγμός είναι η ικανότητα διακυτταρικής μεταφοράς μικρής κλίμακας (cell-to-cell movement) ή διασυστηματικής μεταφοράς (systemic movement) όπως η *A. thaliana* (Daros and Flores, 2004). Συνοπτικά ο πολλαπλασιασμός του ιοειδούς σε κυτταρικό επίπεδο περιλαμβάνει την δημιουργία πολυμερών (-)RNA χρησιμοποιώντας σαν μήτρα κυκλικό PSTVd (cPSTVd). Τα (+)PSTVd πολυμερή ενδιάμεσα δημιουργούνται με μήτρα το (-) PSTVd πολυμερή (Flores et al., 2004, Feldstein et al., 1998) και επεξεργάζονται σε κυκλικά μονομερή (cPSTVd) με μια αντίδραση που περιλαμβάνει τομή και συγκόλληση στην περιοχή της λούπας E της κεντρικής συντηρημένης περιοχής (CCR, Baumstark et al., 1997). Η σύνθεση (-) PSTVd και (+) PSTVd ενδιάμεσων είναι εξαρτώμενη από την RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση II του ξενιστή όπως αποκαλύπτεται από πειράματα ευαισθησίας στην α-αμανιτίνη (Fels et al., 2001). Τα σημεία έναρξης της εξαρτημένης από την πολυμεράση II αντιγραφής cPSTVd σε (-) PSTVd ενδιάμεσα χαρτογραφούνται στις θέσεις A111 και A325 χωρίς να αποκλείονται και άλλα σημεία έναρξης (Fels et al., 2001). Κυκλικό PSTVd αρνητικής πολικότητας είναι μολυσματικό εάν εκφραστεί σε τρανσγενικά φυτά με την βοήθεια αποκοπής από ριβοένζυμο (αν και το *in vitro* μετάγραφο έχει αρκετά μειωμένη μολυσματικότητα σε σχέση με το (+)RNA, Feldstein et al., 1998). Το ίδιο αποδεικνύεται και από τις σχετικές διαφορές στην μολυσματικότητα (-) και (+) PSTVd πολυμερών σε *L. ensulentum* (Tablet et al, 1985). Αν και τα τρανσγενικά φυτά *N. benthamiana* που εκφράζουν (-) RNA πλήρους μήκους εμφανίζονται μολυσμένα και ανιχνεύεται cPSTVd (circular PSTVd, Feldstein et al., 1998), η διαφορά στην μολυσματικότητα ενδέχεται να οφείλεται στην σχετική σταθερότητα του (-) RNA και (+) RNA, με τα

δεύτερα λόγω σταθερότερης δευτεροταγούς δομής να αποδεικνύονται ανθεκτικότερα στην αποικοδόμηση από ενδοκυτταρικές RNases. Εναλλακτικά, μπορεί να οφείλεται και σε λιγότερο σταθερό υποκινητή στην περίπτωση του (-)RNA μορίου. Η *Arabidopsis thaliana*<sup>1</sup> έχει την ικανότητα να καταλύει –μέσω RNase και RNA λιγάσης- την μετατροπή 35S κατευθυνόμενων διμερών κεφαλής με ουρά (+) RNA ποικίλων ιοειδών (CEVd, HSVd, CCCVd, CbVd-1, ASSVd) της οικογένειας Pospiriviridae σε κυκλικό θετικής πολικότητας μολυσματικό PSTVd (Daros and Flores, 2004). Αρνητικής πολικότητας πολυμερή CEVd και HSVd (ενδεικτικά του αυτόνομου διπλασιασμού) επίσης ανιχνεύονται σε διαγονιδιακές σειρές *Arabidopsis* που εκφράζουν τα (+) διμερή. Έκφραση από διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis* (-) διμερούς HSVd οδηγεί στην ανίχνευση θετικής πολικότητας πολυμερών αλλά και ώριμου κυκλικού μορίου (ενδεικτικό της ικανότητας της *Arabidopsis* να επιτρέπει την Pol II εξαρτώμενη μεταγραφή θετικής πολικότητας πολυμερών ιοειδούς από αρνητικής πολικότητας πρόδρομα, Daros and Froes, 2004).

Άλλες περιοχές του ιοειδούς που σχετίζονται ή τροποποιούν την ικανότητα διπλασιασμού περιλαμβάνουν την μεταβλητή περιοχή (V domain, Hu et al., 1996), την περιοχή παθογένειας (pathogenicity domain) όπως αποκαλύπτεται από την ανασταλτική επίδραση μεταλλαγών στις περιοχές αυτές στον πολλαπλασιασμό του ιοειδούς (Owens et al., 1996), ενώ το Hairpin II (δομή που δημιουργείται κατά τον κύκλο διπλασιασμού, για την θέση του και τον τρόπο δημιουργίας του δεξ και παρακάτω και στο σχήμα 1) είναι απαραίτητο για την δημιουργία κατευθυνόμενων από μήτρα (-) PSTVd (+) PSTVd ενδιάμεσων (Schroder et al., 2002), αλλά και για την μολυσματικότητα. Η ακραία αριστερή συντηρημένη περιοχή (TI) είναι απαραίτητη για την σταθερότητα του μορίου (Hu et al., 1997) ενώ μεταλλαγές στην αντίστοιχη περιοχή έχουν επίδραση στον διπλασιασμό (Hammond, 1994). Το μοτίβο Hairpin I είναι απαραίτητο για τον διαμερισμό και συνακόλουθα για την μολυσματικότητα του μορίου (Gast et al., 1998), ενώ η CCR (central conserved region, κεντρική συντηρημένη περιοχή) είναι απαραίτητη για την επεξεργασία μεγαλύτερων πλήρους μήκους ενδιάμεσων μεταγραφής (+) πολικότητας σε cPSTVd (Baumstark et al., 1997, Schoder et al., 2003). Μια νουκλεοτιδική αλλαγή (C<sup>259</sup> => U) επιτρέπει τον διπλασιασμό του KF440-2 σε *Nicotiana tabacum* (Wassenegger et al.,

---

<sup>1</sup> Η *A. thaliana* δεν είναι ξενιστής των ιοειδών όταν αυτά μολύνονται με μηχανική μόλυνση. Ωστόσο, όταν ολιγομερή RNA των ιοειδών εκφραστούν σε τρανσγενικά φυτά, ορισμένα στάδια του διπλασιασμού είναι δυνατόν να ολοκληρωθούν.



1996). Η ίδια μεταλλαγή στο PSTVd<sup>int</sup> ή U<sup>257</sup>=>C έχει σαν αντίκτυπο την αύξηση κατά μια τάξη μεγέθους της ταχύτητας πολλαπλασιασμού σε πρωτοπλάστες καπνού (Qi and Ding, 2002) και της παθογονικότητας σε τομάτα.. Η μεταλλαγή U<sup>259</sup>=>A έχει την δυνατότητα να μετατρέψει το PSTVd<sup>int</sup> σε «θνησιγόνο» στον φυσικό ξενιστή *L. ensulentum* (Qi and Ding, 2003). Οι μεταλλαγές που αλλάζουν την εξειδίκευση ξενιστή ή την παθογένεια εντοπίζονται στο μοτίβο λούπας E (μέρος της CCR) περιοχής απαραίτητης για την επεξεργασία μεγαλύτερων του πλήρους μήκους μεταγράφων θετικής πολικότητας σε ώριμα κυκλικά μόρια (Baumstark et al., 1997).

Με την χρήση χημικών μορίων CEVd και HSVd κατέστη δυνατή η συσχέτιση της ικανότητας αντιγραφής με την δεξιά ακραία συντηρημένη περιοχή (TR domain, Sano et al., 1998) αν και με πειράματα ένεσης μέσω Αγροβακτηρίου CaMV 35S κατευθυνόμενων μεταγράφων μεταλλαγμάτων στην αντίστοιχη περιοχή είχε προηγουμένως διαπιστωθεί η ικανότητα διπλασιασμού του μεταλλάγματος στην περιοχή της μόλυνσης αλλά όχι στους συστηματικά προσβεβλημένους ιστούς (Hammond, 1994). Η περιοχή των μεταλλαγών όμως όπως και των μεταλλαγών που επαναφέρουν την ικανότητα συστηματικής μεταφοράς δεν είναι επικαλυπτόμενες με το ***RY μοτίβο*** το οποίο έχει ικανότητα πρόσδεσης με την πρωτεΐνη Virp1 της τομάτας (Gozmanova et al., 2003). Αδυναμία μόλυνσης με (+) διμερή ιοειδών μετά την παροδική έκφραση μέσω αγροβακτηρίου στην *Arabidopsis* παρέχει ενδείξεις για την αδυναμία συστηματικής μεταφοράς του ιοειδούς, λόγω ίσως έλλειψης κάποιου παράγοντα ξενιστή που ευθύνεται για την μεταφορά (Dargos and Froes, 2004). Η Virp1 πρωτεΐνη της τομάτας δεν έχει στενά συγγενικά ορθόλογα στην *Arabidopsis*, πιθανώς εμπλέκεται στην συστηματική μεταφορά του ιοειδούς (Maniatakis et al., 2003) και είναι ένας πιθανός περιοριστικός παράγοντας για την συστηματική μεταφορά του ιοειδούς στην *Arabidopsis*. Καθώς έχει πρόσφατα αποκαλυφθεί η συμμετοχή της στον πολλαπλασιασμό του ιοειδούς (Kalantidis et al., in preparation) πιθανόν αναφερόμαστε σε ένα πολυλειτουργικό μόριο με ποικίλες εμπλοκές στον κύκλο ζωής του ιοειδούς.

Η μεταφορά του PSTVd μεταξύ κυττάρων (**cell to cell movement**) συμβαίνει δια μέσου πλασμοδεσμάτων όπως αποδεικνύεται από την μεταφορά του σε κύτταρα μεσοφύλλου (και την συσσώρευση του στον πυρήνα- μετά από ένεση αλλά όχι την μεταφορά του μετά από ένεση έξω από τα συμπλασμικά απομονωμένα guard cells, Ding et al., 1997). Σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* στα οποία το PSTVd εκφράζεται μέσω ενός υποκινητή ιστοειδικού για συνοδά κύτταρα (companion cells)

έχει την δυνατότητα να μεταφερθεί σε γειτονικά κύτταρα (Zhu et al., 2002) ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο σε διαγονιδιακές σειρές καπνού. Το PSTVd εντοπίζεται σε κύτταρα φλοιώματος, μεσοφύλλου και επιδερμικά κύτταρα (αλλά και σε cortical cells) ενός φύλλου αποδέκτη φωτοσυνθετικών προϊόντων (sink, Zhu et al., 2001). Σε φύλλα στο μεταίχμιο της μετατροπής από αποδέκτες σε πηγές-αρωγά (source) το PSTVd εντοπίζεται στο αγωγό ιστό (Zhu et al., 2001), ενώ δεν προσβάλλει αρωγά φύλλα (3 wpi) εκτός και αν η μόλυνση έχει ξεκινήσει όταν το φύλλο ήταν ακόμα αποδέκτης. Μεριστωματικά κύτταρα δεν προσβάλλονται από το ιοειδές (Qi and Ding, 2003, Zhu et al., 2001). Το ιοειδές έχει την ικανότητα να μεταγράφεται σε κύτταρα αγωγού ιστού και εντοπίζεται σε κύτταρα αγωγού ιστού από αναπτυσσόμενα σέπαλα αλλά όχι σε άλλα ανθικά μέρη (π.χ. πέταλα, Zhu et al., 2002, Zhu et al., 2001). Όταν PSTVd RNA παραχθεί σε διαγονιδιακά φυτά στα πέταλα έχει την δυνατότητα αναπαραγωγής (replication), όπως φαίνεται από την ύπαρξη της ενδεικτικής διπλασιασμού (-) πολικότητας αλυσίδας, αλλά η απουσία του μετα από μηχανική μόλυνση φύλλων οφείλεται στον αποκλεισμό του λόγω φραγμού εισόδου στα ανθικά μέρη (Zhu et al., 2002). Το PSTVd έχει τα δομικά μοτίβα ώστε να επιτρέψει την συνμεταφορά άσχετου αλληλουχίας μεταγράφου όταν αυτό συνυπάρχει σαν χιμαιρικό μετάγραφο με το PSTVd (Ding et al., 1997). Το PSTVd μπορεί να ετεροκαμψιδωθεί σε ισοσώματα PLRV (ή σε ισοσώματα VTMoV) και να μεταφερθεί μέσω αφίδων (Querci et al., 1997) αν και ο βασικός τρόπος μεταφοράς του είναι η χρήση μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού.

**Υποκυτταρικός εντοπισμός PSTVd.** Με την χρήση σημασμένων RNA μεταγράφων σε πρωτοπλάστες καπνού (BY2) επιβεβαιώθηκε ο πυρηνικός εντοπισμός του PSTVd, διαδικασία που προϋποθέτει την ύπαρξη ενός εξειδικευμένου υποδοχέα καθώς παρατηρείται κορεσμός σε πειράματα ανταγωνισμού με μη σημασμένο μετάγραφο σε περίσσεια (Woo et al., 1999). Με την χρήση μιας κατασκευής στην οποία το cDNA του PSTVd εντέθηκε σε ιντρόνιο το οποίο είχε προηγουμένως εντεθεί στην κωδική περιοχή της mgfr4 και η όλη κατασκευή μεταγράφηκε σε φυτικό κύτταρο *N. benthamiana* ως υπογενωμικό RNA του ιού PVX, οι Zhao et al. (2001) απέδειξαν ότι η έκφραση GFP είναι εφικτή μόνο στην περίπτωση που το υπογενωμικό RNA μεταφερθεί στον πυρήνα από το ιοειδές, λάβει χώρα μάτισμα και επιστροφή του μεταγράφου GFP στο κυτταρόπλασμα για μετάφραση. Η εισαγωγή του PSTVd στον πυρήνα δεν εξαρτάται από τις οργανωμένες δομές του κυτταροσκελετού ούτε περιλαμβάνει δράση GTP-ase όπως αποδεικνύεται με

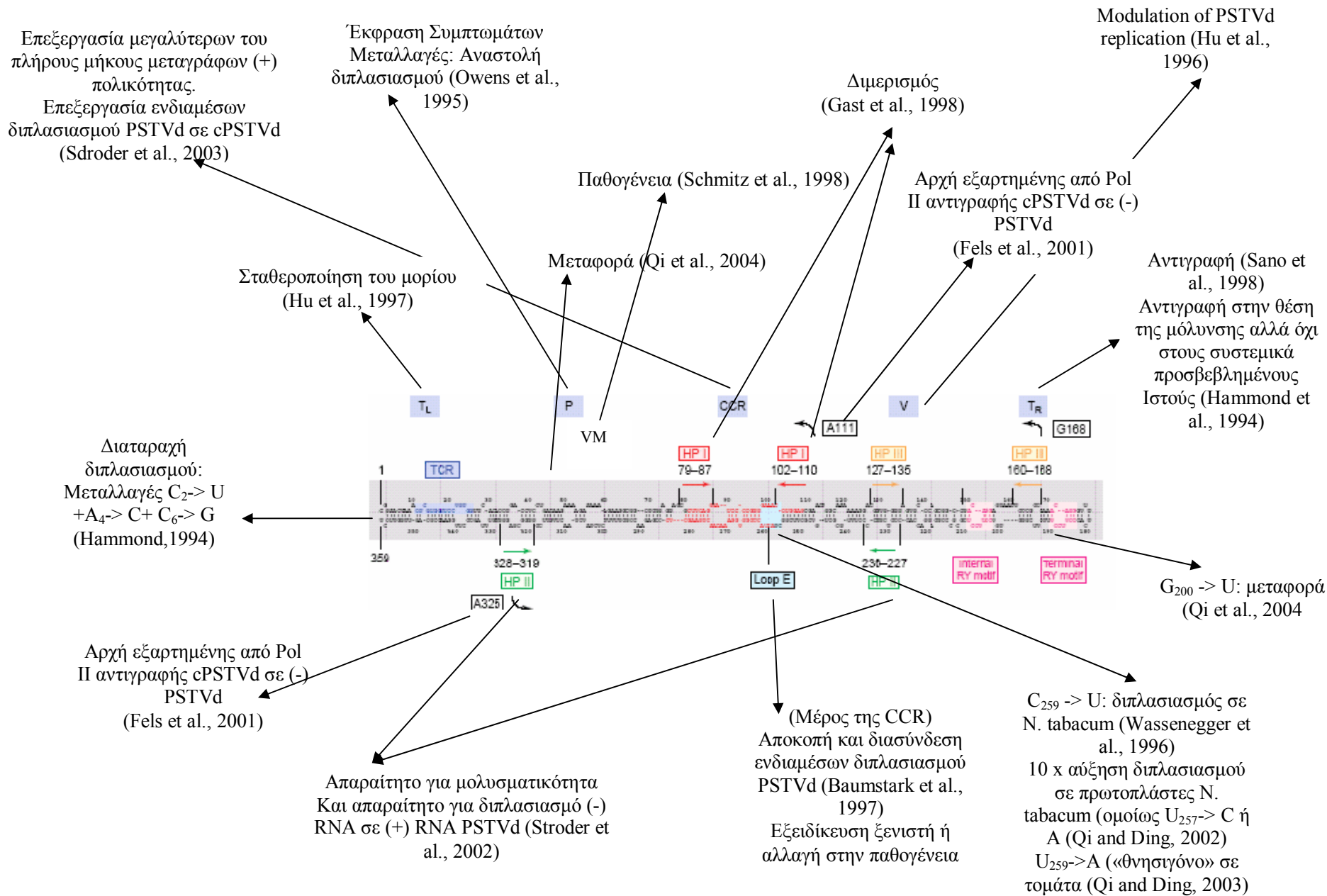
πειράματα σε πρωτοπλάστες καπνού χρησιμοποιώντας αντίστοιχους καταστολείς (Woo et al., 1999). Τα ενδιάμεσα της μεταγραφής του PSTVd έχουν διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό. Τα (-) πολυμερή ενδιάμεσα εντοπίζονται στο νουκλεόπλασμα ενώ τα (+) πολικότητας πολυμερή ενδιάμεσα στο πυρηνίσκο και στο νουκλεόπλασμα (Qi and Ding, 2003). Τα (-) πολυμερή παράγονται από την Pol II στο κυτταρόπλασμα και χρησιμεύουν σαν υπόστρωμα για την δημιουργία (+) πολυμερών στο νουκλεόπλασμα, στον πυρηνίσκο ή και στα δυο. Τα (+) πολυμερή μετατρέπονται σε ώριμα cRNA πιθανότερα στον πυρηνίσκο (ενώ κάποια ώριμα cRNA μπορεί επίσης να παράγονται στο νουκλεόπλασμα και να μεταφέρονται στον πυρηνίσκο), ενώ δεν αποκλείεται και η περίπτωση ώριμα cRNA να ωριμάζουν αποκλειστικά στο νουκλεόπλασμα και στην συνέχεια να μεταφέρονται στον πυρηνίσκο. Η μεταφορά (+) πολυμερών ή/και ώριμων cRNA στον πυρηνίσκο ίσως έχει λειτουργική αξία στην ωρίμανση ή/και στην εμφάνιση συμπτωμάτων του ιοειδούς.

**Ο ρόλος των siRNAs του ιοειδούς.** Τα παραγόμενα siRNAs του ιοειδούς [πιθανώς προερχόμενα από την δράση πυρηνικής Dicer<sup>2</sup> με υπόστρωμα δίκλιωνα ενδιάμεσα του διπλασιασμού του ιοειδούς (που δημιουργούνται κατά τον κύκλο αντιγραφής) ή και το ίδιο το κυκλικό ιοειδές] υπάρχει η πιθανότητα να δρουν σαν miRNAs για την καταστολή ενδογενών μεταγράφων σε μεταμεταγραφικό επίπεδο (Flores et al., 2005) καθώς αρκετά μετάγραφα που καταστέλλονται κατά την μόλυνση από το ιοειδές (Ytaya et al., 2002) είναι **in silico πιθανοί στόχοι** (Karandemiris, personal observations) ή να δρουν σαν αρνητικοί ρυθμιστές ενδογενών miRNAs απομακρύνοντας τα από την δεξαμενή των miRNAs του κυττάρου με αποτέλεσμα την απουσία καταστολής στα αντίστοιχα mRNA στόχους. Ανεξάρτητα από την δράση τους και τον τρόπο παραγωγής τους έχει αποδειχθεί ότι συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα (Denti et al., 2004) αν και το κυκλικό ώριμο cRNA του ιοειδούς δεν είναι στόχος για την ανθρώπινη Dicer (Martinez de Alba and Flores, unpublished results) κατά αντιστοιχία με την αδυναμία ανθρώπινης Dicer να χρησιμοποιήσει σαν υπόστρωμα RNA του ιού της ηπατίτιδας δ (Chang et al., 2003).

**Σχήμα 1 (επόμενη σελίδα).** Λειτουργική εξειδίκευση των διαφόρων δομικών περιοχών του PSTVd. Ο κατάλογος είναι ενδεικτικός και σε καμία περίπτωση δεν συμπυκνώνει το σύνολο των γνώσεων για τα δομικά μοτίβα του μορίου.

---

<sup>2</sup> Πυρηνικός εντοπισμός DCL έχει αποδειχθεί για τις DCL1, DCL2, DCL3 (Xie et al., 2004) ενώ και η DCL4 έχει σινιάλο πυρηνικής στόχευσης.



## Γονιδιακή σίγηση

### Μεταμεταγραφική σίγηση και διαγονίδια.

Εξαρτώμενη από RNA γονιδιακή σίγηση (RNA silencing) είναι ένας μηχανισμός μεταμεταγραφικού ελέγχου γονιδιακής έκφρασης που συναντάται σε φυτά, ζώα και μύκητες (συμπεριλαμβανομένων κάποιων ζυμών, όπως ο *S. pombe*) που χαρακτηρίζεται από μια εξαρτώμενη από αλληλουχία αποικοδόμηση μεταγράφων-στόχων. Χαρακτηριστικό και διακριτικό γνώρισμα είναι η εμφάνιση RNA μορίων 21-26 nt από την δράση νουκλεασών της οικογένειας Dicer, τα οποία αφού αποελικωθούν και εισαχθούν σε ένα σύμπλοκο ονομαζόμενο RISC έχουν την δυνατότητα να επάγουν εξαρτώμενη από αλληλουχία αποικοδόμηση RNA μορίων-στόχων (Voinnet, 2001). Με τον όρο μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (Post-transcriptional gene silencing, PTGS) αναφερόμαστε στην περίπτωση σίγησης στην κωδική περιοχή ενός (δια)γονιδίου ενώ μεταγραφική σίγηση (Transcriptional gene silencing, TGS) στην περίπτωση σίγησης του υποκινητή ενός (δια)γονιδίου.

Επαγωγέας σίγησης είναι ένα τμήμα γενετικού υλικού (διαγονίδιο, ιός κτλ) που έχει την δυνατότητα να εντοπιστεί από το μονοπάτι της σίγησης του κυττάρου και να επάγει σίγηση σε άλλο τμήμα γενετικού υλικού με βάση το επίπεδο ομολογίας. Αντίθετα στόχος είναι τμήμα γενετικού υλικού που δεν αποτελεί αντικείμενο του ενδοκυτταρικού μηχανισμού σίγησης απουσία κάποιου επαγωγέα (π.χ. στην περίπτωση μιας κατασκευής ανεστραμμένων άκρων που στοχεύει ενδοκυτταρικό γονίδιο, επαγωγέας είναι η κατασκευή ανεστραμμένων άκρων και στόχος το ενδογονίδιο).

Διαγονιδιακές σειρές GUS που εμφανίζουν 8 φορές διαφορά στην συσσώρευση GUS mRNA έχουν ίδια επίπεδα έκφρασης GUS όπως αποδεικνύεται από run-off πειράματα σε απομονωμένους πυρήνες και η διαφορά στην συσσώρευση είναι αποτέλεσμα μεταμεταγραφικής σίγησης (*English et al., 1996*). Η επαγωγή της PTGS συμβαίνει μετά τις δυο πρώτες εβδομάδες της ζωής του φυτού, ενώ στους μεριστωματικούς ιστούς σιγημένων διαγονιδίων δεν παρατηρείται σίγηση (*Mitsuhara et al., 2002*). Αν και η σίγηση στην περίπτωση συνκαταστολής μπορεί να γίνει εμφανής μόλις 15 μέρες μετά τη βλάστηση (germination) και να ανιχνεύεται πριν τις πέντε πρώτες εβδομάδες της ζωής του φυτού, επαγωγή σίγησης από ιό είναι ανεξάρτητη από το αναπτυξιακό στάδιο (5 ή 8 εβδομάδων φυτά, *Braunstein et al., 2002*). Η περιοχή του διαγονιδίου που είναι επαγωγέας της σίγησης (π.χ. η 3' περιοχή του GUS στην περίπτωση της T4 διαγονιδιακής σειράς) είναι και επαγωγέας της

σίγησης εναντίον εξωγενώς προερχόμενου RNA στόχου και όχι άλλες περιοχές του GUS (*English et al., 1996*). Σποραδική επαγωγή PTGS σε απόγονους από σιγημένα ή μη φυτά δεν εξαρτάται από την κατάσταση σίγησης των προγόνων τους (*Mitsuhara et al., 2002*). Η σποραδική σίγηση διαγονιδιακών σειρών απελευθερώνεται κατά την καλλογένεση (*Mitsuhara et al., 2002*). In vitro αναγέννηση κάλλων από μη σιγημένα διαγονίδια από ένα στάδιο και μετά εμφανίζουν σποραδική σίγηση (*Mitsuhara et al., 2002*). Ο μηχανισμός της σίγησης είναι ενεργός σε πρωτοπλάστες καπνού όπως αποδεικνύεται από την ανίχνευση siRNAs που προέρχονται από transitive silencing έπειτα από επώαση με χημικά παρασκευασμένα siRNAs για GFP και 35S-GFP (*Vanitharani et al., 2003*).

Δεν είναι απαραίτητη η ύπαρξη πολύπλοκων πολλαπλών ενθέσεων για σίγηση (*Elmayan and Vacheret, 1996*). Η ύπαρξη σιγημένων σειρών που φέρουν single-copy διαγονίδια είναι σχετικά υψηλή, όπως και αφθονούν οι περιπτώσεις προοδευτικής σίγησης single-copy διαγονιδίων (*Meza et al., 2001*). Η σίγηση του ενδογονιδίου είναι πολύ ισχυρότερη από την σίγηση στο ίδιο το διαγονίδιο στην περίπτωση που το διαγονίδιο είναι σιγημένο κωδικής πολικότητας (*Han et al., 2004*). Η ύπαρξη διακυμάνσεων στα επίπεδα σίγησης απογόνων σιγημένων προγόνων δεν είναι χαρακτηριστικό μόνο των φυτών που προέρχονται από φυτά με πολλαπλές ενθέσεις διαγονιδίων (*Meza et al., 2001*). Ισχυρά εκφραζόμενα γονίδια μπορούν να σιγηθούν όταν μεταπίπτουν από ετερόζυγη σε ομόζυγη κατάσταση ή στα μη πρώιμα στάδια της ανάπτυξης τους, ενώ η σίγηση σε κατοπινό στάδιο φαίνεται να συσχετίζεται με την ύπαρξη σε πολύ πρώιμο στάδιο πολύ ισχυρής έκφρασης (*Elmayan and Vaucheret, 1996*).

Διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν μια μη μεταγράψιμη κόπια της Hc-Pro πρωτεΐνης του PVY σε κωδικό προσανατολισμό (sense orientation) εμφανίζουν σε ένα ποσοστό ανθεκτικότητα στον PVY, δεδομένο που αποδεικνύει ότι η καταστολή είναι σε επίπεδο μεταγράφου και όχι διαμεσολαβούμενη από πρωτεΐνη (*Waterhouse et al., 1998*). Πολλαπλές κόπιες διαγονιδίου εμφανίζουν συχνότερα καταστολή από ότι μειωμένος αριθμός (*Waterhouse et al., 1998*). Συνμετασχηματισμός φυτών με κατασκευές που κωδικοποιούν την κωδική και την αντικωδική αλυσίδα της Hc-Pro πρωτεΐνης στο ίδιο φυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ικανότητας καταστολής και αναστολής του διπλασιασμού του ιού (*Waterhouse et al., 1998*). Διασταύρωση δυο διαγονιδιακών σειρών, η μια από τις οποίες έχει το διαγονίδιο της Pro πρωτεΐνης σε κωδικό προσανατολισμό και η άλλη σε αντικωδικό, έχει σαν

αποτέλεσμα dsRNA-μεσολαβούμενη καταστολή του διπλασιασμού του ιού και ανθεκτικότητα (Waterhouse et al., 1998). Κατασκευές ανεστραμμένων ακρών είναι οι πιο αποτελεσματικοί επαγωγείς σίγησης (Waterhouse et al., 1998). Μετά από μόλυνση με ανασυνδυασμένο PVX με ενθέματα GUS σε GUS διαγονιδιακές σειρές αποδείχθηκε ότι ο πιο ισχυρός στόχος της σίγησης βρίσκεται στο 3' μέρος της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου (Braunstein et al., 2002).

Υποβολή σε στρεσογόνες καταστάσεις (π.χ. θερμοκρασιακό στρες) έχει επίδραση στο ποσοστό των σιγημένων απογόνων διαγονιδιακών φυτών στην επόμενη γενιά και στην διαμόρφωση του φαινοτύπου σίγησης (Meza et al., 2001).

Διαγονιδιακοί γενετικοί τόποι-επαγωγείς σίγησης έχουν την δυνατότητα να σιγήσουν *in trans* άλλους διαγονιδιακούς τόπους –στόχους, όταν επαγωγέας και στόχος βρεθούν με **διασταύρωση** στο ίδιο γενετικό περιβάλλον (Van Houdt et al., 2003). Απομάκρυνση του επαγωγέα σίγησης (με outcrossing) έχει σαν αποτέλεσμα την απουσία διατήρησης σίγησης στο διαγονίδιο-στόχο (Van Houdt et al., 2003). Διασταύρωση amplicon σειράς PVX (αμπλικόνιο, δεξ και παρακάτω στο κείμενο για την περιγραφή των αμπλικονίων) με ένθεμα GFP με 35S-GFP σειρά Arabidopsis έχει σαν αποτέλεσμα την σίγηση του 35S-διαγονιδίου, ενώ παρόμοια διασταύρωση με amplicon PVX-GFP με έλλειμμα στην ρεπλικάση του PVX και αδυναμία αυτόνομου διπλασιασμού δεν επηρεάζει την σίγηση (Dalmay et al., 2000). Run-off πειράματα απέδειξαν ότι η σίγηση είναι σε μεταμεταγραφικό επίπεδο (Dalmay et al., 2000). Απουσία γονιδίου-στόχου έχει σαν αποτέλεσμα μικρή ποσότητα siRNAs και μερική μόνο ικανότητα καταστολής TRV-GFP σε PVX-GFP φυτά αμπλικόνια. Αντίθετα παρουσία ενδογενούς στόχου 35S-GFP έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα siRNAs (για τον στόχο GFP και όχι και για το PVX τμήμα του αμπλικονίου) και δυνατότητα αυξημένης ικανότητας καταστολής TRV-GFP (Dalmay et al., 2000).

Έκφραση μεταγράφου **ανάστροφης επανάληψης** απαιτείται για αποτελεσματική σίγηση σε μεταμεταγραφικό επίπεδο, όπως φαίνεται από την σχετική αποτελεσματικότητα κατασκευών ανάστροφης επανάληψης κατευθυνόμενων από 35S- και χωρίς υποκινητή (Sijen et al., 2001). Στην περίπτωση κατασκευής ανεστραμμένων άκρων υπάρχει σίγηση σε ρίζες και φύλλα και είναι ομοιόμορφη (Tomita et al., 2004). Παροδική επαγόμενη καταστολή κατασκευής ανεστραμμένων άκρων σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση επαγόμενων από αιθανόλη υποκινητών και την χορήγηση αιθανόλης στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο (Lo et al., 2005).

Τα **siRNAs** εμφανίζονται πριν γίνει αντιληπτή σε μακροσκοπικό επίπεδο η καταστολή μέσω μεταμεταγραφικής σίγησης και τα επίπεδα τους αρχίζουν να μειώνονται κατά την διάρκεια της περιόδου που είναι εμφανή σε επίπεδο ελάττωσης μεταγράφου η μεταμεταγραφική σίγηση (Han and Grierson, 2002). Μεγαλύτερος αριθμός κοπιών διαγονιδίου κωδικής πολικότητας (sense orientation) σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα siRNAs (Han et al., 2004). Η σίγηση στην περίπτωση της επαγωγής από ιό συνοδεύεται από την ανίχνευση siRNAs ενώ είναι εφικτή η διασπορά της σίγησης στην κατεύθυνση 5'-3' μέσω transitive silencing (Braunstein et al., 2002). Συνμεταφορά χημικά παρασκευασμένων siRNAs ειδικών για GFP έχουν σαν αποτέλεσμα την μείωση επιπέδων GFP σε πρωτοπλάστες καπνού (Vanitharani et al., 2003). siRNAs ειδικά για geminiviruses μπλοκάρουν τον διπλασιασμό του ιού σε πρωτοπλάστες καπνού (Vanitharani et al., 2003).

Σε περίπτωση που μια κατασκευή με δυο reporter genes (GUS και GFP) ενεθεί με αγροένχυση δυο διαδοχικές φορές (χρονικά απομακρυσμένες κατά 3 εβδομάδες) σε GFP διαγονιδιακά φυτά, δεν υπάρχει παροδική έκφραση GFP μετά την δεύτερη ένεση ανεξάρτητα ή όχι με την ύπαρξη υποκινητή με ομολογία με αυτόν του διαγονιδίου (Voinnet et al., 1998).

Σε σιγημένα διαγονιδιακά φυτά υπάρχει συσχέτιση του βαθμού σίγησης σε μεταμεταγραφικό επίπεδο και του βαθμού **μεθυλίωσης** (Van Houdt et al., 1997). Μείωση επιπέδων μεταγράφου σε σιγημένα με μεθυλίωση διαγονιδιακά φυτά σχετίζεται με αύξηση επιπέδων μεθυλίωσης (Ingelbrecht et al., 1994). Σε σιγημένα και μεθυλιωμένα διαγονίδια όταν η σίγηση είναι σε μεταμεταγραφικό επίπεδο η **μείωση** των επιπέδων RNA είναι αποτέλεσμα έλλειψης συσσώρευσης αλλά όχι απουσία μεταγραφής (Ingelbrecht et al., 1994), όπως φαίνεται με run-off πειράματα

**Επαγωγέας μεθυλίωσης** (Jakowitsch et al., 1999) είναι ένα τμήμα γενετικού υλικού (διαγονίδιο, ιός κτλ) που έχει την δυνατότητα να εντοπιστεί από το παρακλάδι της μεθυλίωσης του μονοπατιού της σίγησης του κυττάρου και να επάγει μεθυλίωση σε άλλο τμήμα γενετικού υλικού με βάση το επίπεδο ομολογίας. Αντίθετα στόχος είναι τμήμα γενετικού υλικού που δεν αποτελεί στόχο του ενδοκυτταρικού μηχανισμού μεθυλίωσης απουσία κάποιου επαγωγέα. Διαγονίδιο στόχος μεθυλίωσης, δεν έχει ικανότητα να μετατραπεί σε επαγωγέα δηλαδή να επάγει μεθυλίωση άλλων διαγονιδιακών-τόπων, πιθανώς διότι στερείται ενός διαχεόμενου «σινιάλου» που έχει την ικανότητα να παράξει διαγονίδιο-επαγωγέα (Park et al., 1996). Επαγωγείς (όπως στην περίπτωση του 271 locus) συχνά εντοπίζονται με FISH σε περιοχές του



χρωμοσώματος που λαμβάνει χώρα εκτεταμένη απενεργοποίηση λόγω μεθυλίωσης και αναπροσαρμογής δομής χρωματίνης (Park et al., 1996). Ο 271 γενετικός τόπος είναι ένας σύνθετος γενετικός τόπος που αποτελείται από πολλαπλές κόπιες ενός 35S κατευθυνόμενου antisense NiR διαγονιδίου. Έχει την ικανότητα να προκαλεί μεθυλίωση και απενεργοποίηση οποιουδήποτε 35S ή 19S υποκινητή βρεθεί μέσω διασταύρωσης στο γενετικό του υπόβαθρο. 35S υποκινητές μετα από διασταύρωση μεθυλιώνονται και απενεργοποιούνται in trans. Η μεθυλίωση αυτή είναι κληρονομήσιμη αλλά οι γενετικοί αυτοί τόποι δεν αποκτούν ιδιότητα επαγωγής in trans μεθυλίωσης σε άλλους 35S υποκινητές, υποδεικνύοντας ότι η εγκαθίδρυση μεθυλίωσης και η διατήρηση της είναι δυο διαδικασίες με διακριτές απαιτήσεις. Μάλιστα επειδή ανιχνεύεται sense μετάγραφο NiR στα 271 φυτά (υποδηλώνει ύπαρξη antisense μεταγράφου όχι προερχόμενου από τον 35S) ίσως η εγκαθίδρυση της μεθυλίωσης στον 271 να προϋπόθετε την ύπαρξη antisense 35S μεταγράφου. Η ύπαρξη αυτού του μεταγράφου ίσως σχετίζεται και με την ικανότητα του 271 να εγκαθιδρύει μεθυλίωση in trans σε ομόλογους υποκινητές (Park et al. 1996).

Υπάρχει συσχέτιση του βαθμού **μεθυλίωσης** του επαγωγέα της PTGS και της ικανότητας ενός μεταμεταγραφικά σιγημένου διαγονιδίου να επάγει σίγηση in trans σε άλλα διαγονίδια ή σε ανασυνδυασμένους ιούς που φέρουν τμήματα της περιοχής του επαγωγέα αλλά όχι άλλων περιοχών του διαγονιδίου (*English et al., 1996*). Η μεθυλίωση μπορεί να εγκαθιδρυθεί και σε καταστάσεις στις οποίες η μεταμεταγραφική σίγηση δεν είναι ενεργή, όπως για παράδειγμα η καλλογένεση ενώ μπορεί να ανιχνευτεί και σε μη σιγημένες σειρές στους απογόνους των οποίων όμως μπορεί να επαχθεί σίγηση (Mitsuhashi et al., 2002). Η μεθυλίωση στην κωδική περιοχή σιγημένων σε μεταμεταγραφικό επίπεδο διαγονιδίων σχετίζεται με **μειωμένα** επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου (Mourrain et al., 2000).

Η μείωση στο επίπεδο RNA σε ένα μεθυλιωμένο γενετικό τόπο δεν αντιστοιχεί στην αντίστοιχη μείωση πρωτεϊνικών επιπέδων υποδηλώνοντας ότι το μετάγραφο αν και παράγεται δεν είναι μεταφράσιμο σε ένα ποσοστό λόγω κάποιου χαρακτηριστικού στην δομή του μορίου (ημιτελές ή ατελώς επεξεργασμένο ή μη πολυαδενυλιωμένο) ή ενός μη εξακριβωμένου ακόμα tag (Van Houdt et al., 1997)

Σε τρανσγενικά φυτά όπου το διαγονίδιο κατευθύνεται από 35S ο οποίος με μεταλλαξιγένεση έχει απωλέσει τις συμμετρικές (CG ή CNG) θέσεις μεθυλίωσης, η ύπαρξη 271 locus (επαγωγέα de novo μεθυλίωσης στον 35S) μέσω διασταύρωσης οδηγεί σε σίγηση, υποδεικνύοντας ότι για την de novo μεθυλίωση η ύπαρξη

συμμετρικών θέσεων δεν είναι απαραίτητη. Σε αντίθεση όμως με την προοδευτική εκρίζωση της μεθυλίωσης μετά την απομάκρυνση του επαγωγέα, στην περίπτωση αυτή η μεθυλίωση διαγράφεται άμεσα στην επόμενη γενιά υποδεικνύοντας ότι για την διατήρηση της είναι απαραίτητη η ύπαρξη συμμετρικής μεθυλίωσης (Dienguez et al., 1998).

Στην περίπτωση που με PCR έχουν εισαχθεί 5-m-κυτοσίνες στον υποκινητή ή την κωδική περιοχή κατασκευής ενώ παράλληλα με μεταλλαξιγένεση έχει προκύψει κατασκευή απαλλαγμένη συμμετρικών θέσεων μεθυλίωσης (CG ή CNG) και τα PCR προϊόντα χρησιμοποιηθούν για παροδική έκφραση σε πρωτοπλάστες καπνού παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης της κατασκευής. Πιο συγκεκριμένα, όταν υποκινητής και κωδική περιοχή αν και περιέχουν συμμετρικές θέσεις μεθυλίωσης έχουν ενσωματωμένη 5-m-κυτοσίνη παρατηρείται μείωση επιπέδων μεθυλίωσης (2,7 % σε σχέση με την ίδια κατασκευή μη μεθυλιωμένη). Μεθυλιωμένη κατασκευή που εμφανίζει συμμετρικές θέσεις στον υποκινητή αλλά όχι στην κωδική περιοχή εμφανίζει 6,2 % έκφραση σε σχέση με την μη μεθυλιωμένη. Ομοίως μείωση στο 13,7 % ανιχνεύεται στην περίπτωση μεθυλιωμένης κατασκευής με απουσία συμμετρικών κυτοσινών στον υποκινητή αλλά όχι στην κωδική περιοχή (σε σχέση με την ίδια κατασκευή μη μεθυλιωμένη). Ακόμα και στην περίπτωση όμως που υπάρχουν στην κατασκευή μόνο ασύμμετρες κυτοσίνες υπάρχει μείωση (31 %) στην περίπτωση χρησιμοποίησης μεθυλιωμένης κατασκευής σε σχέση με την ίδια κατασκευή μη μεθυλιωμένη, υποδεικνύοντας ότι και η ύπαρξη ασύμμετρης μεθυλίωσης (χαρακτηριστικό de novo μεθυλίωσης) συνεισφέρει στην μείωση της έκφρασης σιγημένων μεταγραφών (Dienguez et al., 1997).

Διαγονιδιακός τόπος που περιέχει λόγω ανασυνδυασμού παλίνδρομο για υποκινητή NOS pro (είναι επαγωγέας μεθυλίωσης και εμφανίζεται ο ίδιος μεθυλιωμένος) έχει την δυνατότητα να σιγήσει (και να μεθυλιώσει) in trans άλλους διαγονιδιακούς τόπους κατευθυνόμενους από NOSpro (Mette et al., 1999). Η ικανότητα μεθυλίωσης είναι συνυφασμένη με την ικανότητα του παλίνδρομου του υποκινητή να εκφράζεται καθώς διασταύρωση με διαγονιδιακό τόπο που σιγεί σε μεταγραφικό επίπεδο την έκφραση του παλίνδρομου (σίγηση μέσω 271 locus του 35S που είναι υπεύθυνος για την έκφραση του παλίνδρομου) έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια ικανότητας του παλίνδρομου να σιγεί άλλους διαγονιδιακούς τόπους-στόχους μέσω μεθυλίωσης (Mette et al., 1999). Οι Mette et al (2000) χαρακτήρισαν διαγονιδιακές σειρές που περιέχουν την αλληλουχία του Nospro υποκινητή κάτω από τον έλεγχο του

35SCaMV υποκινητή με την μορφή παλίνδρομων. Αυτές οι σειρές οδηγούσαν στην παρασκευή dsRNA του Nospro υποκινητή, που με την σειρά τους οδηγούσαν στην μεθυλίωση άλλων γενετικών τόπων με γονίδια που βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του Nospro.

Σηματοδοτική δράση για μικρές αλληλουχίες τύπου ανάστροφης επανάληψης στην *de novo* μεθυλίωση έχει κατά καιρούς υπαινιχθεί αλλά δεν υπάρχουν ξεκάθαρα δεδομένα για τον τρόπο εμπλοκής και το στάδιο της διαδικασίας που επηρεάζουν (Muller et al., 2002). Πέψη RNA από σειρές που σιγούν μέσω μεθυλίωσης άλλα διαγονίδια-στόχους λόγω δημιουργίας dsRNA για υποκινητή με RNase I, απέδειξε την ύπαρξη διπλόκλωνου RNA σαν επαγωγέα μεθυλίωσης (Mette et al., 2000). Μετατροπή μη παλινδρομικής επανάληψης (direct repeat) σε ανάστροφη επανάληψη (inverted repeat) μετατρέπει έναν ασθενή επαγωγέα μεθυλίωσης σε ισχυρό όπως αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα της μεθυλίωσης σε διαγονίδια στόχους (Mette et al., 2000). Ομοίως διαγονιδιακά που περιέχουν ανάστροφες επαναλήψεις μπορούν να μεθυλιωθούν και η ικανότητα μεθυλίωσης του χάνεται όταν μέσω Cre-lox ανασυνδυασμού χαθεί η ανάστροφη επανάληψη (De Buck and Depicker, 2001). Η επαγόμενη από κατασκευή ανεστραμμένων άκρων μεθυλίωση συνοδεύεται από την ανίχνευση siRNAs ομόλογων με την κατασκευή (Mette et al., 2000). Δίκλωνο RNA σε σιγημένα φυτά με ανάστροφες επαναλήψεις διαγονιδίων δεν μπορεί να ανιχνευτεί με ήπια πέψη με RNase A σε αγρίου τύπου φυτά, πιθανόν διότι γίνεται άμεσα υπόστρωμα για ενδοκυτταρικές DICER, αλλά παρουσία ενός αναστολέα της σίγησης (όπως ο HC-Pro που επηρεάζει την συσσώρευση των μικρών RNAs) μπορούν να ανιχνευτούν (Mallory et al., 2002). Η μεθυλίωση στην ίδια την αλληλουχία του επαγωγέα (σε περίπτωση που ο επαγωγέας είναι ανάστροφη επανάληψη) είναι πιο έντονη στην κεντρική περιοχή και λιγότερο έντονη στις ακραίες περιοχές της ανάστροφης επανάληψης (Van Houdt et al., 2000). Ο ίδιος ο επαγωγέας μεθυλίωσης παρουσία στόχου μεθυλιώνεται σε πιο εκτεταμένο βαθμό και έχει την δυνατότητα να επάγει *de novo* μεθυλίωση σε διαγονίδια-στόχους (Van Houdt et al., 2000).

DNA μεθυλίωση μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε κομμάτι DNA έχει την δυνατότητα να αξιοποιήσει τους μηχανισμούς μεταγραφικής ρύθμισης του κυττάρου, ανεξάρτητα αν είναι ή όχι ενσωματωμένο στο γένωμα (Tang and Leisner, 1998).

Αν και σε όλα τα φύλλα σιγημένου με μεθυλίωση διαγονιδίου (στην κωδική περιοχή) υπάρχει μειωμένη έκφραση του διαγονιδίου, το φαινόμενο είναι πιο έντονο όσο περισσότερο προχωρημένη είναι η αναπτυξιακή ηλικία του φύλλου (Van Houdt

et al., 1997). Σε περιπτώσεις σίγησης in trans γενετικών τόπων λόγω ύπαρξης άλλου γενετικού τόπου-επαγωγέα σίγησης το φαινόμενο είναι πιο έντονο στα πιο προχωρημένα αναπτυξιακά στάδια (Van Houdt et al., 1997). Σε περιπτώσεις προοδευτικής σίγησης σε μεταμεταγραφικό επίπεδο με την ηλικία του φυτού, υπάρχει αντίστοιχη συσσώρευση μεθυλιωμένων κυτοσινών στην κωδική περιοχή που συμβαδίζει με την σίγηση (Van Houdt et al., 1997). Υπάρχει συσχέτιση του βαθμού σίγησης σε μεταμεταγραφικό επίπεδο και του βαθμού μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής ανεξάρτητα από την αναπτυξιακή ηλικία του φύλλου σε περιπτώσεις που η σίγηση είναι εμφανής σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο (Van Houdt et al., 1997). Στο ίδιο φύλλο η σίγηση είναι περισσότερο προφανής όσο πιο προχωρημένη είναι η αναπτυξιακή ηλικία του φύλλου (Van Houdt et al., 1997). Συμπερασματικά, σε περιπτώσεις που υπάρχει σίγηση είτε σε πρωιμότερο αναπτυξιακό στάδιο, είτε σε στάδιο αργότερα, υπάρχει αντιστοιχία στον αυξημένο βαθμό μεθυλιωμένων κυτοσινών της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου.

Σε περιπτώσεις σίγησης διαγονιδίων η μεθυλίωση είναι ανιχνεύσιμη από το στάδιο των οκτώ φύλλων σε νεαρά φύλλα (Van Houdt et al., 1997). Παρουσία επαγωγέα της σίγησης (που επάγει μεθυλίωση), η σίγηση είναι εμφανής μετά τις έξι πρώτες εβδομάδες της ζωής του φυταρίου αλλά αρχίζει σε πρωιμότερο στάδιο (Park et al., 1996). Η σίγηση διαγονιδίου-στόχου παρουσία διαγονιδίου-επαγωγέα σίγησης γίνεται σε πιο πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο όσο περισσότερο μεθυλιωμένη είναι η αλληλουχία του προγόνου διαγονιδίου-στόχου (Park et al., 1996). Παρουσία διαγονιδιακού τόπου επαγωγέα σίγησης με μεθυλίωση (Van Houdt et al., 2000), η μεθυλίωση στόχου και επαγωγέα δεν περιορίζεται σε συμμετρικές θέσεις (Ingelbrecht et al., 1994), υποδεικνύοντας ότι το διαγονίδιο-επαγωγέας επάγει de novo μεθυλίωση.

Μετα την απομάκρυνση με outcrossing διαγονιδιακού-επαγωγέα μεθυλίωσης η μεθυλίωση του γονιδίου στόχου δεν εξοστρακίζεται σε μια μόνο γενιά, υποδεικνύοντας ότι όταν η μεθυλίωση εγκαθιδρυθεί υπάρχει προοδευτική εκρίζωση της σε μια διαδικασία που διαρκεί (σε αρκετές περιπτώσεις) μερικές γενιές (Park et al., 1996). Αν και η μεθυλίωση δεν εκριζώνεται σε μια γενιά μετά την απομάκρυνση διαγονιδίου-επαγωγέα, από την πρώτη γενιά είναι εμφανής η ελάττωση σε κάποιο βαθμό (Park et al., 1996).

Μετα από ένα κύκλο ιστοκαλλιέργειας/αναγέννησης φυτών που ήδη παρουσίαζαν μεθυλίωση στο 3' GUS διαγονίδιο, τα αναγεννημένα φυτά αν και παρουσίαζαν αύξηση επιπέδων GUS σε σχέση με τα προγονικά, παρουσίαζαν

ευαισθησία στην μόλυνση με PVX.GUS (αντίθετα με την προσδοκώμενη ανθεκτικότητα λόγω της ύπαρξης του σιγημένου διαγονιδίου στις προγονικές σειρές, English et al., 1996) και αντίθετα με τα προσδοκώμενα λόγω υψηλότερης έκφρασης του διαγονιδίου εμφάνιζαν αυξημένη μεθυσίωση στον υποκινητή (English et al., 1997). Το παράδοξο εξηγείται με run-off πειράματα που υποδεικνύουν υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα συσσώρευσης μεταγράφου σε σιγημένες διαγονιδιακές σειρές. Αύξηση μεθυσίωσης στον υποκινητή συνοδεύεται από μικρότερο βαθμό μεταγραφής. Σε περίπτωση σίγησης λόγω μεθυσίωσης υποκινητή (σε σχέση με σίγηση στην κωδική περιοχή), υπάρχει μείωση βαθμού μεταγραφής αλλά (σε περίπτωση μεταγράφου με μεγάλο χρόνο ημιζωής) υψηλός βαθμός συσσώρευσης μεταγράφου (English et al., 1997).

Μόνο παρουσία στόχου, το PVX-GFP αμπλικόνιο έχει την δυνατότητα να μεθυσωθεί και να μεθυσίσει τον στόχο (35S-GFP διαγονίδιο) και μάλιστα η ικανότητα μεθυσίωσης είναι περιορισμένη στην περιοχή με ομολογία με τον στόχο (GFP) και όχι καθ'όλο το μήκος του αμπλικονίου (Dalmay et al., 2000). PVX με ένθεμα τμήματα GFP έχει την δυνατότητα να μεθυσίσει GFP καθ'όλο το μήκος της σε 35S-GFP διαγονιδιακές σειρές ανεξάρτητα από το τμήμα της GFP που χρησιμοποιείται σαν ένθεμα. Στοχεύονται συμμετρικές και μη συμμετρικές κυτοσίνες και υπάρχει διασπορά (spreading) της μεθυσίωσης, η οποία όμως ποτέ δεν φτάνει μέσα στα όρια του υποκινητή ή της αλληλουχίας τερματισμού (terminator, Jones et al., 1999) σε περιπτώσεις διαγονιδίων. PVX με ένθεμα τμήμα κωδικής περιοχής GFP έχει την δυνατότητα να μεθυσίσει την κωδική περιοχή του διαγονιδίου αλλά όχι τον υποκινητή του διαγονιδίου. Αντίθετα PVX-35S κατασκευή έχει την δυνατότητα να μεθυσίσει τον 35S αλλά όχι την κωδική περιοχή του διαγονιδίου (Jones et al., 1999). Μόλυνση με TRV-GFP προκαλεί μεθυσίωση και σίγηση εκλεκτικά της κωδικής περιοχής σε 35S-GFP διαγονιδιακά φυτά ενώ TRV-35S εκλεκτικά του υποκινητή (Jones et al., 2001). Η κληρονόμηση της μεθυσίωσης μετά από μόλυνση με ιικό φορέα (TRV) ακολουθεί τα πρότυπα της σίγησης δηλαδή είναι κληρονομήσιμη σε περίπτωση στόχευσης υποκινητή αλλά μη κληρονομήσιμη στην περίπτωση στόχευσης κωδικής περιοχής (Jones et al., 2001).

Η σίγηση σε μεταμεταγραφικό επίπεδο δεν είναι **κληρονομήσιμη** όπως αποδεικνύεται με ύπαρξη φθορισμού σε 35S-GFP διαγονιδιακά φυτά (σιγημένων με TRV-GFP μόλυσμα), ενώ η μόλυνση TRV-35S στην ίδια σειρά οδηγεί σε απώλεια φθορισμού στην επόμενη γενιά προσβεβλημένων φυτών (Jones et al., 2001).

Απόγονοι σιγημένων διαγονιδιακών φυτών 35S-GFP (μετά από μόλυνση με TRV-35S) αν και διατηρούν την σίγηση σε επίπεδο TGS δεν έχουν την δυνατότητα να σιγήσουν μέσω διασταύρωσης άλλες μη σιγημένες 35S-GFP διαγονιδιακές σειρές υποδεικνύοντας ότι είναι μόνο στόχοι αλλά όχι και επαγωγείς TGS (Jones et al., 2001).

Αν και τα *sgs2/sde1/tdr6* και *sgs3* **μεταλλάγματα** έχουν επίδραση στην μεθυλίωση της σιγημένης κωδικής περιοχής σε περιπτώσεις σίγησης μέσω PTGS (και μάλιστα επίδραση στην CNG μεθυλίωση και μόνο μερική αναστροφή της συμμετρικής CG μεθυλίωσης), δεν εμφανίζουν αλλαγές στην μεθυλίωση λόγω TGS και δεν έχουν γενικότερη επίδραση στην αλλαγή των επιπέδων μεθυλίωσης σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Mourrain et al., 2000). Παρόμοια αποτελέσματα στην μεθυλίωση διαγονιδιακών με τα ίδια μεταλλάγματα έχουν παρατηρηθεί και στην περίπτωση όπου αντιστροφή της σίγησης σε επίπεδο PTGS σχετίζεται με απώλεια της αυξημένης μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής του διαγονιδιακού (Dalmay et al., 2000). Οι επιπτώσεις στην σίγηση μέσω συνκαταστολής και PTGS συνυπάρχουν με μείωση των επιπέδων μεθυλίωσης στα *ago1* μεταλλάγματα (Fagard et al., 2000). Τα *sde4* μεταλλάγματα (Pol IV μεταλλάγματα) έχουν επίδραση στην μεθυλίωση SINE retroelements σε μια σχετιζόμενη με RDR2 και DCL3 απόκριση (Herr et al., 2005). Αντίθετα η αντιστροφή της σίγησης στο ίδιο μέταλλαγμα και η μείωση των επιπέδων siRNAs δεν συνεπάγεται έντονες διαφορές στην μεθυλίωση διαγονιδιακών (Herr et al., 2005). Το τελευταίο ίσως υποδεικνύει την ύπαρξη και siRNA-independent βημάτων στην RNA-directed DNA μεθυλίωση (ή τις διαφορετικές απαιτήσεις σε επίπεδα RNA του μηχανισμού της κυτταροπλασματικής σίγησης και της σίγησης με αναπροσαρμογή χρωματίνης). Η RNA pol IV έχει επίδραση στην de novo μεθυλίωση και αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης και όχι στην διατήρηση προεγκαθιδρυμένων δομών σιγημένης χρωματίνης (Herr et al., 2005, Odonera et al., 2005).

Από τους γνωστούς **αναστολείς** της σίγησης, αυτοί για τους οποίους έχουν αποδοθεί εμπλοκή στην κατευθυνόμενη από RNA μεθυλίωση είναι ο 2b (Guo and Ding, 2002) και ο p69 (Chen et al., 2004). Αρχικά πειραματικά δεδομένα, απέτυχαν να συσχετίσουν αναστολείς κυτταρικής σίγησης με RNA-κατευθυνόμενη μεθυλίωση σε θέσεις υποκινητών (Marathe et al., 2000). Στην περίπτωση μεθυλίωσης που έχει ήδη εγκαθιδρυθεί, με την μεταφορά ενός 35S-κατευθυνόμενου GUS διαγονιδίου σε γενετικό background ενός γενετικού τόπου (271) που έχει την ικανότητα να προκαλεί κατευθυνόμενη από RNA σίγηση λόγω μεθυλίωσης 35S υποκινητών in trans, ο HC-

PRO και ο CMV2b δεν έχουν την δυνατότητα (είτε η έκφραση τους προέρχεται από ιϊκή μόλυνση με τον αντίστοιχο ιό είτε με έκφραση από διαγονιδιακά HC-PRO) να αναστρέψουν την υπάρχουσα μεθυλίωση. Τα δεδομένα αυτά είναι συμβατά με το μοντέλο ότι οι δυο αυτοί αναστολείς είτε δεν αλληλεπιδρούν με στάδια του μηχανισμού διατήρησης παγιωμένης μεθυλίωσης, είτε έχουν εκλεκτική δράση στην de novo εγκαθίδρυση μεθυλίωσης.

Για την αποσαφήνιση του ρόλου των δυο αναστολέων στην εγκαθίδρυση της μεθυλίωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα εναλλακτικό μοντέλο (η σειρά 6b5). Το χαρακτηριστικό της σειράς αυτής είναι η ιδιότητα της διαγραφής και επανεγκαθίδρυσης της μεθυλίωσης σε κάθε γενιά. Έτσι διασταύρωση με ένα διαγονιδιακό φυτό που υπερεκφράζει αναστολέα θα είχε επίδραση στην μεθυλίωση της αν ο αναστολέας αλληλεπιδρούσε με την de novo εγκαθίδρυση της μεθυλίωσης (Mallory et. al., 2001). Διασταύρωση με HC-PRO υπερεκφράζον φυτό δεν έχει επίδραση στην εγκαθίδρυση της μεθυλίωσης στην σειρά 6b5 (Mallory et. al., 2001). Αντίθετα διασταύρωση της σειράς αυτής με CMV2b υπερεκφράζον φυτό (Guo et.al., 2002) αποτρέπει την επανεγκαθίδρυση της μεθυλίωσης στο υβρίδιο υποδεικνύοντας ότι ο CMV2b αλληλεπιδρά εκλεκτικά με την εγκαθίδρυση της μεθυλίωσης και ότι η εγκαθίδρυση και η διατήρηση της μεθυλίωσης είναι ανεξάρτητες διαδικασίες με διαφορετικές απαιτήσεις. Με δεδομένο ότι ο HC-PRO στοχεύει το RISC (Silhavy and Burgyan, 2004), οι Mallory και συνεργάτες (2001) απέδειξαν ότι το σήμα για τη συστηματική σίγηση και το σήμα για την εγκαθίδρυση της μεθυλίωσης προηγούνται της δημιουργίας και δράσης των siRNAs. Η αναστολή της συστηματικής σίγησης και του σινιάλου εγκαθίδρυσης της μεθυλίωσης υποδεικνύει ότι ο CMV2b στοχεύει σε ένα βήμα το οποίο προηγείται της δημιουργίας συστηματικού σινιάλου και σινιάλου εγκαθίδρυσης μεθυλίωσης ή αλληλεπιδρά με έναν παράγοντα που έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά και με τα δυο ή κάποιο precursor (με δεδομένο ότι ο CMV2b στοχεύεται στον πυρήνα, Lucy et.al., 2000).

Έκφραση μιας **ανάστροφης επανάληψης** για τον 35S είναι ικανή να καταστείλει την έκφραση μιας άλλης ανάστροφης επανάληψης για chs (λόγω της σίγησης του 35S υποκινητή του τελευταίου, Sijen et al., 2001). Μερική μεθυλίωση υποκινητή δεν έχει επίδραση στην ενεργότητα του, ενώ μεθυλίωση προερχόμενη από επαγωγή τύπου ανάστροφης επανάληψης υποκινητή (ενός στόχου με ομολογία σε επίπεδο υποκινητή με το τελευταίο) έχει ως αποτέλεσμα την σίγηση του διαγονιδίου-στόχου (Sijen et al., 2001). Το τελευταίο ισχύει για διαγονιδιακούς υποκινητές, καθώς

αντίστροφα συμπεράσματα συνάγονται από την μελέτη αναστροφών επαναλήψεων που στοχεύουν ενδογενείς φυτικούς υποκινητές (Sijen et al., 2001).

Διασπορά της σίγησης μέσω **transitive silencing** έχει την δυνατότητα να επάγει in trans μεθυλίωση σε διαγονιδιακούς γενετικούς τόπους που έχουν ομολογία με το τμήμα του διαγονιδίου που έχει σιγηθεί μέσω transitive silencing (Van Houdt et al., 2003).

Σε *sde1*, *sgs3* και *ago1* mutant background, αναστρέφεται η σίγηση του 35S-GUS διαγονιδίου και η απουσία σίγησης συμβαδίζει με την αναστροφή των επιπέδων μεθυλίωσης (Beclin et al., 2002). Σε *sde1*, *sgs3* και *ago1* mutant background, παρουσία επαγωγέα αναστροφής επανάληψης GUS, ένας στόχος GUS (35S-GUS) εμφανίζει αύξηση των επιπέδων μεθυλίωσης (Beclin et al., 2002). Συμπερασματικά οι αναστροφές επαναλήψεις οδηγούν σε αύξηση μεθυλίωσης διαγονιδίων στόχων θετικής πολικότητας (Beclin et al., 2002).

Ακόμα και μια κατασκευή απαρτιζόμενη από αναστροφή επανάληψη του pos terminator συντηγμένη με μια κατασκευή θετικής πολικότητας του γονιδίου της επιλογής μας έχει την δυνατότητα να σιγήσει λόγω **transitive silencing** το γονίδιο της επιλογής μας (Brummel et al., 2003) λόγω της ιδιότητας πολλών σιγημένων διαγονιδιακών σειρών στα οποία η σίγηση αρχίζει από το 3' άκρο του διαγονιδίου, εξαιτίας ιδιομορφιών στην μικροδομή του διαγονιδίου στην περιοχή αυτή. Σίγηση ενός διαγονιδιακού τύπου μπορεί να επιτευχθεί μέσω ενός άλλου διαγονιδιακού τύπου-επαγωγέα (χωρίς να έχουν περιοχή ομολογίας), όταν τα δυο διαγονίδια βρεθούν μέσω διασταύρωσης στο ίδιο γενετικό περιβάλλον παρουσία ενός τρίτου διαγονιδίου το οποίο έχει μια περιοχή ομολογίας με το πρώτο και μια μη επικαλυπτόμενη περιοχή ομολογίας με το δεύτερο (Van Houdt et al., 2003). Άρα είναι δυνατή η διασπορά (spreading) της σίγησης σε 5'-3' κατεύθυνση (transitive silencing) σε διαγονίδιο στόχο όταν υπάρχει επαγωγέας σίγησης. Επίσης υπάρχει η δυνατότητα σίγησης άλλων διαγονιδιακών γενετικών τύπων in trans, οι οποίοι έχουν ομολογία με σιγημένο τμήμα διαγονιδίου (το οποίο με την σειρά του έχει σιγηθεί δευτερογενώς λόγω transitive silencing). Διαγονιδιακός τύπος-στόχος σίγησης, μετά την εισαγωγή του σε γενετικό υπόβαθρο επαγωγέα, έχει την δυνατότητα να επάγει transitive silencing και να παράγει συστηματικό σινιάλο (για την περιοχή στην οποία η σίγηση έχει γίνει μέσω transitive) όπως φαίνεται σε πειράματα μπολιάσματος (grafting, Garcia-Perez et al., 2004). Τα siRNAs που ανιχνεύονται στα εμβόλια (scions) μετά την μεταφορά σήματος από ένα υποκείμενο (rootstock) προέρχονται



από πολλαπλασιασμό (amplification) στο εμβόλιο και όχι από το υποκείμενο (Garcia-Perez et al., 2004).

Η μεταφορά του σήματος στην **διασυστηματική σίγηση** είναι κατευθυνόμενη και προς τις δυο κατευθύνσεις (bidirectional) όπως φαίνεται από την σίγηση του βλαστού και των ριζών μετά από αγραένχυση στα φύλλα (λαμβάνει χώρα με βραδύτερο ρυθμό από την σίγηση νεαρών συστηματικά σιγημένων φύλλων, Voinnet et al., 1998). Η μεταφορά του συστηματικού σιγασίου χωροχρονικά αντικατοπτρίζει την μεταφορά των ιών από τα αρωγά φύλλα στα φύλλα αποδέκτες (Voinnet et al., 1998). Σε περίπτωση που μόνο σε ένα φύλλο γίνει αγραένχυση, μόνο ο μισός βλαστός που αντιστοιχεί στην πλευρά του φύλλου αυτού θα σιγηθεί κατά αντιστοιχία με την συστηματική μεταφορά των ιών (Voinnet et al., 1998).

Σε σιγημένους απογόνους μη σιγημένων προγόνων διαγονιδιακών σειρών β-1,3-γλυκανάσης σε καπνό εμφανίζονται **ενδιάμεσα αποικοδόμησης** προερχόμενα από 3'-5' ή 5'-3' αποικοδόμηση καθώς και μεγαλύτερων του πλήρους μήκους διαγονιδίου προϊόντα αποικοδόμησης τα οποία πιθανώς προέρχονται από read-through μεταγραφή κάποιου ενδογονιδιακού διπλασιασμού που δρα σαν επαγωγέας PTGS (van Eldik et al., 1998). Τα προϊόντα αποικοδόμησης που παρατηρούνται στα βήτα-1-3-γλυκανάσης διαγονιδιακά φυτά είναι πιθανόν τα προϊόντα της αποικοδόμησης από το RISC (Sanders et al., 2004). Τα παρατηρούμενα σε μερικές περιπτώσεις και λανθασμένα χαρακτηρισμένα σαν «aberrant» RNAs δεν είναι ταυτόσημα με το υποθετικό aberrant RNA-επαγωγέα της σίγησης, αλλά μάλλον προϊόντα της εξαρτώμενης από αλληλουχία αποικοδόμησης μέσω RISC (Han and Grierson, 2002). Τα «aberrant» RNAs σε αυτές τις περιπτώσεις είναι προϊόντα του RISC με υποστρώματα ενδοκυτταρικά (ενδογενή ή διαγονιδιακά) μετάγραφα (Han and Grierson, 2002). Το τελευταίο έχει υπαινιχθεί από αντίστοιχες μελέτες κατευθυνόμενης από miRNA αποικοδόμησης μέσω RISC (Jones-Rhoades et al., 2004, Kasschau et al., 2003, Xie et al., 2003, Liave et al., 2002) και μπορεί να αποδειχθεί π.χ. με πειράματα RACE κατά αντιστοιχία με τις παραπάνω εργασίες.

Μόλυνση με CMV ανθεκτικών στον PVY διαγονιδιακών φυτών (μέσω διαγονιδιακής κατασκευής τύπου ανεστραμμένης επανάληψης) και δευτερογενής μόλυνση με PVY οδηγεί σε απώλεια ανθεκτικότητας στον τελευταίο, γεγονός που οφείλεται στην δράση της πρωτεΐνης 2b του CMV ως **αναστολέα** μεταμεταγραφικής σίγησης (Mitter et al., 2003). Μετά από μόλυνση με CMV (2b αναστολέας σίγησης),

TuMV (HC-PRO αναστολέας), TVCV αναστέλλεται η τύπου ανάστροφης επανάληψης και θετικής πολικότητας σίγησης διαγονιδίων GUS (Beclin et al., 2002).

Τα **μεταλλάγματα** *sde1*, *sgs3* και *ago1* δεν έχουν ρόλο στην μεταμεταγραφική σίγηση διαγονιδίων τύπου ανάστροφης επανάληψης (Beclin et al., 2002), υποδεικνύοντας ότι το RdRP εξαρτώμενο παρακλάδι του μονοπατιού δεν είναι απαραίτητο στην περίπτωση προϋπαρχόντων δίκλωνων μορίων. Μόλυνση με TuMV (HC-PRO suppressor της σίγησης) είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή σίγησης GFP σε PVX-GFP αμπλικόνια και σε διασταυρώσεις PVX-GFP αμπλικονίου με 35S-GFP φυτά (Dalmay et al., 2000).

Σιγημένα μέσω μεταμεταγραφικής σίγησης GUS διαγονίδιο αποτρέπει τον διπλασιασμό ανασυνδυασμένου ιού PVX που φέρει σαν ένθεμα μέρος του GUS (*English et al., 1996*<sup>3</sup>). Συμβαίνει επαγόμενη σίγηση ιού από υπερεκφραζόμενο διαγονίδιο με υψηλά επίπεδα μεταγράφου μετα την εμφάνιση ενδιάμεσων διπλασιασμού του ιού στα αρχικά ακόμα στάδια της μόλυνσης στο αρχικά μολυσμένο φύλλο. Εναλλακτικά τα θετικής πολικότητας μετάγραφα δημιουργούν δευτεροταγείς δίκλωνες δομές οι οποίες αποτελούν στόχο για την Dicer και δημιουργούνται θετικής πολικότητας siRNAs τα οποία στοχεύουν εκλεκτικά τα αρνητικής πολικότητας RNA ενδιάμεσα του ιού. Θετικής πολικότητας σε σχέση με την (+) strand του ιού 35S-κατευθυνόμενα μετάγραφα που στοχεύουν την ρεπλικάση ή την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού έχουν την δυνατότητα να σιγήσουν ομόλογους ιούς ή ανασυνδυασμένους ιούς που περιέχουν ενθέματα με ομολογία με το διαγονιδιακό μετάγραφο (Marano and Baulcombe, 1998). Τα θετικής πολικότητας μετάγραφα στοχεύουν τα αρνητικής πολικότητας ενδιάμεσα του διπλασιασμού του ιού ή οποιοδήποτε RNA αντίθετης πολικότητας όπως φαίνεται με την καταστολή έκφρασης χιμαιρικών GUS γονιδίων που φέρουν τμήμα του μεταγράφου του διαγονιδίου αρνητικής πολικότητας (Marano and Baulcombe, 1998). Μεταγραφικά ενεργό διαγονίδιο που εκφράζει την καψιδιακή πρωτεΐνη του BWYV αν και επιρρεπές στην μόλυνση από τον ιό ή από στενά συγγενικό του (PLRV) είναι στόχος VIGS μετα από μόλυνση από τον ιό ενώ η εκλεκτική σίγηση του διαγονιδίου (αλλά όχι και του γενωμικού RNA του ιού) σχετίζεται με την μεθυλίωση της ομόλογης με ιό περιοχής του διαγονιδίου (Brault et al., 2002) αποδεικνύοντας ότι αν η προγενέστερη από την μόλυνση καταστολή του

---

<sup>3</sup> Παρόμοια αποτελέσματα εξάγονται και σε διαγονιδιακές σειρές που εμφανίζουν μεταμεταγραφική αναστολή ενδογενών γονιδίων μετα από μόλυνση με ανασυνδυασμένους PVX φέροντες τα αντίστοιχα ενθέματα (*English et al., 1996*).

διαγονιδίου είναι σε μεταμεταγραφικό επίπεδο (καψιδιακής ή άλλης πρωτεΐνης ιϊκής προέλευσης) το διαγονίδιο δρα ως επαγωγέας μεταμεταγραφικής σίγησης του ιού ενώ η έλλειψη μεταμεταγραφικής σίγησης αποτρέπει την σίγηση του γενωμικού RNA του ιού και καθιστά το διαγονίδιο στόχο μεταμεταγραφικής σίγησης.

**Μεταμεταγραφική σίγηση και ιοί.** Η έκφραση από TRV φορέα ενθέματος GFP σε ρίζες μπορεί να διατηρηθεί ακόμα και 24 μέρες μετά την μόλυνση (*MacFarlane and Popovich, 2000*) ενώ ο φθορισμός GFP μετά από μόλυνση με τον ίδιο φορέα στα φύλλα οδηγεί σε απώλεια φθορισμού σε συστηματικά προσβεβλημένους ιστούς (σε φύλλα αποδέκτες φωτοσυνθετικών προϊόντων) 8 μέρες μετά την μόλυνση (*Ratcliff et al., 1999*). Συνμεταφορά διπλόκλωνου RNA που αντιστοιχεί σε τμήμα ιού και του αντίστοιχου ιού προκαλεί αναστολή μόλυνσης από τον ιό σε μια αντίδραση καταστολής που είναι συναρτώμενη από την ποσότητα του διπλόκλωνου RNA που χρησιμοποιείται (*Tenllado and Diaz-Ruiz, 2001*). Στην περίπτωση ανασυνδυασμένων ιών που προκαλούν VIGS εναντίον διαγονιδίων, ο ιός είναι επαγωγέας αλλά και στόχος VIGS. Το φαινόμενο διακρίνεται σε τρία στάδια: αρχικά τα επίπεδα διαγονιδιακού μεταγράφου είναι αρκετά υψηλά και υπάρχει ισχυρή έκφραση ιϊκά προερχόμενου μεταγράφου ομολόγου του διαγονιδίου. Στην δεύτερη φάση υπάρχει πτώση επιπέδων διαγονιδιακά προερχόμενου RNA και μικρότερη πτώση ιϊκά προερχόμενου μεταγράφου. Στην τρίτη φάση το ενδογενές μετάγραφο επανέρχεται σε κανονικά επίπεδα ενώ το ιϊκά προερχόμενο μετάγραφο μειώνεται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (*Ruiz et al., 1998*). Σε μόλυνση με ανασυνδυασμένου φορέα που έχει ένθεμα ενδογονιδίου το ενδογενές γονίδιο (αλλά όχι ο ανασυνδυασμένος ιός ή το ένθεμα του) είναι στόχος VIGS όπως αποδεικνύεται από την μέτρηση ενδογενών επιπέδων mRNA του ενδογονιδίου PDS<sup>4</sup> (*Ruiz et al., 1998*). Ιϊκοί φορείς που φέρουν τμήμα ιντρονίου ενός ενδογονιδίου δεν προκαλούν VIGS γεγονός που υποδεικνύει ότι το φαινόμενο περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα (*Ruiz et al., 1998*). Βέβαια μια εναλλακτική εξήγηση είναι ότι τα μη ματισμένα mRNAs είναι προστατευμένα.

Η επαγόμενη από ιό γονιδιακή σίγηση προκαλεί επαγωγή *transitive silencing* ενδογενών γονιδίων στόχων όπως αποδεικνύεται από την μείωση των σχετικών επιπέδων μεταγράφου-στόχου χρησιμοποιώντας εκκινητές για ποσοτική RT-PCR που

---

<sup>4</sup> .. με την χρήση RT-PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για PDS εκτός της περιοχής του ενθέματος στον ιό και επιπέδων PDS προερχόμενων από μεταγραφή από τον ιό (χρησιμοποιώντας στην δεύτερη περίπτωση ως ανιχνευτή την αλληλουχία του ενθέματος).

στοχεύουν εκτός της περιοχής του γονιδίου που χρησιμοποιήθηκε σαν ένθεμα σε ιϊκό φορέα PVX (Burton et al., 2000).

**Ανάνυση (recovery)** ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο μετα από μόλυνση από ιό το μολυσμένο φύλλο και τα πρώτα συστηματικά μολυσμένα εμφανίζουν συμπτώματα και υψηλή συγκέντρωση ιού ενώ τα νεότερα συστηματικά εμφανίζουν έλλειψη συμπτωμάτων και μειωμένα επίπεδα ιού. Τα φύλλα αυτά είναι ανθεκτικά σε δευτερογενή μόλυνση με τον ίδιο ιό. Με την χρήση στελεχών συγγενικών και απομακρυσμένων σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας οι Ratcliff et al (1997) απέδειξαν ότι το φαινόμενο είναι συνάρτηση του βαθμού ομοιότητας του ιού της δευτερογενούς μόλυνσης με τον αντίστοιχο της πρωτογενούς. Ανασυνδυασμένος PVX (ικανότητα ανάνυψης) με ενθέματα ιών έχει την δυνατότητα να σιγηθεί και να μην οδηγήσει σε δευτερογενή μόλυνση, όταν έχει προηγηθεί πρωτογενής μόλυνση με ιό που έχει την δυνατότητα να επάγει ανάνυση. Αντίθετα κατασκευές PVX με ένθεμα TMV (ο TMV δεν επάγει ανάνυση) δεν έχει αντίστοιχες δυνατότητες. Σε διαγονιδιακούς ιστούς με ιϊκά προερχόμενη καψιδιακή πρωτεΐνη που παρουσιάζουν ανάνυση μετά από μόλυνση με τον αντίστοιχο ιό, η εμφάνιση ανάνυψης σε συστηματικά προσβεβλημένα φύλλα σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του διαγονιδίου (στην κωδική περιοχή) στους αντίστοιχους ιστούς (Jones et al., 1998). Απουσία ανάνυψης στους απογόνους των φυτών αυτών σχετίζεται με αναστροφή των επιπέδων μεθυλίωσης ενώ συστηματικά μολυσμένα φύλλα πριν την επαγωγή της ανάνυψης παρουσιάζουν ήδη αύξηση επιπέδων μεθυλίωσης (Jones et al., 1998).

Μόλυνση με TRV-GFP (ιός με χαρακτηριστικά ανάνυψης) έχει την δυνατότητα να σιγήσει συστηματικά PVX με ενθέματα GFP (που έχει χρησιμοποιηθεί σαν δευτερογενές μόλυσμα μια βδομάδα μετά την αρχική μόλυνση σε νεαρότερο φύλλο), αλλά όχι PVX-GUS (Ratcliff et al., 1999). Μόλυνση με TRV-GFP έχει την ικανότητα να αποτρέψει την έκφραση GFP αλλά όχι GUS, όταν τα δυο τελευταία συν-αγροενχυθούν σε νεαρότερο φύλλο μετά την αρχική μόλυνση (Ratcliff et al., 1999). Επίσης μόλυνση με PVX-GF(P) έχει την δυνατότητα να σιγήσει σε συστηματικά προσβεβλημένο φύλλο την έκφραση GFP αλλά όχι GUS όταν τα δυο γονίδια εκφραστούν παροδικά μέσω αγροένχυσης (Ratcliff et al., 1999). Ταυτόχρονη μόλυνση με TMV-GFP και PVX-GUS-GF(P) (αν και ο PVX δεν επάγει recovery) έχει την δυνατότητα να περιορίσει συστηματικά τον διπλασιασμό του TMV και την έκφραση GFP ενώ η έκφραση GUS δεν επηρεάζεται (Ratcliff et al., 1999).

Μετά από μόλυνση με ανασυνδυασμένο TRV με ένθεμα τμήματα της κωδικής περιοχής της GFP ή του 35S υποκινητή (11 dpi) παρουσιάστηκε απώλεια φθορισμού σε διαγονιδιακές σειρές *N. benthamiana* 35S-GFP (Jones et al., 2001). Στην περίπτωση του TRV-35S η σίγηση (όπως αποδεικνύεται σε πειράματα run-off) είναι σε μεταγραφικό επίπεδο ενώ στην περίπτωση TRV-GFP σε μεταμεταγραφικό (έκφραση αλλά όχι συσσώρευση του μεταγράφου λόγω RNA μεσολαβούμενης μεταμεταγραφικής σίγησης, Jones et al., 2001). Πρωτογενής μόλυνση με TRV-GFP και δευτερογενής με TMV-GFP οδηγεί σε απώλεια μολυσματικότητας TMV λόγω σίγησης (σε 35S-GFP διαγονιδιακά φυτά) ενώ πρωτογενής μόλυνση με TRV-35S, αν και σιγεί την διαγονιδιακή GFP δεν έχει επίδραση στην μολυσματικότητα του ιού (Jones et al., 2001). Μετάγραφα ενδογενών γονιδίων προερχόμενα από παροδική μεταγραφή από τον ιικό φορέα μπορεί να δημιουργήσουν πρόβλημα στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της σίγησης μέσω VIGS, καθώς είναι δύσκολο να διακριθεί αν το σήμα προέρχεται από το ενδογενές ή το ιικά προερχόμενο μετάγραφο. Αντίθετα έλεγχος χρησιμοποιώντας σαν ανιχνευτή περιοχή εκτός της περιοχής που χρησιμοποιήθηκε σαν στόχος μπορούν να αποκαλύψουν αλλαγές στα επίπεδα μεταγράφου προερχόμενα από μεταγραφή του ενδογονιδίου (Burton et al., 2000).

Μόλυνση με ιικό φορέα PVX που φέρει τμήματα TMV και δευτερογενής μόλυνση με TMV επιφέρει επιβράδυνση συμπτωμάτων προερχόμενων από TMV και μείωση επιπέδων TMV στους δευτερογενώς προσβεβλημένους ιστούς (Culver et al., 1996). Αυξανόμενες ποσότητες αρχικού μολύσματος υποσκελίζουν την προερχόμενη από ιικό φορέα *cross-protection* ενώ ποσότητα RNA μολύσματος αντίστοιχης μολυσματικότητας με ποσότητα απομονωμένων ισωματίων εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία στην μόλυνση από TMV, γεγονός που ίσως αποδεικνύει την ύπαρξη ανώτατου ορίου αρχικής ποσότητας RNA που μπορεί να υπερνικήσει την αποτελεσματική συστηματική σίγηση από ιικό φορέα (Culver et al., 1996). Η επαγωγή συστηματικής σίγησης και το *cross-protection* είναι συνάρτηση του βαθμού ομολογίας στόχου και επαγωγέα σίγησης καθώς αντικατάσταση CP ORF TMV από αντίστοιχο άλλου tobamovirus (CGMMV) με περιορισμένη νουκλεοτιδική ομολογία δεν εμφανίζει *cross-protection* σε διπλές μολύνσεις PVX-CP<sup>TMV</sup>: TMVΔCP<sup>TMV</sup>CP<sup>CGMMV</sup> (Culver et al., 1996). Αντίστοιχα πειράματα έχουν γίνει με συνδυασμό PVX/PPV.

DNA ιοί όπως οι geminiviruses επάγουν VIGS λόγω της ύπαρξης επικαλυπτόμενων ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων αντίθετης πολικότητας και την δημιουργία παροδικών δίκλωνων RNA από την μεταγραφή των ORF αυτών ενώ

αντίθετα με τους περισσότερους RNA ιούς είναι απαραίτητη η δράση *sde1* και *sgs3* (Muangsan et al., 2004) τα οποία δεν είναι απαραίτητα στην περίπτωση στόχων με ικανότητα δημιουργίας εκτεταμένων τμημάτων διπλόκλωνου RNA (Beclin et al., 2002). Αντίθετα στην περίπτωση των ιοειδών, η *sde1/rdr6* δεν είναι απαραίτητη (Kalantidis and Tsagris, unpublished results).

### **Ενζυμα του μονοπατιού της σίγησης και ιϊκή μόλυνση**

Σε *ago1* μεταλλάγματα παρατηρείται 6 φορές υπερσυσσώρευση CMV μετά από μόλυνση με τον αντίστοιχο ιό σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά. Τα ισχυρότερα συμπτώματα συνοδεύονται από πιο έντονες αναπτυξιακές ανωμαλίες (Morel et al., 2002). Μεταλλάγματα τα οποία σχετίζονται με σίγηση μη παλινδρομικών αλληλουχιών (sense-transgene silencing) παρουσιάζουν υπερευαισθησία στον CMV, γεγονός που σχετίζεται με την ανίχνευση αυξημένων επιπέδων ιού μετά από μόλυνση στα αντίστοιχα μεταλλάγματα (Boutet et al., 2003). Αντίθετα με την περίπτωση του CMV, *sgs2/sde1* και *sgs3* μεταλλάγματα δεν παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στον TRV, δηλαδή η επαγόμενη από ιό σίγηση σε αυτή την περίπτωση δεν επηρεάζεται από τα αντίστοιχα μεταλλάγματα (Dalmay et al., 2001). Ομοίως μόλυνση με TuMV και TVCV στα μεταλλάγματα *sgs2/sde1* και *sgs3* δεν είχε επίδραση στην μολυσματικότητα τους υποδεικνύοντας ότι το παρακλάδι του μηχανισμού της σίγησης που σχετίζεται με την σίγηση διαγονιδίων (sense transgene silencing) δεν είναι απόλυτα επικαλυπτόμενο με το μονοπάτι της σίγησης ιών (Mourrain et al., 2000).

Μέρος των ιολογικών **συμπτωμάτων** στα φυτά προέρχονται από την επίδραση των αναστολέων της σίγησης (silencing suppressors) στην βιογένεση των miRNAs, λόγω της επικάλυψης σε λειτουργικό επίπεδο των μονοπατιών της επαγόμενης από ιό απόκρισης του φυτού με σίγηση και του μονοπατιού βιογένεσης των miRNAs (Kasschau et al., 2003). Υπερέκφραση του Hc-Pro αναστολέα στην *Arabidopsis* έχει φαινότυπο που προσομοιάζει ιολογικά συμπτώματα (και φαινότυπο Knock-out dicer, Kasschau et al., 2003). Η υπερέκφραση HC-RPO αν και συντελεί στην αυξανόμενη συσσώρευση miRNAs έχει αρνητική επίδραση στην αποικοδόμηση των στόχων τους από το RISC (Kasschau et al., 2003). Η HC-PRO πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για τις συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις rotynviruses με TMV, CMV, PVX καθώς υπερέκφραση της HC-PRO πρωτεΐνης σε διαγονιδιακά φυτά και μόλυνση με τους αντίστοιχους ιούς προκαλεί πιο έντονα συμπτώματα (Pruss et al., 1997). Λόγω της ύπαρξης των αναπτυξιακών συμπτωμάτων της υπερέκφρασης της HC-PRO μόνο

φυτά HC-PRO με μεταλλαγή στην αλληλουχία του HC-PRO αλλά που διατηρούν την ικανότητα αναστολής της σίγησης μπορούν να αξιοποιηθούν μέσω διασταύρωσης για την υπερέκφραση άλλων διαγονιδιακών (π.χ. αμπλικονίων, Mallory et al., 2002). Μάλιστα η υπερέκφραση αναστολέων της σίγησης στα φυτά συχνά σχετίζεται με αναπτυξιακές ανωμαλίες (Dunoyer et al., 2004, Charman et al., 2004, Chen et al., 2004). Στα φυτά οι αναστολείς της σίγησης έχουν επίδραση στην βιογένεση των miRNAs (π. χ. αύξηση επιπέδων miRNA στην περίπτωση του HC-PRO, Dunoyer et al., 2004, Charman et al., 2004, αλλαγή επιπέδων miRNA στην περίπτωση του p19, Dunoyer et al., 2004, Charman et al., αύξηση επιπέδων miRNA στην περίπτωση του p69, Chen et al., 2004) και στην αναστολή της (μεσολαβούμενης από RISC ή RISC-like δομές) αποικοδόμησης των στόχων τους (π.χ. HC-PRO, Dunoyer et al., 2004, Charman et al., 2004, p19, Dunoyer et al., 2004, Charman et al., 2004) η την αύξηση της αποικοδόμησης στόχων (p69, Chen et al., 2004).

Η αυξημένη **ευαισθησία** της *N. benthamiana* σε ιολογικής φύσης **μολύνσεις** οφείλεται σε μια 72 nt ένθεση στο μετάγραφο της RDR1 που οδηγεί στην δημιουργία μιας μη πλήρους μήκους πρωτεΐνης (Yang et al., 2004). Πειράματα συμπλήρωσης με ετερόλογη RDR1 από *M. truncatula* οδήγησε σε αυξημένη ανθεκτικότητα σε μόλυνση με TMV, SHMV, TVCV αλλά όχι PVX ή CMV (Yang et al., 2004). VIGS της RDR1 μέσω PVX φορέα είχε σαν φαινότυπο σε συστηματικά προσβεβλημένα φύλλα νεκρώσεις που προσομοιάζουν κάποια ιολογικά συμπτώματα (Yang et al., 2004). Η RDR1 είναι το ορθόλογο του γονιδίου που έχει προηγουμένως απομονωθεί στο εργαστήριο του Wassenegger (Schiebel et al., 1998), ταυτόσημη με την επαγόμενη από σαλικυλικό οξύ RdRp που συμμετέχει στην απόκριση στους ιούς (Yu et al., 2003) και η λιγότερο ομόλογη σε σχέση με τα άλλα μέλη της οικογένειας με την sde1 της *N. benthamiana*.

### **Πρόσφατες εξελίξεις στον καταλυτικό μηχανισμό του RISC**

Με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα το βασικό μηχανιστικό μοντέλο της σίγησης σε κυτταροπλασματικό επίπεδο περιλαμβάνει σε πρώτο στάδιο της δημιουργία siRNAs από μια κυττοπλασματική DICER (για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των Dicer στα φυτά και τις πιθανές λειτουργικές τους εξειδικεύσεις δεξ αλλού στο κείμενο) με υπόστρωμα διπλόκλωνο RNA (ανεξάρτητα από τον τρόπο δημιουργίας του). Σε δεύτερο στάδιο τα δίκλωνα siRNAs αφού αποελικωθούν, η μια αλυσίδα χρησιμοποιείται για την σάρωση ενδοκυτταρικών μεταγραφών με βάση την ομολογία

σε ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που ονομάζεται RISC (Novina and Sharp, 2004). Ενεργότητα RISC έχει παρατηρηθεί σε wheat germ extract (Tang et al., 2003). Πηγές δίκλωνου RNA είναι τα ενδιάμεσα του διπλασιασμού των RNA ιών που παρακάμπτουν το εξαρτώμενο από RdRP παρακλάδι του μηχανισμού της σίγησης (Dalmay et al., 2000), ενώ aberrant RNAs μπορούν να είναι υποστρώματα σε μια ανεξάρτητη από εκκινητή αντίδραση για ενδοκυτταρικές RdRP (π.χ. στην περίπτωση της σίγησης sense πολικότητας διαγονιδίων), ή siRNA δρουν σαν εκκινητές για την δημιουργία δίκλωνου RNA και παραγωγή δευτερογενών siRNAs μέσω transitive silencing (Baulcombe, 2004). Αν και ο ρόλος των RdRPs έχει θεμελιωθεί πειραματικά σε φυτικά συστήματα (Vaistij et al., 2002), σε καινοραβδίτη (Smardon et al., 2002), *Neurospora* (Mekeyev and Bamford 2002) αλλά ενεργότητα RdRP έχει αποκαλυφθεί και σε ένζυμο που συμμετέχει στην αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης στον *S. pombe* (Motamedi et al., 2004), δεν έχει παρατηρηθεί ενεργότητα RDRP σε κύτταρα δροσόφιλας και ανθρώπινα (Stein et al., 2003). Αν και η μεγάλης κλίμακας συστηματική σίγηση είναι εξαρτώμενη από την δράση RdRP, η μικρής κλίμακας κύτταρο προς κύτταρο μετακίνηση της σίγησης (η οποία εκτείνεται 11-15 κύτταρα ακτινικά των κυττάρων στα οποία αρχικά επάχθηκε η σίγηση, limited movement of silencing) δεν είναι εξαρτώμενη από την δράση RdRp (Himper et al., 2003).

Τα siRNAs δημιουργούνται από ένα σύμπλοκο DCR-1, RDE-1, RDE4 και DRH-1 στον καινοραβδίτη (Tabara et al., 2002) ενώ τα χαρακτηρισμένα στοιχεία του μηχανισμού αυτού στην δροσόφιλα περιλαμβάνουν το σύμπλοκο R2D2 με την DCR2 (Liu et al., 2003) και παραμένουν στο σύμπλοκο. Η πρόσδεση της R2D2 δεν επηρεάζει την καταλυτική ενεργότητα της DCR2 αλλά προσδέεται στα siRNAs και επάγει την μεσολαβούμενη από RISC αποικοδόμηση των siRNAs γεφυρώνοντας την παραγωγή των siRNAs με την δράση τους στο RISC (Liu et al., 2003). Αν και ο άνθρωπος και ο καινοραβδίτης έχουν από μια Dicer, η δροσόφιλα έχει δυο με διακριτούς ρόλους (Lee et al., 2004). Παρόμοια κατάσταση επικρατεί στα φυτά με τουλάχιστον τέσσερα ομόλογα (δες αλλού στο κείμενο). Η DCR1 αν και συμμετέχει στην δημιουργία των miRNAs στην δροσόφιλα, δεν έχει κύριο ρόλο στην δημιουργία και δράση των siRNAs από την DCR2 η οποία διεκπεραιώνει την δημιουργία των siRNAs και συμμετέχει στην μεσολαβούμενη από RISC αποικοδόμηση ενδοκυτταρικών μεταγράφων (Lee et al., 2004). Από την στιγμή που το σύμπλοκο DCR2/R2D2 οδηγεί στην δημιουργία των siRNAs και συνδέσει το αρχικό στάδιο με το στάδιο της αποικοδόμησης, δημιουργούνται τρία ενδιάμεσα σύμπλοκα στα



οποία συμμετέχουν DCR2/R2D2 και siRNAs τα οποία θα καταλήξουν στην δημιουργία ενός ενεργού RISC (Pham et al., 2004). Άρα, η Dicer είναι ένα συστατικό του ενεργού RISC (Pham et al., 2004). Η μεσολαβούμενη από εξωγενή παροχή siRNAs σίγηση σε κύτταρα θηλαστικών, που παρακάμπτει το αρχικό βήμα της εξαρτώμενης από Dicer δημιουργίας siRNAs επίσης απαιτεί dicer (και πρωτεΐνες της οικογένειας piwi) και συνηγορεί υπέρ της δράσης της Dicer σε κατοπινά στάδια του μηχανισμού (Doi et al., 2003). Εκτός από τον παγιωμένο ρόλο των Dicer στην δημιουργία των siRNA και στον μηχανισμό του RISC, πρόσφατα σε τρωκτικό η ύπαρξη της Dicer έχει συσχετισθεί με σίγηση κεντροσωμικών επαναλήψεων, μεταγραφικής σίγησης, DNA μεθυλίωσης και αναπροσαρμογής δομής χρωματίνης (Kanelloroulou et al., 2005), ενώ τα μέχρι στιγμής γνωστά παραδείγματα για συμμετοχή στην αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης περιορίζονταν σε έναν οργανισμό που στερείται DNA μεθυλίωσης (*S. pombe*, Volpe et al., 2002), και σε ένα οργανισμό που παρουσιάζει DNA μεθυλίωση (*A. thaliana*, Chan et al., 2004).

Επιπλέον σαν μέλη του RISC (εκτός από το DCR-1, RDE-1, RDE4 και DRH-1 σύμπλοκο στο καινοραβδίτη ή το R2D2/DCR2 στην δροσόφιλα) έχουν υποδειχθεί ελικάσες και μέλη της οικογένειας Ago κ.α., τα οποία συνολικά συνεισφέρουν στην αποελίκωση των δίκλωνων siRNAs και στην χρήση της μιας αλυσίδας σαν οδηγό για την αποικοδόμηση ενδοκυτταρικών mRNA.

### **Ο ρόλος των μελών των οικογενειών της Dicer, της RdRp και της Ago στην ωρίμανση και δράση των miRNA/siRNA στα φυτά.**

Το γένωμα της *Arabidopsis* κωδικοποιεί για τέσσερις DICER-like πρωτεΐνες (Schauer et al., 2002), έξι RdRps (ανήκουν σε τρεις φυλογενετικά απομακρυσμένες υποοικογένειες) και τουλάχιστον 10 argonaute σχετιζόμενες πρωτεΐνες (Carmell et al., 2002).

Η DCL1 δεν αναμειγνύεται σε μεταμεταγραφική σίγηση ενός διαγονιδίου τύπου ανεστραμμένης επανάληψης (inverted repeat, Finnegan et al., 2003) αλλά ελαττώνει τα επίπεδα siRNAs προερχόμενα από ανεστραμμένη επανάληψη υποκινητή εκφρασμένης σε διαγονιδιακά φυτά (Papp et al., 2003) και σχετίζεται με την συσσώρευση miRNAs (Park et al., 2002, Papp et al., 2003, Palatnik et al., 2003, Kasschaue et al., 2003, Xie et al., 2004), ενώ εμπλέκεται και σε επαγόμενη από ιό γονιδιακή σίγηση (virus induced gene silencing, Xie et al., 2004). Η DCL2 δεν συμμετέχει στην ωρίμανση miRNAs και στην συσσώρευση ενδογενών siRNAs, ενώ έχει και ήπια επίδραση στην επαγόμενη από ιό σίγηση (Xie et al., 2004). Η DCL3 δεν

έχει εμπλοκή στην ωρίμανση των miRNAs ή στην επαγομένη από ιό μεταμεταγραφική σίγηση αλλά εξαλείφει τα ενδογενή siRNAs (Xie et al., 2004) και συμμετέχει στην RdDM (RNA directed DNA methylation, Chan et al., 2004). Υποκυτταρικά η DCL1 εντοπίζεται στον πυρήνα (Papp et al., 2003), η DCL2 και στα δυο κυτταρικά διαμερίσματα (πυρήνα και κυτταρόπλασμα) με την πλειονότητα των μορίων πυρηνικά, ενώ η DCL3 είναι αποκλειστικά πυρηνική πρωτεΐνη (Xie et al., 2004). Η DCL4 έχει NLS αλλά η στόχευση της στον πυρήνα δεν έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά. Υπάρχουν μια σειρά από μελέτες για την δράση της DICER σε ζωικά συστήματα (Knight et al., 2001, Ketting et al., 2001, Pham et al., 2004) ή τις ιδιότητες και τις απαιτήσεις σε συμπράγοντες της ανασυνδυασμένης Dicer (ικανότητες πρόσδεσης και καταλυτικές ιδιότητες, Provost et al., 2002, Zhang et al., 2002) αλλά οι DCL πρωτεΐνες των φυτών δεν έχουν αναλυθεί βιοχημικά. Η DCL1 (CAF) δεν εμπλέκεται στην μεταμεταγραφική σίγηση ενώ η DCL3 σχετίζεται με την παραγωγή ενδογενών siRNAs (υπεύθυνων για αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης) ενώ η DCL2 ανήκει στον μηχανισμό μεταμεταγραφικής σίγησης των ιών (Xie et al., 2004). Τα 24-nt siRNAs σχετίζονται με την συστηματική σίγηση στα φυτά και με την RNA directed DNA methylation ενώ τα 21 nt siRNAs με την μεταμεταγραφική σίγηση (Hamilton et al., 2002) και έχει υποτεθεί ότι ο διαχωρισμός αυτός είναι αποτέλεσμα της δράσης διαφορετικών DCL πρωτεϊνών με την DCL2 υποψήφια για την παραγωγή των τελευταίων ενώ την DCL3 των πρώτων. Η ανάλυση των λειτουργιών των DCL στην Arabidopsis θα αποκαλύψει εάν η DCL3 είναι επίσης σχετιζόμενη με συστηματική σίγηση ή εάν η DCL2 έχει επίδραση στο transitive silencing.

Υπάρχουν τρεις υποοικογένειες RdRp πρωτεϊνών. Η RDR6 (sde1/sgs2) έχει ρόλο στην μεταμεταγραφική σίγηση διαγονιδίων αλλά όχι σε επαγομένη από ιό μεταμεταγραφική σίγηση (Dalmay et al., 2000) και είναι μέλος ενός αντι-ϊικού μηχανισμού για μια υποκατηγορία ιών (όπως ο CMV). Το ομόλογο σε καπνό της RDR1 της Arabidopsis σχετίζεται με αντι-ϊκή προστασία φυτών (Xie et al., 2001) και είναι το ορθόλογο της RDRP που χαρακτηρίστηκε βιοχημικά και γενετικά στην τομάτα (Schiebel et al., 1998). Η RDR1 δεν σχετίζεται με κανένα ρυθμιστικό σύστημα μικρών RNA και ο ρόλος της είναι εντοπισμένος στην αντιμετώπιση των ιών (Xie et al., 2004). Η RDR2 δεν σχετίζεται με έλεγχο ιών ή ωρίμανση miRNAs αλλά στην δημιουργία των ενδογενών siRNAs (Xie et al., 2004).

Το AGO1 εμπλέκεται στην δράση των miRNAs (Kinder et al., 2004), στην μεταμεταγραφική σίγηση επαγομένη από διαγονίδια τύπου ανεστραμμένης

επανάληψης ή απλά θετικής πολικότητας μεταγράφων (Kinder et al., 2004) και στην επαγόμενη από ιό μεταμεταγραφική σίγηση (Morel et al., 2002). Το Zwiille δεν συμμετέχει στην μεταγραφική σίγηση αλλά έχει επικαλυπτόμενη δράση με το AGO1 στην ωρίμανση και δράση των miRNAs (Morel et al., 2002). Το AGO4 σχετίζεται με RdDM (Zilberman et al., 2003). Το Zippy δεν έχει ρόλο στην μεταμεταγραφική σίγηση διαγονιδίων αλλά είναι υποψήφιος παράγοντας επεξεργασίας προδρόμων miRNAs (Hunder et al., 2003) ενώ για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές πληροφορίες.

### **Εφαρμογές μεταμεταγραφικής σίγησης σε φυτικά και ζωικά συστήματα.**

Σύμπλοκα 12μερούς πολυαργινίνης με δίκλωνο RNA όταν συνεπωαστούν με υγρές κυτταροκαλλιέργειες καπνού έχουν την δυνατότητα να σιγήσουν μετάγραφα (σε μια εξαρτώμενη από την αλληλουχία του επαγωγέα απόκριση), ενώ είναι δυνατή η ανίχνευση siRNAs για τα προς αποικοδόμηση μετάγραφα (Unnamalai et al., 2004).

Χημικά παρασκευασμένα siRNAs μπορούν να μεταφερθούν και να επάγουν γονιδιακή σίγηση σε πρωτοπλάστες καπνού, αποδεικνύοντας ότι ο μηχανισμός της σίγησης είναι ενεργός στους πρωτοπλάστες και ότι σε αντιστοιχία με τα ζωικά συστήματα υπάρχει δυνατότητα σίγησης φυτικών μεταγράφων και με τεχνητά siRNAs μόρια (Vaitrharani et al., 2003). Επίσης, γενετικός μετασχηματισμός μέσω αγροβακτηρίου με παλινδρομικές κατασκευές μήκους 19 νουκλεοτιδίων, διακοπτόμενα από μικρού μήκους spacer, έχει την δυνατότητα να σιγήσει γονιδιαστόχους (Lu et al., 2004).

Σε αντίθεση με τα φυτικά συστήματα, στα κύτταρα των θηλαστικών ο μεγαλύτερος περιορισμός για την επαγωγή σίγησης μέσω μεγάλου μήκους παλινδρομικών αλληλουχιών είναι η ύπαρξη της dsRNA επαγόμενης από ιντερφερόνη απόκρισης σε δίκλινο RNA μεγαλύτερα των 30 bp. Μεταφορά, μέσω μη ικανού για διπλασιασμό αδενοϊού, ενός stem-loop (απαρτιζόμενο από 19nt stem και 9 nt loop) είναι ικανό να επάγει εξαρτώμενη από αλληλουχία σίγηση και να υπερπηδήσει το εμπόδιο της απόκρισης στην ιντερφερόνη (Shen et al., 2003). Μεταφορά χημικά παρασκευασμένων siRNAs μέσω κατιονικών λιποσωμάτων σε κύτταρα θηλαστικών είναι σε κάποιες περιπτώσεις αποτελεσματική μέθοδος για την σίγηση των επιλεγμένων γονιδίων (Sorensen et al., 2003), ενώ πρέπει να αναφερθεί και η υψηλή αποτελεσματικότητα της χρήσης τροποποιημένων με χοληστερόλη siRNAs σε ενέσιμη μορφή σε ποντίκι (Soutschek et al., 2004). Διαφορετικές μέθοδοι σύνθεσης μπορούν να αξιοποιηθούν, όπως για παράδειγμα η χημική σύνθεση και

annealing δίκλωνων siRNA μορίων, η κατευθυνόμενη από T7 in vitro παρασκευή των δυο αλυσίδων του siRNA και το επακόλουθο annealing ή η χρησιμοποίηση ανασυνδυασμένης Dicer για την δημιουργία siRNAs από μεγάλα δίκλιωνα μόρια. Η τελευταία στρατηγική έχει το πρόβλημα της μειωμένης ευαισθησίας των μαζικά παραγόμενων siRNAs. Μια εναλλακτική στρατηγική στηρίζεται στην έκφραση τους σε κύτταρα μέσω DNA φορέα με την μορφή παλινδρομικών αλληλουχιών 19 nt διακοπτόμενων από μικρή λούπα (Duxbury et al., 2004).

## **Κατασκευές:**

1. **X1intron1** (2 και 11): Κλωνοποίηση τμήματος PCR με εκκινητές Fwin1 (5'-AATGCTATATTGCATTTATC -3') και Revin1 (5'- GCATTTGTTAGAACTTCC AA -3') με υπόστρωμα X16α (Tzortzakaki et al., unpublished results) σε pGEM T-easy.
2. **X1BP**. Υποκλωνοποίηση του BamHI-PstI θραύσματος του X13'-end BamHI (Tzortzakaki et al., unpublished results) σε pBluescript BamHI-PstI.
3. **X1HS**. Υποκλωνοποίηση του HindIII-SacI θραύσματος του X1CIRSA (Martinez de Alba et al., 2003) σε pBluescript HindIII-SacI.
4. **X1PR250**. Υποκλωνοποίηση του 250 bp PstI-EcoRI 3'-end θραύσματος του X1CIRSA σε pT3T7 PstI-EcoRI .
5. **X1PR400**. Υποκλωνοποίηση του 400 bp PstI-EcoRI 5'-end θραύσματος του X1CIRSA σε pT3T7 PstI-EcoRI
6. **X1EoEa**. Υποκλωνοποίηση του EagI-EcoRI θραύσματος του X1CIRSA σε pBluescript EagI-EcoRI.
7. **X1EB**. Υποκλωνοποίηση του BamHI-EagI θραύσματος του X1CIRSA σε pBluescript BamHI-EagI.
8. **X1BH300** (X1BH3). Υποκλωνοποίηση του 300 bp BamHI-HindIII 3'-end θραύσματος του X1CIRSA σε pBluescript BamHI- HindIII.
9. **X1BH400** (X1BH4). Υποκλωνοποίηση του 400 bp BamHI-HindIII 5'-end θραύσματος του X1CIRSA σε pBluescript BamHI-HindIII.
10. **X1NB500** (X1NB5). Υποκλωνοποίηση του 500 bp BamHI-NcoI 3'-end θραύσματος του X16α σε pT20 BamHI-NcoI .
11. **X1NB200** (X1NB2). Υποκλωνοποίηση του 200 bp BamHI-NcoI 5'-end θραύσματος του X16α σε pT20 BamHI-NcoI.
12. **X1NH**. Υποκλωνοποίηση του HindIII-NcoI θραύσματος του X1CIRSA σε pT20 HindIII-NcoI.

13. **X1Vix.** Κλωνοποίηση τμήματος PCR με εκκινητές Virpb (5'- GTTACCCCATC CACCAGCCCG -3') και Xbdb (5'- ACTTGAGGGGCCCTTGACACCGTCGACAG ATCTACG -3') με υπόστρωμα X1cl8 (Martinez de Alba et al., 2003) σε pGEM T-easy.
14. **X1ViVi.** Κλωνοποίηση τμήματος PCR με εκκινητές Virpa (5'- GTTACCTCG GCTGATGGCGGAGG -3') και Virpd (5'- AACCCAAACCTACCCCA -3') με υπόστρωμα X1cl8 σε pGEM T-easy.
15. **X1LR.** Κλωνοποίηση τμήματος PCR με εκκινητές Lexon for (5'- GCTACC CATTTTCCTCCCG-3') και Rabcd (5'- TTCAAGAAAAATCAATATTTA -3') με υπόστρωμα X1cl8 σε pGEM T-easy.
16. **X18:.** Κλωνοποίηση τμήματος PCR με εκκινητές Kpn5UTR(5'- CTTCAA ACCCTTGCCTTCATTT-3') και Virpc (5'- CCGAAATTCAGGCCGTC -3') με υπόστρωμα X1cl8 σε pGEM T-easy.
17. **X1BiVi.** Κλωνοποίηση τμήματος PCR με εκκινητές X1BCL1(5'- GCGTGA TCAATGGCATCCGCCGTCTTA -3') και Virpc (5'- CCGAAATTCAGGCCGTC -3') με υπόστρωμα X16a σε pGEM T-easy.
18. **X1LeX.** Κλωνοποίηση τμήματος PCR με εκκινητές Lexon for (5'- GCTACC CATTTTCCTCCCG-3') και X1revXba (5'- GGGGTCTAGACTCAAGAGTGT GTGCATCATCAGC -3') με υπόστρωμα X16a σε pGEM T-easy.
19. **X2XP.** Το 600 bp 5'-ακραίο. τμήμα της αλληλουχίας AF247819 κλωνοποιημένο σε pGEM T-easy αφού προηγήθηκε αντίστροφη μεταγραφή με υπόστρωμα RNA από νεαρά φύλλα τομάτας.
20. **X2HS.** Υποκλωνοποίηση του HindIII-SacI θραύσματος του X2XP σε pBluescript HindIII-SacI.
21. **X2SK.** Υποκλωνοποίηση του KpnI-SacI θραύσματος του X2HS σε pBluescript KpnI-SacI. Προσοχή!!! Η κατασκευή αυτή αν και έχει άθικτη την αντίστοιχη περιοχή της Virp2 εμφανίζει μια μικροέλλειψη στην γειτονική περιοχή του πολυσυνδέτη.
22. **X2SS.** Υποκλωνοποίηση του Sall-SacI θραύσματος του X2HS σε pBluescript Sall –SacI.
23. **X2SX1K.** Υποκλωνοποίηση του XhoI-SacI 1 kb θραύσματος του X2Cl60 (Martinez de Alba, unpublished results) σε pT3T7 Sall –SacI.
24. **X2SX1,5K.** Υποκλωνοποίηση του XhoI-SacI 1,5 kb θραύσματος του X2Cl60 (Martinez de Alba, unpublished results) σε pT3T7 Sall –SacI.

25. **X2HBc**. Υποκλωνοποίηση του HindIII-BclI θραύσματος του X2SX1,5K σε pBluescript HindIII-BclI.
26. **T3T7I**. Υποκλωνοποίηση του SacI-PstI θραύσματος του pBluescript-intron (GDHintron2 σε pBluescript SmaI-Missiou, unpublished results) σε pT3T7 SacI-PstI.
27. **X2HBc/Pro**. Υποκλωνοποίηση του SacI-NotI θραύσματος του X2HBc σε pProexHTc SacI-NotI.
28. **X1NX**. Υποκλωνοποίηση του NcoI-XhoI θραύσματος του X1C18 σε pAS2-1 NcoI-XhoI.
29. **X1BH**. Υποκλωνοποίηση του BclI-HincII θραύσματος του X1pGEMT-Easy (Marinou et al., unpublished results) σε T3T7 BamHI-SmaI
30. **X1BX**. Υποκλωνοποίηση του BclI-XbaI θραύσματος του X1pGEMTEasy (Marinou et al., unpublished results) σε pT3T7 BamHI-XbaI.
31. **X1BH/AS**. Υποκλωνοποίηση του EcoRI -PstI θραύσματος του X1BH σε pAS2-1 EcoRI -PstI. Προσοχή!!! Η κατασκευή αυτή αν και περιέχει άθικτο το τμήμα της X1 εμφανίζει μια έλλειψη στην DNA-binding κωδική περιοχή του **φορέα**.
32. **X1BX/AS**. Υποκλωνοποίηση του EcoRI -PstI θραύσματος του X1BX σε pAS2-1 EcoRI -PstI.
33. **X2XP3/pTV**. Υποκλωνοποίηση του HindIII-SalI θραύσματος του X2XP σε pTV00 HindIII-SalI.
34. **X18HK/pTV**. Υποκλωνοποίηση του HindIII-KpnI θραύσματος του X1C18 σε pTV00 HindIII- KpnI.
35. **X2HS/20**. Υποκλωνοποίηση του SacI-SalI θραύσματος του X2HS σε pT20 SacI-SalI.
36. **X2HSK6**. Υποκλωνοποίηση του PstI-EcoRI θραύσματος του X2HS/20 σε pBluescript-intron PstI-EcoRI.
37. **pHX2/T3T7**. Υποκλωνοποίηση του SacI-EcoRI θραύσματος του X2HSK6 σε X2SS SacI -EcoRI.
38. **pHX2/Art7a**. Υποκλωνοποίηση του HindIII θραύσματος του pHX2/T3T7 σε pART7 HindIII.
39. **pHX2/Art7b**. Υποκλωνοποίηση του SalI θραύσματος του pHX2/T3T7 σε pART7 SalI.

40. **pHX2/Art27**. Υποκλωνοποίηση του NotI θραύσματος του pHX2/ART7 σε pART27 NotI.

**Κατασκευές τρίτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία:**

41. **X13'-endBamHI**. Το 900bp BamHI 3'-άκρου θραύσμα του X1c18 σε pT3T7 (Gosmanova et al., unpublished results).

42. **X1CIRSA**. Το partial (~2 kb) RSA θραύσμα του X1c18 (Martinez de Alba et al., 2003) σε pT3T7 (Tzortzakaki et al., unpublished results).

43. **X16α**: Κλώνος από Κλωνοποίηση προϊόντος αντίστροφης μεταγραφής που περιλαμβάνει τα ιντρόνια 1 και 2 της Virp1 με εκκινητές X1BCL1-XIREVXBA (contamination από την ύπαρξη μεγάλων ποσοτήτων γενωμικού DNA στο RNA δείγμα) σε φορέα pGEM T-easy (Tzortzakaki and Tsagris, unpublished results).

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αποσαφήνιση της γενωμικής οργάνωσης του Virp1 γονιδίου:

Kpn5UTR(5'- CTTCAAACCCTTGCCTTCATTT-3')

116REV (5'- CCATAGTAGGGAACCTTTAGCA-3'),

Virpc '(5'- CCGAAATTCAGGCCGTC -3'),

X1BclI (5'- GCGT**GATCA**ATGGCATCCGCCGTCTTA -3'),

Virpd (5'- AACCCAAACCTACCCCA -3'),

Virpa (5'- GTTACCTCGGCTGATGG CGGAGG -3'),

Virpb (5'- GTTACCCCATCCACCAGCCCG -3'),

Xbdb (5'- ACTTGAG**GGGCC**CTTGACACCG**T**CGACAGATCT****ACG -3'),

X1 eco (5'- GTTGGGGACTCGA**ATT**TCTGAT -3'),

Rbcd (5'- AAGTAGAAAGTGTCATGTGTTATCATC -3'),

Lexon for (5'- GCTACCCATTTTCCTCCCG-3'),

X1revXba (5'- **GGGGTCTAG**ACTCAAGAGTGTGTGCATCATCAGC -3').

Fwin1 (5'- AATGCTATATTGCATTTATC -3')

Revin1 (5'- GCATTTGTTAGAACTTCC AA -3')



**Σύνδεση τμημάτων DNA (DNA ligation, Sambrook et al., 1989).** DNA από φορέα-απομονωμένο με την κλασσική τεχνική απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση υφίσταται τεμαχισμό με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, διαχωρίζεται σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώνεται η κατάλληλη ζώνη και υποβάλλεται σε καθαρισμό από αγαρόζη. Ομοίως τμήμα DNA προς ένθεση υφίσταται επίδραση των αντίστοιχων περιοριστικών ενδονουκλεασών απομονώνεται και καθαρίζεται από αγαρόζη. 50 ng του φορέα αναμειγνύεται με κατάλληλη ποσότητα υποψήφιου ενθέματος ώστε η αναλογία άκρων μορίων φορέα: υποψήφιου ενθέματος να είναι τουλάχιστον 1:3. Το μίγμα της αντίδρασης- εκτός από τις απαιτούμενες ποσότητες DNA - περιλαμβάνει ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (30 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT and 1 mM rATP), 1 mg/ml BSA και 4 units ενζύμου T4 DNA λιγάσης (Minotech) σε τελικό όγκο 10 λ. Η αντίδραση της λιγάσης πραγματοποιείται για 2-16 h στους 16 °C (ή 4–8 °C overnight). Για blunt-end ligations επώαση 15–25 °C overnight.

**Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων E. coli.** Η μέθοδος αυτή είναι μια τροποποίηση του κλασσικού πρωτοκόλλου του Hanahan (Hanahan et al., 1991, Hanahan, 1983) με τροποποιήσεις. Με την βοήθεια αποστειρωμένης λούπας κάνουμε streaking σε πιάτο LB (με τα κατάλληλα αντιβιοτικά -π.χ. τετρακυκλίνη στη περίπτωση των X11-blue, χωρίς αντιβιοτικά στην περίπτωση των JM83 ή DH5α- ή M9 (6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5g NaCl, 1g NH<sub>4</sub>Cl, 15g Agar/l, pH=7.4 με 5N NaOH, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2 % Glucose) με 1 mM θειαμίνη (JM109) και επωάζουμε για 16 h στους 37 °C. Μοναδιαίες αποικίες μεταφέρονται σε υγρό θρεπτικό για καλλιέργεια μικρής κλίμακας, η οποία αφού επωαστεί overnight με συνεχή ανακίνηση χρησιμοποιείται για inoculation καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας (100 ml) με καλό αερισμό. Η καλλιέργεια επωάζεται στις ίδιες συνθήκες έως ότου η πυκνότητα της καλλιέργειας είναι  $6 \times 10^8$ /ml με  $8 \times 10^8$ /ml (OD<sub>600</sub>=0,6-0,8). Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 4000rpm, για 20 min στους 4 °C αφού προηγηθεί επώαση στον πάγο για 20-30 min. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου η πελέττα επαναδιαλύεται με ήπιο vortex σε ice-cold διάλυμα TFB I (30mM potassium acetate, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glycerol) και επωάζεται στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και επαναδιάλυση σε ice-cold TFB II (10 mM MOPS, pH=7, 75mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 15% glycerol),

διασπορά σε aliquots και ψύξη σε υγρό άζωτο. Τα δεκτικά φυλάσσονται στους -80 °C.

**Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* (JM83, JM109, DH5α ή XL1-Blue, Hanahan et al., 1991).** Ποσότητα από το μίγμα της αντίδρασης προστίθενται σε κατάλληλη ποσότητα δεκτικών κυττάρων και επωάζεται για 20 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί θερμικό σοκ για 90 δευτερόλεπτα, επώαση σε πάγο για 2 λεπτά και επώαση στους 37 °C παρουσία θρεπτικού μη επιλεκτικού -χωρίς αντιβιοτικά- με συνεχή ανακίνηση (για 45 λεπτά-2 h). Στην συνέχεια το περιεχόμενο του θρεπτικού κατακρημνίζεται και το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων, αφού επαναδιαλυθεί σε LB με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών, χρησιμοποιείται για την επίστρωση τρυβλίων. Τα τρυβλία επωάζονται για 16 h στους 37 °C. Η επιλογή των θετικών κλώνων πραγματοποιείται είτε με μεταφορά των βακτηριών σε μεμβράνη και υβριδοποίηση με ανιχνευτή που αντιστοιχεί σε τμήμα του ενθέματος, είτε με τυχαία επιλογή κλώνων για απομόνωση DNA και ανάλυση περιοριστικών πρότυπων, είτε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκκινητές που εσωκλείονται ή περιβάλλουν το ένθεμα.

<b>Τελική συγκέντρωση</b>	
<b>Αμπικιλίνη</b>	50-100 µg/ml
<b>Καναμυκίνη</b>	50-100 µg/ml
<b>Τετρακυκλίνη</b>	10-15 µg/ml
<b>Στρεπτομυκίνη</b>	100 µg/ml
<b>ΡΙφαμυκίνη</b>	150 µg/ml
<b>Καρβενικιλίνη</b>	100 µg/ml
<b>Στρεπτομυκίνη</b>	25 µg/ml
<b>Γενταμυκίνη</b>	25 µg/ml

**Πίνακας 1.** Χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών

**Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Birnboim et al., 1979).** Με αποστειρωμένο στυλέο μεταφέρουμε μια βακτηριακή αποικία σε ποσότητα LB (με τις απαραίτητες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών) και επωάζουμε στους 37 °C με συνεχή ανάδευση για 16h. Φυγοκεντρούμε το περιεχόμενο της υγρής καλλιέργειας στις 5000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4 °C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε ποσότητα διαλύματος P1 (50 mM Tris-

HCl pH=8,0, 10 mM EDTA) με έντονη ανάδευση. Προσθέτουμε ίσο όγκο P2 (0,2 N NaOH, 1 % SDS) - στόχος του P2 είναι η θραύση κυττάρων-αναδεύουμε ήπια και επωάζουμε 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε ίσο όγκο P3 (3 M οξικό κάλιο pH=5,5), αναδεύουμε προσεκτικά και ήπια και επωάζουμε για 15 λεπτά στον πάγο. Το P3 προστίθεται αφ' ενός για την εξουδετέρωση του P2 και αφ' ετέρου γιατί το SDS με το άλας συνκατακρυσμνίζουν τις πρωτεΐνες. Φυγοκεντρούμε στις 10000 στροφές για 5-15 λεπτά ώστε να κατακαθίσουν οι πρωτεΐνες και συλλέγουμε το υπερκείμενο αφού το φιλτράρουμε με την βοήθεια υαλοβάμβακα. Προσθέτουμε 2 νοί απόλυτη παγωμένη (-20 °C) αιθανόλη (εναλλακτικά 0,8 όγκους ισοπροπανόλης) και επωάζουμε για 5-15 λεπτά στους -80 °C (ή 30 λεπτά στους -20 °C). Φυγοκεντρούμε στις 12000 στροφές ανά λεπτό για 30 λεπτά στους 4 °C, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα αιθανόλη 70 %. Αναδεύουμε, φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου (ή με λυοφιλοποίηση). Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε αποστειρωμένο νερό (>100 λ) ή TE (1 mM EDTA /10 mM Tris-HCl, pH=8) και προσθέτουμε RNase A (τελική συγκέντρωση 100 μg/μl) με επώαση για μίση ώρα στους 37 °C. Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης, κάνουμε ένα απαλό vortexing (1-2 sec) και φυγοκεντρούμε στις 3000-8000 στροφές ανά λεπτό για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Συλλέγουμε την υδατική φάση και επαναλαμβάνουμε την διαδικασία με την φαινόλη. Εναλλακτικά χρησιμοποιούμε μίγμα φαινόλη :χλωροφόρμιο:ισοαμυλική με αναλογία όγκων 25:24:1 και συνολικού όγκου ίσου με το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης. Συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 2 όγκους μίγματος χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής (αναλογία όγκων 24:1), φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες και συλλέγουμε την υδατική φάση. Προσθέτουμε 2,5 όγκους απόλυτης παγωμένης αιθανόλης, 1/10 του όγκου οξικό νάτριο 3 M (pH=5,2) και ψύχουμε στους -80 °C για 5-15 min ή 30 λεπτά στους -20 °C. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στους 4 °C (ψυχόμενη φυγόκεντρος) στις 12.000 στροφές ανά λεπτό, αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα αιθανόλη 70 % (παγωμένη). Φυγοκεντρούμε, απομακρύνουμε υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε αποστειρωμένο νερό (<100 λ) .

Συνήθως για μικρής κλίμακας καλλιέργειες χρησιμοποιείται μια παραλλαγή του παραπάνω πρωτοκόλλου που συνοπτικά περιλαμβάνει την επαναδιάλυση της πελλέτας σε διάλυμα Solution I (50 mM Tris- HCl pH=8,0, 10 mM EDTA παρουσία

γλυκόζης), επώαση του επανεωρήματος για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία διαλύματος Solution II (0,2 N NaOH, 1 % SDS), προσθήκη Solution III (5 M οξικό κάλιο pH=4,8), στιγμιαία έντονη ανακίνηση και επώαση στον πάγο για 5 λεπτά, φυγοκέντρηση (δυο διαδοχικές φορές) στις 14000 στροφές για 3-5 λεπτά, extraction του υπερκειμένου με ίσο φαινόλης:χλωροφορμίου και στην συνέχεια με δυο όγκους χλωροφορμίου. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει κατακρήμνιση της υδατικής φάσης με 2 vol απόλυτης αιθανόλης με επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 2 λεπτά και επαναδιάλυση της πελλέτας αφού προηγηθεί έκπλυση με 70 % αιθανόλη και στέγνωμα.

**Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης(Polymerase Chain Reaction, Dieffenbach et al., 1995, Innis et al., 1990, Saiki et al., 1985).**

**Γενικά εισαγωγικά στοιχεία.** Η αντίδραση αυτή έχει ως στόχο την ενίσχυση μιας περιοχής DNA που ορίζεται από δυο εκκινητές. Το τμήμα DNA που βρίσκεται μεταξύ των εκκινητών αυτών μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι  $10^6$  φορές με την βοήθεια αλληλάλληλων επαναλήψεων ενός κύκλου αντίδρασης. Αρχή της αντίδρασης είναι ο εκλεκτικός πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA από ένα ετερογενές σύνολο μορίων.

#### **Υλικά.**

**Υπόστρωμα DNA:** Υπάρχει δυνατότητα χρησιμοποίησης οποιοδήποτε τύπου DNA (είτε πρόκειται για ολικό φυτικό γενωμικό DNA σε τελική ποσότητα ανά αντίδραση 50 ng, είτε για ολικό DNA από cDNA βιβλιοθήκες σε τελική ποσότητα 50-80 ng). Σε DNA-κλώνο πλασμιδιακό η ποσότητα είναι ακόμα μικρότερη. Μία τροποποίηση της μεθόδου επιτρέπει την χρησιμοποίηση υποστρώματος που προέρχεται από προϊόν αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).

**Εκκινητές:** Μικρές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μήκους συνήθως 17-25 νουκλεοτιδίων που παράγονται με την χρήση χημικών μεθόδων. Παρέχονται από τον κατασκευαστή λυοφιλοποιημένοι και επαναδιαλύονται σε αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό (τελική συγκέντρωση 1 mg/ml). Η τελική τους συγκέντρωση ανά αντίδραση καθορίζεται σε 10 ng ανά εκκινητή.

**Διάλυμα πολυμεράσης:** Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος περιλαμβάνει 100 mM Tris.HCl pH=8.3 και 100 mM KCl. Το πρώτο είναι ρυθμιστικό του pH της αντίδρασης ενώ το δεύτερο ευνοεί την υβριδοποίηση εκκινητή και αλληλουχίας στόχου.

**BSA** (Bovine Serum Albumin, τελική συγκέντρωση στο μίγμα της αντίδρασης 100 μg/μl). Είναι απαραίτητη για την σταθερότητα και κατά επέκταση την δράση της πολυμεράσης.

**dNTPs**: Μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 0.25 mM ανά αντίδραση.

**MgCl<sub>2</sub>**: Τα Ιόντα Mg<sup>+2</sup> είναι απαραίτητα για την δράση της πολυμεράσης ενώ σε συνεργασία με τα μονοσθενή ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης υποβοηθούν την ουδετεροποίηση του σκελετού του DNA εκκινητών και υποστρώματος –και κατ'επέκταση μειώνουν την θερμοκρασία υβριδοποίησης και η τελική συγκέντρωσή τους στην αντίδραση κυμαίνεται από 0.7-2 mM ανά αντίδραση ανάλογα με την φύση και την εξειδίκευση της αντίδρασης. Η συνηθισμένη συγκέντρωσή έχει οριστεί στο 1.5 mM.

**Ταq πολυμεράση (Minotech)**: Θερμοανθεκτική DNA-κατευθυνόμενη DNA πολυμεράση (ποσότητα ανά αντίδραση: 0,7 units/αντίδραση)

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης κυμαίνεται από 10-50 λ

#### **Συνθήκες Αντίδρασης.**

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τυπικούς θερμοανακυκλωτές με τις ακόλουθες συνθήκες:

1. Προθέρμανση του μηχανήματος στους 94-95 °C πριν την προσθήκη των δειγμάτων.
2. Αρχική αποδιάταξη DNA στους 94-95 °C για 3-5 λεπτά.
3. Αποδιάταξη στους 94-95 °C για 30-60 δευτερόλεπτα .
4. Υβριδοποίηση εκκινητή -στόχου στους 48-65 °C (ανάλογα με την θερμοκρασία τήξης του εκκινητή)<sup>5</sup> για 30-60 δευτερόλεπτα.
5. Επέκταση αλληλουχίας στους 68-72 °C (ανάλογα με την φύση του ενζύμου πολυμερισμού για 45 sec-2 min ανάλογα με το μήκος της αναμενόμενης αλληλουχίας).
6. Επανάληψη των βημάτων 3-5 30-40 φορές.
7. 68-72 °C για 3-5 λεπτά με στόχο την συμπλήρωση ημιτελών αλυσίδων.

---

<sup>5</sup> Η θεωρητική θερμοκρασία τήξης του εκκινητή για μικρά oligονουκλεοτιδια προσδιορίζεται από τον εμπειρικό τύπο  $T_m = \text{αριθμός A/Tα} \times 2 + \text{αριθμός G/C} \times 4$ . Στην πράξη όμως προσδιορίζεται εμπειρικά μετά από δοκιμές σε διάφορες θερμοκρασίες.

Στην περίπτωση που κρίθηκε απαραίτητο τα PCR προϊόντα κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς είτε με την αξιοποίηση της τεχνολογίας TA cloning (Holton et al., 1991, Marchuk et al., 1991) ή με την χρήση περιοριστικών ουρών στους εκκινητές (Kaufman et al., 1990).

**Προετοιμασία κυττάρων X11-blue MRF για μόλυνση με φάγο (*Sambrook et al., 1989*).** Απο Stab κυττάρων X11-blue MRF πραγματοποιείται streaking σε πιάτο LB- tet. Μοναδιαίες αποικίες χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό καλλιέργειας LB μικρής κλίμακας, η οποία με την σειρά της μετά από overnight επώαση στους 37 °C χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια LB/0,2 % μαλτόζη/10 mM MgSO<sub>4</sub>. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C μέχρι η πυκνότητα των κυττάρων να είναι 10<sup>9</sup> κύτταρα /ml (OD600=1). Στην συνέχεια η καλλιέργεια συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 15 λεπτά στους 4 °C και επαναδιαλύεται σε 10 mM MgSO<sub>4</sub> με τελική πυκνότητα κυττάρων 5 x 10<sup>8</sup> κύτταρα/ml.

**Μετατροπή φαγικής σε cDNA βιβλιοθήκη (*Sambrook et al., 1989*).** Αναμειγνύονται 1,5 x 10<sup>9</sup> pfu από την φαγική βιβλιοθήκη με (100 x αντιπροσώπευση του τίτλου της βιβλιοθήκης) με 1,5 x 10<sup>10</sup> κύτταρα X11-blue MRF (παρασκευασμένα όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη παράγραφο και επαναδιαλυμένα σε τελική πυκνότητα 10<sup>9</sup>/ml). Προστίθεται 1,5 x 10<sup>11</sup> pfu ExAssist Helper phage και το μείγμα επωάζεται στους 37 °C για υποβοήθηση της πρόσδεσης του φάγου στα κύτταρα. Στην συνέχεια το μείγμα προστίθεται σε LB και επωάζεται για 2-3 h στους 37 °C με συνεχή ανακίνηση. Το μείγμα θερμαίνεται στους 70 °C για 15-20 λεπτά και τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10000 rpm. Παράλληλα εμβολιάζεται καλλιέργεια 2x YT-Kan (100 μg/ml) με το στέλεχος SOLR και επωάζεται στους 37 °C με συνεχή ανακίνηση μέχρι η πυκνότητα της καλλιέργειας να φτάσει 8 x 10<sup>8</sup> κύτταρα/ml και μεταφέρεται σε καλλιέργεια 1L 2x YT(+ Kan). Ακολουθεί επώαση στις ίδιες συνθήκες μέχρι πυκνότητας 5 x 10<sup>8</sup> κύτταρα/ml. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές για 15 λεπτά στους 4 °C και η πελέττα επαναδιαλύεται σε 100ml 10 mM MgSO<sub>4</sub>, η οποία (αφού επωαστεί χωρίς ανακίνηση για 15 λεπτά στους 37 °C) αναμειγνύεται με το 1/10 των phagemid cDNA clones από το προηγούμενο στάδιο (10<sup>11</sup> pfu), επωάζεται για 15 λεπτά στους 37 °C χωρίς ανακίνηση και χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 400ml 2xYT. Στην καλλιέργεια, αφού επωαστεί για 2 ώρες στους 30 °C με ανακίνηση απουσία

αντιβιοτικού, προστίθεται αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml και επωάζεται στις ίδιες συνθήκες overnight. Αφού συγκεντρωθεί με φυγοκέντρηση χρησιμοποιείται για την απομόνωση DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Το πλασμιδιακό πια DNA είναι έτοιμο για ανάλυση PCR.

**Απομόνωση φαγικού DNA (Sambrook et al., 1989).** Σε 100 ml κυττάρων ξενιστή μεγαλωμένα στους 37 °C με συνεχή ανακίνηση μέχρι πυκνότητας  $6 \times 10^8$  κύτταρα/ml προστίθενται  $10^9$  pfu φάγου και η καλλιέργεια επωάζεται στις ίδιες συνθήκες μέχρι την λύση των κυττάρων. Στην συνέχεια προστίθενται 1 ml χλωροφορμίου και έπειτα από ανακίνηση στις ίδιες συνθήκες για 15 λεπτά –για την λύση και των εναπομεινάντων τυχόν μη λυμένων κυττάρων- η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 7000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C (για την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων). Το υπερκείμενο –αφού τιτλοδοτηθεί- χρησιμοποιείται για DNA extraction. Στο υπερκείμενο προστίθεται τελική συγκέντρωση 0,6 mM NaCl, 0,2 mM Tris/HCl pH=7,5, 20 µM EDTA, 0,4 µg/ml BSA, 40 µg/ml RNase και 12 µg/ml DNase για την απομάκρυνση του βακτηριακού RNA και DNA αντίστοιχα. Μετά από επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά στο υπερκείμενο προστίθενται τελικές συγκεντρώσεις 5 % PEG6000 και 0,5 M NaCl και η κατακρήμνιση των φαγοσωματίων επιταχύνεται με επώαση για μια ώρα στον πάγο. Το ίζημα των φαγοσωματίων συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 10 λεπτά και έπειτα από παρατεταμένο στέγνωμα επαναδιαλύεται σε διάλυμα 100 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH=7,5, 25 mM EDTA και υφίσταται dialysis έναντι 2 lt του ίδιου διαλύματος με ανακίνηση και περιστασιακή αλλαγή του buffer ανά 6 h για 5-6 φορές για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων της PEG6000. Προστίθεται SDS σε τελική συγκέντρωση 2% και έπειτα από ήπια ανακίνηση και παραμονή στους 70 °C για 20 λεπτά, οι αποδιαταγμένες από το SDS φαγικές και φαινόλες πρωτεΐνες κατακρημνίζονται με την προσθήκη ολικού καλίου pH=5,5 (τελική συγκέντρωση 1 M- το SDS με το μονοσθενές ιόν κατακρημνίζει τις πρωτεΐνες), ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 15 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο υφίσταται 3 διαδοχικά extraction με φαινόλη/ φαινόλη: χλωροφόρμιο και χλωροφόρμιο και κατακρημνίζεται παρουσία ίσου όγκου ισοπροπανόλης, επώαση για μια 1 h στους -20 °C και φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές/λεπτό για 30 λεπτά στους 4 °C. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει ξέπλυμα με 70% αιθανόλη, στέγνωμα και επαναδιάλυση σε TE παρουσία RNase.

**Απομόνωση συνολικού DNA από ιστό.** Η μέθοδος που περιγράφεται είναι μια τροποποίηση του γενικού πρωτοκόλλου για απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (Dellaporta et al., 1983). Αρχικά ο ιστός παγώνεται παρουσία υγρού αζώτου και στην συνέχεια λειοτριβείται παρουσία υγρού αζώτου. Προστίθενται 10 vol/gr extraction buffer (100mM Tris/Cl, pH=8, 50 mM EDTA pH=8, 500 mM NaCl, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη). Στην συνέχεια προστίθεται SDS –προθερμασμένο στους 65 °C- σε τελική συγκέντρωση 1, 25 % και αφού διασπαρθεί ομοιόμορφα με ανακίνηση το δείγμα επωάζεται στους 65 °C για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 10 min για την απομάκρυνση κυτταρικών τοιχωμάτων και λοιπών κυτταρικών υπολειμμάτων. Προστίθεται στο υπερκείμενο οξικό κάλιο σε τελική συγκέντρωση 0,25M, το δείγμα ανακινείται ήπια και επωάζεται για 20 λεπτά στους 0 °C. Μετά την φυγοκέντρηση του δείγματος (10.000 rpm/15 min/4 °C), το υπερκείμενο διέρχεται από Miracloth και προστίθεται σε 0,7 vol παγωμένη ισοπροπανόλη. Αφού ανακινηθεί μέχρι ομογενοποίησης, επωάζεται στους -20 °C για 20 λεπτά και επαναφυγοκεντρείται (12.000 rpm/15 min/4 °C). Η πελέττα επαναδιαλύεται σε TE αφού προηγηθεί ξέπλυμα με 70 % αιθανόλη και στέγνωμα. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα RNase, το επανεώρημα επωάζεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αφού επαναφυγοκεντρηθεί, για την απομάκρυνση του αδιάλυτου μη νουκλεϊνικού οξέος περιεχομένου του, φυλάσσεται στους -20 °C.

#### **Απομόνωση συνολικού DNA από φυτικό ιστό (κατά Murray and Thompson).**

Ιστός παγώνεται παρουσία υγρού αζώτου και λειοτριβείται σε σκόνη με την βοήθεια γουδιού και γουδοχειριού παρουσία υγρού αζώτου. Επαναδιαλύεται σε 10 vol/gr ιστού extraction buffer [0.7 M NaCl, 1% CTAB, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, και 1% 2-mercaptoethanol]. Επωάζεται για 20-30 λεπτά στους 50-60 °C με περιοδική ήπια ανακίνηση. Κυτταρικά τοιχώματα, αποδιαταγμένες πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες απομακρύνονται μετά από επανελλημένα extraction με χλωροφόρμιο /ισοαμυλική (24:1), ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 4000 rpm/10min/4 °C) μέχρι το υπερκείμενο να αποκτήσει διαύγεια. Προστίθεται 0,1 vol 10% CTAB, 0.7 M NaCl και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της φυγοκέντρησης στις ίδιες συνθήκες. Ένα ίζημα νουκλεϊκού οξέος-CTAB δημιουργείται όταν η συγκέντρωση του αλατιού μειωθεί από 0,7 σε 0,35 με την προσθήκη 1% CTAB, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), και 10 mM EDTA. Μετά από overnight επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, το ίζημα κατακρημνίζεται με την βοήθεια φυγοκέντρησης στις 7000 rpm/20 λεπτα/4 °C).



### **Απομόνωση DNA από ιστό (Fulton et al., 1995)**

Σε λειοτριβημένο ιστό με γουδί και γουδοχέρι παρουσία υγρού αζώτου προστίθενται 7,5 vol/gr ιστού πρόσφατα παρασκευασμένου extraction buffer [2,5 μέρη DNA extraction buffer (0.35 M sorbitol, 100 mM Tris-base pH=7,5 and 5 mM EDTA): 2,5 μέρη Nuclei lysis buffer (0.2 M Tris-base (pH 8.0), 50 mM EDTA, pH 8.0), 2 M NaCl and 2 % CTAB): 1 μέρη sacrosyl 5%- στο buffer προστίθεται 0,3 έως 0,5 gr sodium bisulphite/100 mL buffer λίγο πριν την χρήση] και αναμειγνύεται με ήπια ανακίνηση (ήπιο vortex). Επωάζεται στους 65 °C για 30-60 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), το δείγμα ανακατεύεται 50-100 φορές και φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές /15 min . Το extraction με χλωροφόρμιο επαναλαμβάνεται μέχρι το υπερκείμενο να είναι διαυγές. Στην συνέχεια προστίθενται 0,7 vol ισοπροπανόλη, το δείγμα φυγοκεντρείται άμεσα στις 12000 στροφές /15 min, η πελέττα ξεπλένεται με 70 % αιθανόλη, στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε TE με RNase.

Στην πράξη μια τροποποίηση του παραπάνω πρωτοκόλλου χρησιμοποιείται (που περιγράφεται στο Li et al., 2001) με τροποποιήσεις. Συνοπτικά, μετά την λειοτρίβιση του ιστού, προστίθεται 6 vol DNA extraction buffer (100 mM Tris-base and 5 mM EDTA pH=7,5, 0.35 M sorbitol, 0.4 g/100 mL buffer sodium bisulfite λίγο πριν την χρήση), το δείγμα ανακινείται με ήπιο vortex για 1 λεπτό και φυγοκεντρείται στις 7000 στροφές για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η πελέττα επαναδιαλύεται με ήπιο vortex για 1 λεπτό σε 2,5 vol DNA extraction buffer και προστίθενται 6 vol διαλύματος {0.2 M Tris-base (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), 2 M NaCl, 55 mM CTAB και 5 % sacrosyl}. Τα δείγματα ανακατεύονται ήπια μέχρι ομογενοποίησης και επωάζονται στους 65 °C για 30 λεπτά. Το chloroform extraction και το isopropanol precipitation πραγματοποιούνται όπως περιγράφεται στο Fulton et al. (1995).

### **Απομόνωση DNA από πλούσιο σε πολυσακχαρίτες ιστό (Sharma et al.,2002).**

Ο ιστός λειοτριβείται μέχρι τέλειας σκόνης παρουσία υγρού αζώτου και προστίθεται 5 vol/gr ιστού διάλυμα {5 M NaCl, 2% sarcosyl}. Το μίγμα αναδεύεται μέχρι ομογενοποίησης και φυγοκεντρείται στις 7000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής (24:1) και μετά από ήπια ανακίνηση για 1 λεπτό φυγοκεντρείται στις

3000 στροφές για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο υπερκείμενο προστίθενται 2 vol extraction buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% CTAB) αναμειγνύεται ήπια και επωάζεται σε 60 °C για 30 λεπτά με συνεχή ήπια ανακίνηση. Επαναλαμβάνεται το extraction με χλωροφόρμιο στις ίδιες συνθήκες επανειλημμένες φορές μέχρι διαύγειας του υπερκειμένου, στο υπερκείμενο προστίθεται 1/30 vol 3 M sodium acetate (pH 5.2) και 0,7 vol ισοπροπανόλη, το δείγμα αναμειγνύεται και φυγοκεντρείται στις 12000 στροφές για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το δείγμα επαναδιαλύεται σε TE (αφού προηγηθεί πλύσιμο με 70 % αιθανόλη και στέγνωμα) και επωάζεται παρουσία RNase για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

#### **Ανάλυση κατά Southern (*Sambrook et al., 1989*).**

**Πέψη γενωμικού DNA.** Η πέψη του γενωμικού DNA (~20 γ) πραγματοποιήθηκε παρουσία (ή μη) σπερμιδίνης σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM για την υποβοήθηση της αποελίκωσης του μεγαλομοριακού DNA και την διευκόλυνση της πρόσβασης από το περιοριστικό ένζυμο. Η σύσταση του αντιδρώντος μίγματος είναι 100 u περιοριστικής ενδονουκλεάσης παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος ενδονουκλεάσης -το ρυθμιστικό διάλυμα ενδονουκλεάσης εξαρτάται από την ενδονουκλεάση που χρησιμοποιείται και περιλαμβάνει Tris-HCl κατάλληλου pH βέλτιστου για την αντίδραση, κατάλληλη ποσότητα αλατιού NaCl, δισθενές ιόν για την λειτουργικότητα του ενζύμου ( $Mg^{+2}$ ) και τα απαραίτητα αντιοξειδωτικά-10 μg/ml BSA (Η παρουσία BSA δεν είναι απαραίτητη για την δράση όλων των ενδονουκλεασών αλλά η προσθήκη της στις περιπτώσεις ενζύμων που δεν την απαιτούν για την δράση τους δεν αλλοιώνει την ενεργότητα του ενζύμου). Ο όγκος του προστιθέμενου ενζύμου δεν πρέπει να είναι >1/10 του συνολικού όγκου της αντίδρασης για την αποφυγή αναστολής του ενζύμου από υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης που χρησιμοποιούνται κατά την διατήρηση των ενζύμων.

#### **Ηλεκροφορητικός διαχωρισμός και προεργασία για μεταφορά σε μεμβράνη.**

Η αντίδραση της πέψης πραγματοποιείται στους 37 °C για 16 h. Ποσότητα (1/10 ολικού όγκου αντίδρασης) διαχωρίζεται ηλεκτροφορητικά (~60 V για 6 h σε 0.8 % πήκτωμα αγαρόζης- για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της αντίδρασης. Η υπόλοιπη ποσότητα υφίσταται -προαιρετικά- κατεργασία με φαινόλη (phenol extraction), ακολουθούμενη από κατακρήμνιση με αιθανόλη παρουσία μονοσθενών ιόντων (ethanol precipitation) ακριβώς όπως περιγράφεται αλλού στο κείμενο. Το προϊόν της

επαναδιάλυσης υφίσταται ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό (~18 V για 16 h ) σε 0.8 % πήκτωμα αγαρόζης. Το πήκτωμα κατεργάζεται παρουσία 0.25 N HCl με ανακίνηση για 10 min για την διευκόλυνση της μεταφοράς μεγάλων μορίων DNA στην μεμβράνη. Σε περιπτώσεις μεταφοράς σε μεμβράνη νουκλεϊκών οξέων μικρού μοριακού βάρους το βήμα αυτό μπορεί να παραληφθεί. Ακολουθεί κατεργασία με ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης (1x denaturation-87,66 gr NaCl, 20 gr NaOH/l, pH=12) 2 φορές με συνεχή ανακίνηση για 40 λεπτά κάθε φορά και ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετέρωσης (1x neutralization: 121,1 gr Trisma-base, 87,66 gr NaCl/l, pH=8- η ρύθμιση του pH με HCl 37 %) δυο φορές για 40 λεπτά κάθε φορά με συνεχή ανακίνηση. Ακολουθεί ανακίνηση για μια ώρα σε 2x SSC (17,53 gr NaCl, 8,82 gr κιτρικό νάτριο/l).

**Μεταφορά σε μεμβράνη.** Σε ένα πλαστικό δοχείο προσθέτουμε 20x SSC και πάνω στο δοχείο τοποθετούμε κάθετα μια γυάλινη επίπεδη επιφάνεια. Πάνω στην γυάλινη επίπεδη επιφάνεια τοποθετούμε μια γέφυρα από χαρτί whatman (το τελευταίο έχει εμβαπτιστεί πρώτα σε 20 x SSC). Στο σημείο επαφής της γυάλινης επιφάνειας και της γέφυρας τοποθετούμε το πήκτωμα αγαρόζης και πάνω σε αυτό ένα κομμάτι μεμβράνης ακριβώς ίδιων διαστάσεων με το πήκτωμα. Με νυστέρι απομακρύνουμε το τμήμα της αγαρόζης που τυχόν περισσεύει σε σχέση με την μεμβράνη. Πάνω από την μεμβράνη τοποθετούμε 4 χαρτιά whatman (τα δυο πρώτα κατά προτίμηση εμβαπτισμένα στο 2 x SSC ενώ οι διαστάσεις τους οφείλουν να ταυτίζονται με αυτές του πηκτώματος). Στις τέσσερις πλευρές της γέφυρας που γειτονεύουν με το περίγραμμα του πηκτώματος προσθέτουμε πάραφιλμ (κολλώντας το σταθερά πάνω στην γέφυρα) και πάνω από αυτό τοποθετούμε saran κατά τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτει τις εκτεθειμένες στην ατμόσφαιρα περιοχές του διαλύματος (ώστε να αποφεύγεται η εξάτμιση του τελευταίου). Πάνω από τα χαρτιά whatman τοποθετούμε κοινές χαρτοπετσέτες στην κορυφή των οποίων εφαρμόζουμε ένα βάρος περίπου 1 kg. Για τον σκοπό αυτό τοποθετούμε μια γυάλινη υποδοχή στην κορυφή των χαρτοπετσετών ενώ στην υποδοχή αυτή προσαρμόζουμε το κατάλληλο βάρος. Στην πράξη αυτό που θα συμβεί είναι ότι το 20 x SSC θα περάσει από το διάλυμα στην γέφυρα και από εκεί με οσμωτικά φαινόμενα θα παρασύρει το σύνολο του DNA από το πήκτωμα στην μεμβράνη. Η μεταφορά του DNA στην μεμβράνη πραγματοποιείται overnight.

**Μονιμοποίηση και υβριδοποίηση της μεμβράνης.** Η μεμβράνη την επόμενη μέρα υφίσταται μονιμοποίηση του DNA με επίδραση υπεριώδους φωτισμού για 20

sec σε απόσταση 15 εκατοστών και παραμονή στους 80 °C για δυο ώρες. Ακολουθεί προϋβριδοποίηση των μεμβρανών παρουσία 50-100 µg/ml DNA –φορέα (carrier) για 2-6 ώρες στους 65 °C ακολουθούμενη από υβριδοποίηση για 16 h στους 65 °C. Η σύσταση του διαλύματος υβριδοποίησης αναφέρεται αλλού στο κείμενο.

#### **Απομόνωση ολικού RNA από ιστό (*Chomczynske and Sacchi, 1987*).**

Σε ομογενοποιητή προσθέεται το δείγμα από τον ιστό (διατήρηση σε υγρό άζωτο) και κατάλληλη ποσότητα διαλύματος ομογενοποίησης (0.1 M LiCl, 100 mM Tris/HCl pH=8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS) ώστε να μην είναι ιξώδες το δείγμα και ομογενοποιείται. Στην συνέχεια προστίθεται 1/10 vol 2 M Οξικό νάτριο pH=4 και 1 vol όξινη φαινόλη<sup>6</sup> και ανακινούμε έντονα (vortex) για 10 λεπτά. Προσθέτουμε 1/5 όγκου (όπου 1 όγκος ο όγκος του δείγματος πριν από την προσθήκη όξινης φαινόλης) μίγματος χλωροφορμίου:ισοαμλικής (24:1) και επαναλαμβάνουμε την διαδικασία της έντονα ανακίνησης (vortex) για 5 λεπτά. Επωάζουμε για 15 min στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 20 λεπτά στους 4 °C και λήψη της υπερκείμενης φάσης. Στην υπερκείμενη φάση προστίθεται 1 όγκος ουδέτερης φαινόλης και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της έντονης ανακίνησης (vortex) για 10 λεπτά ακολουθούμενη από προσθήκη 1/5 του όγκου του υπερκείμενου της φυγοκέντρησης χλωροφόρμιο: ισοαμλική (24:1) και έντονη ανακίνηση (vortex) για 5 λεπτά. Το δείγμα επωάζεται ξανά σε πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές ανά λεπτό για 20 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο κατακρημνίζεται με προσθήκη 2.5 vol απόλυτη παγωμένη αιθανόλη (ή 1 vol ισοπροπανόλης), επώαση στους -80 °C για 30 λεπτά (είτε στην περίπτωση της ισοπροπανόλης στους 20 °C για 1-2 h) και φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στους 4 °C στις 13000 στροφές ανά λεπτό. Το ίζημα ξεπλένεται με 75% αιθανόλη και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της φυγοκέντρησης στις ίδιες συνθήκες. Το ίζημα στεγνώνεται σε πάγο και

---

<sup>6</sup> Παρασκευή Όξινης φαινόλης: Φαινόλη σε στερεή μορφή προστίθεται σε ένα πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα 50 ml και διαλύεται τοποθετώντας την για 15 λεπτά σε προθερμασμένο υδατολουτρο στους 65 ° C. Παράλληλα πραγματοποιείται αραιώση 2 M οξικό νάτριο (pH=4,0) σε τελική συγκέντρωση 50 mM και ανάδευση με το χέρι μέχρι ομογενοποιησεως. Ακολουθεί προσθήκη στην φαινόλη ίσου όγκου 50 mM οξικό νάτριο, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη στο υποκείμενο ίσου όγκου 50 mM οξικό νάτριο pH=4, και αφού προηγηθεί ανάδευση, ήπια φυγοκεντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει απόρριψη υπερκείμενου αφήνοντας μόνο λίγο ώστε να καλύπτει την φαινόλη και να αποφεύγεται η οξείδωση της τελευταίας.

επαναδιαλύεται σε διπλά αποστειρωμένο νερό. Προστίθεται LiCl σε τελική συγκέντρωση 2M και το δείγμα επωάζεται στους -20 °C overnight. Το ίζημα συγκεντρώνεται με φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 30 λεπτά στους 4 °C. Η πελέττα είναι εμπλουτισμένη σε mRNA και rRNA ενώ το υπερκείμενο σε μικρά RNA, tRNA και γενωμικό DNA. Η πελέττα επαναδιαλύεται σε TE και επανακατακρυμνίζεται με 1/9 vol οξικό νάτριο pH=6,1 και 2 vol απόλυτη παγωμένη αιθανόλη, επώαση στους -20 °C για 1h-overnight και φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 30 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα ξεπλένεται με 70 % αιθανόλη, στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε TE. Φυλάσσεται στους -80 °C

**Ανάλυση κατά Northern (Sambrook et al., 1989).** Η ηλεκτροφόρηση είχε πραγματοποιηθεί σε ένα αποδιατακτικό πήκτωμα φορμαλδεΰδης /αγαρόζης 1,2 % και το RNA μεταφέρθηκε σε μια πλαστική μεμβράνη. Αρχικά τοποθετείται σε 2 x SSC και μεταφέρεται σε κύλινδρο υβριδοποίησης. Προθερμασμένο στους 68 °C διάλυμα υβριδοποίησης αναμείχθηκε με κατάλληλη ποσότητα (προθερμασμένου για 5 λεπτά στους 100°C) carrier DNA -τελική συγκέντρωση στο διάλυμα προϋβριδοποίησης: 50-100 µg/ml- και προστέθηκε στον κύλινδρο. Η προϋβριδοποίηση διάρκεσε 2 h στους 65 °C. Ακολούθως ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής αποδιατάχθηκε για 5 λεπτά στους 100 °C, τοποθετήθηκε αμέσως σε πάγο και, έπειτα από μια στιγμιαία φυγοκέντρηση, αναμείχθηκε με φρέσκο διάλυμα υβριδοποίησης προθερμασμένο στους 68 °C. Το διάλυμα αυτό αντικατέστησε το προηγούμενο και η υβριδοποίηση διάρκεσε 2 h-overnight στους 65 °C. Η διαδικασία των πλυσιμάτων που ακολουθήθηκε περιγράφεται αλλού στο κείμενο. Η μεμβράνη εκτέθηκε στους -80 °C.

**In vitro μεταγραφή (Sambrook et al., 1989).**

Ποσότητα DNA (0,5-1 µg) αναμειγνύεται με τελική συγκέντρωση 40 mM Tris-HCl pH=8, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTT, 0,5 mM από κάθε ριβονουκλεοτίδιο, 4 mM σπερμιδίνη (στην περίπτωση μεταγραφής από την T7 RNA πολυμεράση) ή 40 mM Tris-HCl pH=7,9, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM DTT, 0,5 mM από κάθε ριβονουκλεοτίδιο, 2 mM σπερμιδίνη (στην περίπτωση μεταγραφής από την T3 RNA πολυμεράση) ή 40 mM Tris-HCl pH=7,9, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM DTT, 0,5 mM από κάθε ριβονουκλεοτίδιο (στην περίπτωση μεταγραφής από την SP6 RNA πολυμεράση) παρουσία ενός αναστολέα RNases (Rnasin, 100 units) και της απαραίτητης πολυμεράσης (50 units). Στην περίπτωση ραδιενεργής σήμανσης για την

αποφυγή ανταγωνισμού από το υπόστρωμα, η τελική συγκέντρωση μη σημασμένου UTP είναι 10  $\mu\text{M}$  ενώ η ποσότητα του ραδιενεργού είναι 2,5  $\mu\text{Ci}$   $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -UTP. Το μείγμα επωάζεται για 1,5 -2 h στους 37 °C και προστίθεται ποσότητα DNases (RNase free) για την απομάκρυνση του υποστρώματος (επώαση για 5 min/ RT). Τα ένζυμα απομακρύνονται με extraction με φαινόλη και το υπερκείμενο αραιωμένο σε 500  $\lambda$  TE διέρχεται από κολώνα Bio-gel (Bio-rad, παρασκευασμένη σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή) και συλλέγονται κλάσματα. Τα κλάσματα εκατέρωθεν του πρώτου peak αντιπροσωπεύουν το ραδιοσημασμένο προϊόν ενώ του δεύτερου τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια. Ποσότητα ραδιοσημασμένου προϊόντος κατάλληλης ειδικής ενεργότητας αναμειγνύεται με ίσο όγκο 2 x φορμαμίδης και αφού αποδιαταχθεί με βρασμό στους 100 °C για 3 λεπτά και παρουσία πάγου αποφευχθεί η επαναδιάταξη, προστίθεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος υβριδοποίησης. Στην περίπτωση μη ραδιοσημασμένου προϊόντος η κατεργασία με DNase και η κλασμάτωση παραλείπεται.

**Σήμανση DNA (Sambrook et al., 1989) με την μέθοδο του random priming (Διάλυμα προς σήμανση):** Μίγμα αντίδρασης. Ποσότητα δείγματος DNA προς σήμανση που περιέχει ποσότητα DNA ίση με 10-100 ng σε όγκο 7,5  $\lambda$  αναμειγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης LS- 11,5  $\lambda$ - [Το LS είναι μίγμα που περιέχει τα τυχαία εξαμερή και τα μη σημασμένα νουκλεοτίδια. Τα τυχαία εξαμερή είναι εξαμερή τυχαίας αλληλουχίας κάποια από τα οποία περιμένουμε ότι θα έχουν αλληλουχία συμπληρωματική με το DNA που έχουμε και θα δράσουν ως εκκινητές για το ένζυμο της Klenow πολυμεράσης<sup>7</sup> Σύσταση του LS :25 μέρη HEPES1 M pH=6,5 (το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης): 25 μέρη DTM (περιέχει τα μη σημασμένα νουκλεοτίδια: 0,1 mM dGTP, 0,1 mM TTP in 250mM Tris-HCl pH=8, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM b-mercaptoethanol]: 7 μέρη OL (περιέχει τα τυχαία εξαμερή: 1mM Tris-HCl pH=7,5, 1mM EDTA, 90 units/ml random primers), 2  $\lambda$   $\gamma$ - $\text{p}^{32}$ - dCTP και  $\gamma$ -  $\text{p}^{32}$ - dATP, 5 units Klenow, 1  $\mu\text{g/ml}$  BSA σε συνολικό όγκο αντίδρασης: 25  $\mu\text{l}$

**Διαδικασία** Αρχικά το διάλυμα που περιέχει το DNA υφίσταται αποδιάταξη με βρασμό στους 95 °C. Στην συνέχεια τοποθετείται στον πάγο -για αποφυγή επαναδιάταξης του μορίου-, υφίσταται μια στιγμιαία φυγοκέντρηση και στην

---

<sup>7</sup> Η Klenow πολυμεράση είναι ένα θραύσμα της DNA πολυμεράσης I της E.coli το οποίο δεν έχει 5'=>3' εξωνουκλεολυτική δράση.

συνέχεια προστίθενται τα υπόλοιπα διαλύματα. Η αντίδραση της σήμανσης διαρκεί 3 h στους 37 °C

**Απομάκρυνση μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων μέσω διέλευσης από στήλη χρωματογραφίας και μέτρηση ειδικής ενεργότητας.** Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση της σήμανσης στους 37 °C το μίγμα της αντίδρασης ρυθμίζεται σε τελικό όγκο 100 λ και διέρχεται από στήλη χρωματογραφίας διήθησης Sephadex G-50 για την απομάκρυνση των μη ενσωματωμένων ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων. Ακολουθεί μέτρηση της ειδικής ενεργότητας του ανιχνευτή έπειτα από κατακρήμιση με TCA 10 %. 1 λ του δείγματος τοποθετείται σε χαρτί whatman με 10 mg DNA-φορέα (carrier) ώστε να κατακρημιστούν τα μόρια DNA άνω των 50 νουκλεοτιδίων. Το χαρτί ξεπλένεται με TCA 10% για 5 min για την απομάκρυνση των ελεύθερων ραδιενεργών νουκλεοτιδίων ακολουθούμενο από ξέπλυμα με παγωμένη ακετόνη για 5 min και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Η μέτρηση των κρούσεων πραγματοποιείται σε σπινθηρομετρική απουσία υγρού σπινθηρομέτρησης. Σε αυτές της συνθήκες η καταγραφόμενη ένδειξη εκτιμάται ότι είναι 2.5 φορές χαμηλότερη της πραγματικής.

#### ***Αλγόριθμος υπολογισμού Ειδικής ενεργότητας (Specific Activity)***

**Ορισμός Ειδικής ενεργότητας:** Ονομάζουμε ειδική ενεργότητα την αριθμητική τιμή των κρούσεων ανά λεπτό ποσότητας ανιχνευτή ίσης με 1 γ (1 μg).

**Ειδική ενεργότητα**= αριθμός κρούσεων ανά λεπτό x (συνολικός όγκος αντίδρασης μετά από διέλευση από κολώνα / όγκος που χρησιμοποιήθηκε κατά την μέτρηση x (1 γ/ ποσότητα DNA που χρησιμοποιήθηκε κατά την σήμανση) x 2.5

#### **Σήμανση με την μέθοδο του H<sup>3</sup>O-PCR (Sambrook et al., 1989).**

##### ***Διαδικασία***

Μια παραλλαγή της παραπάνω μεθόδου είναι η σήμανση σχετικά μικρών μορίων DNA (100-300 nt) παρουσία ραδιενεργού νουκλεοτιδίου. Η διαδικασία είναι μια τυπική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τις ακόλουθες τροποποιήσεις: Η τελική συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων -εκτός του ραδιενεργού- στο μίγμα της αντίδρασης είναι η μισή της αντίστοιχης σε κανονική αντίδραση πολυμεράσης, το μίγμα των νουκλεοτιδίων δεν περιέχει το αντίστοιχο νουκλεοτίδιο του ραδιοσημασμένου ώστε να ελαχιστοποιηθούν φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ ραδιενεργού νουκλεοτιδίου και μη ραδιενεργού, ενώ προστίθεται 1 λ ραδιενεργού νουκλεοτιδίου στο τελικό μίγμα της αντίδρασης. Η απομάκρυνση των αδέσμευτων

νουκλεοτιδίων από τον ραδιοσημασμένο ανιχνευτή πραγματοποιείται με διέλευση του μίγματος της αντίδρασης (ρυθμισμένου σε τελικό όγκο 100 λ) από στήλη χρωματογραφίας διέλευσης G-50. Ακολουθεί μέτρηση ειδικής ενεργότητας έπειτα από κατακρήμιση με TCA.

**Εκτίμηση επιτυχίας αντίδρασης.** Σε αντίθεση με την μέθοδο των τυχαίων εξαμερών- η οποία δίνει προϊόντα τυχαίων μεγεθών που προκύπτουν από τον υβριδισμό τυχαίων εξαμερών με την αλληλουχία στόχο- η αντίδραση με ραδιενεργό PCR αποδίδει ένα προϊόν τα άκρα του οποίου ορίζονται από τους χρησιμοποιούμενους εκκινητές. Για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης ποσότητα ραδιοσημασμένου DNA -έπειτα από την απομάκρυνση των μη ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων με την χρήση στήλης χρωματογραφίας διέλευσης- διαχωρίζεται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης, κατεργάζεται για μισή ώρα σε TCA 10% με συνεχή ανακίνηση για προαγωγή της αφυδάτωσης του μορίου και αφυδατώνεται παρουσία βάρους για 2 h. Ακολουθεί έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας σε ειδικές οθόνες ενίσχυσης σήματος στους -80 °C για 3 h. Από το αποτέλεσμα της αυτοραδιογραφίας γίνεται εκτίμηση του μεγέθους του μορίου.

***Υβριδοποίηση μεμβράνης (Sambrook et al., 1989).***

Ακολουθεί μονιμοποίηση του DNA στην μεμβράνη με έκθεση σε υπεριώδη φωτισμό για 20 sec σε απόσταση 15 εκατοστών και επώαση στους 80 °C για 1.5 ώρα.

Η μεμβράνη εμποτίζεται σε 2x SSC και μεταφέρεται στην εσωτερική επιφάνεια του κυλίνδρου κατά τέτοιο τρόπο ώστε η πλευρά που έχει το DNA να μην ακουμπάει στα τοιχώματα του κυλίνδρου. Ο κύλινδρος τοποθετείται στους 65 °C παρουσία 12 ml 2x SSC στην περιστρεφόμενη βάση. Ποσότητα DNA-φορέα (carrier DNA, τελική συγκέντρωση στο διάλυμα προϋβριδοποίησης: 50-100 μg/ml) αποδιατάσσεται με βρασμό στους 95 °C, μεταφέρεται σε πάγο, υφίσταται στιγμιαία φυγοκέντρωση και προστίθεται σε προθερμασμένο στους 65 °C διάλυμα προϋβριδοποίησης (Church hybridization buffer: 500 mM Na/phosphate buffer pH=7,2, 7% SDS, 1% BSA, 1mM EDTA ή Denharts hybridization buffer: 5x SSC, 0,02% PVP, 0,02 % ficoll, 0,02 %BSA, 1% SDS, 50 % formamide) το οποίο αντικαθιστά το 2x SSC. Συνθήκες προϋβριδοποίησης: 65 °C για 6 h. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται RNA ανιχνευτής προστίθεται 250 μg/ml tRNA.

Η παρουσία DNA-φορέα (carrier, ανθρώπινο ολικό γενωμικό DNA θραυσματοποιημένο με υπερήχους, είτε ολικό DNA σπέρματος σολομού ή ρέγκας) στο διάλυμα προϋβριδοποίησης συμβάλλει στην ελάττωση των μη ειδικών



αλληλεπιδράσεων ανιχνευτή και DNA μεμβράνης. Ραδιοσημασμένο DNA (με την μέθοδο του ραδιενεργού PCR ή των τυχαίων εξαμερών) αποδιατάσσεται με βρασμό στους 95 °C, μεταφέρεται σε πάγο, και έπειτα από στιγμιαία φυγοκέντρηση, προστίθεται σε προθερμασμένο διάλυμα υβριδοποίησης- στους 65 °C- το οποίο ανανεώνει το προηγούμενο. Η υβριδοποίηση διαρκεί 16 h στους 65 °C.

***Έκπλυση μεμβράνης (Sambrook et al., 1989).***

Συνθήκες έκπλυσης για Southern :

1. 2x με 2x SSC για 15 λεπτά κάθε φορά στους 65 °C
2. 2x με 2x SSC/0.1% SDS -προθερμασμένου στους 65 °C- για 15 λεπτά στους 65° C
3. 2x με 1x SSC/0.5% SDS -προθερμασμένου στους 65 °C- για 15 λεπτά στους 65° C
4. 2x 0.5x SSC/1 % SDS -προθερμασμένου στους 65 °C- για 15 λεπτά στους 65° C

Συνθήκες έκπλυσης για Northern :

1. 2x με 2x SSC για 15 λεπτά κάθε φορά στους 65 °C
2. 2x με 2x SSC/0.5% SDS -προθερμασμένου στους 65 °C- για 15 λεπτά στους 65° C
3. 2x με 0,1x SSC/0.1% SDS -προθερμασμένου στους 65 °C- για 15 λεπτά στους 65° C

Τα δυο τελευταία βήματα (ή το τελευταίο στην περίπτωση του Northern) είναι προαιρετικά και παραλείπονται στην περίπτωση της ύπαρξης εντοπισμένων σημάτων και απουσίας θορύβου υποβάθρου από μη ειδική πρόσδεση του ανιχνευτή. Η έκθεση πραγματοποιείται στους -80 °C σε ειδικά διαμορφωμένες οθόνες ενίσχυσης σήματος και διαρκεί από ώρες έως μερικές ημέρες .

***Αποϋβριδοποίηση μεμβράνης (Sambrook et al., 1989).*** Για την απομάκρυνση του ειδικού σήματος μετά το πέρας της αυτοραδιογραφίας ακολουθείται έκπλυση με 0.4 N NaOH για 20 min ακολουθούμενη με έκπλυση με 2x SSC (15 min). Η αποϋβριδοποιημένη μεμβράνη φυλάσσεται στους 4 °C. Εναλλακτικά η μεμβράνη εμποτίζεται σε 1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH=7,4, 0,1 % SDS και αποϋβριδοποιείται με βρασμό για 15 λεπτά.

***RT-PCR (Sambrook et al., 1989).*** Η μέθοδος αυτή είναι μια παραλλαγή της κλασσικής αντίδρασης πολυμεράσης που επιτρέπει τον συνδυασμό της με την αντίστροφη μεταγραφή. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο εκλεκτικός πολλαπλασιασμός

μιας αλληλουχίας που καθορίζεται από δυο εκκινητές με την χρήση RNA (ολικού ή mRNA) ως πρώτη ύλη. Η θεωρεία της αντίδρασης είναι ότι πραγματοποιείται ένα βήμα πολυμερισμού DNA χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα RNA με την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, ακολουθούμενο από αποικοδόμηση του RNA με την δράση της RNase H. Ακολουθεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της μεθόδου. Στην πρώτη η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής είναι μηχανιστικά και χωροχρονικά διαχωρισμένη από την αντίστοιχη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ενώ στην δεύτερη το μίγμα της αντίδρασης είναι κοινό για τα δυο ένζυμα απλά η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής και του πολυμερισμού στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνουν διαδοχικά με αλλαγή της θερμοκρασίας (η Taq πολυμεράση έχει μικρή ενεργότητα στην θερμοκρασία δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης)

Αρχικά εκκινητές<sup>8</sup> (oligo -dt ή τυχαία εξαμερή ή εκκινητής ειδικός για την προς ενίσχυση αλληλουχία) και RNA (η ποσότητα του RNA καθορίζεται από το ένζυμο που χρησιμοποιείται –στην περίπτωση της Omniscript reverse transcriptase/ Qiagen ή της Thermoscript reverse transcriptase- η απαιτούμενη ποσότητα είναι 2 γ RNA) υφίστανται αποδιάταξη στους 65 °C για 5 λεπτά και ακολούθως τοποθετούνται στους 4 °C. Το μίγμα της αντίδρασης περιέχει τελική συγκέντρωση 50 mM Tris acetate (pH 8.4), 75 mM potassium acetate, 8 mM magnesium acetate, 0,5 mM dNTPs, 5mM DTT, 40 units RNase inhibitor ,15 units Reverse transcriptase (στην περίπτωση Thermoscript reverse transcriptase για την περίπτωση της σύστασης του μίγματος της Omniscript ακολουθήθηκαν οι υποδείξεις της κατασκευάστριας εταιρίας{Qiagen}). Μετά από spin στο μίγμα RNA-εκκινητών προστίθεται ο κατάλληλος όγκος από το μίγμα αντίδρασης και η αντίδραση πραγματοποιείται στους 50 °C (37 °C στην περίπτωση της Omniscript) για 1—2 ώρες. Για έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης ένας μικρός όγκος ραδιενεργού προστίθεται στην τελική ποσότητα της αντίδρασης (προαιρετικά).

**Απομόνωση DNA από αгарόζη (Sambrook et al., 1989).** Βλέπουμε στο υπεριώδες την ζώνη που μας ενδιαφέρει και είναι καλά διακριτή από όλες τις υπόλοιπες. Με την βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού κόβουμε το περίγραμμα της ζώνης αυτής και την

---

<sup>8</sup> Ως εκκινητές είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν είτε ολιγονουκλεοτίδια προκαθορισμένης αλληλουχίας είτε τυχαία εξαμερή.

τοποθετούμε σε Eppendorf. Κόβουμε την αγαρόζη (που περιέχει DNA) σε όσο πιο λεπτές φέτες μπορούμε με την βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού. Εναλλακτικά χρησιμοποιούμε ένα υποτυπώδες πλαστικό «γουδί» -το οποίο έχουμε φροντίσει προηγουμένως να εκθέσουμε στο υπεριώδες για χρόνο αρκετό ώστε να καταστραφεί κάθε ίχνος DNA που τυχόν περιέχει- το οποίο μπορεί να εφαρμοστεί στην εσωτερική επιφάνεια του Eppendorf και να πολτοποιήσει την αγαρόζη. Βάζουμε το ομογενοποίημα σε ένα Eppendorf 0,5 ml, το οποίο και έχουμε τροποποιήσει ως εξής: στο κάτω άκρο με την βοήθεια σύριγγας ινσουλίνης ανοίγουμε μια τρυπά και προσθέτουμε -με την βοήθεια πιπέτας Παστέρ στο εσωτερικό του κάτω άκρου υαλοβάμβακα (μέχρι να καλυφθεί περίπου το 1 /3 του μήκους του Eppendorf). Προσαρμόζουμε το Eppendorf 0,5 ml στο εσωτερικό ενός 1,5 ml Eppendorf. Προσθέτουμε τις ψιλοκομμένες φέτες στο εσωτερικό του 0,5 ml Eppendorf. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 9-11.000 στροφές ανά λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Στην πράξη κατά την διάρκεια της φυγοκέντρωσης η αγαρόζη θα κατακρατηθεί στον υαλοβάμβακα ενώ το DNA θα διέλθει και θα συσσωρευτεί στο 1,5 ml Eppendorf. Επαναλαμβάνουμε την φυγοκέντρωση μέχρι να σταματήσει να συσσωρεύεται DNA στο Eppendorf. Ακολουθεί τυπικό πρωτόκολλο επεξεργασίας με φαινόλη (phenol extraction) και κατακρήμνισης με αιθανόλη παρουσία αλάτων (ethanol precipitation).

**Ηλεκτροέκλυση (Sambrook et al., 1989).** Ενυδατωμένο τμήμα ημιδιαπερατής μεμβράνης (μεγέθους πόρων που αποκλείει την διέλευση νουκλεοτιδικών σκελετών πάνω από 18 nt) σφραγίζεται εκατέρωθεν ενώ στο εσωτερικό του έχουν εναποτεθεί το τμήμα της αγαρόζης σε ποσότητα TE (0,5 ml). Η κατασκευή με επίδραση πεδίου (30 λεπτά στα 100 V) επιτρέπει την απομάκρυνση του DNA από την αγαρόζη στο περιεχόμενο buffer. Αντιστροφή πόλων για 30 sec στα 100V επιτρέπει την απομάκρυνση του DNA που έχει επικαθίσει στα τοιχώματα της κατασκευής. Extraction με φαινόλη/ χλωροφόρμιο επιτρέπει την απομάκρυνση του βρωμιούχου αιθιδίου και τον καθαρισμό του δείγματος το οποίο συμπυκνώνεται με ethanol precipitation και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο TE όπως περιγράφεται αλλού στο κείμενο.

**Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων (Sambrook et al., 1989).** Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x TAE (4.48 gr Tris-base, 1.141 ml οξικού οξέος και 2 ml 0.5 M EDTA pH=8/l) ή 0,5 % TBE (5,4 gr Tris-base, 2,75 gr boric acid, 2 ml 0.5 M EDTA pH=8/l) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου τόσο στο πήκτωμα όσο και στο ρυθμιστικό διάλυμα σε τελική συγκέντρωση 100 ng/ml. Στις ίδιες συνθήκες πραγματοποιήθηκε και ο μη αποδιατακτικός διαχωρισμός των RNA.

**Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (*Sambrook et al., 1989*).** Ποσότητα 28 polyacrilamide:2 bis- polyacrilamide αραιώνεται σε 0,5 x TBE κατά τέτοιο τρόπο ώστε η τελική συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης να είναι η επιθυμητή και αφού αναμιχθεί με 20 λ TEMED (καταλύτης της αντίδρασης πολυμερισμού) και 0,5 % τελική συγκέντρωση APS αφήνεται να πολυμεριστεί στην συσκευή που συναρμολογείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Bio-rad).

**Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες (*Sambrook et al., 1989*).** Ποσότητα 28 polyacrilamide:2 bis- polyacrilamide αραιώνεται σε H<sub>2</sub>O κατά τέτοιο τρόπο ώστε η τελική συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης να είναι η επιθυμητή και αφού αναμιχθεί με Tris-HCl pH=8,8 σε τελική συγκέντρωση 0,375 M, 0,1 % SDS (τελική συγκέντρωση), 0,1% APS (τελική συγκέντρωση) και 20 λ TEMED προστίθεται σε όγκο ίσο με τα 2/3 του συνολικού όγκου της συσκευής η οποία συναρμολογείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Bio-rad). Στην πάνω επιφάνεια προστίθεται αλκοόλη για τον καλύτερο διαχωρισμό των δυο φάσεων. Αφού πολυμεριστεί η πηκτή (separating gel, η οποία αντιστοιχεί στο τμήμα της πηκτής που επιτρέπει τον διαχωρισμό πρωτεϊνών) και απομακρυνθεί η αλκοόλη προστίθεται το τμήμα της πηκτής χωρίς διαχωριστικές ιδιότητες αλλά με την ιδιότητα του πακεταρίσματος των πρωτεϊνών σε ενιαίο μέτωπο (stacking gel) με σύσταση (τελικές συγκεντρώσεις): 5% πολυακρυλαμίδη, 0,125 M Tris-HCl pH=6,8, 0,1 % SDS, 0,1% APS και 20 λ TEMED και αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα δείγματα παρουσία 0,0625 M τελικής συγκέντρωσης Tris-HCl pH=6,8, 10 % glycerol, 5% b-mercaptoethanol, SDS) υφίστανται αποδιάταξη με βρασμό στους 95 °C για 2-3 λεπτά ενώ η αποφυγή της επαναδιάταξης επιτυγχάνεται με διατήρηση στον πάγο μέχρι την στιγμή που θα φορτωθούν στην πηκτή για να ηλεκτροφορηθούν παρουσία διαλύματος ηλεκτροφόρησης 0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glycine pH=8,3, SDS. Η πηκτή υφίσταται επώαση για 20 λεπτά με διάλυμα 0,1 % coomassie blue με

ανακίνηση, ακολουθούμενη από αποχρωματισμό με διάλυμα 50 % μεθανόλη, 10 % οξικό οξύ.

### **Γενετική τροποποίηση Agrobacterium.**

Κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά στελέχη Agrobacterium, το LBA4404 το οποίο φέρει το βοηθό πλασμίδιο pAL4404 (Streptomycin/Rifabycin resistance), το GV3101 που φέρει το βοηθό πλασμίδιο Pmon (Rifambicin/ Gentamycin resistance) και το GV3101 τροποποιημένο ώστε να έχει το πλασμιδιο pSoup (Rifambicin, Tetracycline resistance, Hellens et al., 2000). Το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε για τα βασισμένα σε pGreen ανασυνδυασμένα πλασμίδια του pTV00. Τρεις διαφορετικές μέθοδοι γενετικού μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικά ανά περίπτωση

**Τριγωνική σύζευξη (Triparental mating, Ditta et al., 1980, Fraley et al., 1983 με τροποποιήσεις).** Από πρόσφατο streaking, εμβολιάζονται αποικίες μετασχηματισμένου με ανασυνδυασμένο binary φορέα E. coli (100 µg/ml Spectinomycin για τα pART27 βασιζόμενα πλασμίδια, 100 µg/ml Kanamycin για τα pGreen βασιζόμενα πλασμιδια), παράλληλα με E. coli μετασχηματισμένο με το βοηθητικό πλασμιδιο pRK2013 (100 µg/ml Kanamycin). Ταυτόχρονα εμβολιάζεται καλλιέργεια με ένα από το κατάλληλο στέλεχος Agrobacterium (150 µg/ml Rifabycin). Οι τρεις καλλιέργειες αφού αναπτυχθούν για τουλάχιστον 12 h αναμειγνύονται (50-100 λ από την καθεμία) και χρησιμοποιούνται για την δημιουργία κηλίδων (30 λ η καθεμία) πάνω σε στερεό LB απουσία αντιβιοτικών. Το τρυβλίο επωάζεται για 12 h στους 28 °C. Ποσότητα από την κηλίδα διαλύεται σε υγρό LB και χρησιμοποιείται για την επίστρωση τρυβλίου με Rifabycin (150 µg/ml) και αντιβιοτικό για το οποίο έχει γονίδιο ανθεκτικότητας ο binary φορέας. Μετά την διέλευση δυο ημερών στους 28 °C, οι ανθεκτικές αποικίες αντιπροσωπεύουν τα επιτυχή αποτελέσματα του μετασχηματισμού.

**Ψύξη-Απόψυξη (Freeze- throw, Tzfira et al., 1997).** Καλλιέργεια (overnight στους 28 °C) μικρής κλίμακας (που προήλθε από εμβολιασμό μοναδιαίας αποικίας από πρόσφατα παρασκευασμένο πιάτο από streaking) σε LB-Rif στελέχους Agrobacterium που φέρει το απαραίτητο Ti βοηθό πλασμιδιο χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό μεγάλης κλίμακας καλλιέργειας (100 ml σε φλάσκα 1 L), η οποία αναπτύσσεται στους 28 °C με συνεχή ανάδευση μέχρι η πυκνότητα των κυττάρων να γίνει  $5 \times 10^8 - 10^9$  κύτταρα/ml. Η καλλιέργεια αφού διατηρηθεί στον πάγο για 15 min, συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C και η

πελέττα επαναδιαλύεται σε 1ml/10ml όγκου καλλιέργειας 20 mM CaCl<sub>2</sub> ( ice-cold). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, επαναδιάλυση της πελέττας σε 2ml/100 ml καλλιέργειας 20 mM CaCl<sub>2</sub>/10% γλυκερόλη, άμεση ψύξη σε υγρό άζωτο μετά από δημιουργία aliquots (σε προψυγμένα Erentorf tubes) και διατήρηση στους -80 °C. Ποσότητα αποψυγμένων σε πάγο κυττάρων αναμειγνύεται με 1 μg πλασμιδίου και καταψύχεται ακαριαία σε υγρό άζωτο για 5 λεπτά. Ακολουθεί απόψυξη για 25 λεπτά στους 37 °C, προσθήκη ποσότητας υγρού θρεπτικού και επώαση με ανακίνηση στους 28 °C για 3-4 h. Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση σε χαμηλές στροφές, επαναδιάλυση σε μικρό όγκο υγρού θρεπτικού και επίστρωση τρυβλίων θρεπτικού με τα απαραίτητα αντιβιοτικά

**Ηλεκτροπόρωση (electroporation).** Η μέθοδος (*Dower et al., 1988* με τροποποιήσεις, Lu et al., 2003) που περιγράφεται εδώ χρησιμοποιείται για την παρασκευή δεκτικών κυττάρων είτε *E. coli*, είτε *Agrobacterium*. Καλλιέργεια μικρής κλίμακας –προερχόμενη από μοναδιαία αποικία- και αναπτυγμένη στους 37 °C (overnight) με συνεχή ανακίνηση χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό καλλιέργειας 0,5 L (2 L φλάσκα). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται μέχρι οπτικής πυκνότητας  $5 \times 10^8$  κύτταρα/ml και αφού διατηρηθεί σε πάγο για 20 λεπτά, συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 15 λεπτά στους 4 °C. Η πελέττα επαναδιαλύεται σε ice-cold αποστειρωμένο νερό (2 x αρχικού όγκου καλλιέργειας) και επανασυλλέγεται με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία της έκπλυσης με αποστειρωμένο νερό στις ίδιες συνθήκες -για την απομάκρυνση αλάτων που μπορούν να δημιουργήσουν βραχυκυκλώματα σε μετέπειτα στάδιο- και μετά την συλλογή της με φυγοκέντρηση, επαναδιαλύεται σε 10 % γλυκερόλη (1/10 αρχικού όγκου καλλιέργειας). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και επαναδιάλυση των κυττάρων σε τελική πυκνότητα  $2 \times 10^{11}$  κύτταρα/ml. Τα κύτταρα διασπείρονται σε προψυγμένα aliquots, καταψύχονται σε υγρό άζωτο και διατηρούνται στους -80 °C.

Αποψυγμένα σε πάγο κύτταρα αναμειγνύονται με 1 μg πλασμδιακού DNA (pg στην περίπτωση μετασηματισμού δεκτικών *E. coli* ή ποσότητα από αντίδραση συγκόλλησης άκρων) μεταφέρονται στην κατάλληλη κυψελίδα σε στείρες συνθήκες και υφίστανται μετασηματισμό στις ακόλουθες συνθήκες (2,3 KV, 25 μF, 200 Ω, Time constant= 5-5,2 ms). Στην συνέχεια μεταφέρονται σε ice-cold LB (απουσία αντιβιοτικών) και επωάζονται για 2-4 h στους 28 °C (37 °C στο *E. coli*). Αφού συλλεγούν και συμπυκνωθούν με φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση σε μικρότερο

όγκο υγρού θρεπτικού χρησιμοποιούνται για την επίστρωση τρυβλίων με τα απαραίτητα αντιβιοτικά.

**Αγροένχυση (Agroinfiltration, Wroblewski et al.,2005, Yang et al., 2000, Schob et al., 1997, Lu et al., 2003).**

Εμβολιάζονται μοναδιαίες αποικίες ανασυνδυσασμένων κλώνων *Agrobacterium* σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας LB με τα απαραίτητα αντιβιοτικά (100 µg/ml στρεπτομυκίνη στην περίπτωση pART27 βασιζόμενου κλώνου, 100 µg/ml καναμυκίνη σε περίπτωση pGreen/pTVOO/pBIN19/pBINTRA6 βασιζόμενου πλασμιδίου, 150 µg/ml ριφαμυκίνη, 12,5 µg/ml τετρακυκλίνη στην περίπτωση pSoup μετασχηματισμένου στελέχους αγροβακτηρίου) με 20 µM ακετοσυριγκόνη και επωάζονται για 1,5 -3 μέρες στους 28 °C με συνεχή ανακίνηση. Στην συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύονται σε ίσο όγκο 10 mM MES pH=5,6 (σε MS, η σύσταση του MS παρατείνεται παρακάτω) με 200 µM ακετοσυριγκόνη. Αφού επωαστούν στους 28 °C για 1-3h με συνεχή ανακίνηση, επανασυλλέγονται με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και επαναδιαλύονται σε 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Επαναφυγοκεντρώνται στις ίδιες συνθήκες και η διαδικασία επαναλαμβάνεται δυο ακόμη φορές. Τελικά επαναδιαλύονται σε τελική πυκνότητα 10<sup>8</sup> κύτταρα/ml στην περίπτωση ανασυνδυσασμένων πλασμιδίων που φέρουν μολυσματικά cDNA ιών ή σε 4 x 10<sup>8</sup>/ κύτταρα/ml στις υπόλοιπες περιπτώσεις. Στην περίπτωση που απαιτείται από το πείραμα (όπως στην περίπτωση pTV00/pBINTRA6) γίνεται αγροένχυση με περισσότερα από ένα στελέχη τα οποία αναμειγνύονται σε ίσες ποσότητες.

Με την βοήθεια αιχμηρού αντικειμένου δημιουργείται οπή στην κάτω επιφάνεια του φύλλου στην οποία προσαρμόζεται σύριγγα χωρίς αιχμηρό άκρο η οποία περιέχει το επανέωρημα του *Agrobacterium* και το οποίο ενχύεται στους μεσοκυττάριους χώρους. Τα φυτά τοποθετούνται σε 16 day/8 night φωτοπερίοδο, στους 23/19 °C για δυο μέρες, συνθήκες που υποβοηθούν την μόλυνση με *Agrobacterium* πριν μεταφερθούν σε συνθήκες θερμοκηπίου.

**1. ΜΑΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ**

<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	<b>82,5 mM</b>
<b>KNO<sub>3</sub></b>	<b>18,8 mM</b>
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	<b>3 mM</b>
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	<b>1,5 mM</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>1,4 mM</b>

**2. Μικροστοιχεία**

<b>KI</b>	<b>5 μM</b>
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	<b>100 μM</b>
<b>MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	<b>109 μM</b>
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	<b>30 μM</b>
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	<b>1,2 μM</b>
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,1 μM</b>
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,1 μM</b>

**3. BITAMINEΣ**

<b>Biotin</b>	<b>0,004 μM</b>
<b>Nicotinic acid</b>	<b>4 μM</b>
<b>Pyridoxine</b>	<b>2,5 μM</b>
<b>Thiamine</b>	<b>1,5 μM</b>
<b>D-Pantothenic acid</b>	<b>2,125 μM</b>
<b>Myoinositol</b>	<b>5,5 μM</b>

- **Fe Na EDFS** **1,17 mM**
- **Σακχαροζη** **30 gr/l**
- **Αγαρ** **7 gr/l**



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η αποσαφήνιση του φυσιολογικού ρόλου της πρωτεΐνης Virp1 της τομάτας ανεξάρτητα ή όχι από την προβολή του ιοειδούς. Με δεδομένο ότι πιθανότατα το ιοειδές εκμεταλλεύεται την φυσιολογική δράση πρωτεϊνών του κυττάρου για να επιτελέσει τον βιολογικό του κύκλο -όχι απαραίτητα παρεκτρέποντας τις από την φυσιολογική τους λειτουργία αλλά χρησιμοποιώντας την βιολογική τους λειτουργία για το δικό του όφελος- μια σειρά πειραμάτων σχεδιάστηκαν αφενός για να «χαρτογραφηθεί» με λεπτομέρεια το πρότυπο έκφρασης της Virp1 αλλά και αφετέρου να διαλευκανθεί η λειτουργική σημασία της Virp1 σε μη προσβεβλημένο κύτταρο αλλά και σε κύτταρο κατά την διάρκεια της μόλυνσης.

Το πρώτο ερώτημα που έπρεπε να απαντηθεί ήταν η γνωμική οργάνωση της κωδικής περιοχής της Virp1. Για τον σκοπό αυτό μια σειρά από συνδυασμούς εκκινητών σχεδιάστηκαν για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) -σε γενωμικό DNA από τομάτα- που καλύπτουν το σύνολο της μεταγράψιμης περιοχής της Virp1 (συμπεριλαμβανομένων της 5' και 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής) για την οποία υπήρχε γνώση αλληλουχίας (Martinez de alba et al., 2003). Η ύπαρξη μιας ζώνης υποδηλώνει την ύπαρξη μιας κόπιας της Virp1 στο γένωμα της τομάτας ενώ περισσότερων την ύπαρξη στενά συγγενικών γονιδίων. Η ύπαρξη ζώνης με μεγαλύτερο μέγεθος από το αναμενόμενο με βάση την cDNA αλληλουχία υποδηλώνει την ύπαρξη ιντρονίου στην αντίστοιχη περιοχή. Η διάταξη των εκκινητών περιγράφεται στο σχήμα 1 ενώ για την αλληλουχία τους ο αναγνώστης πρέπει να ανατρέξει στην αντίστοιχη ενότητα των Υλικών και Μεθόδων .

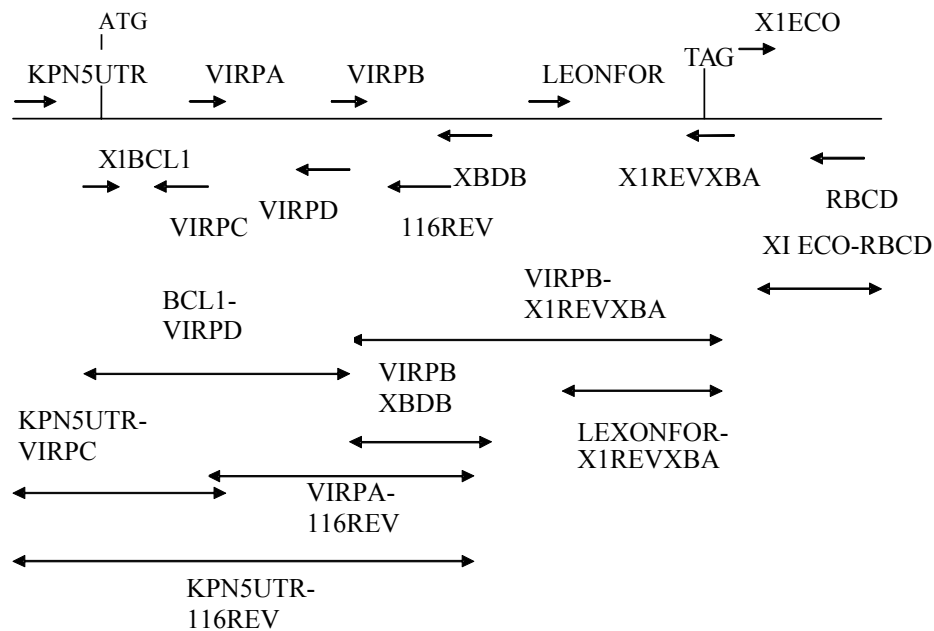
Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 95 °C για 5 λεπτά ακολουθούμενη από 35 κύκλους 95 °C για 1 λεπτό, χ °C για 1 λεπτό και 72 °C για 2 λεπτά και ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά <sup>9</sup> όπου χ η θερμοκρασία του annealing η οποία για το κάθε ζεύγος εκκινητών περιγράφεται στον πίνακα 1.

<sup>9</sup> Οι ακόλουθες τροποποιήσεις χρησιμοποιήθηκαν για τα ζεύγη των εκκινητών LEXONFOR-X1REXBA (45 δευτερόλεπτα αποδιάταξη, 45 δευτερόλεπτα annealing, 45 δευτερόλεπτα επιμήκυνση) KPN5UTR-VIRPC (επιμήκυνση 1:15 λεπτά) ενώ ο χρόνος επιμήκυνσης για τα όλα τα ζεύγη και ιδιαίτερα τα X1ECO-RBCD, VIRPB-XBDB, X1BCL1-VIRPD μπορεί να ελαττωθεί χωρίς αξιοσημείωτη αλλαγή στο πρότυπο που προκύπτει.

<b>ΖΕΥΓΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ</b>	<b>°C</b>
<b>LEXONFOR-X1REVXBA</b>	62 °C
<b>XIECO-RBCD</b>	56 °C
<b>VIRPB-XIREVXBA</b>	60 °C
<b>VIRPB-XBDB</b>	60 °C
<b>VIRPA-116REV</b>	61 °C
<b>XIBCL1-VIRPD</b>	60 °C
<b>KPN5UTR-VIRPC</b>	61 °C
<b>KPN5UTR-116REV</b>	61 °C

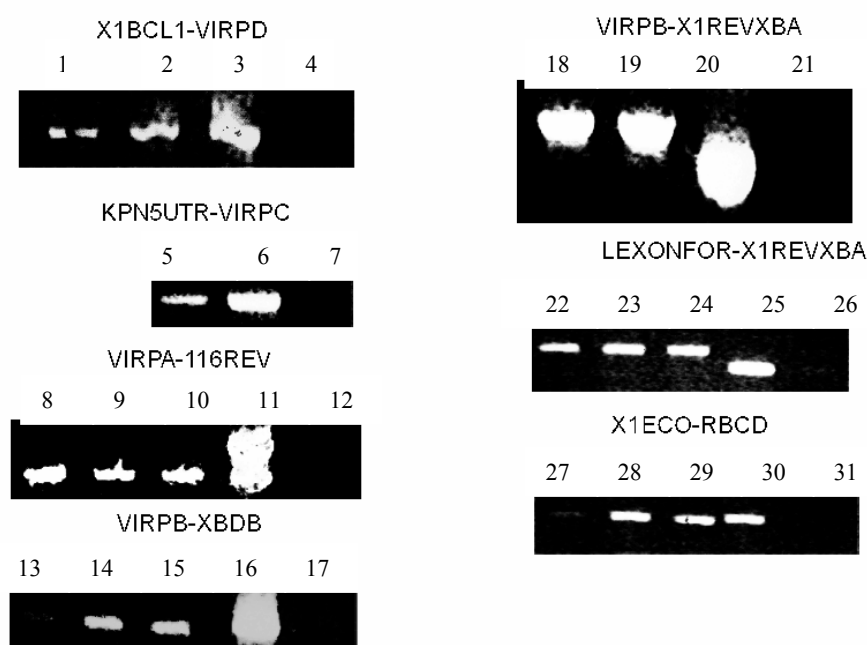
Πίνακας 2. Ζεύγη εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν και οι βέλτιστες τιμές annealing για το κάθε ζεύγος.

Ένα εύρος θερμοκρασιών εκατέρωθεν της βέλτιστης χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η πιστότητα των αποτελεσμάτων σε λιγότερο και περισσότερο αυστηρές συνθήκες. Ο χρόνος επιμήκυνσης είναι ελαστικός. Γενικά το εύρος και η ελαστικότητα των συνθηκών επιτρέπει την απομόνωση και στενά συγγενικών γονιδίων στην περίπτωση που υπάρχουν.



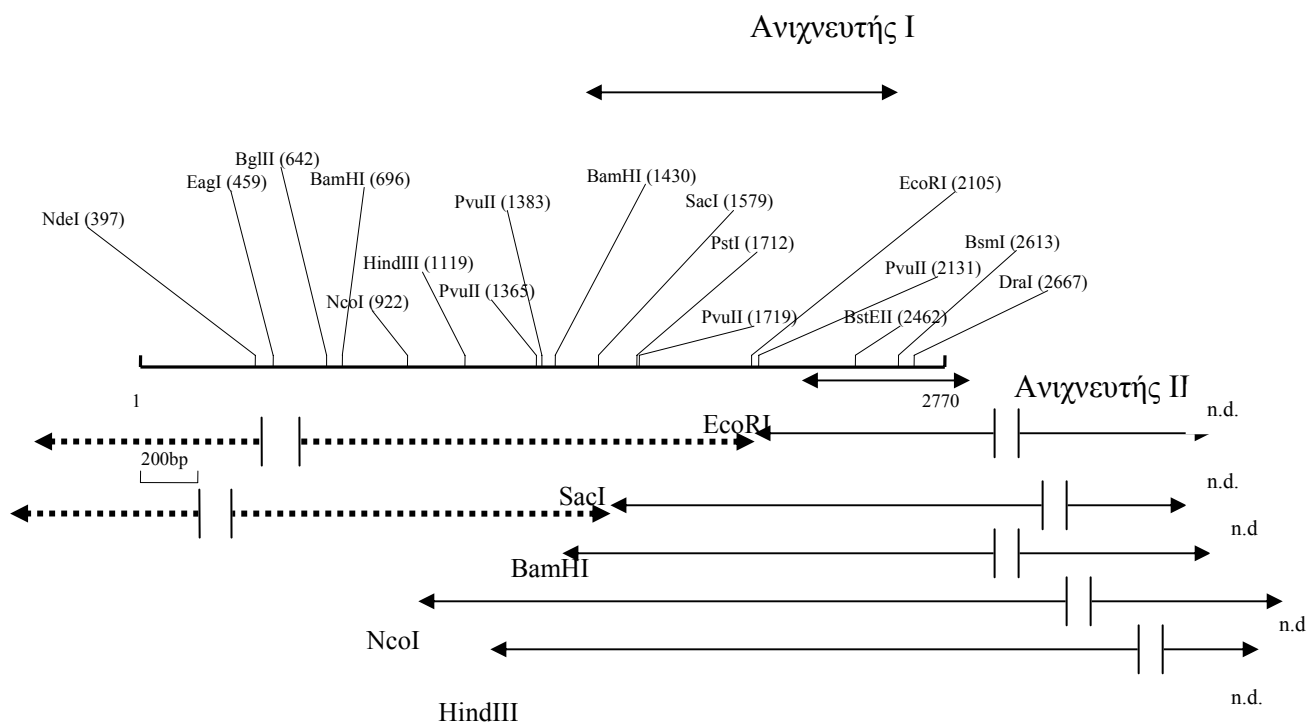
Σχήμα2. Σχετική θέση εκκινήτων και αναμενόμενα μεγέθη από PCR.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η γενωμική κόπια της *Virp1* περιλαμβάνει δυο μικρά ιντρόνια. Το πρότυπο του ζεύγους LEXONFOR-X1REVXBA υποδηλώνει την ύπαρξη ενός τουλάχιστον μικρού ιντρονίου στην περιοχή που περικλείεται από τους δυο εκκινητές ενώ από την σύγκριση των προτύπων των ζευγών VIRPB-XIREVXBA και VIRPB-XBDB (σε συνδυασμό και με τα αποτελέσματα του ζεύγους LEXONFOR-X1REVXBA) αποδεικνύεται η ύπαρξη ενός τουλάχιστον ακόμα ιντρονίου στην περιοχή ανάμεσα στους εκκινητές XBDB και LEXONFOR.



**Εικόνα 1.** PCR σε γενωμικό DNA από τομάτα. Lanes 1-4: PCR με εκκινητές X1BCL1-Virpd (Lane 1: *L. ensulentum* genomic DNA/58 °C, Lane 2: *L. ensulentum* genomic DNA/60 °C, Lane 3: X1C18 θετικός μάρτυρας/60 °C, Lane 4: αρνητικός μάρτυρας/60 °C). Lanes 5-7: PCR με εκκινητές Kpn5utr-Virpc (Lane 5: *L. ensulentum* genomic DNA/60 °C, Lane 6: X1C18 θετικός μάρτυρας/60 °C, Lane 7: αρνητικός μάρτυρας/60 °C). Lanes 8-12: PCR με εκκινητές Virpa-116rev (Lane 8: *L. ensulentum* genomic DNA/56 °C, Lane 9: *L. ensulentum* genomic DNA/58 °C, Lane 10: *L. ensulentum* genomic DNA/60 °C, Lane 11: X1C18 θετικός μάρτυρας/60 °C, Lane 12: αρνητικός μάρτυρας/60 °C). Lanes 13-17: PCR με εκκινητές Virpb-Xbdb (Lane 13: *L. ensulentum* genomic DNA/56 °C, Lane 14: *L. ensulentum* genomic DNA/58 °C, Lane 15: *L. ensulentum* genomic DNA/60 °C, Lane 16: X1C18 θετικός μάρτυρας/60 °C, Lane 17: αρνητικός μάρτυρας/60 °C). Lanes 18-21: PCR με εκκινητές Virpb-X1revXba (Lane 18: *L. ensulentum* genomic DNA/58 °C, Lane 19: *L. ensulentum* genomic DNA/60 °C, Lane 20: X1C18 θετικός μάρτυρας/60 °C, Lane 21: αρνητικός μάρτυρας/60 °C). Lanes 22-26: PCR με εκκινητές Lexonfor-X1revXba (Lane 22: *L. ensulentum* genomic DNA/56 °C, Lane 23: *L. ensulentum* genomic DNA/58 °C, Lane 24: *L. ensulentum* genomic DNA/60 °C, Lane 25: X1C18 θετικός μάρτυρας/60 °C, Lane 26: αρνητικός μάρτυρας/60 °C). Lanes 27-31: PCR με εκκινητές X1Eco-RABCD (Lane 27: *L. ensulentum* genomic DNA/56 °C, Lane 28: *L. ensulentum* genomic DNA/58 °C, Lane 29: *L. ensulentum* genomic DNA/60 °C, Lane 30: X1C18 θετικός μάρτυρας/60 °C, Lane 31: αρνητικός μάρτυρας/60 °C).

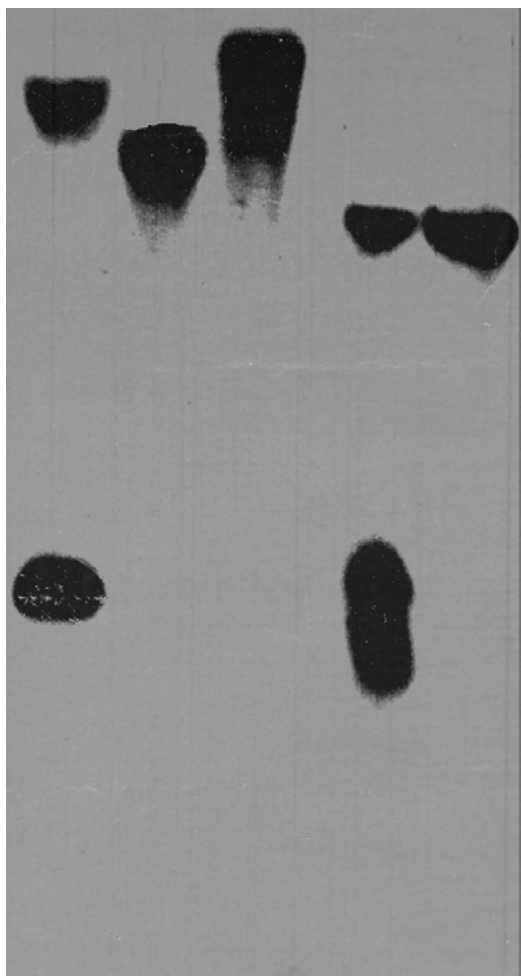
**Ανάλυση κατά Southern.** Για την αποσαφήνιση του αριθμού των κοπιών της πρωτεΐνης Virp1 καθώς και την πιθανή ύπαρξη στενά συγγενικών γονιδίων στο γένωμα της τομάτας ανάλυση κατά Southern πραγματοποιήθηκε σε DNA από φύλλα ντομάτας. Γενωμικό DNA κατατμήθηκε με τα ένζυμα BamHI, NcoI, SacI, EcoRI, HindIII, αποτυπώθηκε σε μεμβράνη (όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη ενότητα των υλικών και μεθόδων) και υβριδοποιήθηκε με τους ανιχνευτές (probes): Ανιχνευτή I (νουκλεοτίδια 1430-2374 της αλληλουχίας AJ249595) και Ανιχνευτή II (2105-2739 της AJ249595). Με τον Ανιχνευτή I, αναμένονται δυο μπάντες μετα από πέψη με SacI και EcoRI ενώ μια ζώνη στις περιπτώσεις πέψης με BamHI, NcoI, HindIII στην περίπτωση που έχουμε μια κοπιά στο γένωμα της τομάτας. Αντίθετα με τον ανιχνευτή II στην περίπτωση μη ύπαρξης συγγενικού γονιδίου αναμένονται σε όλες της περιπτώσεις μια ζώνη (δες και σχήμα). Τα ακριβή μεγέθη των μπάντων δεν μπορούν να προβλεφθούν διότι δεν υπάρχει γνώση αλληλουχίας της περιβάλλουσας το γονίδιο γενωμικής περιοχής.



**Σχήμα 3 (προηγούμενη σελίδα). Αναμενόμενα θραύσματα κατά Southern ανάλυσης. Με διακεκομμένες γραμμές εμφανίζονται οι μπάντες που ανιχνεύονται μόνο με την χρήση του Ανιχνευτή I.**

Παρακάτω παρατίθεται μια αντιπροσωπευτική αυτοραδιογραφία με την χρήση του Ανιχνευτή I.

S	N	B	E	H
a	c	a	c	i
c	o	m	o	n
I	I	H	R	d
		I	I	III



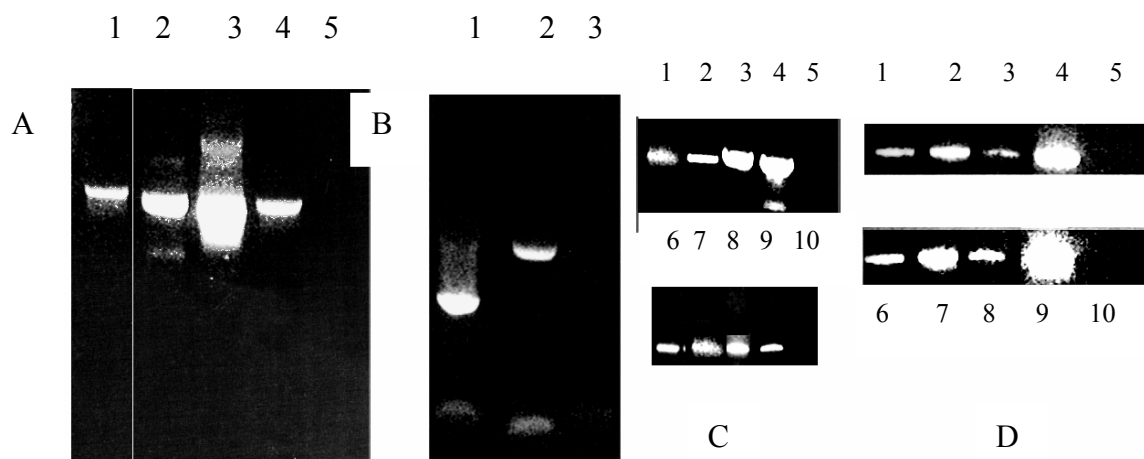
**Εικόνα 2. Southern σε γενωμικό DNA από τομάτα με την χρήση του Ανιχνευτή I.**

Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με την ύπαρξη μιας κóπιας της Virp1 στο γένωμα της τομάτας. Παράλληλα με τα παραπάνω παρόμοια αποτελέσματα έχουν εξαχθεί και με την χρήση και άλλων συνδυασμών περιοριστικών ενζύμων (π.χ. BgIII, data non shown). Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου (Martinez de Alba et al., 2003), όπου

ξεκάθαρα φαίνεται η μονογονιδιακή υπόσταση της *Virp1* στο γένωμα της τομάτας. Η ύπαρξη σε μια μόνο από τις τέσσερις πέψεις στην περίπτωση των Martinez de Alba et al. (2003) μιας επιπλέον (πολύ αχνότερης) ζώνης δεν ανατρέπει την υπόθεση. Στην τελευταία περίπτωση η αχνότερη ζώνη πιθανόν είναι προϊόν μερικής πέψης διότι σε αντίθεση με την αυστηρότητα των συνθηκών στην περίπτωση της παρούσας εργασίας (υβριδοποίηση στους 65 °C, εκτεταμένα πλυσίματα, δεξ υλικά και μέθοδοι), οι Martinez de Alba και συνεργάτες χρησιμοποίησαν μη αυστηρές συνθήκες υβριδοποίησης (50 °C). Η φύση της αλληλουχίας του ανιχνευτή (σημασμένο RNA μετάγραφο στην περίπτωση των Martinez de Alba et al σε αντίθεση με σημασμένο DNA ανιχνευτή στην περίπτωση της παρούσας εργασίας) ίσως έχει επίδραση δεδομένου ότι υπήρχαν επανελλημένες αναφορές για ύπαρξη παραπροϊόντων μετά την χρήση ανιχνευτών RNA σε πειράματα υβριδοποίησης (Tzortzakaki et al., unpublished results). Φυσικά δεν αποκλείονται η ύπαρξη μελών της οικογενείας τις *Virp1* με πολύ χαμηλότερη ομολογία (< 60 %) όπως εικάζεται από την ανάλυση δεδομένων ESTs στις βάσεις δεδομένων (Genebank, SGN). Εξάλλου, τα ομόλογα στην *Arabidopsis* είναι μέλη μεγάλων γονιδιακών οικογενειών με **περιορισμένη** ομολογία μεταξύ τους εκτός από διάσπαρτα ισχυρά συντηρημένα μοτίβα (Karandemiris, personal observations, δεξ και παρούσα εργασία). Φυσικά σε είδη *Nicotiana* και στο *Solanum tuberosum* με RT-PCR έχουν ανιχνευτεί δυο μετάγραφα σε κάθε περίπτωση (Denti et al., unpublished results), η ανάλυση των οποίων με αλληλούχηση απέδειξε την ύπαρξη στις περιπτώσεις αυτές δυο στενά συγγενικών γονιδίων, αλλά η λειτουργική αξία της ιδιαιτερότητας αυτής δεν είναι γνωστή. Ίσως εξέταση της πιθανής λειτουργικής εξειδίκευσης των μεταγράφων αυτών στο *Solanum tuberosum* (φυσικός ξενιστής του PSTVd) και των διαφορών τους αναφορικά με τις RNA-binding ιδιότητες τους θα βοηθούσε στην διαλεύκανση του ζητήματος.

**Αποσαφήνιση προτύπου έκφρασης *Virp1*.** Η αδυναμία του ίοειδούς να προσβάλλει φύλλα τομάτας στην περίπτωση που το φύλλο είναι αρωγός κατά την έναρξη της μόλυνσης (Zhou et al., 2002) ενώ προσβεβλημένα φύλλα αρωγοί είναι δυνατόν να υπάρξουν μόνο αν η μόλυνση είχε ξεκινήσει όταν ακόμα ήταν αποδέκτες, επιβάλλει την ανάγκη να μελετηθεί εκτενέστερα το πρότυπο έκφρασης της *Virp1*. Με δεδομένο ότι τα επίπεδα της *Virp1* ελαττώνονται κατά την μόλυνση από το ίοειδές (Martinez de Alba, Ph.D thesis, Kalantidis, personal communication) αλλά δεν έχει

παρατηρηθεί η ύπαρξη εναλλακτικών μεταγράφων, νεαρά και μη φύλλα τομάτας και πληθυσμοί RNA από φύλλα κατά την διάρκεια της μόλυνσης ελέγχθηκαν για το πρότυπο της έκφρασης της *Virp1* με αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής (με στόχο να κλωνοποιηθούν -αν υπάρχουν- αντίστοιχα εναλλακτικά μετάγραφα).



Εικόνα 3. RT PCR ανάλυση σε φύλλα, πέταλα και σέπαλα *L. ensulentum cv Rentita*. Στην περίπτωση των πετάλων, η αναμενόμενη ζώνη είναι εμφανής αλλά δεν μπορεί να αποτυπωθεί επειδή είναι λίγο πιο αχνή (πιθανώς λόγω μη βέλτιστης ποσότητας RNA που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την περίπτωση). Σε όλες της αντιδράσεις για το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής X1revXba. Lane A1: Υγιή φύλλα με εκκινητές X1BCL1-116rev/59 °C, Lane A2: Υγιή φύλλα με εκκινητές X1BCL1-116rev/63 °C, Lane A3: X1C18 θετικός μάρτυρας/63 °C, Lane A4: Υγιή φύλλα με εκκινητές X1BCL1-116rev/61 °C, Lane A5: αρνητικός μάρτυρας/63 °C. Η μη αναμενόμενη ζώνη 600 bp χρησιμοποιήθηκε εκ νέου για αντίδραση PCR. Lane B1: 600 bp ζώνη με εκκινητές X1BCL1-116rev/63 °C, Lane B2: X1C18 θετικός μάρτυρας/63 °C, Lane B3: αρνητικός μάρτυρας/63 °C. Η ζώνη αυτή κλωνοποιήθηκε και αποδείχθηκε με αλληλούχηση ότι ήταν τμήμα ριβοσωμικού DNA. Lanes C1-C5: RT-PCR με εκκινητές Kpn5utr-116rev (Lane C1: Υγιή πέταλα με εκκινητές Kpn5utr-116rev /58 °C, Lane C2: Υγιή σέπαλα με εκκινητές Kpn5utr-116rev /58 °C, Lane C3: Υγιή φύλλα με εκκινητές Kpn5utr-116rev /58 °C, Lane C4: X1C18 θετικός μάρτυρας/58 °C, Lane C5: αρνητικός μάρτυρας/58 °C.). Lanes C6-C10: RT-PCR με εκκινητές Kpn5utr-Virpc (Lane C6: Υγιή φύλλα με εκκινητές Kpn5utr- Virpc /60 °C, Lane C7: Υγιή πέταλα με εκκινητές Kpn5utr- Virpc /60 °C, Lane C8: Υγιή σέπαλα με εκκινητές Kpn5utr- Virpc/60 °C, Lane C9: X1C18 θετικός μάρτυρας/60 °C, Lane C10: αρνητικός μάρτυρας/60 °C.). Lanes D1-D5: RT-PCR με εκκινητές Kpn5utr-116rev (Lane D1: Μολυσμένα με ιοειδές πέταλα με εκκινητές Kpn5utr-116rev/58 °C, Lane D2: Μολυσμένα με ιοειδές σέπαλα με εκκινητές Kpn5utr-116rev/58 °C, Lane D3: Μολυσμένα με ιοειδές φύλλα με εκκινητές Kpn5utr-116rev/58 °C, Lane D4: X1C18 θετικός μάρτυρας/58 °C, Lane D5: αρνητικός μάρτυρας/58 °C). Lanes D6-D10: RT-PCR με εκκινητές Kpn5utr-Virpc (Lane D6: Μολυσμένα με ιοειδές φύλλα με εκκινητές Kpn5utr- Virpc/60 °C, Lane D7: Μολυσμένα με ιοειδές πέταλα με εκκινητές Kpn5utr- Virpc/60 °C, Lane D8: Μολυσμένα με ιοειδές σέπαλα με εκκινητές Kpn5utr- Virpc/60 °C, Lane D9: X1C18 θετικός μάρτυρας/60 °C, Lane D10: αρνητικός μάρτυρας/60 °C.).

Οι συνθήκες PCR για τα RT-PCR περιγράφονται παρακάτω:

*X1BCL1-116rev*. Μετά από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης στους 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 61 °C για 45 δευτερόλεπτα και 72 °C για 1 λεπτό, ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά.

***Kpn5UTR- 116rev.*** Μετά από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης στους 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 58 °C για 1 λεπτό και 72 °C για 1:30 λεπτά, ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά.

***Kpn5UTR-Virpc.*** Μετά από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης στους 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 60 °C για 1 λεπτό και 72 °C για 1:30 λεπτά, ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά.

Οι PCR αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στις συνθήκες που περιγράφονται εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά στο κείμενο. Σε περιπτώσεις που ελέγχθηκαν ποικιλία συνθηκών, οι συνθήκες αυτές αντιπροσωπεύουν τις βέλτιστες και οι επιπλέον συνθήκες που ελέγχθηκαν αναφέρονται στο κείμενο με έμφαση στις αποκλίσεις που χρησιμοποιήθηκαν από τις βέλτιστες τιμές.

Σε νεαρά πέταλα το ιοειδές μπορεί να μολύνει αλλά υπάρχει αδυναμία μόλυνσης στα άλλα ανθικά μέρη (Zhou et al., 2002, Zhou et al., 2001). Με δεδομένο ότι το ιοειδές μπορεί να διπλασιαστεί σε όλα τα ανθικά μέρη –όπως αποδεικνύεται με την ύπαρξη της ενδεικτικής διπλασιασμού αρνητικής πολικότητας αλυσίδας σε όλα τα ανθικά μέρη μετά από 35S επαγόμενη έκφραση της θετικής (Zhou et al., 2002)- αλλά ανιχνεύεται και μεταδίδεται και μέσω του σπόρου, η αδυναμία προσβολής μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη περιορισμού στην μεταφορά του ιοειδούς ή στην απαγορευτική απουσία ενός απαραίτητου παράγοντα του ξενιστή. Οι αλλαγές στην έκφραση της *Virp1* σε διαφορετικούς ιστούς και η ύπαρξη εναλλακτικών μεταγράφων της *Virp1* με διαφορετικές φυσιολογικές ιδιότητες είναι ένας πιθανός λόγος για τα ίδια πρότυπα της απουσίας του ιοειδούς από κάποια ανθικά μέρη. Δεδομένα όμως που αποδυναμώνουν την θεωρία της ύπαρξης εναλλακτικών μεταγράφων σε πέταλα και καρπό είναι το γεγονός ότι η απουσία ή μη λειτουργικότητα της *Virp1* είναι περιοριστικός παράγοντας για τον διπλασιασμό του ιοειδούς, ενώ ο μηχανισμός είναι άθικτος στα ανθικά μέρη (δες παραπάνω), η ύπαρξη της *Virp1* σε όλα τα ανθικά μέρη (παρούσα εργασία, Tzortzakaki and Tsagris, unpublished results) αλλά η απουσία εναλλακτικών μεταγράφων (παρούσα εργασία) αλλά και το γεγονός ότι και σε μετέπειτα αναπτυξιακό στάδιο που πιστοποιημένα υπάρχει ιοειδές (καρπός) πάλι δεν μεταβάλλονται τα επίπεδα έκφρασης της *Virp1* ούτε ανιχνεύονται εναλλακτικά μετάγραφα (Tzortzakaki and Tsagris, unpublished results).

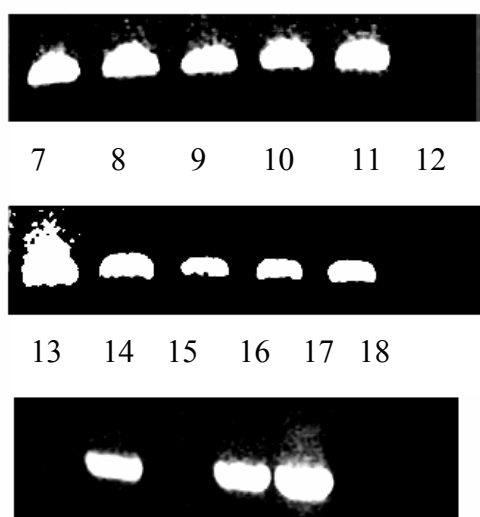
Η επιλογή ενός εκκινητή που στοχεύει στον κλώνο 19 –μικρό ποσοστό συντήρησης αλληλουχίας στην περιοχή του μερικού κλώνου 19 και σε άλλα μέλη της



πολυγονιδιακής οικογένειας της Virp1 (Karandemiris, personal observation)- και με εκκινητές που στοχεύουν το πολύ πιο συντηρημένο τμήμα του 5'-end του γονιδίου και η ύπαρξη των αναμενόμενων μπαντών στις αντιδράσεις PCR αποδεικνύει ότι η το 5'-end που απουσίαζε από την ελάχιστη περιοχή με RNA-binding ιδιότητες (μερικός κλώνος 19) και ο κλώνος 19 ανήκουν στην ίδια μεταγραφική μονάδα, η οποία σε όλες τις περιπτώσεις είναι ταυτόσημη με την δημοσιευμένη αλληλουχία (AJ249595, Martinez de alba,2003). Αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί η ύπαρξη εναλλακτικών μεταγράφων ή ακόμα και δεύτερου μη συγγενικού γονιδίου, τέτοιο γεγονός δεν προκύπτει από την ανάλυση των αποτελεσμάτων σε φύλλα, σέπαλα και πέταλα ανεξάρτητα από το αναπτυξιακό τους στάδιο ή/και την μόλυνση ή όχι από ιοειδές. Παρόμοια συμπεράσματα εξάγονται από την ανάλυση υγιών και μολυσμένων ριζών και καρπών αλλά και με μελέτη διαφορετικών ποικιλιών (Tzortzakaki and Tsagris, unpublished results). Η αδυναμία εύρεσης δεύτερου μεταγράφου και σε αυτές τις περιπτώσεις αν και δεν αποδυναμώνει την πεποίθηση της ύπαρξης εναλλακτικών μεταγράφων, υποδηλώνει ότι ακόμα και αν αυτά υπάρχουν απαντώνται είτε σε εξαιρετικά μικρές ποσότητες, γεγονός που καθιστά αμφίβολη την συμμετοχή τους στον βιολογικό κύκλο του ιοειδούς, είτε σε αναπτυξιακά στάδια και ιστούς που ελάχιστη συνεισφορά έχουν στην εξακρίβωση του μηχανισμού παθογένειας του ιοειδούς. Η παρατήρηση της απομόνωσης με RT προϊόντος που περιέχει τα ιντρόνια της Virp1 (Tzortzakaki and Tsagris, unpublished results) δεν επιβεβαιώνεται στην παρούσα μελέτη. Με δεδομένο ότι στα RNA δείγματα από τα οποία έγινε η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής είναι δυνατός επιπλέον ο πολλαπλασιασμός με PCR ενός τμήματος του intergenic spacer των rRNA γονιδίων (Karandemiris and Tsagris, unpublished results) που φυσιολογικά δεν μεταγράφεται και η χρήση με βρωμιούχο αιθίδιο αποδεικνύει την ύπαρξη contamination από γενωμικό DNA στα RNA δείγματα το οποίο οφείλεται για την ύπαρξη της ζώνης αυτής. Το γεγονός ότι η περιστασιακή ύπαρξη μπαντών διαφορετικού από το αναμενόμενο μέγεθος ποτέ δεν επιβεβαιώνεται ακόμα και στα ίδια δείγματα ή/και στις ίδιες συνθήκες υποδηλώνει ότι η περιστασιακή εμφάνιση αυτών ίσως είναι αποτέλεσμα cross-hybridization ή και προϊόντα αποικοδόμησης από τους επανελεειμένους κύκλους ψύξης/απόψυξης ή κατά την διάρκεια της απομόνωσης αν και δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο να έχουν κάποια βιολογική σημασία. Η πιθανότητα ύπαρξης μεταγράφου Virp1 που δεν περιλαμβάνει το “bromodomain” όπως εικάζεται από την ύπαρξη αντίστοιχου EST στις βάσεις δεδομένων δεν επιβεβαιώνεται στην παρούσα μελέτη γεγονός που

οφείλεται στο ότι τα δεδομένα της βάσης δεν είχαν υποστεί την χρονική εκείνη στιγμή πρωτόλεια επεξεργασία για την αποφυγή artifacts. Παρομοίως ESTs που εντοπίστηκαν στις βάσεις δεδομένων και παρουσίαζαν αποκλίσεις από την δημοσιευμένη αλληλουχία (AJ249595) κατά την διάρκεια της παρούσας διατριβής απομακρύνθηκαν στην συνέχεια από τις βάσεις δεδομένων ως χμιαϊκοί κλώνοι. Όλα τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν υπέρ του γεγονότος ότι η βασική μεταγραφική μονάδα και πιθανός η βιολογικά ενεργή περιλαμβάνεται στην δημοσιευμένη αλληλουχία.

Εκτός από την πιθανή αναπτυξιακή ρύθμιση της *Virp1*, μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης της και η πιθανή ύπαρξη εναλλακτικών μεταγράφων σε cDNA από την βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του κλώνου (βιβλιοθήκη από μολυσμένα φύλλα τομάτας με ιοειδές, Sagesser et al., 1997).



**Εικόνα 4.** PCR σε ολικό πλασμιδιακό DNA από cDNA βιβλιοθήκη *L. ensulentum cv Rentita* από μολυσμένα από ιοειδές φύλλα. Lanes 1-6: PCR με εκκινητές X1BC11-*Virpc* (Lane 1: DNA από βιβλιοθήκη, αραιώση 1:1, Lane 2: DNA από βιβλιοθήκη, αραιώση 1:5, Lane 3: DNA από βιβλιοθήκη, αραιώση 1:25, Lane 4: DNA από βιβλιοθήκη, αραιώση 1:100, Lane 5: X1C18 θετικός μάρτυρας, Lane 6: αρνητικός μάρτυρας). Lanes 7-12: PCR με εκκινητές *Lexonfor-X1revXba* (Lane 7: DNA από βιβλιοθήκη, αραιώση 1:1, Lane 8: DNA από βιβλιοθήκη, αραιώση 1:5, Lane 9: DNA από βιβλιοθήκη, αραιώση 1:25, Lane 10: DNA από βιβλιοθήκη, αραιώση 1:100, Lane 11: X1C18 θετικός μάρτυρας, Lane 12: αρνητικός μάρτυρας). Lanes 13-18: PCR με εκκινητές *Kpn5UTR-*Virpc** (Lane 13: DNA από βιβλιοθήκη, αραιώση 1:1, Lane 14: DNA από βιβλιοθήκη, αραιώση 1:5, Lane 15: DNA από βιβλιοθήκη, αραιώση 1:25, Lane 16: DNA από βιβλιοθήκη, αραιώση 1:100, Lane 17: X1C18 θετικός μάρτυρας, Lane 18: αρνητικός μάρτυρας).

Οι συνθήκες PCR για τα PCR που περιγράφονται σε αυτή την ενότητα αναφέρονται παρακάτω:

***X1BCL1-Virpc.*** Μετά από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης στους 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 62 °C για 1 λεπτό και 72 °C για 1 λεπτό, ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά.

***Kpn5UTR-Virpc.*** Μετά από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης στους 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 60 °C για 1 λεπτό και 72 °C για 1 λεπτό, ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά.

***Lexonfor-XIrevXba.*** Μετά από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης στους 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 64 °C για 1 λεπτό και 72 °C για 1 λεπτό, ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά.

### **Κατασκευές για την ανίχνευση αλληλεπιδρώντων με την Virp1 πρωτεϊνών με την μέθοδο του two-hybrid.**

Η πρόσφατη αποσαφήνιση του λειτουργικού ρόλου της Virp1 στον κύκλο ζωής του ιοειδούς (Kalantidis et al., unpublished results) και του ενδοκυτταρικού ρόλου της Virp1 απουσία ιοειδικής μόλυνσης (Karandemiris and Tsagris, unpublished results) καθιστά ελκυστική την ανάγκη εύρεσης αλληλεπιδρώντων με την Virp1 πρωτεϊνών. Αν και υπάρχουν υποψήφιες πρωτεΐνες baits ίσως η πιο σωστή στρατηγική στην περίπτωση αυτή θα ήταν η σάρωση two-hybrid βιβλιοθηκών.

Για τον σκοπό αυτό στα πλαίσια της παρούσας εργασίας δημιουργήθηκαν **τρεις κατασκευές** σε φορέα pAS2-1 (Invitrogen) σαν μεταφραστικά fusions (στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο) στο καρβοξυτελικό άκρο της DNA binding domain του GAL4 (για τις λεπτομέρειες δεξ υλικά και μέθοδοι). Η πρώτη περιλαμβάνει το σύνολο της κωδικής περιοχής της Virp1 (AJ249595 225-2030 nt) κλωνοποιημένη στο καρβοξυτελικό άκρο της DNA binding domain του GAL4. Η δεύτερη περιλαμβάνει το καρβοξυτελικό άκρο της Virp1 (AJ249595 922-2030 nt) το οποίο περιλαμβάνει το RNA-binding μοτίβο της Virp1 (Denti et al., unpublished results) και το 3' άκρο της κωδικής περιοχής αλλά όχι το bromodomain κλωνοποιημένη στο καρβοξυτελικό άκρο της DNA binding domain του GAL4. Η πραγματοποίηση της τρίτης κατασκευής (η οποία περιλαμβάνει το τμήμα ανάμεσα στα nt 225-1300) δεν κατέστη δυνατή πιθανόν λόγω της αδυναμίας σταθεροποίησης σε E. coli δυο περιοχών με DNA-binding ιδιότητες στο ίδιο μεταφραστικό σύμπλοκο (DNA binding domain του GAL4 και bromodomain).

Για την πραγματοποίηση των κατασκευών αυτών απαιτήθηκε ένα βήμα υποκλωνοποίησης καθεμίας εκ των τριών περιοχών της *Virp1* που περιγράφονται παραπάνω σε pT3T7 από όπου με τις περιοριστικές πέψεις που περιγράφονται στα υλικά και μέθοδοι αποσχίστηκαν και εντέθηκαν στον pAS2-1. Οι τελευταίες κατασκευές (στον pT3T7) επιπλέον χρησιμοποιούνται για την παραγωγή *in vitro* σημασμένων RNA μεταγράφων για τις αντίστοιχες περιοχές της πρωτεΐνης.

#### **Υποκλωνοποίηση τμημάτων πρωτεΐνης *Virp1* σε πλασμιδιακούς φορείς για την δημιουργία *in vitro* μεταγράφων.**

Μια σειρά από κατασκευές δημιουργήθηκαν που περιλαμβάνουν τμήματα της *Virp1* (20-500 bp) και οι λεπτομέρειες της κατασκευής τους περιγράφονται στην αντίστοιχη ενότητα των υλικών και μεθόδων. Σε περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, οι συνθήκες παρατίθενται παρακάτω.

**PCR με εκκινητές *Virpb- Xbdb*.** Μετά από μια αρχική αποδιάταξη 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι στις συνθήκες: 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 62 °C για 45 δευτερόλεπτα και 72 °C για 1 λεπτό ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά.

**PCR με εκκινητές *Virpa- Virpd*.** Μετά από μια αρχική αποδιάταξη 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι στις συνθήκες: 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 64 °C για 45 δευτερόλεπτα και 72 °C για 1 λεπτό ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά.

**PCR με εκκινητές *Lexon for- Rabcd*.** Μετά από μια αρχική αποδιάταξη 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι στις συνθήκες: 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 58 °C για 45 δευτερόλεπτα και 72 °C για 1 λεπτό ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά.

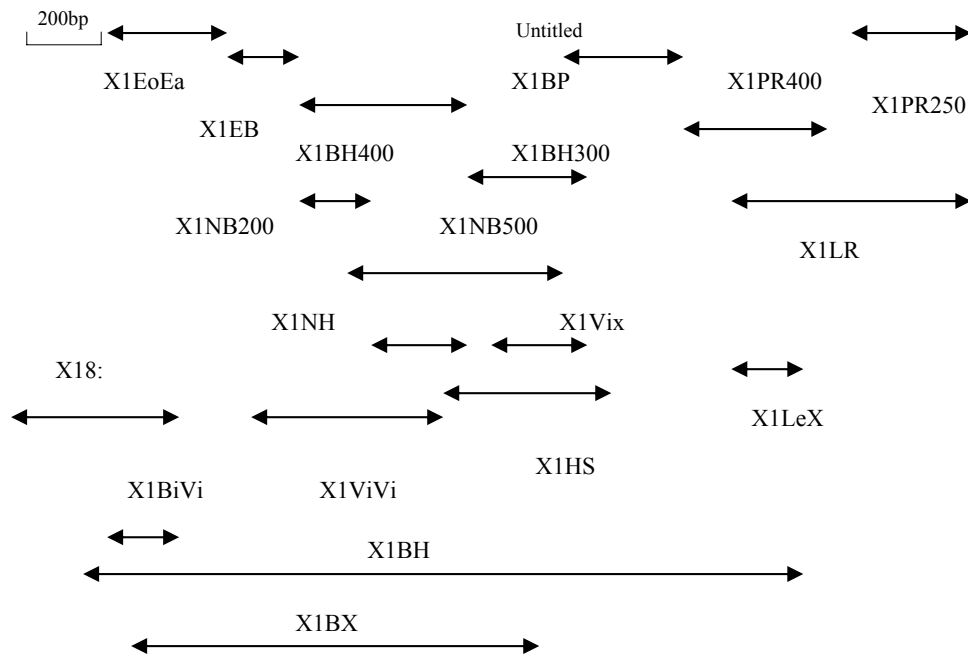
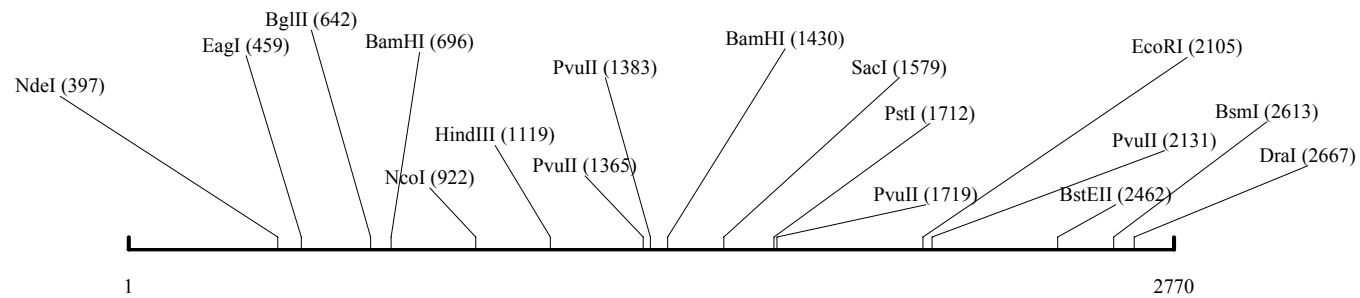
**PCR με εκκινητές *Kpn5UTR- Virpc*.** Μετά από μια αρχική αποδιάταξη 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι στις συνθήκες: 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 61 °C για 45 δευτερόλεπτα και 72 °C για 1:15 λεπτά ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά

**PCR με εκκινητές *XIBCL1- Virpc*.** Μετά από μια αρχική αποδιάταξη 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι στις συνθήκες: 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 63 °C για 45 δευτερόλεπτα και 72 °C για 1:15 λεπτά ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά

**PCR με εκκινητές Lexon for- XIrenXba.** Μετά από μια αρχική αποδιάταξη 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι στις συνθήκες: 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 64 °C για 45 δευτερόλεπτα και 72 °C για 1 λεπτό ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά

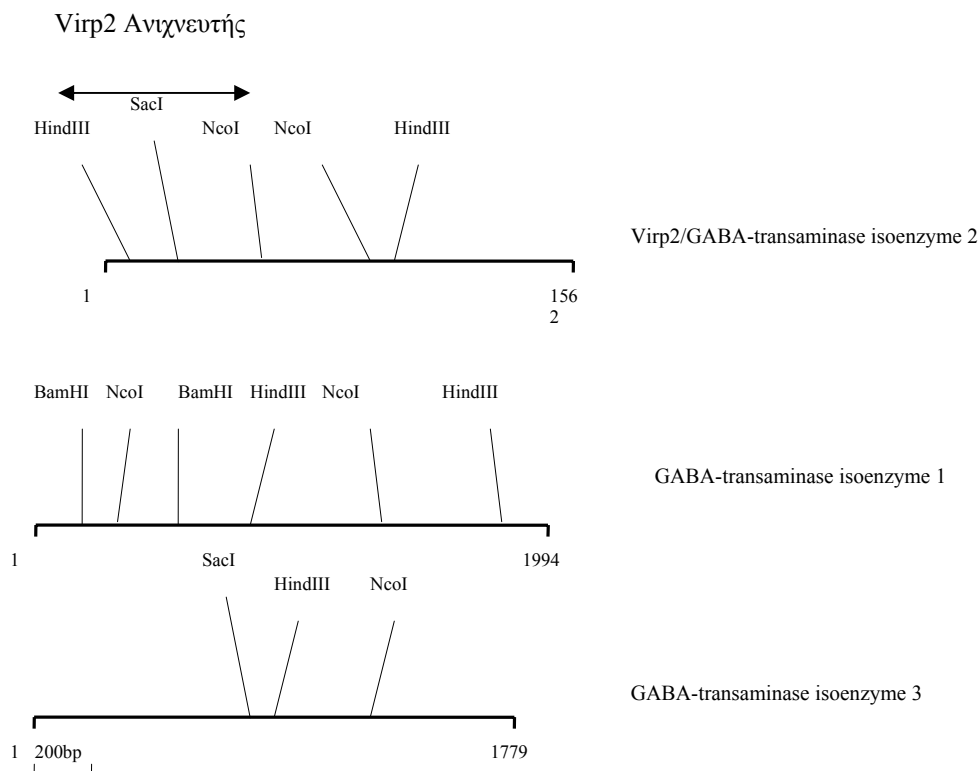
Εκτός από τις κατασκευές που περιγράφονται στο σχήμα επιτεύχθηκε και η υποκλωνοποίηση σε φορέα pGEMT-easy της αλληλουχίας του πρώτου ιντρονίου της *Virp1* με υπόστρωμα **πλασμιδιακό** DNA που φέρει το γενωμικό τμήμα της *Virp1* που αντιστοιχεί στην κωδική περιοχή και εκκινητές *Fwin1- Revin1*. Οι συνθήκες του PCR ήταν: Μετά από μια αρχική αποδιάταξη 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι στις συνθήκες: 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 61 °C για 45 δευτερόλεπτα και 72 °C για 1 λεπτό ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά. Το ιντρόνιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για ανιχνευτής σε κατά Northern αναλύσεις σε διάφορους ιστούς χωρίς ποτέ να υπάρξει θετικό σήμα.

**Σχήμα 4. Σχετική θέση κάθε υποκλωνοποιημένου τμήματος σε πλασμιδιακό φορέα σε σχέση με τον σύνολο του πλήρους μήκους cDNA κλώνου της *Virp1*.**





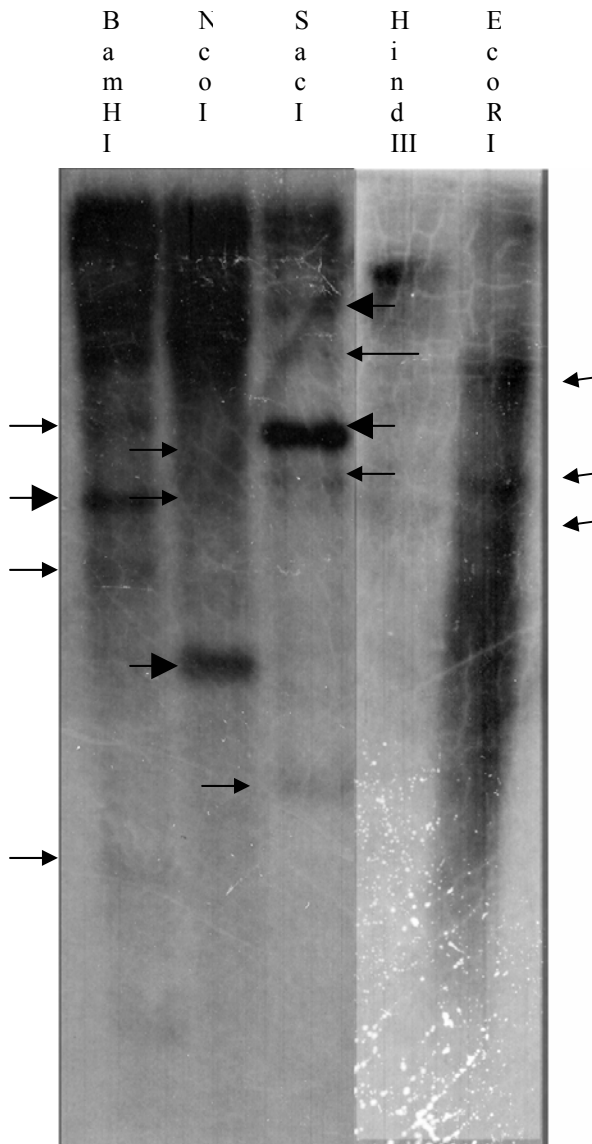
**Ανάλυση κατά Southern για Virp2.** Σύγκριση της πρωτεΐνης Virp2 με αλληλουχίες κατατεθειμένες στις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων αποκάλυψε ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι ταυτόσημη με μια υπομονάδα της τρανσαμινάσης του γ-αμινοβουτυρικού. Με βάση την υπάρχουσα πληροφορία στις γονιδιακές βάσεις δεδομένων, το γένωμα της τομάτας κωδικοποιεί για τουλάχιστον τρία ισoenζυμα του ενζύμου αυτού (με Genebank accession no. AAO92256.1, AAO92257.1, AAO92255.1) με μεταξύ τους πρωτεϊνικές ομοιότητες που κυμαίνονται από 70-80 %. Για την εξακρίβωση αν τα τρία ισoenζυμα κωδικοποιούνται από τρεις διακριτούς γονιδιακούς τόπους, ανάλυση κατά Southern πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα BamHI, SacI, HindIII, NcoI, EcoRI. Με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των τριών ισoenζύμων (AY240229, AY240230, AY240231) αναμένονται τρεις μπάντες μετά από πέψη με EcoRI, BamHI, NcoI με την χρήση του ανιχνευτή Virp2. Ανιχνευτή 1 σε περίπτωση που το καθένα ισoenζυμο κωδικοποιείται από ανεξάρτητο γενετικό τόπο (δες και σχήμα). Αντίθετα αναμένονται πέντε μπάντες στην περίπτωση των πέψεων με HindIII και SacI με την χρήση του ίδιου ανιχνευτή. Φυσικά στην περίπτωση πέψης με BamHI αναμένεται και μια τέταρτη ζώνη μεγέθους 250bp ενώ δεν μπορεί να αποκλειστεί η ανίχνευση και μιας ακόμα NcoI (~ 500 bp) η οποία όμως υβριδοποιείται με την άκρη του ανιχνευτή.





**Σχήμα 5.** Σχετικές θέσεις περιοριστικών θέσεων στην αλληλουχία των τριών ισοενζύμων. Το σχήμα έχει κατασκευαστεί υπό κλίμακα και οι περιοχές ομολογίας εμφανίζονται στοιχισμένες.

Παρακάτω παρουσιάζεται η εικόνα αυτοραδιογραφίας με την χρήση των προαναφερθέντων πέσεων και την χρήση του ανιχνευτή όπως παρουσιάζεται στο αντίστοιχο σχήμα.



**Εικόνα 5.** Southern με ανιχνευτή Virp2. Οι πιο έντονες μπάντες (σημειώνονται με έντονη αιχμή του βέλους) πιθανόν αντιστοιχούν στην Virp2 και εμφανίζονται εντονότερες λόγω 100 % ομολογίας με τον ανιχνευτή. Οι υπόλοιπες αντιστοιχούν στα άλλα δυο μέλη της οικογένειας (μικρότερο ποσοστό ομολογίας) είναι αχνότερες και εμφανίζονται με βέλος με μη έντονη και πλατυσμένη αιχμή. Η πέψη με HindIII δεν ήταν επιτυχής.

Τα δεδομένα αυτά είναι συμβατά με την ύπαρξη τουλάχιστον τριών γενετικών τόπων για την Virp2 στο γένωμα της τομάτας. Το γεγονός αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη στην περίπτωση δημιουργίας κατασκευών με ανεστραμμένα άκρα για την σίγηση της Virp2. Είναι γνωστό ότι επαγωγέας σίγησης με ομολογία 100 % με γονίδιο στόχο σε μια περιοχή 23 nt έχει την δυνατότητα να επάγει αποικοδόμηση του στόχου μέσω γονιδιακής σίγησης (στην περίπτωση που ο επαγωγέας είναι τμήμα ιικού φορέα, Thomas et al., 2001). Επιπλέον αναλογικά με την περίπτωση των miRNAs στα φυτά, δυο ή τρία mismatches είναι αποδεκτά για τον μηχανισμό της μεσολαβούμενης από RISC αποικοδόμησης (Jones- Roades et al., 2004, Roades et al., 2002). Τέλος είναι γνωστό ότι αλληλουχίες ανάστροφης επανάληψης είναι δυνατόν να επάγουν παραγωγή δευτερογενών siRNAs στους στόχους μέσω transitive silencing (Van Houdt et al, 2003). Δεν πρέπει να παραληφθεί, ότι κατά αναλογία με την κατάσταση στα ζωικά κύτταρα, ελλοτούμενου του βαθμού ομολογίας ένα siRNA μπορεί να δράσει σαν miRNA επάγοντας αναστολή της μετάφρασης του γονιδίου-στόχου (Doench et al., 2003). Τα προβλήματα αυτά είναι υπαρκτά σε περίπτωση που απαιτείται εκλεκτική σίγηση ενός μέλους μιας πολυγονιδιακής οικογένειας, τα μέλη της οποίας έχουν υψηλό βαθμό μεταξύ τους ομολογίας. Αν και στοίχιση των αλληλουχιών των τριών ισοενζύμων αποκάλυψε την ύπαρξη ισχυρών τοπικών συντηρημένων περιοχών (μεγέθους 20-25 nt στην περιοχή που επιλέχθηκε τελικά για την κατασκευή της ανάστροφης επανάληψης αλλά και εκτός) και εμφανίζεται κατά μήκος των τριών αλληλουχιών εκτεταμένος βαθμός ομολογίας (> 70 %), δεν υπάρχουν δεδομένα που να αποδεικνύουν την συμμετοχή των άλλων δυο ισοενζύμων στον κύκλο ζωής του ιοειδούς. Επομένως αν και δεν αποκλείονται παράπλευρες επιδράσεις της κατασκευής ανεστραμμένων άκρων στην σίγηση και των άλλων μελών της οικογένειας, αυτό δεν μπορεί να επηρεάσει τις μελέτες παθογένειας του ιοειδούς. Εξάλλου, η ελάχιστη απαίτηση για 23 nt ομολογία με στόχο συμβαίνει στην περίπτωση του διαγονιδίου-στόχου ενώ δεν επιβεβαιώνεται στην περίπτωση ενδογονιδίου. Για την αποφυγή τέτοιων προβλημάτων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν περιοχές γονιδίων με περιορισμένη ομολογία (π. χ. UTRs). Δυστυχώς όμως στην περίπτωση αυτή έχουμε κλώνους μερικής αλληλουχίας και στις γνωστές περιοχές αλληλουχίας δεν υπάρχουν διαφοροποιήσεις σχετικά με το ποσοστό ομολογίας επιμέρους περιοχών. Βέβαια με δεδομένο ότι δεν έχει αποκλειστεί η πιθανότητα περισσότερα του ενός ισοένζυμα να προσδένονται στο PSTVd, ίσως

ταυτόχρονη στόχευση και των τριών ισοενζύμων μέσω RNA σίγησης να ήταν απαραίτητη.

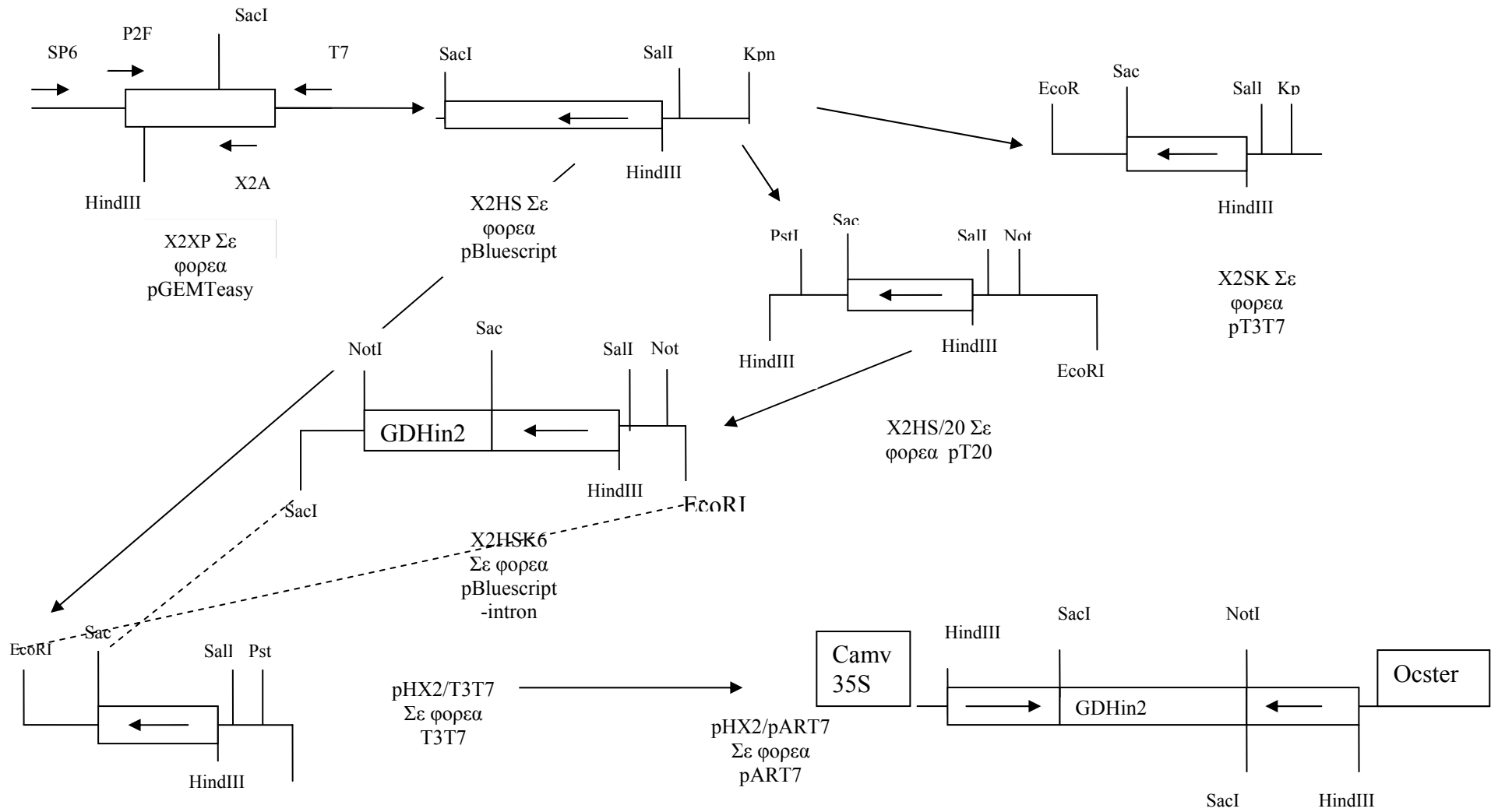
### **Κατασκευή για την καταστολή της έκφρασης της Virp2.**

Πρόσφατα αποσαφηνίστηκε ο ρόλος της Virp1 αναφορικά με την συμμετοχή της στον κύκλο ζωής του ιοειδούς (Kalantidis et al., unpublished results) ενώ διαφαίνονται ενδείξεις για την αποσαφήνιση της ενδοκυτταρικής λειτουργίας της Virp1 (Karandemiris, Kalantidis and Tsagris, unpublished results) με την χρήση γενετικά τροποποιημένων φυτών που φέρουν κατασκευή ανεστραμμένων άκρων (Σίγηση Virp1). Για την συμβολή στην αποσαφήνιση του λειτουργικού ρόλου της Virp2 σε υγιή και μολυσμένα από ιοειδές φυτά μια κατασκευή ανάστροφων άκρων δημιουργήθηκε που φέρει μια παλινδρομική επανάληψη του 350 bp 5'-άκρου της Virp2 (AY230240), κατευθυνόμενη από τον 35S υποκινητή και ακολουθούμενη από τον σινιάλο πολυαδενυλίωσης του γονιδίου *ocs*. Η κατασκευή κλωνοποιήθηκε σε δυαδικό φορέα (pART27) και μετασχηματίστηκε σε Αγροβακτήριο LBA4404 που φέρει το βοηθό πλασμίδιο pAL4404. Η διαδικασία δημιουργίας της κατασκευής απεικονίζεται στο ακόλουθο σχήμα. Το μετασχηματισμένο *Agrobacterium* χρησιμοποιήθηκε για γενετικό μετασχηματισμό φυλλικών δίσκων *N. tabacum* και *N. benthamiana*. Η διαδικασία της αναγέννησης φυλλικών δίσκων και ο χαρακτηρισμός των υποψηφίων διαγονιδιακών φυτών βρίσκεται σε εξέλιξη.

Το διαγονιδιακό αυτό φυτό θα βοηθήσει να επιβεβαιωθούν τα *in vitro* πειράματα για αλληλεπίδραση της Virp2 με το ιοειδές. Ο πιθανός της ρόλος είναι ομιχλώδης λόγω της ασθενούς αλληλεπίδρασης με το PSTVd RNA (Martinez de Alba, Ph.D Thesis). Φυσικά δεν πρέπει να παραβλεφθεί το γεγονός ότι τα αποτελέσματα στην περίπτωση αυτή είναι περισσότερο ποιοτικά διότι σε αντίθεση με την παρούσα εργασία όπου κατέστη δυνατή η υπερέκφραση της Virp2 σε κυτταρά *E. coli* (δες αντίστοιχη ενότητα), ο Martinez de Alba (Ph.D thesis) δεν ήταν σε θέση να χρησιμοποιήσει εμπλουτισμένα σε Virp2 παρασκευάσματα πρωτεΐνης στα βιοχημικά πειράματα λόγω της αδυναμίας υπερέκφρασης της Virp2 σε βακτηριακό σύστημα. Μάλιστα από την μη υποκυτταρική στόχευση της Virp2 στον πυρήνα (Bouche and Fromm, 2004) όπου λαμβάνει χώρα ο διπλασιασμός του ιοειδούς ενδιαφέροντα ερωτήματα προκύπτουν για τον ρόλο της κατά την μόλυνση με PSTVd. Εκτός από την πιθανότητα συμμετοχής της στην διακυτταρική ή συστηματική μεταφορά του

ϊοειδούς, η χρησιμοποίηση της από το PSTVd σαν κρησφύγετο για την αποφυγή της αποικοδόμησης από ενδοκυτταρικές νουκλεάσες δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Στην παρούσα κατασκευή προτιμήθηκε η χρήση ιντρονίου με ικανότητα ματίσματος τοποθετημένο σε σωστό προσανατολισμό για να ματιστεί. Η χρήση ματιζόμενου ιντρονίου έχει αποδειχθεί περισσότερο αποτελεσματικός σε κατασκευές -επαγωγείς σίγησης σε σύγκριση με την χρήση απλών διαχωριστικών τμημάτων (Smith et al., 2000), πιθανότατα λόγω υποβοήθησης της δημιουργίας του δίκλωνου κατά την φάση του ματίσματος από τις ίδιες τις μηχανιστικές λεπτομέρειες του μηχανισμού. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ίσοι βραχίονες κωδικής και αντικωδικής κόπιας αν και η ύπαρξη μη ισοσκελών βραχιόνων στο 5' άκρο είναι γενικά αποδεκτοί (με φυσικά μια μειωμένη αποτελεσματικότητα, Wesley et al., 2001). Το μέγεθος των βραχιόνων (350 nt) είναι μέσα στα αποδεκτά όρια (Wesley et al., 2001).



Σχήμα 6. (προηγούμενη σελίδα). Η πειραματική πορεία για την δημιουργία της κατασκευής ανεστραμμένων άκρων. Οι λεπτομέρειες των επιμέρους κατασκευών περιγράφονται στην αντίστοιχη ενότητα των υλικών και μεθόδων. Για την αντίδραση PCR με εκκινητές P2F- X2A οι συνθήκες ήταν: Μετά από μια αρχική αποδιάταξη 95 °C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 36 κύκλοι στις συνθήκες: 95 °C για 45 δευτερόλεπτα, 60 °C για 45 δευτερόλεπτα και 72 °C για 1 λεπτό ακολουθούμενοι από ένα τελικό στάδιο 72 °C για 5 λεπτά

Η δημιουργία κατασκευών ανεστραμμένων άκρων για την επαγωγή σίγησης σε φυτά έχει αποκτήσει ευρεία διάδοση για δημιουργία Knock-out διαγονιδιακών φυτών. Η χρήση της δεν περιορίζεται μόνο στην δημιουργία διαγονιδίων με ανθεκτικότητα σε ιικές μολύνσεις (Wang and Waterhouse,2001) οι οποίες σε συνδυασμό της τις προσπάθειες παροδικής έκφρασης δίκλωνων μορίων ειδικών για τον ιό σε συνδυασμό με την μόλυνση με τον αντίστοιχο ιό (ανασκόπηση σε Tenlando et al., 2004) τείνουν να υποκαταστήσουν τις παρωχημένες (αλλά επίσης βασιζόμενες στην γονιδιακή σίγηση- η μηχανιστική συσχέτιση δεν είχε αποκρυσταλλωθεί στην αντίστοιχη περίοδο) μεθόδους της μεσολαβούμενης από «έκφραση» ιικής πρωτεΐνης σε διαγονιδιακά φυτά (pathogen derived resistance, Baulcombe,1996). Αντίθετα εκτείνεται στην μελέτη ενδογονιδίων, έρευνα φαινοτύπων, μελέτη αναπτυξιακών μεταλλαγμάτων κ.τ.λ. και έχει υποκαταστήσει την χρησιμοποίηση αντικωδικών κατασκευών (Mol et al., 1990) για την δημιουργία Knock-out φαινοτύπων. Έτσι π.χ. με την μελέτη κατασκευών ανεστραμμένων άκρων που εκφράζονται με την βοήθεια ενός ιστοειδικού υποκινητή που εκφράζεται στο έμβρυο έγινε δυνατή η ανίχνευση φαινοτύπου για το γονίδιο της Δ12-αποσατουράσης ενώ ταυτόχρονα υποδείχθηκε ότι ακόμα και σε αυτό το πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο παρουσία επαγωγέα ο μηχανισμός της μεταμεταγραφικής σίγησης είναι ενεργός στην *Arabidopsis* (Stoutjesdijk et al., 2002). Μάλιστα με την χρήση διασταυρώσεων έγινε δυνατή η ύπαρξη στο ίδιο γενετικό υπόβαθρο περισσότερων από ενός κατασκευών ανάστροφων άκρων που στοχεύουν ενδογονιδια του ίδιου μονοπατιού και αποκαλύφθηκε η συνεργιστική τους επίδραση (Liu et al., 2002). Σε συμφωνία με άλλες μελέτες (δες εισαγωγή) που υποστήριζαν την λειτουργικότητα κατασκευών ανάστροφων άκρων στις ρίζες, έγινε δυνατή η αξιοποίηση τους για την ανίχνευση αναπτυξιακών φαινοτύπων στις ρίζες με μετασχηματισμό με *Agrobacterium rhizogeges* που στόχευε είτε διαγονιδια ή το κυριότερο ενδογονιδια (Limpens et al., 2004).

Ενώ αφθονούν πια τα παραδείγματα για χρήση κατασκευών ανεστραμμένων άκρων ειδικοί φορείς και μεθοδολογίες έχουν αναπτυχθεί για την ικανοποίηση συγκεκριμένων αναγκών. Έτσι σε αντίθεση με την χρησιμοποίηση του 35Sυποκινητή

(όπως στην παρούσα εργασία), η σίγηση μέσω του οποίου μπορεί να δημιουργήσει πλειοτροπικά αποτελέσματα ιστοειδικοί (δες παραπάνω) ή επαγόμενοι υποκινητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν (σε συνδυασμό με κατασκευές ανεστραμμένων άκρων), όπως ο επαγόμενος από χορήγηση αιθανόλης για παροδική σίγηση σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο με την χρήση ενσωματωμένων στο γένωμα κατασκευών (Chen et al., 2003). Εναλλακτικά όταν προτεραιότητα είναι ο αυστηρός έλεγχος της επαγωγής της σίγησης, η επαγόμενη (από 17β-εστραδιόλη) έκφραση Cre ρεκομπινάσης μπορεί να απαλείψει το διαχωριστικό τμήμα ανάμεσα στον υποκινητή και στην αλληλουχία ανάστροφης επανάληψης και να οδηγήσει σε επαγόμενη σίγηση διαγονιδίων ή ενδογονιδίων (Guo et al., 2003). Φυσικά σε περίπτωση που το ζητούμενο είναι η υπερέκφραση ενός διαγονιδίου, επίσης μπορεί να αξιοποιηθεί η τεχνολογία της σίγησης είτε με συν-αγροένχυση του προς υπερέκφραση διαγονιδίου με μια κατασκευή που υπερεκφράζει αναστολέα της σίγησης (Voinnet et al., 2003), είτε με διασταύρωση ενός σιγημένου διαγονιδίου με ένα διαγονίδιο που υπερεκφράζει αναστολέα σίγησης (και φυσικά μόνο όταν η υπερέκφραση αναστολέα δεν συνυπάρχει με αναπτυξιακές ανωμαλίες, Mallory et al., 2002).

Φυσικά η τεχνολογία δημιουργίας ανεστραμμένων άκρων δεν είναι η μόνη σχετιζόμενη με μεταμεταγραφική σίγηση εφαρμογή στα φυτά. Εκτός από την αξιοποίηση καθ'αυτών siRNAs (δες εισαγωγή) ή την χρήση κατασκευής ανεστραμμένων άκρων (κοινής ανεξάρτητα με τον στόχο) σε συνδυασμό με θετικής πολικότητας τμήμα του γονιδίου-στόχου για την επαγωγή σίγησης στο γονίδιο-στόχο της επιλογής μας μέσω transitive silencing (δες και εισαγωγή), μια ενδιαφέρουσα εφαρμογή στηρίζεται στην διαγονιδιακή έκφραση ικανού για διπλασιασμό ιού που φέρει τμήμα γονιδίου της επιλογής μας (αμπλικόνιο).

Διαγονιδιακές σειρές -αμπλικόνια ονομάζονται διαγονιδιακές σειρές στις οποίες το διαγονίδιο είναι 35S (ή από άλλο υποκινητή) κατευθυνόμενο cDNA φυτικού ιού με δυνατότητα αυτόνομου διπλασιασμού στο οποίο ενθέματα γονιδίων του ξενιστή μπορούν να εντεθούν (Angell and Baulcombe, 1997). Οι σειρές αυτές είναι ασυμπτωματικές έστω και αν εκχυλίσματα από τρανσγενικά φυτά όταν χρησιμοποιηθούν για μόλυσμα εμφανίζουν συμπτώματα. Τέτοια φυτά είναι ανθεκτικά σε στελέχη ιού με > 80% ομολογία ενώ έλλειψη αυτόνομου διπλασιασμού μπλοκάρει την μολυσματικότητα. Διασταύρωση φυτού που εκφράζει ένα γονίδιο «reporter» GUS με σειρά αμπλικονίου η οποία έχει ένθεμα του ίδιου reporter (GUS) στο γένωμα του ιού προκαλεί σίγηση του εκφραζόμενου reporter (Angell and

Baulcombe, 1999). Ενθέματα που παράγουν siRNAs και προέρχονται από ενδογενή γονίδια έχουν την δυνατότητα να δημιουργήσουν φαινοαντίγραφα των αντίστοιχων μεταλλαγών (loss-of-function) και να προκαλέσουν φαινότυπο ανάλογο με την καταστολή του αντίστοιχου γονιδίου (Angell and Baulcombe, 1999). Βιοτικό και αβιοτικό στρες έχουν επίδραση στην ρύθμιση των αμπλικονίων (Talianky et al., 2004).

### **Υπερέκφραση της πρωτεΐνης Virp2 σε E. coli.**

Προηγούμενες προσπάθειες απέτυχαν να υπερεκφράσουν σε υψηλά επίπεδα την πρωτεΐνη Virp2 σε βακτηριακό σύστημα (Martinez de Alba, Ph. D Thesis), αν και με μειωμένο βαθμό υπερέκφρασης κατέστη δυνατός ο καθαρισμός και η αξιοποίηση της παραγόμενης πρωτεΐνης για βιοχημικές μελέτες. Για την παραγωγή αντισωμάτων ο βαθμός υπερέκφρασης από προϋπάρχουσες κατασκευές δεν είναι εφικτός. Παράλληλα αυξημένη υπερέκφραση μπορεί να επιτρέψει την παρασκευή απομονωμένης πρωτεΐνης σε υψηλότερη καθαρότητα για πιο εξειδικευμένες βιοχημικές μελέτες.

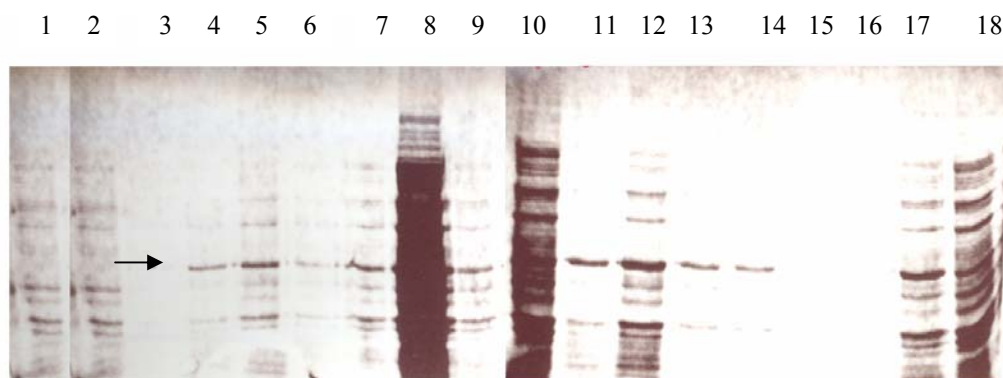
Για τον σκοπό αυτό, δημιουργήθηκε μια **καινούργια κατασκευή** το τμήμα της κωδικής περιοχής που αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 21-1280 της Virp2 (AF247819) κλωνοποιήθηκε στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο στον φορέα pPROEX-HTc (Invitrogen). Η κατασκευή αυτή επιτρέπει την έκφραση της πρωτεΐνης από τον υβριδικό και επαγόμενο από IPTG υποκινητή P<sub>trc</sub> σαν μεταφραστικό fusion με His-tag στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Ανάμεσα στο His-tag και την κωδική περιοχή της πρωτεΐνης παρεμβάλλεται θέση αναγνώρισης για rTEV πρωτεάση που επιτρέπει την απομάκρυνση του tag μετά την υπερεκφραση. Για την δημιουργία της κατασκευής αυτής ένα επιπλέον βήμα υποκλωνοποίησης απαιτήθηκε. Στο πρώτο η κωδική περιοχή της Virp2 (21-1280 nt) υποκλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript (Stratagene) από όπου με κατάλληλες περιοριστικές πέψεις αποσχίστηκε και υποκλωνοποιήθηκε στον pPROEX-HTc (για τις λεπτομέρειες της δημιουργίας της κατασκευής αυτής ο αναγνώστης καλείται να ανατρέξει στην αντίστοιχη ενότητα των υλικών και μεθόδων). Σαν ένθεμα για την υποκλωνοποίηση σε pBluescript χρησιμοποιήθηκε μια κατασκευή η οποία περιέχει το σύνολο της γνωστής αλληλουχίας της Virp2 (AF247819) υποκλωνοποιημένη σε pT3T7, η οποία δημιουργήθηκε κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας για να αποφευχθούν



προβλήματα σταθερότητας που παρουσίαζε ο κλώνος που περιγράφεται στο Martinez de Alba (Ph.D Thesis).

Συνοπτικά η διαδικασία υπερέκφρασης (όπως διαμορφώθηκε στην διάρκεια της παρούσας εργασίας) περιλαμβάνει την λήψη μοναδιαίων αποικιών από πιάτο με πρόσφατα μετασηματισμένα κύτταρα DH5a (ή BL21) και τον εμβολιασμό καλλιέργειών μικρής κλίμακας (επώαση ο/ν, 37 °C, συνεχή ανακίνηση). Η καλλιέργεια αυτή χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας στην οποία γίνεται επαγωγή με IPTG όταν η πυκνότητα των κυττάρων είναι (6-8 x 10<sup>8</sup> κύτταρα /ml, μέχρι το σημείο αυτό ίδιες συνθήκες επώασης με προηγούμενως). Για την βελτιστοποίηση των συνθηκών υπερέκφρασης, μετά την προσθήκη IPTG, πραγματοποιήθηκε επώαση σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25 °C, 30 °C, 37 °C) ενώ ελήφθησαν κλάσματα στους χρόνους 0 h, 2h, 4h, 16 h και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

Η κατασκευή κωδικοποιεί για την έκφραση μιας πρωτεΐνης ~43 kDa. Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι ο βαθμός υπερέκφρασης δεν παρουσιάζει ισχυρές διακυμάνσεις στις διάφορες συνθήκες. Προτιμήθηκε για τα επόμενα στάδια καθαρισμού η συνθήκη: 37 °C, 4h διότι έδινε ελαφρά υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης.



**Εικόνα 6.** Κυτταρικά εκχυλίσματα μετά την επαγωγή υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Virp2. Lane 1: βακτηριακό στέλεχος-μάρτυρας μη μετασηματισμένος με την κατασκευή. Lane 2: 0 h επαγωγή, Lane 3: 2 h επαγωγή/37 °C, Lane 4: 4 h επαγωγή/37 °C, Lane 5: 16 h επαγωγή/37 °C, Lane 6: 2 h επαγωγή/30 °C, Lane 7: 4 h επαγωγή/30 °C, Lane 8: 16 h επαγωγή/30 °C, Lane 9: 2 h επαγωγή/25 °C, Lane 10: 16 h επαγωγή/25 °C, Lane 11: 4 h επαγωγή/37 °C, Lane 12: 16 h επαγωγή/37 °C, Lane 13: 2 h επαγωγή/30 °C, Lane 14: 4 h επαγωγή/30 °C, Lane 15: 16 h επαγωγή/30 °C, Lane 16: 2 h επαγωγή/25 °C, Lane 17: 4 h επαγωγή/25 °C, Lane 18: 16 h επαγωγή/25 °C. Στην περίπτωση των δειγμάτων 1-10 χρησιμοποιήθηκε βακτηριακό στέλεχος DH5a ενώ στην περίπτωση των δειγμάτων 11-18, BL21.

**Επαγωγή παροδικής σίγησης αλληλεπιδρώντων με ιοειδές πρωτεϊνών.** Η επαγόμενη από ιό γονιδιακή σίγηση είναι ένα πολύ ισχυρό εργαλείο, το οποίο αρχίζει να αποκτάει εκτεταμένη χρήση σαν υποκατάστατο της χρονοβόρας διαδικασίας γενετικού μετασχηματισμού φυτών μέσω *Agrobacterium* (Burch-Smith et al., 2004). Διάφοροι ιικοί φορείς έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ή λιγότερο εκτεταμένα για γονιδιακή σίγηση όπως για παράδειγμα ο PVX (Lu et al., 2003, Burton et al., 2000), TRV (Ratcliff et al., 2001, Liu et al., 2002), PopMV (Naylor et al., 2004), geminiviruses (Turnage et al., 2002, Peele et al., 2001, Atkinson et al., 1998, Kjemtrup et al., 1998), δορυφορικά RNA ιών (satellite viruses, Gossale et al., 2002), άλλες ιικά προερχόμενες αλληλουχίες (Kumagai et al., 1995) κ.α.

Προηγούμενες προσπάθειες στο ίδιο εργαστήριο για σίγηση της *Virp1* (Martinez de Alba, Ph.D thesis) με την χρήση PVX.204 φορέα (Baulcombe et al., 1995) είχαν το πρόβλημα της επικάλυψης του φαινοτύπου από την εμφάνιση ιικών συμπτωμάτων από τον PVX, όπως και το γεγονός ότι οι αντίστοιχοι φορείς ήταν σχεδιασμένοι για υπερέκφραση και όχι σίγηση γονιδίων στα φυτά αλλά κάνουν και σίγηση (Baulcombe et al., 1995). Αν και πιο ενδεδειγμένος έλεγχος θα αποκαλύψει αν ο παρατηρούμενος φαινότυπος ήταν αποτέλεσμα υπερέκφρασης ή σίγησης, ένα εναλλακτικό σύστημα είναι αναγκαίο για την επαγωγή στοχευμένης σίγησης μέσω ιού για τις δυο αλληλεπιδρώντες με ιοειδές πρωτεΐνες. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν ιικοί φορείς βασισμένοι στον TRV (Ratcliff et al., 2001). Βασικό πλεονέκτημα του συστήματος αυτού σε σχέση με τον PVX και τις άλλες αντίστοιχες ανασυνδυασμένες κατασκευές είναι η αυξημένη σταθερότητα των TRV κατασκευών σε βακτήρια, η ικανότητα του TRV να προσβάλλει (σε αντίθεση με τον PVX) αναπτυσσόμενους ιστούς, ανθικά μέρη κ.τ.λ., η απλοποίηση της διαδικασίας μολύνσεων με συνακόλουθη μείωση κόστους (αγροένχυση). Επιπλέον καθίσταται αδύνατη η υπερέκφραση των κλωνοποιούμενων τμημάτων διότι σε αντίθεση με άλλους ιικούς φορείς TRV (π.χ. MacFarlane and Popovic, 2000) δεν υπάρχουν παρακείμενες στον φορέα αλληλουχίες υπογενωμικών υποκινητών που μπορούν να οδηγήσουν στην δημιουργία υπογενωμικών RNA και την έκφραση του ενθέματος (Ratcliff et al., 2001). Μάλιστα στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συνυπολογίζεται η ικανότητα του TRV να έχει ευρύ φάσμα ξενιστών και με δεδομένο ότι ήδη έχουν αναπτυχθεί τροποποιήσεις της μεθόδου σε αρκετά είδη (δες και παρακάτω) μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για την μελέτη γονιδίων σε οργανισμούς όπως η **τομάτα** που παρουσιάζει δυσκολίες στον γενετικό μετασχηματισμό μέσω *Agrobacterium*.

Η αρχή του συστήματος του TRV στηρίζεται στην φύση του ιού που έχει υπόσταση σαν RNA ιός αποτελούμενος από δυο γενωμικά RNA, αν και υπάρχουν μολυσματικές μορφές μόνο με το RNA1 του ιού (NM μολύνσεις, MacFarlane et al., 1997). Η αρχή της μεθόδου συνίσταται στην έκφραση του ενθέματος σαν τμήμα εκφραζόμενου από 35S υποκινητή RNA2 του ιού (Ratliff et al., 2001). Η ικανότητα αυτόνομου διπλασιασμού και ολοκλήρωσης του κύκλου της μόλυνσης προέρχεται από την συναγροένχυση κλωνοποιημένου downstream από 35S υποκινητή του περιέχοντα την ρεπλικάση του ιού RNA1.

Στην παρούσα εργασία **δυο κατασκευές** δημιουργήθηκαν με την εισαγωγή αντιστοιχών ενθεμάτων στο cDNA2 του ιού (και αναλύονται στην αντίστοιχη ενότητα των υλικών και μεθόδων). **Στην πρώτη κατασκευή** το ελάχιστο 3' άκρο με RNA-binding ιδιότητες [που περιλαμβάνει σημείο λήξης και 3' UTR και πρακτικά είναι σχεδόν ταυτόσημο με τον Κλώνο19 της Virp1 (Sagesser et al., unpublished results), αν και προέρχεται από τον κλώνο 8 (Martinez de Alba Ph.D thesis)] της Virp1 (νουκλεοτίδια 1119-2430 της αλληλουχίας AJ249595) κλωνοποιήθηκε στον pTV (RNA2 TRV). Η επιλογή του συγκεκριμένου τμήματος της αλληλουχίας στηρίχθηκε στο γεγονός ότι κατά αντιστοιχία με άλλα μέλη της οικογένειας της Virp1 στα φυτά (Karandemiris, personal observations, δεξ και παρακάτω στην παρούσα εργασία), το τμήμα αυτό εμφανίζει ελάχιστη συντήρηση ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας της Virp1 και πρακτικά δεν ανιχνεύονται ESTs από τομάτα με αξιοσημείωτη ομολογία (>60 %) στις γονιδιακές βάσεις δεδομένων. Αντίστοιχα το τμήμα που αντιστοιχεί στις 600 bp του 5' άκρου της γνωστής αλληλουχίας της Virp2 (δεξ υλικά και μέθοδοι) χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία της **δεύτερης κατασκευής** για να υπάρχει αντιστοιχία με την κατασκευή του διαγονιδιακού (οι λόγοι επιλογής του συγκεκριμένου κομματιού αναφέρονται στην αντίστοιχη ενότητα).

Δυστυχώς παρά την **αξιοσημείωτη** για ιικό φορέα **σταθερότητα** των pTV ανασυνδυασμένων κλώνων που περιγράφονται παραπάνω, η χρήση των παραπάνω κατασκευών δεν κατέστη δυνατή καθότι δεν υπήρχε δυνατότητα αυτόνομου διπλασιασμού του ιού λόγω μη λειτουργικού RNA1 (pBINTRA6, αυτό που φέρει την ρεπλικάση **και όχι αυτού που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των κατασκευών και το οποίο ονομάζεται pTV, Karandemiris, personal observation**).

**Η παρατήρηση πρόσφατα επαληθεύθηκε και από τρίτους (Baulcombe, personal communication).** Στην παρούσα χρονική στιγμή η προβληματική κατασκευή έχει αντικατασταθεί και βρίσκονται σε εξέλιξη οι επαναλήψεις των πειραμάτων.

Με επαγόμενη από ιό γονιδιακή σίγηση μπορούν να αναπαραχθούν φαινότυποι σίγησης διαγονιδίων (δες εισαγωγή) αλλά και ενδογονιδίων, είτε αναπτυξιακά ρυθμιζόμενων όπως γονιδίου NLF (Ratcliff et al., 2001), rubisco small subunit (Himber et al., 2003), PDS (Liu et al., 2002, Ruiz et al., 1998), CTR1 (Liu et al., 2002), Deficiens (Liu et al., 2004) κ. α.

Η βασική εφαρμογή όμως μέχρι τώρα της μεθόδου περιορίζεται στην μελέτη αλληλεπιδράσεων παθογόνου–ξενιστή αλλά και στην εξιχνίαση των μηχανισμών της μεταμεταγραφικής σίγησης. Έτσι, για παράδειγμα TRV:N καταστέλλει συστηματικά την έκφραση του N γονιδίου σε *N. benthamiana* γενετικά τροποποιημένη με το N γονίδιο ανθεκτικότητας στον TMV και δευτερογενής μόλυνση με TMV δεν οδηγεί στην χαρακτηριστική αντίδραση υπερευαισθησίας (Liu et al., 2002). Καταστολή υποψήφιων για συμμετοχή σε N-διαμεσολαβούμενη ανθεκτικότητα μέσω VIGS έχει τον ίδιο φαινότυπο με καταστολή του N γονιδίου (Liu et al., 2004, Liu et al., 2002, Peart et al., 2002).

Επαγόμενη από ιό γονιδιακή σίγηση δεν περιορίζεται μόνο στην βασική έρευνα σε οργανισμούς μοντέλα όπως η *Arabidopsis thaliana* και η *N. benthamiana*, αλλά καταβάλλονται προσπάθειες η χρήση της να επεκταθεί και σε οργανισμούς με οικονομική σημασία. Έτσι κατέστη δυνατή η προσαρμογή του για χρήση σε είδη *Solanum* με πειράματα αγροένχυσης χρησιμοποιώντας τον TRV (Brigetti et al., 2004) ή τον PVX (Faivre-Rampant et al., 2004), ή τομάτα με την χρήση του TRV (Liu et al., 2002). Ακόμα και μικρές αλληλουχίες ανεστραμμένων άκρων ενσωματωμένες στο ιικό γένωμα που αυξάνουν την απόκριση σίγησης έχουν χρησιμοποιηθεί με ιικούς φορείς που προσβάλλουν μονοκοτυλήδονα ή δικοτυλήδονα είδη αντίστοιχα (Lacomme et al., 2003)

**Ομόλογα της Virp1 σε διάφορα βασίλεια.** Αρχικές έρευνες χρησιμοποιώντας βιοπληροφορικά εργαλεία απέτυχαν να ανιχνεύσουν ομόλογα της Virp1 με υψηλό βαθμό ομολογίας. Είχε γίνει φανερό ότι η Virp1 είναι μέλος μιας οικογένειας με ταχείς εξελικτικούς ρυθμούς, πιθανώς επειδή τα μέλη της έχουν εξειδικευτεί για να προσδένουν διαφορετικά RNA σε διάφορους οργανισμούς (καθώς

και η αλληλουχία των RNA αυτών συνεξεγείσεται) ή διαφορετικά ομόλογα στον ίδιο οργανισμό έχουν εξειδικευτεί για την πρόσδεση διαφορετικών στόχων. Με βάση την αλληλουχία της Virp1 και των στενότερα συγγενικών σε επίπεδο πρωτεϊνικής αλληλουχίας ομολόγων στην *Arabidopsis* δημιουργήθηκε μια στοίχιση με έμφαση στις αυστηρά συντηρημένες περιοχές (με την βοήθεια του προγράμματος Blocks, ). Για την στοίχιση χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες AJ249595, AT1G06230, AT1G17790, AT1G73150, AT5G10550, AT5G65630. Από την στοίχιση εκτός από τα αυστηρά συντηρημένα μοτίβα που αντιστοιχούν με το bromodomain, προέκυψαν άλλα δυο συντηρημένα μοτίβα, τα consensus των οποίων είναι: LuQDDD EIELDIDALDsETLWELDRFVTNYKKMLSKKKR (Μοτίβο I, αμινοξέα 398-443 της Aj249595) και KPKAKDPNKRDMTMEEEK+KLGscLQDLPPDKLQLVQIIRK RNsH (Μοτίβο II, αμινοξέα 443-482 της Aj249595). Το Μοτίβο I είναι συντηρημένο σε ζωικές και φυτικές πρωτεΐνες και μάλιστα είναι ένα μοτίβο που απαντάται αποκλειστικά στα μέλη της οικογένειας BET. Κατά αντιστοιχία το μοτίβο αυτό απαντάται σε όλα τα φυτικά μέλη της οικογένειας και σε **ελάχιστες** ακόμα πρωτεΐνες. Το Μοτίβο II είναι διακριτικό μόνο των φυτικών μελών της οικογένειας και κατά αντιστοιχία με το Μοτίβο I, εκτός από τα μέλη της οικογένειας απαντάται σε ελάχιστες ακόμα πρωτεΐνες. Έξω από την περιοχή των μοτίβων αυτών υπάρχει ελάχιστη νουκλεοτιδική ομολογία ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας. Το διακριτικό των μελών της οικογένειας BET είναι ότι εκτός των συντηρημένων περιοχών, η υπόλοιπη αμινοξική αλληλουχία εμφανίζει ταχείς εξελικτικούς ρυθμούς. Η οικογένεια BET ανήκει στους καθολικούς (global) μεταγραφικούς ρυθμιστές και περιλαμβάνει μέλη όπως το BDF1 στον σακχαρομύκητα που είναι καθολικός παράγοντας αντισίγησης σε επίπεδο χρωματίνης, το Fsh στην δροσόφιλα, το Brd4 στα θηλαστικά και το BRDT στα θηλαστικά το οποίο έχει πρόσφατα ενοχοποιηθεί για καθολική σίγηση σε χρωματινικό επίπεδο στο στάδιο της σπερματογένεσης, στάδιο κατά το οποίο συμβαίνουν επίσης εκτεταμένες αλλαγές σε επίπεδο DNA μεθυλίωσης (δες και παρακάτω στο κείμενο). Η Virp1 είναι το πρώτο μέλος της οικογένειας στο οποίο έχουν αποδοθεί RNA binding ιδιότητες. Με δεδομένο το πρόσφατο ενδιαφέρον για την σχέση RNA και αναπροσαρμογής δομής χρωματίνης, συζητώνται οι πρόσφατες εξελίξεις στο πεδίο της RNA ανεξάρτητης και RNA κατευθυνόμενης αναπροσαρμογής σε επίπεδο χρωματίνης και η πιθανή εμπλοκή της Virp1 στην αναπροσαρμογή της χρωματινικής δομής.

Οι ιστόνες είναι στόχος πολλαπλών μεταμεταγραφικών τροποποιήσεων συμπεριλαμβανομένης ακετυλίωσης σε κατάλοιπα λυσίνης, μεθυλίωσης (μονομεθυλίωσης ή διμεθυλίωσης συμμετρικής ή ασύμμετρης σε κατάλοιπα αργινίνης ή μόνο-, δι-, ή τριμεθυλίωσης σε κατάλοιπα λυσίνης, ουμικουτινιλύωσης σε κατάλοιπα λυσίνης, σουμουλίωσης σε κατάλοιπα λυσίνης, φωσφοριλίωσης σε κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης (Fischle et al., 2003). Δυο διαφορετικές μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις δεν μπορούν να συνυπάρχουν στο ίδιο κατάλοιπο λυσίνης.

Υπερακετυλίωση καταλοίπων λυσίνης ιστονών σχετίζεται με μεταγραφικά ενεργές περιοχές τόσο σε τοπικό όσο και σε ολικό επίπεδο (Fischle et al., 2003). Αποακετυλίωση ή υποακετυλίωση σχετίζεται με αναστολή μεταγραφής και σίγηση (Fischle et al., 2003). Τις περισσότερες φορές μεθυλίωση ιστονών σχετίζεται με μεταγραφική σίγηση. Έτσι μεθυλίωση H3-K9 (μεθυλίωση λυσίνης 9 της ιστόνης H3) (ή H3-K36) σχετίζεται με σίγηση και αναστολή μεταγραφής. Αντίθετα σε περιπτώσεις όπως μεθυλίωση H3- K4, η μεθυλίωση αυτή σχετίζεται με μεταγραφικά ενεργή χρωματίνη, ενώ η διμεθυλίωση H3- K4 σχετίζεται και με ανενεργή και με ενεργή χρωματίνη (η τριμεθυλίωση H3-K4 σχετίζεται αποκλειστικά με ενεργή χρωματίνη, Fischle et al., 2003).

Η ακετυλίωση ουδετεροποιεί το φορτίο των λυσινών στις ιστόνες κάνοντας τις πιο προσβάσιμες από άλλες πρωτεΐνες και χαλαρώνει την δομή της χρωματίνης (Yang, 2004). Η ακετυλίωση των ιστονών έχει επίδραση στην αποσταθεροποίηση των ανώτερων βαθμών οργάνωσης της χρωματίνης, καταστρέφοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ νουκλεοσωμάτων που συγκρατούν την ανώτερη δομή χρωματίνης (Fry and Peterson, 2001). Η ακετυλίωση των ιστονών ουδετεροποιώντας τον σκελετό των ιστονών ελαττώνει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του βασικού αμινοτελικού άκρου των ιστονών και του αρνητικά φορτισμένου σκελετού του DNA. Εναλλακτικά οι διάφορες μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις δημιουργούν σινιάλα πάνω στο αμινοτελικό άκρο των ιστονών –κώδικας ιστονών- που ερμηνεύονται από τις πρωτεΐνες που προσδέονται σε αυτά για να σηματοδοτήσουν αλλαγές στην δομή των νουκλεοσωμάτων και να υποδείξουν την μεταγραφική κατάσταση του νουκλεοσώματος ή να επάγουν αλλαγές (Marmorstein, 2001).

Ακετυλιωμένα κατάλοιπα λυσινών σε άλλες πρωτεΐνες (εκτός από ιστόνες) μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στην μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων τους όπως για παράδειγμα η ακετυλίωση καταλοίπων λυσίνης των Brahma,

HMG1(Y), TCF,RelA, Nk-kb κ.α.(Yang, 2004). Μεθυλίωση (και απενεργοποίηση) της H3-K9 συνδέεται με αδυναμία ακετυλίωσης άλλων καταλοίπων λυσίνης (H3-K14, H3-K18, H3-K23, άρα και μεταγραφική ενεργοποίηση). Αν και η ακετυλιωμένη λυσίνη σχετίζεται με μεταγραφική ενεργοποίηση έχουν βρεθεί ακετυλτρανσφεράσες ιστονών (π.χ. Myst οικογένεια) που συμμετέχουν στην γονιδιακή σίγηση (Marmorstein, 2001).

Μεθυλίωση H3-K4 (περίπτωση μεταγραφικά ενεργής χρωματίνης) αποκλείει σινιάλα που σχετίζονται με μεταγραφική σίγηση όπως H3-K9 μεθυλίωση και προωθεί σινιάλα που σχετίζονται με μεταγραφική ενεργοποίηση όπως ακετυλίωσεις στην H3. Επιπλέον σινιάλα για ενεργοποίηση (ακετυλίωση H3-K9 ή H3-K14) επάγουν επιπλέον σινιάλα για ενεργοποίηση, όπως μεθυλίωση H3-K4. Μεθυλίωση H4-R3 δεν συμβαίνει παρουσία σινιάλων ενεργοποίησης (ακετυλίωση H4-K5, H4-K8, H4-K12, H4-K6). Η ακετυλίωση/απακετυλίωση ιστονών είναι ένα εύκολα αντιστρεπτό σινιάλο και χρησιμοποιείται στην περίπτωση που χρειάζονται άμεσες αποκρίσεις σε αλλαγές στα ερεθίσματα ενώ η μεθυλίωση των ιστονών λόγω της μεγαλύτερης σταθερότητας του είναι ένα σινιάλο που σχετίζεται με πιο μακροπρόθεσμες τάσεις σχετικά με την ενεργοποίηση/αδρανοποίηση μιας μεταγραφικής μονάδας. Η μεγάλη σταθερότητα της μεθυλίωσης λυσινών σχετίζεται με την παγίωση δομών ετεροχρωματίνης (Lachner and Jenuwein, 2002). Η μεθυλίωση DNA είναι απλά ένα επιπλέον –πιο σταθερό και δύσκολα αναστρέψιμο- σινιάλο σχετιζόμενο με αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης σε οργανισμούς που έχουν τον αντίστοιχο μηχανισμό. Επίσης γενώματα εύπλαστα που ανταποκρίνονται γρήγορα σε περιβαλλοντολογικά ερεθίσματα ή έχουν ταχείς εξελικτικούς ρυθμούς ή εύελικτα αναπτυξιακά προγράμματα (όπως οι ζύμες και τα έντομα -Drosophila- δεν παρουσιάζουν μεθυλίωση σε επίπεδο DNA σε αντίθεση με οργανισμούς που δεν επιδέχονται θεμελιώδεις αλλαγές στα αναπτυξιακά τους προγράμματα καθώς η μεθυλίωση είναι μια υπογραφή σε επίπεδο DNA η οποία σχετικά δύσκολα εγκαθίσταται η εκριζώνεται. Μεθυλίωση λυσινών ιστονών σχετίζεται με μεθυλίωση σε επίπεδο DNA (Lachner and Jenuwein, 2002).

Η ακετυλίωση ιστονών (Yang, 2004) επιτελείται από ακετυλτρανσφεράσες («ενεργοποιούν» χρωματίνη, θετικοί ρυθμιστές μεταγραφής) ενώ απακετυλίωση από απακετυλάσες (αρνητικοί ρυθμιστές μεταγραφής), η οποία είναι προϋπόθεση για μεθυλίωση H3-K9 από μεθυλτρανσφεράσες **ιστονών** («απενεργοποιούν» χρωματίνη). Το σχετιζόμενο με σίγηση Hp1 και τα ομόλογα του προσδένονται στο σινιάλο σίγησης μεθυλιωμένη H3-K9. Είναι δυνατόν ένα ένζυμο που σχετίζεται με σινιάλο

για ενεργοποίηση χρωματίνης (π.χ. για μεθυλίωση H3-K4) να εντοπίζεται σε σύμπλοκα ανενεργής χρωματίνης (π.χ. σιγημένοι rDNA γενετικοί τόποι). Διαφορετικά σύμπλοκα αναπροσαρμογής δομής χρωματίνης ATP-ασών έχουν διαφορετικά μοτίβα που αναγνωρίζουν διαφορετικά σινιάλα-τροποποιήσεις ιστονών, γεγονός που μπορεί να είναι βάση της λειτουργικής τους εξειδίκευσης: Έτσι, σύμπλοκα σχετιζόμενα με SWI/SNF έχουν Bromodomains, με ISWI SANT domains ενώ με CHD chromodomains (Horn and Peterson, 2001). Τα bromodomain αλληλεπιδρούν με ακετυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης ιστονών (και ακετυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης άλλων πρωτεϊνών, Winston and Allis, 1999) άρα κατά βάση οι πρωτεΐνες που τα περιέχουν σχετίζονται με ενεργή χρωματίνη, ενώ τα chromodomains σε μεθυλιωμένες λυσίνες H3-K9 που σχετίζονται με ανενεργή χρωματίνη (Horn and Peterson, 2001, Lachner and Jenuwein, 2002). Τα bromodomains αγκιστρώνουν τις ακετυλτρανσφεράσες και άλλους bromodomain-containing ενεργοποιητές σε ενεργή χρωματίνη (Winston and Allis, 1999).

Ρόλος bromodomain:

1. Να υποβοηθούν αλληλεπιδράσεις ενζύμων με χρωματίνη, ο ρόλος των οποίων είναι να ξεδιπλώνουν χρωματίνη για μεταγραφική ενεργοποίηση (Marmorstein and Berger, 2001).
2. Ευαίσθητοι αισθητήρες αλλαγών σε επίπεδο μεταμεταγραφικών τροποποιήσεων χρωματίνης (Horn and Peterson, 2001).
3. Αναγνώριση νουκλεοσωμικών υποστρωμάτων και σινιάλων του κώδικα των ιστονών (Marmorstein and Berger, 2001).
4. Προσαρμογείς για προσέλκυση πρωτεϊνών ενεργοποιητών με ανάλογες τροποποιήσεις (Horn and Peterson, 2001).
5. Διαδραματίζουν ρόλο σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις όχι μόνο πρωτεϊνών με ιστόνες αλλά πρωτεϊνών-πρωτεϊνών άλλων από ιστόνες (π.χ. το bromodomain του hGcn5 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Ku70, Marmorstein and Berger, 2001).
6. Μπορεί να υποβοηθούν την έμμεση επαφή των πρωτεϊνών που τα περιέχουν με την χρωματίνη μέσω πρόσδεσης σε ακετυλιωμένους μεταγραφικούς ενεργοποιητές οι οποίοι είναι ήδη αγκιστρωμένοι στην χρωματίνη (Marmorstein and Berger, 2001).
7. Μπορεί να κατευθύνουν σύμπλοκα σε προ-ακετυλιωμένη χρωματίνη (Horn and Peterson, 2001).



Η δημιουργία ανενεργής χρωματίνης σχετίζεται με την ύπαρξη ενός αισθητήρα (bromodomain) που θα αναγνωρίσει ενεργή χρωματίνη η οποία πρόκειται να απενεργοποιηθεί. Η πρωτεΐνη που θα το περιέχει θα έχει την πληροφορία για την αδρανοποίηση. Τελικό αποτέλεσμα είναι ένας καταρράκτης γεγονότων, απακετυλίωση και στην συνέχεια μεθυλίωση των ιστονών. Η πληροφορία για το πια περιοχή του γενώματος πρόκειται να απενεργοποιηθεί ίσως να βρίσκεται σε ένα άλλο μοτίβο κατά μήκος του υποθετικού αυτού bromodomain-containing μορίου.

Με βάση τις ιδιότητες των domains που έχουν οι διάφορες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αναπροσαρμογή της δομής της χρωματίνης ένα μοντέλο για την αλληλουχία των γεγονότων μπορεί να προταθεί. Στο μοντέλο αυτό παραλείπονται οι πρόσφατες ενδείξεις για την συμμετοχή του RNA στον μηχανισμό και το πώς η αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης μπορεί να συνδεθεί με ομοιοπολικού δεσμού τροποποιήσεις σε επίπεδο DNA (σε οργανισμούς που διαθέτουν αυτό το επιπλέον στάδιο, αν και η θέση της είναι προσδιορισμένη επακριβώς με βάση τα υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα, Matzke and Bichler, 2005). Διακρίνονται δυο στάδια, η μετατροπή ενεργής σε ανενεργή χρωματίνη (de novo απενεργοποίηση) και η διατήρηση της κατάστασης της αδρανοποιημένης χρωματίνης. Από την στιγμή που έχει συμβεί η ομοιοπολική τροποποίηση του DNA (στην περίπτωση συμμετρικού τύπου τροποποίησης) απαιτείται η αφαίρεση του σινιάλου ενεργής χρωματίνης (ακετυλομάδας στην λυσίνη), μέσω μιας απακετυλάσης και η μεθυλίωση στην H3-K9 από μια SET-domain-containing ομόλογη πρωτεΐνη. Η μεθυλίωση H3-K9 αναγνωρίζεται μέσω του chromodomain πρωτεϊνών όπως η HP1 που διατηρούν την απενεργοποιημένη κατάσταση χρωματίνης ή chromodomain-containing πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε ομοιοπολικές τροποποιήσεις σε επίπεδο DNA.

Στο υποθετικό (απλουστευτικό) μοντέλο το πρώτο στάδιο είναι η αναγνώριση υπογραφής ενεργής χρωματίνης (ακετυλ-λυσίνης τροποποιημένης ιστόνης) που πρόκειται να απενεργοποιηθεί από μια bromodomain-containing πρωτεΐνη. Η γνώση της ακριβούς θέσης πάνω στο DNA που θα συμβούν οι αλλαγές ίσως προσδιορίζεται από σινιάλα που προσδένονται σε άλλα domains της πρωτεΐνης αυτής ή με αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες που φέρουν τα σινιάλα μέσω άλλων domains της υποθετικής αυτής bromodomain-containing πρωτεΐνης. Το επόμενο βήμα είναι η αφαίρεση του σινιάλου της ακετυλιωμένης λυσίνης από μια απακετυλάση, η αντικατάσταση της ακετυλομάδας από μεθυλομάδα από μια πρωτεΐνη ομόλογη με τις SET-containing μεθυλτρανσφεράσες ιστονών και η χρήση του σινιάλου της

μεθυλιωμένης λυσίνης από chromodomain-containing πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν μέσω του chromodomain το σινιάλο ανενεργής χρωματίνης και πιθανόν συμβάλουν στην παγίωση των αλλαγών και σε επίπεδο ομοιοπολικών τροποποιήσεων σε επίπεδο DNA. Πιθανότατα εάν το σινιάλο σε επίπεδο RNA είναι περισσότερα από 1 μόρια ανεξάρτητα, διαφορετικές πρωτεΐνες μπορεί να φέρουν καθένα από αυτά τα μόρια ή μπορεί να υπάρχει ανάγκη για πολλαπλή επιβεβαίωση ότι το τμήμα αυτό της χρωματίνης πρόκειται να απενεργοποιηθεί όποτε καθεμία από τις πρωτεΐνες του μοντέλου οφείλουν να έχουν ικανότητα πρόσδεσης με το RNA σινιάλο ή να «αισθάνονται» την ύπαρξη του ή ακόμα σε διαφορετικά συστήματα μια ή περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες σε σημεία κλειδιά για να ολοκληρωθεί το φαινόμενο πρέπει να έχει RNA binding ιδιότητες.

Σε αυτό το μοντέλο μετά από κάθε κύκλο διπλασιασμού του κυττάρου θα υπάρχει η ανάγκη για μαρκάρισμα των νεοεισαγόμενων στην χρωματίνη ιστονών με υπογραφές ανενεργούς χρωματίνης και για ομοιοπολική τροποποίηση της νεοσυντιθέμενης DNA αλυσίδας. Πρωτεΐνες που προσδέονται σε ομοιοπολικές τροποποιήσεις DNA (π.χ. MecP2) θα πρέπει να προσελκύουν bromodomain-containing αναπροσαρμογείς δομής χρωματίνης η οποίοι με την σειρά τους θα έρχονται σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με απακετυλάσες ιστονών και μεθυλτρανσφεράσες ιστονών. Επειδή σε οργανισμούς όπως τα φυτά σε αντίθεση με την κατάσταση στους μύκητες η ομοιοπολική τροποποίηση του DNA προηγείται της μεθυλίωσης H3-K9 ομόλογες της MeCP2 μπορεί να προσδέονται σε bromodomain-containing πρωτεΐνες για την μετατροπή του σήματος αναπροσαρμογής δομής DNA σε αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης. Διαφορετικά ένζυμα που τροποποιούν ομοιοπολικά το DNA δρουν σε διαφορετικά σημεία του μονοπατιού αυτού (και παραλείπονται για λόγους συντομίας).

Κατά την διάρκεια της αντιγραφής του DNA κατά την μίτωση υπάρχει τυχαία κατανομή των πατρικών ιστονών στις δυο αλυσίδες και τα κενά καλύπτονται από νεοσυντιθέμενες ακετυλιωμένες ιστόνες. Το HP1 μέσω πρωτεϊνών προσδέεται στο σύμπλοκα και προσελκύει απακετυλάσες ιστονών, μεθυλτρανσφεράσες ιστονών και τροποποιητές που εισάγουν ομάδες με ομοιοπολικούς δεσμούς σε επίπεδο DNA. Η μεθυλίωση ιστονών προσφέρει νέες θέσεις πρόσδεσης στο HP1 για την διατήρηση της κεκτημένης κατάστασης (Maison and Almouzni, 2004).

Από τα ένζυμα που περιγράφονται παραπάνω RNA-binding ιδιότητες έχουν περιγραφεί για μια SET-containing πρωτεΐνη (Krajewski et al., 2005), και για

chromodomain- containing πρωτεΐνες (HP1, Maison and Almouzni, 2004) αν εξαιρέσουμε φυσικά τα ένζυμα που συνδέουν την σίγηση σε επίπεδο RNA με την σίγηση σε επίπεδο χρωματίνης. Homeodomains αν και συνήθως σχετίζονται με πρόσδεση σε DNA έχουν περιστασιακά εμπλακεί και σε RNA-binding (Simpson, 2004). Το chromodomain- containing HP1 έχει την ικανότητα να προσδένει RNA (και DNA γυμνό ή περιβεβλημένο από ιστόνες) μέσω της Hinge περιοχής που έχει ανάμεσα στο chromodomain και στο chromoshadow domain (Maison and Almouzni, 2004). Chromodomains σε διάφορες πρωτεΐνες έχουν επίσης RNA binding ιδιότητες όπως για παράδειγμα η chromodomain του MOF που προσδένει το non-coding RNA rox2 (Akhtar et al., 2000). Μη συντηρημένες περιοχές με RNA binding ιδιότητες μπορεί να προσφέρουν εξειδίκευση υποστρώματος και διαφορετικά ομόλογα να έχουν διαφορετική εξειδίκευση ως προς τα RNA στόχους (Maison and Almouzni, 2004).

Τα μέλη της οικογένειας BET έχουν δυο συντηρημένες περιοχές με γνωστή λειτουργική δράση, το bromodomain και το ET domain (Florence and Faller, 2001). Εκτός όμως από αυτές τις δυο έχουν και άλλες ισχυρά συντηρημένες περιοχές διατηρημένες αποκλειστικά στα μέλη της οικογένειας (διακριτικές της οικογένειας), μια από τις οποίες είναι συντηρημένη αποκλειστικά μόνο στα φυτικά μέλη της οικογένειας (Karandemiris, personal observations). Στο ET μοτίβο έχουν αποδοθεί ικανότητες αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες ή/και ικανότητα φωσφοριλίωσης υποστρωμάτων με αμφίβολη όμως *in vivo* λειτουργία (Florence and Faller, 2001). Αν και υπάρχουν υπολείμματα ATP-εξαρτώμενων modules για αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης επικαλυπτόμενα με τα bromodomains σε bromodomain-containing πρωτεΐνες (και της BET οικογένειας στην οποία ανήκει η Virp1 και στην ίδια την Virp1) δεν έχουν λειτουργική σημασία και είναι πιθανόν νεκρά εξελικτικά υπολείμματα (Florence and Faller, 2001). Επιπλέον υπάρχει διχογνωμία αν κάποια μέλη της οικογένειας BET έχουν ενεργότητα κινάσης και τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα (Florence and Faller, 2001). Πολλά μέλη της οικογένειας BET στα θηλαστικά έχουν πρότυπο έκφρασης κατά την οργανογένεση των αρσενικών αναπαραγωγικών οργάνων και την σπερματογένεση γεγονός στα οποία συμβαίνουν εκτεταμένες αναπροσαρμογές στην δομή χρωματίνης και στις ομοιοπολικές τροποποιήσεις σκελετών DNA (Rousseaux et al., 2005).

Μια πλειάδα bromodomain-containing πρωτεϊνών εκφράζονται στα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα των θηλαστικών και κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης

(Baz family, Jones et al., 2000α), BPTF (Jones et al., 2000β), συμπεριλαμβανομένων γονιδίων της Bet οικογένειας (BRDT, Jones et al., 1997). Κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης δυο αλληλένδετα γεγονότα συμβαίνουν: ολικές αναπροσαρμογές δομής χρωματίνης που καταλήγουν στην δημιουργία πιο συμπαγών δομών χρωματίνης στα σπερματοζώαρια (Rousseaux et al., 2005) και αναπροσαρμογή στο πρότυπο της DNA μεθυλίωσης σε διαφορεικά μεθυλιωμένες περιοχές του γενόματος η οποία διατηρείται κατά την διάρκεια της ενήλικης ζωής και σχετίζεται με σίγηση αλληλομόρφου από τον ένα γονέα και έκφραση μόνο του αλληλομόρφου από τον άλλο (imprinting, Berger, 2004, Li et al., 2004). Το τελευταίο φαινόμενο σχετίζεται με απαλοιφή των προτύπων μεθυλίωσης που κληρονόμησαν οι γονείς και εγκαθίδρυση των προτύπων μεθυλίωσης που ο γονέας θα κληροδοτήσει στα παιδιά του (Rousseaux et al., 2005). Αν και παρουσιάζει μηχανιστικές ομοιότητες το φαινόμενο στα φυτά έχει ιδιαιτερότητες (Autran et al., 2005, Berger, 2004).

Αντίθετα στην περίπτωση της ολικής αναπροσαρμογής της χρωματίνης κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης (Rousseaux et al., 2005), ενώ στα κύτταρα των πρόδρομων των σπερματοζωαρίων η κατάσταση σίγησης διατηρείται από την HP1 πριν την μείωση, συμβαίνουν μια σειρά αλλαγών κατά την διάρκεια της μείωσης για να καταλήξουν μετα-μειωτικά στην πρόσδεση μιας chromodomain-containing πρωτεΐνης στους H3-K9 «σημασμένους» γενετικούς τόπους, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την προσέλκυση απακετυλασών για να απακετυλιώσουν τις λυσίνες των ιστονών και να συνεισφέρουν στην ολική σίγηση γονιδίων (χαρακτηριστικό του σταδίου). Στην συνέχεια αφού προηγηθεί μαζική αποδόμηση των απακετυλασών, υπάρχει μαζική ακετυλίωση από ακετυλτρανσφεράσες. Bromodomain-containing πρωτεΐνες της οικογένειας BET όπως η BRDT προσελκύνονται από το σινιάλο των ακετυλιωμένων ιστονών και σε συνεργασία με άλλους παράγοντες συμβάλουν στην συμπύκνωση της χρωματίνης, με αποτέλεσμα στην περίπτωση τουλάχιστον αυτή να έχουν λειτουργική σημασία όχι για επαγωγή αλλά για καθολική σίγηση γονιδίων (Pivot-Pajot et al., 2003) επάγοντας μεγάλης κλίμακας εξαρτώμενης από ακετυλίωση αναπροσαρμογή χρωματίνης. Το BRDT μέσω πρόσδεσης σε υπερακετυλιωμένη χρωματίνη προσελκύει παράγοντες για απομάκρυνση των ακετυλιωμένων ιστονών (Pivot-Pajot et al., 2003). Το Brd4 επίσης συνδέεται σε συμπυκνωμένα χρωμοσώματα (μιτωτικά χρωμοσώματα) σε μια κατάσταση καθολικής μεταγραφικής σίγησης (Dey et al., 2000) κατά αντιστοιχία με το BDF1 (Chua et al., 1995)

**Συμμετοχή μελών οικογένειας BET στην αναδιοργάνωση δομής χρωματίνης και στην αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης.** Το ομόλογο Ring3 αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες με έναν εξαρτώμενο από την παρουσία ακετυλιωμένων λυσινών ιστονών (Crowley et al., 2002). Η πρόσδεση αναστέλλεται απουσία του ET domain το οποίο είναι γενικά μοτίβο που σχετίζεται με πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Denis et al., 2000) όπως το ET domain του BDF1 το οποίο έχει λειτουργική σημασία στην πρόσδεση της πρωτεΐνης στις πρωτεΐνες της βασικής μεταγραφικής μηχανής (Matangkasombut et al., 2000). Το ομόλογο Fsr1 έχει βρεθεί να είναι προσδεμένο σε ευχρωματινικές δομές (Crowley et al., 2002). Η πρωτεΐνη Brd4 προσδέεται με μη κεντρομερικές δομές (hot spot για σίγηση) μιτωτικών χρωμοσωμάτων (Dey et al., 2003). Το Brd2 εντοπίζεται στα χρωμοσώματα όπως και το BDF1 (Chua et al., 1995). Το ομόλογο σε σακχαρομύκητα BDF1 εμφανίζει προτίμηση πρόσδεσης στις ακετυλιωμένες ιστόνες ενώ το BDF2 προσδέεται στις ιστόνες ανεξάρτητα από την κατάσταση ακετυλίωσης τους (Matangkasombut et al., 2003). Το BDF1 είναι ένας παράγοντας αντισίγησης καθώς ανταγωνίζεται απακετυλάσες ιστονών για πρόσδεση σε ακετυλιωμένες λυσίνες ιστονών και διατηρεί την ευχρωματινική δομή στα σύνορα ευχρωματίνης-ετεροχρωματίνης (Landurner et al., 2003). Το BDF1 είναι μέρος της βασικής μεταγραφικής μηχανής ενώ διαδραματίζει ρόλο στην ρύθμιση κυτταρικής αύξησης στον σακχαρομύκητα (Lygerou et al., 1994). Το BDF1 παρεμποδίζει την επέκταση των ειδικών για σιγημένες περιοχές του συμπλόκου SIR να διασπαρθούν σε γειτονικές ευχρωματινικές (π.χ. στα τελομερή) (Landurner et al., 2003). Το ομόλογο BRDT εμφανίζει εκλεκτικότητα πρόσδεσης με ακετυλιωμένες λυσίνες ιστονών (Pivot-Pajot et al., 2003). Το ομόλογο Fsr4 συγκατακρυνίζεται με το σύμπλοκο mediator το οποίο είναι απαραίτητο για την προσέλευση του ολοενζύμου της RNA polII σε υποκινητή έπειτα από ενεργοποίηση μέσω πρόσδεσης ενός DNA-binding μεταγραφικού παράγοντα (Jiang et al., 1998). Το ομόλογο RING3 έχει ικανότητα πρόσδεσης σε πρωτεΐνες του συμπλόκου του mediator και με την RNA polII (Crowley et al., 2002). Συμπερασματικά τα μέλη της οικογένειας μπορούν να προσδεθούν με πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, mediator και μεταγραφική μηχανή συμπεριλαμβανομένης RNA pol II με ένα εξαρτώμενο από πρόσδεση σε ακετυλιωμένη λυσίνη τρόπο (Crowley et al., 2002).

**Εξαρτώμενη από κυτταρικό κύκλο λειτουργική εξειδίκευση μελών οικογένειας BET.** Το Brd2/Ring3/Fsr1 εκφράζεται σε διαιρούμενα κύτταρα

ποντικού ενώ και το Brd4/MCAP εκφράζεται σε αναπτυσσόμενα κύτταρα (Maruyama et al., 2002). Υπερέκφραση του ομόλογου Brd4 οδηγεί σε αναστολή αντιγραφής DNA κατά την διάρκεια της μίτωσης και αλληλεπιδρά με τον παράγοντα αντιγραφής C (Maruyama et al., 2002). Ένα άλλο ομόλογο (MCAP) εμφανίζει ισχυρή πρόσδεση με την χρωματίνη σε σημείο να παραμένει προσδεμένο σε μιτωτικά χρωμοσώματα ενώ το σύνολο των ρυθμιστικών πρωτεϊνών σε εκείνη την φάση απαγκιστρώνονται από την χρωματίνη και έχει επίδραση στην μετάβαση από την G2 στην M φάση του κυτταρικού κύκλου (Dey et al., 2000). Το ομόλογο Brd4 προσδέεται με μιτωτικά χρωμοσώματα και μάλιστα σε ακετυλιωμένη χρωματίνη κατά την διάρκεια της μίτωσης σε μια διαδικασία εξαρτώμενη από την ύπαρξη του bromodomain (Dey et al., 2003). Απαλοιφή του Bromodomain αναστέλλει την ικανότητα του Brd4 να προσδέεται σε παράγοντες του κυτταρικού κύκλου (Maruyama et al., 2002). Η πρωτεΐνη RING3 (ανθρώπινο ομόλογο) συγκατακρυσμνίζεται με ρυθμιστικούς παράγοντες του κυτταρικού κύκλου (Denis et al., 2000). Το ομόλογο στον σακχαρομύκητα BDF1 επίσης σχετίζεται με μειωτικά και μιτωτικά χρωμοσώματα (Chua et al., 1995). Η μίτωση χαρακτηρίζεται από μαζική υποακετυλίωση και αποσύνδεση των περισσότερων bromodomain-containing πρωτεϊνών από την χρωματίνη που σχετίζεται με καθολική καταστολή της μεταγραφής. Σε αυτή την φάση οι κώδικες ακετυλίωσης των ιστονών διαγράφονται κατά την μίτωση και επαναγράφονται στα θυγατρικά κύτταρα. Η ελάχιστη ακετυλιωμένη χρωματίνη κατά την διάρκεια της μίτωσης μπορεί να συνεισφέρει στην μεταφορά κωδικών ιστονών στην επόμενη γενιά μέσω αλληλεπίδρασης με BET πρωτεΐνες (Dey et al., 2003).

Συμπερασματικά, οι πρωτεΐνες της οικογένειας BET είναι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την πρόσδεση σε ακετυλιωμένες λυσίνες ιστονών κυρίως σε καταστάσεις που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και κατά αντιστοιχία με άλλες bromodomain-containing πρωτεΐνες αποκωδικοποιούν τον κώδικα των ιστονών μετατρέποντας τα σινιάλα του σε λειτουργικές διεργασίες πρωτεϊνών (Agalioti et al., 2002). Η πρόσδεση σε μιτωτικά χρωμοσώματα είναι ένα διακριτικό χαρακτηριστικό της οικογένειας (Dey et al., 2003) ενώ διαφορετικά bromodomains διαφορετική εξειδίκευση για διαφορετικές ακετυλιωμένες λυσίνες ιστονών και αναγνωρίζουν τις διαφορετικές θέσεις ακετυλίωσης σαν διακριτά σινιάλα (Dey et al., 2003).

Επισώματα papillomavirus αν δεν είναι προσδεμένα στην χρωματίνη κατά την διάρκεια της μίτωσης θα μπορούσαν να βρεθούν στο κυτταρόπλασμα και να

γίνουν στόχος αποικοδόμησης. Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης E2 του ιού με την bromodomain-containing πρωτεΐνη Brd4 της οικογένειας BET -η οποία προσδένεται σε μιτωτικά χρωμοσώματα- σιγουρεύει ότι ο ιός περικλείεται στον νέο νουκλεϊκό φάκελο μετά την μίτωση. Προσδεδεδμένος στην E2 ιός αγκιστρώνεται στα μιτωτικά χρωμοσώματα μέσω της αλληλεπίδρασης Brd4 με E2 του ιού (You et al., 2004).

Μια πρωτεΐνη υποψήφια για αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης (PHD finger motif) αλληλεπιδρά με την VPg των rotoviruses και έχει επίδραση στην συστηματική μεταφορά του ιού και στην εκδήλωση των συμπτωμάτων (Dunover et al., 2004) αν και αφενός το μοτίβο αυτό είναι λειτουργικά άσχετο με το bromodomain και αφετέρου δεν υπάρχουν ενδείξεις για λειτουργική εξειδίκευση της πρωτεΐνης αυτής κατά την αναπροσαρμογή χρωματινικής δομής.

### **Χρωματίνη και RNAi**

Το ομόλογο του Ago1 στον *S. pombe* (Ago1) σχηματίζει ένα σύμπλοκο με μια chromodomain-containing πρωτεΐνη (Chp1) και με την πρωτεΐνη Tas3 (RITS, Verdel et al., 2004). Αντίθετα η RDRp (Rdp1) σχηματίζει σύμπλοκο (RDRC) με μια ελικάση (Hrr1) και μια RNA-binding πρωτεΐνη (Cid12) (Motamedi et al., 2004). Στο RITS εντοπίζονται siRNAs τα οποία δημιουργούνται με έναν εξαρτώμενο από την Dcr1 τρόπο (Verdel et al., 2004). Τα siRNAs αντιστοιχούν σε σιγημένες κεντρομερικά μετάγραφα και προέρχονται από την επεξεργασία αυτών των μεταγράφων (Verdel et al., 2004). Ενεργότητα RDRp έχει χαρακτηριστεί για την Rdp1 (Motamedi et al., 2004) η οποία είναι απαραίτητη για την δημιουργία των συνδεδεμένων με το RITS siRNAs (Sugiyama et al., 2005). Τα siRNAs αναγνωρίζουν και προσδένονται σε χρωματινικές περιοχές για να επάγουν ετεροχρωματινοποίηση (Verdel et al., 2004). Απουσία λειτουργικού RDRp συμπλόκου siRNAs δεν συγκατακρυνίζονται με το RITS (Motamedi et al., 2004). Το RNAi- μονοπάτι πρέπει να είναι άθικτο για μεθυλίωση ιστονών και πρόσδεση HP1 στην *Drosophila* (Pal-Bhadra et al., 2004).

Το Ago1 και οι άλλες πρωτεΐνες του RITS προσδένονται σταθερά σε όλες τις μονίμως ετεροχρωματινικές περιοχές στον *S. pombe* και η Rdp1 έχει βρεθεί συνδεδεμένη με τα σιγημένα κεντρομερή (Sugiyama et al., 2005).

Σε Knock-out Dcr1 (η Clr4, μια μεθυλτρανσφεράση H3-K9) υπάρχει απεντοπισμός του RITS από τα κεντρομερή, απουσία siRNAs από το RITS (τα οποία πλέον δεν συνεντοπίζονται με την Chp1, Verdel et al., 2004) και η Rdp1 δεν εντοπίζεται στα κεντρομερή (Sugiyama et al., 2005). Σαν αποτέλεσμα σε μεταλλάγματα Rdp1 δεν εντοπίζονται siRNAs στο RITS ενώ υπάρχει επίδραση στην

μεθυλίωση H3-K9 των ιστονών (Sugiyama et al., 2005). Το RNAi-μονοπάτι απαιτείται για την πρόσδεση του RITS με δομές ετεροχρωματινής (Verdel et al., 2004). Αντίθετα απουσία Hp1 ομολόγου δεν υπάρχουν αλλαγές στην μεθυλίωση ιστονών και στην πρόσδεση του RITS αλλά η Rdp1 δεν στοχεύεται στα κεντρομερη (Sugiyama et al., 2005). Η πρωτεΐνη Chr1 προσδένεται με τα siRNAs (Verdel et al., 2004). Σε αντίθεση με την παραπάνω κατάσταση (de novo αναπροσαρμογή δομής χρωματινής) σε περιπτώσεις προ-εγκατεστημένης σίγησης, η απουσία Chr1 και RNAi γονιδίων δεν έχει επίδραση στην αλλαγή του πρότυπο H3-K9 μεθυλίωσης (Sadaie et al., 2004). Απουσία Htt η cid12 έχει επίδραση στην σίγηση κεντρομερικών γονιδίων (Motamedi et al., 2004). Απουσία homeless (μηχανισμός RNAi στην *Drosophila*) έχει επίδραση στην κατανομή του HP1 στις ετεροχρωματινικές περιοχές (εντοπίζεται και σε ευχρωματινικές) ενώ μειώνεται η H3-K9 μεθυλίωση (Pal-Bhadra et al., 2004) ενώ και στα aubergine/piwi μεταλλάγματα έχουμε μερική αναστροφή της μεθυλίωσης ιστονών αλλά όχι επίδραση στην κατανομή HP1 υποδεικνύοντας την συσχέτιση μεθυλίωσης ιστονών και του RNAi-μονοπατιού

Συμπερασματικά η Rdp1 χρειάζεται για την στόχευση του RITS στα κεντρομερή αλλά και εξαρτάται από το RITS για να συνδεθεί με χρωματίνη (Sugiyama et al., 2005) ενώ φαίνεται να έχει ρόλο είτε στην δημιουργία των siRNAs είτε στην επαφή τους με το RITS (Motamedi et al., 2004). Το ago1 είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση του RDRp σύμπλοκου με το RITS (Motamedi et al., 2004) με αποτέλεσμα να υπάρχει δομική αλληλεπίδραση και λειτουργική συνάφεια ανάμεσα στα δυο σύμπλοκα ή οποία (αλληλεπίδραση) εξαρτάται από την Dicer και μια μεθυλτρανσφεράση ιστονών.

Μεταλλαγές σε γονίδια που σχετίζονται με τον μηχανισμό του RNAi στην *Drosophila* (piwi/homeless/aubergine) έχουν επίδραση στην σίγηση μέσω ετεροχρωματινοποίησης λόγω γειννίασης με ετεροχρωματινικές περιοχές (position effect variegation, Pal-Bhadra et al., 2004).

Το RITS σύμπλοκο περιέχει siRNAs τα οποία αντιστοιχούν σε όλους τους γνωστούς στόχους για απενεργοποίηση χρωματινής μέσω RNAi-σχετιζόμενης σίγησης.

Στην αναπροσαρμογή του γενόματος στην *Tetrahymena* και στην DNA μεθυλίωση αναμειγνύεται ένας RNAi συσχετιζόμενος μηχανισμός όπως φαίνεται από την συμμετοχή ενός Ago ομολόγου (Twi1p, Mochizuki et al., 2002). Πριν την εγκαθίδρυση των αναπροσαρμογών, μικρά RNA (~28 nt) κάνουν την εμφάνιση τους



(Mochizuki et al., 2002), τα οποία συγκατακρυμνίζονται με την Twi1p (Mochizuki and Gorovski, 2004) γεγονός που προσθέτει ρήγματα στην κρατούσα θεωρία για ανάμειξη DNA pairing στην DNA μεθυλίωση στον οργανισμό αυτό.

### **RNA binding μοτίβα:**

Διάφορες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην πρόσδεση RNA έχουν εμπλακεί και σε μονοπάτια που σχετίζονται με αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης όπως για παράδειγμα το LD (homeodomain πρωτεΐνη με RNA-binding ιδιότητες), το FCA και FPA που περιέχει RRM RNA-binding μοτίβα, το FLK με KH-motifs, το FY με ομολογία με RNA-binding παράγοντες πολυαδενυλίωσης. Στην περίπτωση αυτή όμως οι RNA-binding πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες για αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης δεν λειτουργούν γραμμικά στο ίδιο μονοπάτι (Simpson, 2004). Αντίθετα πρωτεΐνες που σχετίζονται με bromodomain-containing σύμπλοκα αναπροσαρμογής δομής χρωματίνης έχουν χαρακτηριστεί σαν RNA-binding πρωτεΐνες αλλά η εξειδίκευση της πρόσδεσης με RNA και ο ρόλος του RNA αυτού στην προσέλκυση της πρωτεΐνης σε συγκεκριμένους γονιδιακούς τόπους όπως και η σχέση της πρωτεΐνης αυτής με την προσέλκυση πρωτεϊνών αναπροσαρμογής δομής χρωματίνης και η πιθανή αποσιώπηση γονιδίων δεν έχει χαρακτηριστεί με ακρίβεια (Zhang et al., 2004).

Ένα εναλλακτικό μοντέλο για την δράση της Virp1 θα μπορούσε να είναι η πρόσδεση και η απομάκρυνση ενός ακετυλιωμένου παράγοντα αναπροσαρμογής χρωματίνης με στόχο την απομάκρυνση του από το σύμπλοκο, την απομάκρυνση μεθυλτρανσφερασών και HP1 και την αντικατάστασή τους από κατευθυνόμενες από πρωτεΐνες του ιού ακετυλτρανσφερασες (και την αναστολή της σίγησης γονιδίου κατά αντιστοιχία με την E1 πρωτεΐνη των αδενοϊών, Ghosh and Harter, 2003). Το μοντέλο αυτό στο οποίο οι αλλαγές στην δομή του συμπλοκου επιτελούνται κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου είναι ελκυστικό διότι υπάρχει απαίτηση για λειτουργική RNA polIII για την αντιγραφή του ιοειδούς.

Η πρωτεΐνη Virp1 αποκάλυψε την ύπαρξη ενός προηγουμένως μη χαρακτηρισμένου RNA binding μοτίβου (Martinez de Alba, 2003, Denti unpublished results) και είναι η πρώτη πρωτεΐνη της οικογένειας της για την οποία έχουν αποδοθεί

RNA binding ιδιότητες και πιθανή συμμετοχή στην αναπροσαρμογή χρωματινικών δομών. Ανάμεσα στις πιο χαρακτηρισμένες οικογένειες με RNA binding μοτίβα- με έμφαση στις οικογένειες που απαντώνται συχνότερα στο γένωμα της *Arabidopsis* (Lim et al., 2004) ανήκουν η οικογένεια με Puf μοτίβα, η οικογένεια με RRM μοτίβα, η οικογένεια με KH-μοτίβα, η οικογένεια με dsRBD μοτίβα (Eduards et al., 2001). Από την συζήτηση εξαιρούνται κυρίως πρωτεΐνες που συνδέονται με τον κλασσικό μεταβολισμό των RNA μορίων όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ωρίμανση των RNA, την νουκλεοκυττοπλασμική έξοδο, τον έλεγχο της πολυαδενυλίωσης κτλ (Stutz and Rosbash, 1998, Sandi-Goldi, 2004, Leary and Huang, 2001, Kusrsten et al., 2001). Το dsRBD (Saunders and Barber, 2003) εμφανίζεται σε μια ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών που δρουν σαν αισθητήρες RNA μορίων, όπως η PKR η οποία ανιχνεύει μόρια >30 nt και σχετίζεται με την απόκριση σε ιντερφερόνη και αντι-ϊική άμυνα, πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με RNA ιών όπως η TRBP που σχετίζεται με τον κύκλο ζωής του HIV, το Staufen (Macchi et al., 2004) που σχετίζεται με υποκυτταρικό εντοπισμό RNA μορίων, αλλά και πρωτεΐνες με πιθανό εντοπισμό στον πυρήνα με ρόλο στην σπερματογένεση, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο RNA editing (ADARs). Στην οικογένεια αυτή ανήκουν και διάφορες ελικάσες που σχετίζονται με μεταγραφική σίγηση, πρωτεΐνες που σχετίζονται με την βιογένεση miRNAs (HYL1) αλλά και πρωτεΐνες της οικογένειας της Dicer που συμμετέχουν στην μεταμεταγραφική σίγηση, στην βιογένεση ενδογενών siRNAs και miRNAs αλλά και συνδέουν γεγονότα που σχετίζονται με τροποποίηση RNA μορίων με την αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης. Το dsRNA μοτίβο γενικά δεν εμφανίζει εξειδίκευση αλληλουχίας (Ramanathan et al., 2003). Από την άλλη πλευρά πολλοί φυτικοί ιοί κωδικοποιούν για dsRNA binding πρωτεΐνες για τις οποίες υπάρχουν ενδείξεις ότι ένας από τους ρόλους τους είναι να δρουν σαν αναστολείς σίγησης πιθανόν επειδή υπάρχει ανταγωνισμός υποστρώματος με τις dsRNA πρωτεΐνες του μηχανισμού της σίγησης (Lichner et al., 2003).

Εναλλακτικά binding μοτίβα για πρόσδεση δίκλωνου RNA περιλαμβάνουν C2H2 ZF μοτίβα (τα οποία είναι dsDNA binding μοτίβα αν και ορισμένες φορές έχουν RNA binding ιδιότητες) ενώ και άλλα zinc finger μοτίβα (που παραδοσιακά χαρακτηρίζονται σαν αλληλεπιδρώντα με γενωμικό DNA) έχουν RNA binding ιδιότητες (ή ακόμα και lysine-rich μοτίβα όπως στην πρωτεΐνη TRIP που σχετίζεται με τον κύκλο ζωής του HIV). Η πρωτεΐνη Hua1 αν και περιέχει zinc fingers δεν παρουσιάζει DNA binding ιδιότητες και μάλλον πρόκειται για μια RNA binding

πρωτεΐνη που έχει σχέση με την μεταμεταγραφική ρύθμιση μεταγράφων που σχετίζονται με την ρύθμιση της άνθησης στα φυτά (Li et al., 2001).

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες κατηγορίες το μοτίβο RRM (Scomburg et al., 2001) αναγνωρίζει μονόκλωνο RNA και αποτελείται από ένα σύνολο μη φορτισμένων υδροφοβικών αμινοξέων. Το γεγονός ότι υπάρχει ετερογένεια στην αλληλουχία των αμινοξέων υποδεικνύει όπως στην περίπτωση της Virp1 ότι απαιτείται μια κάποια χαλαρή συντήρηση για λειτουργική εξειδίκευση των μελών της οικογένειας στην πρόσδεση διαφορετικών RNA μορίων. Το KH-μοτίβο απαντάται σε πολλαπλές κόπιες ανά πρωτεΐνη και σχετίζεται με μεταγραφική ωρίμανση πρωτεϊνών, με τον μηχανισμό ματίσματος, νουκλεοκυττοπλασμική μεταφορά, έλεγχο σταθερότητας μεταγράφου, μεταφραστική σίγηση (Lim et al., 2004). KH- μοτίβα για παράδειγμα έχουν χαρακτηριστεί στις πρωτεΐνες FLK και HEN4 (Cheng et al., 2003) που σχετίζονται με την ρύθμιση του FLC κατά την άνθηση (Lim et al., 2004). Φαίνεται ότι το KH-μοτίβο και το CCCH RNA binding μοτίβο απαντώνται σε πρωτεΐνες που συνεργάζονται μεταξύ τους σε διάφορα αναπτυξιακά προγράμματα (Cheng et al., 2003). Τα KH-μοτίβα χαρακτηρίζονται από μια αλληλουχία υδροφοβικών αμινοξέων, ένα τμήμα GLY-x-x-GLY και μια λούπα και επίσης παρουσιάζουν συνάφεια με μονόκλωνο RNA (Cheng et al., 2003). Το PUF μοτίβο είναι ένα δομικό μοτίβο που σχετίζεται με πρόσδεση RNA και το οποίο έχει δομικές ομοιότητες με μοτίβα που έχουν σχέση με την πρόσδεση πρωτεϊνών (Eduards et al., 2001), ενώ το πρώτο μέλος της οικογένειας (Pumillio) συμμετέχει μαζί με το Nanos στο μεταμεταγραφικό εντοπισμό (targeting) RNA μορίων. Φυσικά εκτός από τις παραπάνω οικογένειες υπάρχουν και άλλες π.χ. με RGG μοτίβα (Lansberg et al., 2002), DEAD-box μοτίβα, zinc knuckles κτλ που δεν αναλύονται στην παρούσα μελέτη (Lim et al., 2004). Φυσικά έχουν περιγράψει περιπτώσεις κατά τις οποίες ένα binding μοτίβο σε επίπεδο RNA έχει συσχετιστεί με μια κυτταρική λειτουργία π.χ. το RRE RNA μοτίβο το οποίο συμμετέχει στην έξοδο RNA (env RNA HIV) από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω της REV (Stutz and Rosbash, 1998) ενώ αρκετά παραδείγματα πρωτεϊνών που σχετίζονται με αναγνώριση και έξοδο από τον πυρήνα έχουν περιγράψει (όπως π.χ. η exportin 5, η οποία είναι μια RNA binding πρωτεΐνη που εκτός των άλλων συμμετέχει στην έξοδο των προδρόμων των miRNAs, Bohnsack et al., 2004). Ελάχιστα, σποραδικά παραδείγματα έχουν χαρακτηριστεί κατά τα οποία η πρωτεΐνη μέσω μιας αυτορυθμιστικής λούπας συμμετέχει στην ρύθμιση του δικού της RNA όπως η περίπτωση του FCA (McDonald and McMahan, 2003).

Η πρωτεΐνη διακυτταρικής μεταφοράς (movement protein) του TBSV (p19) έχει την δυνατότητα να αλληλεπιδρά με έναν Homeodomain-containing μεταγραφικό παράγοντα (Desvoyes et al., 2002). Στην περίπτωση αυτή όμως η ύπαρξη ενός παραγωγικού συμπλόκου στο οποίο συμμετέχουν μια RNA binding πρωτεΐνη με ένα homeodomain έχει ρόλο στην μεταφορά του ιού χρησιμοποιώντας πιθανώς την ικανότητα μεταφοράς της πρωτεΐνης του ξενιστή. Άλλες movement πρωτεΐνες ιών όπως η αντίστοιχη του TSWV αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες της DNAJ οικογένειας οι οποίες εμπλέκονται στην ενδοκυτταρική μεταφορά και ίσως συμμετέχουν στην μεταφορά του ιού (Soellick et al., 2000). Με δεδομένο ότι οι DNAJ πρωτεΐνες έχουν ικανότητα πρόσδεσης με τις HSP-70 chaperones οι οποίες εντοπίζονται στο φλοιώμα ενώ ο BYV κωδικοποιεί στο γένωμα του ένα ομόλογο HSP-70 (με δυνατότητα πρόσδεσης με τον κυτταροσκελετό, Karasev et al., 1992), οι πρωτεΐνες αυτές ίσως συμμετέχουν στην συστηματική μεταφορά ιών. Αντίθετα άλλες κατηγορίες HSP ομολόγων έχουν σχέση με περιορισμό της συστηματικής μεταφοράς ιών μέσω του φλοιώματος όπως η RTM1/RTM2 στην περίπτωση rotoviruses (TEV) στην Arabidopsis (Chischolm et al., 2001). Στον πίνακα 1 περιγράφονται μερικές αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών ιού με πρωτεΐνες ξενιστή (από Orarka, 2004 με τροποποιήσεις)

Virus	Host protein	Putative function
	<b>Chaperones</b>	
TSWV	DNAJ-like	Chaperone (regulator of HSP70)
TSWV	DNAJ-like	Chaperone
PMTV (TGB 2)	DNAJ-like	Chaperone
	<b>Nucleus</b>	
ToMV	KELP	Transcriptional co-activator of pathogenesis-related protein
ToMV	MBF1	Transcriptional co-activator
TBSV	HFI22	Homeodomain protein (leucine zipper)
GRV (ORF 3)	Fibrillarin	Unknown
TBSV (19K)	REF	Transcriptional co-activator, RNA export factor
	<b>Cytoskeleton</b>	
TMV	Actin	vRNA movement
TMV	Tubulin	vRNA movement
TMV	Tubulin	vRNA degradation
TMV	MPB2C	Negative regulator of MP function
TSWV	At4/1	Limited homology to myosin or kinesin
	<b>Vesicle trafficking</b>	
GFLV	KNOLLE	t-SNARE (syntaxin)
GRV (ORF 3)	Unknown	RNA and vesicle trafficking (N-terminal Rab sequence)
CaMV	MP 17	Rab receptor (homology to rat PRA1)
	<b>PD and cell periphery</b>	
TMV	PME	MP-PD interaction (pectin esterification)
TVCV	PME	MP-PD interaction
CaMV	PME	MP-PD interaction
TCV	AtP8	Unknown (contains RGD motifs)
PVX (triple-gene-block-interacting proteins)	TIPs	Interact with $\beta$ -1,3-glucanase

Πίνακας 3. Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών ξενιστή με φυτικούς ιούς (από Orarka et al., 2004).

Έχει περιγράψει η αλληλεπίδραση ενός SWI/SNF σύμπλοκου -ATP εξαρτώμενη αναπροσαρμογή χρωματίνης- ομολόγου στην Arabidopsis με την RNA binding πρωτεΐνη FCA στην ρύθμιση της άνθησης (Sarnowski et al., 2002).

Παραδείγματα πρωτεϊνών με bromodomain που αλληλεπιδρούν με ακετυλιωμένες πρωτεΐνες ιών έχουν περιγράψει για παράδειγμα στην αλληλεπίδραση του PCAF bromodomain με ακετυλιωμένη Tat του HIV (Mujtaba et al., 2002).

**Γενικά συμπεράσματα για την ρύθμιση της έκφρασης RNA binding πρωτεϊνών.** Εκτός από την αναπτυξιακή ρύθμιση που περιγράφηκε παραπάνω, συχνά RNA binding πρωτεΐνες απαντώνται σε αναπτυσσόμενους και διαιρούμενους ιστούς (Suzuki et al, 2000, Hecht et al, 1997). Το abscisic acid έχει επίδραση στην επαγωγή πολλών RNA binding πρωτεϊνών (Hugouvieux et al, 2002 )

**Περιπτώσεις πρωτεϊνών με μοτίβα που σχετίζονται με αναπροσαρμογή δομής χρωματίνης ή μεταγραφικούς παράγοντες με ικανότητα διακυτταρικής μεταφοράς στα φυτά.** Πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες στα φυτά έχουν ικανότητα μεταφοράς από το κύτταρο στο οποίο παράγονται, αν και ο φυσιολογικός ρόλος της μεταφοράς αυτής τις περισσότερες των περιπτώσεων –αν υπάρχει- είναι ομιχλώδης. Το Knotted1 κωδικοποιεί για ένα Homeodomain-containing μεταγραφικό παράγοντα. Η πρωτεΐνη του Knotted1 έχει την ικανότητα να μεταφέρει το RNA του Knotted1 και μάλιστα με έναν εξαρτώμενο από την ύπαρξη του homeodomain τρόπο (Lucas et al., 1995, Jackson, 2002, Kim et al., 2003). Άλλοι μεταφερόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες είναι το MADS domain containing Deficiens και Globosa (Perbal et al., 1996), το MADS domain containing Apetala3, το pistillata, το Leavy (Wu et al, 2003), το GRAS family Short Root (Lucas and Lee, 2004), Nac domain πρωτεΐνες (CmNACP, Rouiz-Medrano, 1999). Γενικά πρωτεΐνες μέχρι 50 kDa έχουν την ικανότητα μη εξειδικευμένης συμπλασμικής μεταφοράς, διαδικασία που είναι αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη και εξαρτάται από την δομή των πλασμοδεσμάτων, η οποία είναι συνάρτηση της αποδέκτη ή αρωγού κατάστασης του φύλλου (sink-source, Orarka et al., 1999). Δηλαδή μόνο σε φύλλα αποδέκτες φωτοσυνθετικών προϊόντων η δίοδος μακρομορίων μέχρι 50 kDa είναι ελεύθερη.

Ανεξάρτητα η όχι από την φυσιολογική τους λειτουργική σημασία, οι μεταφερόμενες αυτές πρωτεΐνες ίσως προσφέρουν οχήματα για την συστηματική μεταφορά RNA παθογόνων στα φυτά όπως έχει αποδειχθεί και για άλλες πρωτεΐνες με ρόλο στην συστηματική μεταφορά των ιών.

1. Agalioti, T., Chen, G. and Thanos., D. (2002) Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*, **111**, 381–392.
2. Akhtar, A., Zink, D. and Becker, P.B. (2000) Chromodomains are protein–RNA interaction modules. *Nature*, **407**, 405-409.
3. Angell, S.M. and C.Baulcombe, D. (1997) Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO J.*, **16**, 3675–3684.
4. Angell, S.M. and Baulcombe, D.C. (1999) Technical advance: potato virus X amplicon-mediated silencing of nuclear genes. *Plant J*, **20**, 357-362.
5. Atkinson, R.G., Bielecki, L., Gleave, A.P., Janssen, B.-J. and Morris, B. (1998) Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in petunia using a geminivirus based episomal vector. *Plant J*, **15**, 593-604.
6. Autran, D., Huanca-Mamani, W. and Vielle-Calzada, J.-P. (2005) Genomic imprinting in plants: the epigenetic version of an Oedipus complex. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 19-25.
7. Baulcombe, D., Chapman, S. and Santa-Cruz, S. (1995) Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J*, **7**, 1045-1053.
8. Baulcombe, D.C. (1996) Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. *Plant Cell*, **8**, 1833-1844.
9. Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, **431**, 356-363.
10. Baumstark, T., Schroder, A.R. and Riesner, D. (1997) Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.*, **16**, 599–610.
11. Beclin, C., Boutet, S., Waterhouse, P. and Vaucheret, H. (2002) A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr Biol*, **12**, 684-688.
12. Berger, F. (2004) Imprinting—a Green Variation. *Science*, **303**, 483-485.

13. Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
14. Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. and Gorlich, D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, **10**, 185-191.
15. Bouche, N. and Fromm, H. (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends in plant science*, **9**, 110-115.
16. Boutet, S., Vazquez, F., Liu, J., Beclin, C., Fagard, M., Gratias, A., Morel, J.B., Crete, P., Chen, X. and Vaucheret, H. (2003) Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Curr Biol*, **13**, 843-848.
17. Brault, V., Pfeffer, S., Erdinger, M., Mütterer, J. and Ziegler-Graff, V. (2002) Virus-induced gene silencing in transgenic plants expressing the minor capsid protein of Beet western yellows virus. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**, 799-807.
18. BRAUNSTEIN, T.H., MOURY, B., JOHANNESSEN, M. and ALBRECHTSEN, M. (2002) Specific degradation of 39 regions of GUS mRNA in posttranscriptionally silenced tobacco lines may be related to 59-39 spreading of silencing. *RNA*, **8**, 1034–1044.
19. Brigneti, G., Martin-Hernandez, A.M., Jin, H., Chen, G., Baulcombe, D., Baker, B. and Jones, J. (2004) Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J*, **39**, 264-272.
20. Brummell, D.A., Balint-Kurti, P.J., Harpster, M.H., Palys, J.M., Oeller, P.W. and Gutterson, N. (2003) Inverted repeat of a heterologous 3'-untranslated region for high-efficiency, high-throughput gene silencing. *Plant J*, **33**, 793-800.
21. Burch-Smith, T.M., Anderson, J.C., Martin, G.B. and Dinesh-Kumar, S.P. (2004) Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J*, **39**, 734–746.
22. Burton, R.A., Gibeaut, D.M., Bacic, A., Findlay, K., Roberts, K., Hamilton, A., Baulcombe, D.C. and Fincher, G.B. (2000) Virus-Induced Silencing of a Plant Cellulose Synthase Gene. *Plant Cell*, **12**, 691–705.
23. Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q. and Hannon, G.J. (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem

- cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*, **16**, 2733-2742.
24. Chan, S.W.-L., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L.K., Carrington, J.C. and Jacobsen, S.E. (2004) RNA Silencing Genes Control de Novo DNA Methylation. *Science*, **303**, 1336.
  25. Chang, J., Provost, P. and Taylor, J.M. (2003) Resistance of Human Hepatitis Delta Virus RNAs to Dicer Activity. *JOURNAL OF VIROLOGY*, **77**, 11910–11917.
  26. Chapman, E.J., Prokhnevsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V. and Carrington, J.C. (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.*, **18**, 1179–1186
  27. Chen, S., Hofius, D., Sonnewald, U. and Bomke, F. (2003) Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double stranded RNA. *Plant J*, **36**, 731-740.
  28. Chen, X. (2004) A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in Arabidopsis Flower Development. *Science*, **303**, 2022-2025.
  29. Cheng, Y., Kato, N., Wang, W., Li, J. and Chen, X. (2003) Two RNA Binding Proteins, HEN4 and HUA1, Act in the Processing of AGAMOUS Pre-mRNA in Arabidopsis thaliana. *Developmental Cell*, **4**, 53–66.
  30. Chisholm, S.T., Parra, M.A., Anderberg, R.J. and Carrington, J.C. (2001) Arabidopsis RTM1 and RTM2 Genes Function in Phloem to Restrict Long-Distance Movement of Tobacco Etch Virus1. *Plant Physiol.*, **127**, 1667–1675.
  31. Chomczynske, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.*, **162**, 156-159.
  32. Chua, P. and Roeder., G.S. (1995) Bdf1, a yeast chromosomal protein required for sporulation. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3685–3696.
  33. CROWLEY, T.E., KAINE, E.M., YOSHIDA, M., NANDI, A. and WOLGEMUTH, D.J. (2002) Reproductive Cycle Regulation of Nuclear Import, Euchromatic Localization, and Association with Components of Pol II Mediator of a Mammalian Double-Bromodomain Protein. *Molecular Endocrinology*, **16**, 1727–1737.
  34. CULVER, J.N. (1996) Tobamovirus Cross Protection Using a Potexvirus Vector. *Virology*, **226**, 228–235.
  35. Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (2000)



- An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, **101**, 543-553.
36. Dalmay, T., Hamilton, A., Mueller, E. and Baulcombe, D.C. (2000) Potato virus X amplicons in Arabidopsis mediate genetic and epigenetic gene silencing. *Plant Cell*, **12**, 369-379.
  37. Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H. and Baulcombe, D.C. (2001) SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Embo J*, **20**, 2069-2078.
  38. Daros, J.-A. and Flores, R. (2004) Arabidopsis thaliana has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *PNAS*, **101**, 6792–6797.
  39. De Buck, S. and Depicker, A. (2001) Disruption of their palindromic arrangement leads to selective loss of DNA methylation in inversely repeated GUS transgenes in Arabidopsis. *Mol Gen Genet*, **265**, 1060-1068.
  40. Dellaporta, Wood and Hicks. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Reporter*, **4**, 19-21.
  41. Denis, G., Vaziri, C., Guo, N. and Faller, D. (2000) RING3 kinase transactivates promoters of cell cycle regulatory genes through E2F. *Cell Growth Differ.*, **11**, 417–424.
  42. Denti, M., Boutla, A., Tsagris, M. and Tabler, M. (2004) Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *Plant J*, doi: 10.1111/j1365-313x.2004.02001.x
  43. Desvoyes, B., Faure-Rabasse, S., Chen, M.H., Park, J.W. and Scholthof, H.B. (2002) A novel plant homeodomain protein interacts in a functionally relevant manner with a virus movement protein. *Plant Physiol*, **129**, 1521-1532.
  44. Dey, A., Ellenberg, J., Farina, A., Coleman, A.E., Maruyama, T., Sciortino, S., Lippincott-Schwartz, J. and Ozato, K. (2000) A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G2-to-M transition. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 6537–6549.
  45. Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T. and Ozato, K. (2003) The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *PNAS*, **100**, 8758–8763.
  46. Dieffenbach, C.W. and Dveksler, G.S. (1995) *PCR Primer: A Laboratory*

- Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Press, Cold Spring Harbor, New York.
47. Dieguez, M.J., Bellotto, M., Afsar, K., Mittelsten Scheid, O. and Paszkowski, J. (1997) Methylation of cytosines in nonconventional methylation acceptor sites can contribute to reduced gene expression. *Mol Gen Genet*, **253**, 581-588.
  48. Dieguez, M.J., Vaucheret, H., Paszkowski, J. and Mittelsten Scheid, O. (1998) Cytosine methylation at CG and CNG sites is not a prerequisite for the initiation of transcriptional gene silencing in plants, but it is required for its maintenance. *Mol Gen Genet*, **259**, 207-215.
  49. Ding, B., Kwon, M.O., Hammond, R. and Owens, R. (1997) Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant J*, **12**, 931-936.
  50. Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D.R. (1980) *PNAS*, **77**, 7347-7351.
  51. Doench, J.G., Petersen, C.P. and Sharp, P.A. (2003) siRNAs can function as miRNAs. *GENES & DEVELOPMENT*, **17**, 438-442.
  52. Doi, N., Zenno, S., Ueda, R., Ohki-Hamazaki, H., Ui-Tei, K. and Saigo, K. (2003) Short-Interfering-RNA-Mediated Gene Silencing in Mammalian Cells Requires Dicer and eIF2C Translation Initiation Factors. *Current Biology*, **13**, 41-46.
  53. Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-6145.
  54. Dunoyer, P., Thomas, C., Harrison, S., Revers, F. and Maule, A. (2004) A Cysteine-Rich Plant Protein Potentiates Potyvirus Movement through an Interaction with the Virus Genome-Linked Protein VPg. *JOURNAL OF VIROLOGY*, **78**, 301-2309.
  55. Dunoyer, P., Lecellier, C.-H., Parizotto, E.A., Himber, C. and Voinnet, O. (2004) Probing the MicroRNA and Small Interfering RNA Pathways with Virus-Encoded Suppressors of RNA Silencing. *Plant Cell*, **16**, 1235-1250.
  56. Duxbury, M.S. and Whang, E.E. (2004) RNA Interference: A Practical Approach. *Journal of Surgical Research*, **117**, 339-344.
  57. Edwards, T.A., Pyle, S.E., Wharton, R.P. and Aggarwal, A.K. (2001) Structure of Pumilio Reveals Similarity between RNA and Peptide Binding Motifs. *Cell*, **105**, 281-289.

58. Elmayan, T. and Vacheret, H. (1996) Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant Journal*, **9**, 787-797.
59. English, J.J., Mueller, E. and Baulcombe, D.C. (1996) Suppression of Virus Accumulation in Transgenic Plants Exhibiting Silencing of Nuclear Genes. *Plant Cell*, **8**, 179-188.
60. English, J.J. and Baulcombe, D. (1997) The influence of small changes in transgene transcription on homology-dependent virus resistance and gene silencing. *Plant J*, **12**, 1311-1318.
61. Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C. and Vaucheret, H. (2000) AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11650-11654.
62. Faivre-Rampant, O., Gilroy, E.M., Hrubikova, K., Hein, I., Millam, S., Loake, G.J., Birch, P., Taylor, M. and Lacomme, C. (2004) Potato Virus X-Induced Gene Silencing in Leaves and Tubers of Potato. *Plant Physiology*, **134**, 1308–1316.
63. Feldstein, P.A., Hu, Y. and Owens, R.A. (1998) Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6560-6565.
64. 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 Res*, **29**, 4589-4597.
65. Finnegan, E.J., Margis, R. and Waterhouse, P.M. (2003) Posttranscriptional Gene Silencing Is Not Compromised in the Arabidopsis CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) Mutant, a Homolog of Dicer-1 from Drosophila. *Curr Biol*, **13**, 236-240.
66. Fischle, W., Wang, Y. and Allis, D. (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Current Opinion in Cell Biology*, **15**, 172–183.
67. Florence, B. and Faller, D. (2001) You-BET-CHA: A novel family of transcriptional regulators. *Front Biosci*, **6**, D1008-1018.
68. Flores, R., Delgado, S., Gas, M.-E., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S. and Pena, M.D.I. (2004) Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Letters*, **567**, 42–48.

69. Flores, R., Hernandez, C., Martinez de Alba, A.E., Daros, J.-A. and Serio, F.D. (2005) Viroids and viroid-hosts interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **43**, 4.1-4.23.
70. Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *PNAS*, **80**, 4803-4807.
71. Fry, C. and Peterson, C. (2001) Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr Biol*, **11**, R185–R197.
72. Fulton, T., Chunwongse, J. and Tanksley, S. (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Reporter*, **13**, 207-209.
73. Gast, F.U., Kempe, D. and Sanger, H.L. (1998) The dimerization domain of potato spindle tuber viroid, a possible hallmark for infectious RNA. *Biochemistry*, **37**, 14098-14107.
74. Ghosh, M.K. and Harter, M.L. (2003) A Viral Mechanism for Remodeling Chromatin Structure in G0 Cells. *Molecular Cell*, **12**, 255–260.
75. Gossele, V., Fache, I., Meulewaeter, F., Cornelissen, M. and Metzlauff, M. (2002) SVISS – a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants. *Plant J*, **32**, 859–866.
76. Gozmanova, M., Denti, M.A., Minkov, I.N., Tsagris, M. and Tabler, M. (2003) Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of potato spindle tuber viroid RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5534-5543.
77. Garcia-Perez, R.D., Van Houdt, H. and Depicker, A. (2004) Spreading of post-transcriptional gene silencing along the target gene promotes systemic silencing. *Plant J*, doi: 10.1111/j1365-313x.2004.02067.x
78. Guo, H.S. and Ding, S.W. (2002) A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *Embo J*, **21**, 398-407.
79. Guo, H.S., Fei, J.-F., Xie, Q. and Chua, N.-H. (2003) A chemical regulated inducible RNAi system in plants. *Plant J*, **34**, 383-392.
80. Hall, I.M., Noma, K.-I. and Grewal, S.I.S. (2003) RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *PNAS*, **100**, 193–198.

81. Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D. (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J*, **21**, 4671-4679.
82. Hammond, R.W. (1994) Agrobacterium-mediated inoculation of PSTVD cDNAs onto tomato reveals the biological effect of apparently lethal mutations. *Virology*, **201**, 36-45.
83. Han, Y. and Grierson, D. (2002) Relationship between small antisense RNAs and aberrant RNAs associated with sense transgene mediated gene silencing in tomato. *Plant J*, **29**, 509-519.
84. Han, Y., Griffiths, A., Li, H. and Grierson, D. (2004) The effect of endogenous mRNA levels on co-suppression in tomato. *FEBS Letters*, **563**, 123-128.
85. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
86. Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F.R. (1991) Plasmid transformation of E. coli and other bacteria. *Methods Enzymol.*, **204**, 63-113.
87. Hecht, V., Stiefel, V., Delseny, M. and Gallois, P. (1997) A new Arabidopsis nucleic-acid-binding protein gene is highly expressed in dividing cells during development. *Plant Mol Biol*, **34**, 119-124.
88. Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. and Mullineaux, P.M. (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol*, **42**, 819-832.
89. Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T. and Baulcombe, D.C. (2005) RNA Polymerase IV Directs Silencing of endogenous DNA. *Science* 29, in press. Published online: February 24, 2005. 10.1126/science.1106910.
90. Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. and Voinnet, O. (2003) Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO Journal*, **22**, 4523-4533.
91. Holton, T.A. and Graham, M.W. (1991.) A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1154.
92. Horn, P. and Peterson, C. (2001) The bromodomain: A regulator of ATP-dependent chromatin remodeling? *Front Biosci.*, **6**, D1019-1023.
93. Hu, Y., Feldstein, P.A., Bottino, P.J. and Owens, R.A. (1996) Role of the variable domain in modulating potato spindle tuber viroid replication.

- Virology*, **219**, 45-56.
94. Hu, Y., Feldstein, P.A., Hammond, J., Hammond, R.W., Bottino, P.J. and Owens, R.A. (1997) Destabilization of potato spindle tuber viroid by mutations in the left terminal loop. *J Gen Virol*, **78**, 1199-1206.
  95. Hugouvieux, V., Murata, Y., Young, J.J., Kwak, J.M., Mackesy, D.Z. and Schroeder, J.I. (2002) Localization, ion channel regulation, and genetic interactions during abscisic acid signaling of the nuclear mRNA cap-binding protein, ABH1. *Plant Physiol.*, **130**, 1276-1287.
  96. Hunter, C., Sun, H. and Poethig, R.S. (2003) The Arabidopsis Heterochronic Gene ZIPPY Is an ARGONAUTE Family Member. *Current Biology*, **13**, 1734-1739.
  97. Ingelbrecht, I., Van Houdt, H., Van Montagu, M. and Depicker, A. (1994) Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10502-10506.
  98. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sinsky, J.J. and White, T.J. (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, California.
  99. Itaya, A., Matsuda, Y., Gonzales, R.A., Nelson, R.S. and Ding, B. (2002) Potato spindle tuber viroid Strains of Different Pathogenicity Induces and Suppresses Expression of Common and Unique Genes in Infected Tomato. *MPMI*, **15**, 990–999.
  100. Jackson, D. (2002) Double Labeling of KNOTTED1 mRNA and Protein Reveals Multiple Potential Sites of Protein Trafficking in the Shoot Apex. *Plant Physiol.*, **129**, 1423–1429.
  101. Jakowitsch, J., Papp, I., Moscone, E.A., van der Winden, J., Matzke, M. and Matzke, A.J. (1999) Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. *Plant J*, **17**, 131-140.
  102. Jiang, Y., Veschambre, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Conaway, J., Conaway, R. and Kornberg, R. (1998) Mammalian mediator as an end-point of signal transduction pathways. *PNAS*, **95**, 8538–8543.
  103. Jones, M.H., Numata, M. and Shimane, M. (1997) Identification and Characterization of BRDT: A Testis-Specific Gene Related to the Bromodomain Genes RING3 and Drosophila fsh. *GENOMICS*, **45**, 529–534.

104. Jones, A.L., Thomas, C.L. and Maule, A.J. (1998) De novo methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *Embo J*, **17**, 6385-6393.
105. Jones, L., Hamilton, A.J., Voinnet, O., Thomas, C.L., Maule, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999) RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell*, **11**, 2291-2301.
106. Jones, M.H., Hamana, N., Nezu, J.i. and Shimane, M. (2000) A novel family of Bromodomain genes. *Genomics*, **63**, 40-45.
107. Jones, M.H., Hamana, N. and Shimane, M. (2000) Identification and Characterization of BPTF, a Novel Bromodomain Transcription Factor. *Genomics*, **63**, 35–39.
108. Jones, L., Ratcliff, F. and Baulcombe, D.C. (2001) RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol*, **11**, 747-757.
109. Jones-Rhoades, M.W. and Bartel, D.P. (2004) Computational Identification of Plant MicroRNAs and Their Targets, Including a Stress-Induced miRNA. *Molecular Cell*, **14**, 787–799.
110. Kalantidis, K., Psaradakis, S., Tabler, M. and Tsagris, M. (2002) The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**, 826-833.
111. Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M. and Rajewsky, K. (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *GENES & DEVELOPMENT*, **19**, 489–501.
112. Karasev, A.V., Kashina, A.S., Gelfand, V.I. and Dolja, V.V. (1992) *FEBS Lett.*, **304**, 12–14.
113. Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A. and Carrington, J.C. (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell*, **4**, 205-217.
114. Kaufman, D.L. and Evans, G.A. (1990) Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *BioTechniques*, **9**, 304-306.
115. Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J. and

- Plasterk, R.H. (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*, **15**, 2654-2659.
116. Kidner, C.A. and Martienssen, R.A. (2004) Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature*, **428**, 81-84.
117. Kim, J.-Y., Yuan, Z. and Jackson, D. (2003) Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in Arabidopsis. *Development*, **130**, 4351-4362.
118. Kjemtrup, S., Sampson, K., Peele, C., Nguyen, L., Conkling, M., Thompson, W. and Robertson, D. (1998) Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *Plant J*, **14**, 91-100.
119. Knight, S.W. and Bass, B.L. (2001) A Role for the RNase III Enzyme DCR-1 in RNA Interference and Germ Line Development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **293**, 2269-2271.
120. Krajewski, W.A., Nakamura, T., Mazo, A. and Canaani, E. (2005) A Motif within SET-Domain Proteins Binds Single-Stranded Nucleic Acids and Transcribed and Supercoiled DNAs and Can Interfere with Assembly of Nucleosomes. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, **25**, 1891–1899.
121. Kuersten, S., Ohno, M. and Mattaj, I.W. (2001) Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *TRENDS in Cell Biology*, **11**, 497-503.
122. Kumagai, M.H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. and Grill, L.K. (1995) Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus derived RNA. *PNAS*, **92**, 1679-1683.
123. Lachner, M. and Jenuwein, T. (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Current Opinion in Cell Biology*, **14**, 286–298.
124. Lacomme, C., Hrubikova, K. and Hein, I. (2003) Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats. *Plant J*, **34**, 543–553.
125. Ladurner, A.G., Inouye, C., Jain, R. and Tjian., R. (2003) Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell*, **11**, 365–376.
126. Landsberger, M., Lorkovi, Z.J. and Oelmüller., R. (2002.) Molecular characterization of nucleus-localized RNA-binding proteins from higher plants. *Plant Molecular Biology*, **48**, 413–421.



127. Leary, D.J. and Huang, S. (2001) Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS Letters*, **509**, 145-150.
128. Lee, Y.S., Nakahar, K., Pham, J.W., Kim, K., Sontheimer, E.J. and Carthew, R.W. (2004) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, **117**, 69–81.
129. Li, J., Jia, D. and Chen, X. (2001) HUA1, a Regulator of Stamen and Carpel Identities in Arabidopsis, Codes for a Nuclear RNA Binding Protein. *The Plant Cell*, **13**, 2269–2281.
130. LI, H., LUO, J., HEMPHILL, J.K., WANG, J.-T. and GOULD, J.H. (2001) A Rapid and High Yielding mDinNiprAep Miniprep for Cotton (*Gossypium* spp.). *Plant Mol Biol Reporter*, **19**, 183a–183e.
131. Li, J.-Y., Lees-Murdockb, D.J., Xua, G.-L. and Walsh, C.P. (2004) Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics*, **84**, 952– 960.
132. Lichner, Z., Silhavy, D. and Burgyan, J. (2003) Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. *Journal of General Virology*, **84**, 975–980.
133. Lim, M.-H., Kim, J., Kim, Y.-S., Chung, K.-S., Seo, Y.-H., Lee, I., Kim, J., Hong, C.B., Kim, H.-J. and Park, C.-M. (2004) A New Arabidopsis Gene, FLK, Encodes an RNA Binding Protein with K Homology Motifs and Regulates Flowering Time via FLOWERING LOCUS C. *The Plant Cell*.(www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.019331.)
134. Limpens, E., Ramos, J., Franken, C., Raz, V., Compaan, B., Franssen, H., Bisseling, T. and Geurts, R. (2004) RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 983-992.
135. Liu, Q., Singh, S.P. and Green, A.G. (2002) High-Stearic and High-Oleic Cottonseed Oils Produced by Hairpin RNA-Mediated Post-Transcriptional Gene Silencing. *Plant Physiol*, **129**, 1732–1743.
136. Liu, Y., Schiff, M. and Dinesh-Kumar, S.P. (2002) Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal*, **31**, 777-786.
137. Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R. and Dinesh-Kumar, S.P. (2002) Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, **30**, 415-429.

138. Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.-E., Smith, D.P. and Wang, X. (2003) R2D2, a Bridge Between the Initiation and Effector Steps of the *Drosophila* RNAi Pathway. *Science*, **301**, 1921-1925.
139. Liu, Y., Schiff, M. and Dinesh-Kumar, S.P. (2004) Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WYRK/MYM transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, **38**, 800-809.
140. Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA Targets Directed by a Class of Arabidopsis miRNA. *Science*, **297**, 2053-2056.
141. Lo, C., Wang, N. and Lam, E. (2005) Inducible double-stranded RNA expression activates reversible transcript turnover and stable translational suppression of a target gene in transgenic tobacco. *FEBS Letters*.(doi:10.1016/j.febslet.2005.01.062)
142. Lu, R., Martin-Hernandez, A.M., Peart, J.R., Malcuit, I. and Baulcombe, D.C. (2003) Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, **30**, 296–303.
143. Lu, R., Malcuit, I., Moffett, P., Ruiz, M.T., Peart, J., Wu, A.-J., Rathjen, J.P., Bendahmane, A., Day, L. and Baulcombe, D. (2003) High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO Journal*, **22**, 5690-5699.
144. Lu, S., Shi, R., Tsao, C.-C., Yi, X., Li, L. and Chiang, V.L. (2004) RNA silencing in plants by the expression of siRNA duplexes. *Nucleic Acids Research*, **32**, 21, e171, 1-7 (doi:10.1093/nar/gnh170)
145. Lucas, W.J., Bouche-Pillon, S., Jackson, D.P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B. and Hake, S. (1995) Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science*, **270**, 1980-1983.
146. Lucas, W.J. and Lee, J.-Y. (2004) PLASMODESMATA AS A SUPRACELLULAR CONTROL NETWORK IN PLANTS. *NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY*, **5**, 712-726.
147. Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X. and Ding, S.W. (2000) Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *Embo J*, **19**, 1672-1680.

148. Lygerou, Z., Conesa, C., Lesage, P., Swanson, R.N., Ruet, A., Carlson, M., Sentenac, A. and Seraphin, B. (1994) The yeast BDF1 gene encodes a transcription factor involved in the expression of a broad class of genes including snRNAs. *Nucleic Acids Research*, **22**, 5332-5340.
149. Macchi, P., Brownawell, A.M., Grunewald, B., DesGroseillers, L., Macara, I.G. and Kiebler, M.A. (2004) The Brain-specific Double-stranded RNA-binding Protein Staufen2. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, **279**, 31440–31444.
150. MacDonald, C.C. and McMahon, K.W. (2003) The Flowers that Bloom in the Spring: RNA Processing and Seasonal Flowering. *Cell*, **113**, 671–672.
151. MacFarlane, S.A. and Popovich, A.H. (2000) Efficient Expression of Foreign Proteins in Roots from Tobravirus Vectors. *Virology*, **267**, 29-35.
152. Maison, C. and Almouzni, G. (2004) HP1 AND THE DYNAMICS OF HETEROCHROMATIN MAINTENANCE. *NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY*, **5**, 296-304.
153. Makeyev, E.V. and Bamford, D.H. (2002) Cellular RNA-Dependent RNA Polymerase Involved in Posttranscriptional Gene Silencing Has Two Distinct Activity Modes. *Molecular Cell*, **10**, 1417–1427.
154. Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. and Vance, V.B. (2001) HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell*, **13**, 571-583.
155. Mallory, A.C., Parks, G., Endres, M.W., Baulcombe, D., Bowman, L.H., Pruss, G.J. and Vance, V.B. (2002) The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants. *Nat Biotechnol*, **20**, 622-625.
156. Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Bartel, D., Vance, V.B. and Bowman, L.H. (2002) A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15228-15233.
157. Maniataki, E., Martinez de Alba, A.E., Sagesser, R.S., 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.

158. Marano, M.R. and Baulcombe, D.C. (1998) Pathogen-derived resistance targeted against the negative strand RNA of tobacco mosaic virus: RNA strand specific RNA silencing? *Plant Journal*, **13**, 537-546.
159. Marathe, R., Smith, T.H., Anandalakshmi, R., Bowman, L.H., Fagard, M., Mourrain, P., Vaucheret, H. and Vance, V.B. (2000) Plant viral suppressors of post-transcriptional silencing do not suppress transcriptional silencing. *Plant J*, **22**, 51-59.
160. Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. and Collins, F.S. (1991) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1156.
161. Marmorstein, R. (2001) PROTEIN MODULES THAT MANIPULATE HISTONE TAILS FOR CHROMATIN REGULATION. *Nature Mol Cel Biol Reviews*, **2**, 422-432.
162. Marmorstein, R. and Berger, S.L. (2001) Structure and function of bromodomains in chromatin-regulating complexes. *Gene*, **272**, 1-9.
163. Martinez de Alba, A.E., 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. *J Virol*, **77**, 9685-9694.
164. Maruyama, T., Farina, A., Dey, A., Cheong, J., Bermudez, V.P., Tamura, T., Sciortino, S., Shuman, J., Hurwitz, J. and Ozato, K. (2002) Mammalian Bromodomain Protein, Brd4, Interacts with Replication Factor C and Inhibits Progression to S Phase. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, **22**, 6509-6520.
165. Matangkasombut, O., Buratowski, R.M., Swilling, N.W. and Buratowski, S. (2000) Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID. *Genes Dev.*, **14**, 951-962.
166. Matangkasombut, O. and Buratowski, S. (2003) Different Sensitivities of Bromodomain Factors 1 and 2 to Histone H4 Acetylation. *Molecular Cell*, **11**, 353-363.
167. Matzke, M.A. and Birchler, J.A. (2005) RNAi-MEDIATED PATHWAYS IN THE NUCLEUS. *NATURE REVIEWS GENETICS*, **6**, 24-35.
168. Mette, M.F., van der Winden, J., Matzke, M.A. and Matzke, A.J. (1999) Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. *Embo J*, **18**, 241-

- 248.
169. Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A. and Matzke, A.J. (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J*, **19**, 5194-5201.
170. Meza, T.J., Kamfjord, D., Hekelien, A.-M., Evans, I., Godager, L.H., Mandal, A., Jakobsen, K.S. and Aalen, R.B. (2001) The frequency of silencing in *Arabidopsis thaliana* varies highly between progeny of siblings and can be influenced by environmental factors. *Transgenic Research*, **10**, 53–67.
171. Missiou, A., Kalantidis, K., Boutla, A., Tzortzakaki, S., Tabler, M. and Tsagris, M. (2004) Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Molecular Breeding*, **14**, 185–197.
172. Mitsuhashi, I., Shirasawa-Seo, N., Iwai, T., Nakamura, S., Honkura, R. and Ohashi, Y. (2002) Release from post-transcriptional gene silencing by cell proliferation in transgenic tobacco plants: possible mechanism for noninheritance of the silencing. *Genetics*, **160**, 343-352.
173. Mitter, N., Sulistyowati, E. and Dietzgen, R.G. (2003) Cucumber mosaic virus infection transiently breaks dsRNA-induced transgenic immunity to Potato virus Y in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact*, **16**, 936-944.
174. Mochizuki, K., Fine, N.A., Fujisawa, T. and Gorovsky, M.A. (2002) Analysis of a piwi-Related Gene Implicates Small RNAs in Genome Rearrangement in Tetrahymena. *Cell*, **110**, 689-699.
175. Mochizuki, K. and Gorovsky, M.A. (2004) Small RNAs in genome rearrangement in Tetrahymena. *Current Opinion in Genetics & Development*, **14**, 181–187.
176. Mol, J.N.M., van der Krol, A.R., van Tunen, A.J., van Bfokland, R., de Lange, P. and Stuitje, A.R. (1990) Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *FEBS LETTERS*, **268**, 427-430.
177. Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F. and Vaucheret, H. (2002) Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell*, **14**, 629-639.
178. Motamedi, M.R., Verdel, A., Colmenares, S.U., Gerber, S.A., Gygi, S.P. and Moazed, D. (2004) Two RNAi Complexes, RITS and RDRC,

- Physically Interact and Localize to Noncoding Centromeric RNAs. *Cell*, **119**, 789-802.
179. Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T.A. and Vaucheret, H. (2000) Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, **101**, 533-542.
180. Muangsan, N., Beclin, C., Vaucheret, H. and Robertson, D. (2004) Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. *Plant Journal*.doi: 10.1111/j1365-313x.2004.02103.x
181. Muchardt, C., Guillem, M., Seeler, J.-S., Trouche, D., Dejean, A. and Yaniv, M. (2002) Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1a. *EMBO reports*, **3**, 975–981.
182. Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Farooq, A., Carlson, J.E., Ott, M., Verdin, E. and Zhou, M.M. (2002) Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Mol Cell*, **9**, 575-586.
183. Muller, A., Marins, M., Kamisugi, Y. and Meyer, P. (2002) Analysis of hypermethylation in the RPS element suggests a signal function for short inverted repeats in de novo methylation. *Plant Mol Biol*, **48**, 383-399.
184. Murashige, I. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, **15**, 473-497.
185. Murray, M.G. and W.F.Thompson. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4321.
186. Naylor, M., Reeves, J., Cooper, J.I., Edwards, M.-L. and Wang, H. (2004) Construction and properties of a gene-silencing vector based on Poplar mosaic virus (genus Carlavirus). *Journal of Virological Methods*. (doi:10.1016/j.jviromet.2004.10.007).
187. Novina, C.D. and Sharp, P.A. (2004) The RNAi revolution. *Nature*, **430**, 161-164.
188. Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Nunes, P.C., Pontes, O. and Pikaard, C.S. (2005) Plant Nuclear RNA Polymerase IV Mediates siRNA and DNA Methylation-Dependent Heterochromatin Formation. *Cell*, **120**, 513–

622.

189. Oparka, K.J., Roberts, A.G., Boevink, P., Santa Cruz, S., Roberts, I., Pradel, K.S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N. and Epel, B. (1999) Simple, but Not Branched, Plasmodesmata Allow the Nonspecific Trafficking of Proteins in Developing Tobacco Leaves. *Cell*, **97**, 743–754.
190. Oparka, K.J. (2004) Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes? *TRENDS in Plant Science*, **9**, 33-41.
191. Owens, R.A., Chen, W., Hu, Y. and Hsu, Y.H. (1995) Suppression of potato spindle tuber viroid replication and symptom expression by mutations which stabilize the pathogenicity domain. *Virology*, **208**, 554-564.
192. Owens, R.A., Steger, G., Hu, Y., Fels, A., Hammond, R.W. and Riesner, D. (1996) RNA structural features responsible for potato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology*, **222**, 144-158.
193. Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B.A., Gandhi, S.G., Rao, M., Bhadra, U., Birchler, J.A. and Elgin, S.C.R. (2004) Heterochromatic Silencing and HP1 Localization in Drosophila Are Dependent on the RNAi Machinery. *SCIENCE*, **303**, 669-672.
194. Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. and Weigel, D. (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, **425**, 257-263.
195. Papp, I., Mette, M.F., Aufsatz, W., Daxinger, L., Schauer, S.E., Ray, A., van der Winden, J., Matzke, M. and Matzke, A.J. (2003) Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol*, **132**, 1382-1390.
196. Park, Y.D., Papp, I., Moscone, E.A., Iglesias, V.A., Vaucheret, H., Matzke, A.J. and Matzke, M.A. (1996) Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J*, **9**, 183-194.
197. Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. and Chen, X. (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol*, **12**, 1484-1495.
198. Peart, J.R., Cook, G., Feys, B.J., Parker, J.E. and Baulcombe, D.C. (2002) An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant J*, **29**, 569-579.

199. Peele, C., Jordan, C.V., Muangsan, N., Turnage, M., Egelkrou, E., Eagle, P., Hanley-Bowdoin, L. and Robertson, D. (2001) Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant Journal*, **27**, 357-366.
200. Perbal, M.-C., Haughn, G., Saedler, H. and Schwarz-Sommer, Z. (1996) Non-cell-autonomous function of the *Antirrhinum* floral homeotic proteins DEFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development*, **122**, 3433-3441.
201. Pham, J.W., Pellino, J.L., Lee, Y.S., Carthew, R.W. and Sontheimer, E.J. (2004) A Dicer-2-Dependent 80S Complex Cleaves Targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell*, **117**, 83–94.
202. Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2003) Acetylation-Dependent Chromatin Reorganization by BRDT, a Testis-Specific Bromodomain-Containing Protein. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, **23**, 5354–5365.
203. Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Frendewey, D., Samuelsson, B. and Radmark, O. (2002) Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *Embo J*, **21**, 5864-5874.
204. Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. and Vance, V.B. (1997) Plant Viral Synergism: The Potyviral Genome Encodes a Broad-Range Pathogenicity Enhancer That Transactivates Replication of Heterologous Viruses. *Plant Cell*, **9**, 859-868.
205. Qi, Y. and Ding, B. (2002) Replication of Potato spindle tuber viroid in cultured cells of tobacco and *Nicotiana benthamiana*: the role of specific nucleotides in determining replication levels for host adaptation. *Virology*, **302**, 445-456.
206. Qi, Y. and Ding, B. (2003) Differential Subnuclear Localization of RNA Strands of Opposite Polarity Derived from an Autonomously Replicating Viroid. *Plant Cell*, **15**, 2566–2577.
207. Qi, Y., Pelissier, T., Itaya, A., Hunt, E., Wassenegger, M. and Ding, B. (2004) Direct Role of a Viroid RNA Motif in Mediating Directional RNA Trafficking across a Specific Cellular Boundary. *Plant Cell*, **16**, 1741–1752.
208. Querci, M., Owens, R.A., Bartolini, I., Lazarte, V. and Salazar, L.F. (1997) Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid



- in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, **78**, 1207–1211.
209. Ramanathan, Y., Song, L., Mathews, M.B. and Tolia, P.P. (2003) Functional cloning of genes encoding dsRNA binding proteins. *Methods*, **30**, 348–352.
210. Ratcliff, F.G., Harrison, B.D. and Baulcombe, D.C. (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, **276**, 1558–1560.
211. Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A. and Baulcombe, D.C. (1999) Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell*, **11**, 1207–1216.
212. Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M. and Baulcombe, D.C. (2001) Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J*, **25**, 237–245.
213. Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. and Bartel, D.P. (2002) Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell*, **110**, 513–520.
214. Rousseaux, S., Caron, M.B., Govin, J., Lestrat, C., Faure, A.-K. and Khochbin, S. (2005) Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene*, **345**, 139–153.
215. Ruiz, M.T., Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. (1998) Initiation and Maintenance of Virus-Induced Gene Silencing. *Plant Cell*, **10**, 937–946.
216. Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cazares, B. and Lucas, W.J. (1999) Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development*, **126**, 4405–4419.
217. Sadaie, M., Iida, T., Urano, T. and Nakayama, J.-I. (2004) A chromodomain protein, Chp1, is required for the establishment of heterochromatin in fission yeast. *The EMBO Journal*, **23**, 3825–3835.
218. Sagesser, R., Martinez, E., Tsagris, M. and Tabler, M. (1997) Detection and isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of a cDNA expression library. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3816–3822.
219. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) *Science*, **230**.
220. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

Harbor, New York.

221. Sanders, M., Lannoo, N., Maddelein, W., Depicker, A., Montagu, M.V., Cornelissen, M. and Jacobs, J. (2004) The preferred route for the degradation of silencing target RNAs in transgenic plants depends on pre-established silencing conditions. *Nucleic Acids Research*, **32**, 3400–3409.
222. Sano, T. and Ishiguro, A. (1998) Viability and pathogenicity of intersubgroup viroid chimeras suggest possible involvement of the terminal right region in replication. *Virology*, **240**, 238-244.
223. Sarnowski, T.J., Swiezewski, S., Pawlikowska, K., Kaczanowski, S. and Jerzmanowski, A. (2002) AtSWI3B, an Arabidopsis homolog of SWI3, a core subunit of yeast Swi/Snf chromatin remodeling complex, interacts with FCA, a regulator of flowering time. *Nucleic Acids Res*, **30**, 3412-3421.
224. SAUNDERS, L.R. and BARBER, G.N. (2003) The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *The FASEB Journal*, **17**, 961-983.
225. Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W. and Ray, A. (2002) DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends Plant Sci*, **7**, 487-491.
226. Schiebel, W., Pelissier, T., Riedel, L., Thalmeir, S., Schiebel, R., Kempe, D., Lottspeich, F., Sanger, H.L. and Wassenegger, M. (1998) Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell*, **10**, 2087-2101.
227. Schmitz, A. and Riesner, D. (1998) Correlation between bending of the VM region and pathogenicity of different Potato Spindle Tuber Viroid strains. *Rna*, **4**, 1295-1303.
228. Schob, H., Kunz, C. and Meins, F.J. (1997) Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigation of sequence requirements for gene silencing. *Mol. Gen. Genet.*, **256**, 581–585.
229. Schomburg, F.M., Patton, D.A., Meinke, D.W. and Amasino, R.M. (2001) FPA, a Gene Involved in Floral Induction in Arabidopsis, Encodes a Protein Containing RNA-Recognition Motifs. *The Plant Cell*, **13**, 1427–1436.
230. Schrader, O., Baumstark, T. and Riesner, D. (2003) A mini-RNA containing the tetraloop, wobble-pair and loop E motifs of the central

- conserved region of potato spindle tuber viroid is processed into a minicircle. *Nucleic Acids Res*, **31**, 988-998.
231. Schroder, A.R. and Riesner, D. (2002) Detection and analysis of hairpin II, an essential metastable structural element in viroid replication intermediates. *Nucleic Acids Res*, **30**, 3349-3359.
232. SHARMA, A.D., GILL, P.K. and SINGH, P. (2002) DNA Isolation From Dry and Fresh Samples of Polysaccharide-Rich Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, **20**, 415a–415f.
233. Shen, C., Buck, A.K., Liu, X., Winkler, M. and Reske, S.N. (2003) Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Letters*, **539**, 111-114.
234. Sijen, T., Vijn, I., Rebocho, A., van Blokland, R., Roelofs, D., Mol, J.N. and Kooter, J.M. (2001) Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol*, **11**, 436-440.
235. Silhavy, D. and Burgyan, J. (2004) Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *TRENDS in Plant Science*, **9**, 76-83.
236. Simpson, G.G. (2004) The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 570–574.
237. Singh, R. (1973) Experimental host range of the potato spindle tuber "virus". *Am. Pot j.*, **50**, 111-123.
238. Smardon, A., Spoerke, J.M., Stacey, S.C., Klein, M.E., Mackin, N. and Maine, E.M. (2000) EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Current Biology*, **10**, 169–178.
239. Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.-B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G. and Waterhouse, P.M. (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, **407**, 319-320.
240. Soellick, T.-R., Uhrig, J.F., Bucher, G.L., Kellmann, J.-W. and Schreier, P.H. (2000) The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *PNAS*, **97**, 2373–2378.
241. Sorensen, D.R., Leirdal, M. and Sioud, M. (2003) Gene Silencing by Systemic Delivery of Synthetic siRNAs in Adult Mice. *J. Mol. Biol.*, **327**,

- 761–766.
242. Soutschek, J. et al, (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, doi:10.1038/nature.
243. STEIN, P., SVOBODA, P., ANGER, M. and SCHULTZ, R.M. (2003) RNAi: Mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase. *RNA*, **9**, 187-192.
244. Stoutjesdijk, P.A., Singh, S.P., Liu, Q., Hurlstone, C.J., Waterhouse, P.A. and Green, A.G. (2002) hpRNA-Mediated Targeting of the Arabidopsis FAD2 Gene Gives Highly Efficient and Stable Silencing. *Plant Physiology*, **129**, 1723–1731.
245. Stutz, F. and Rosbash, M. (1998) Nuclear RNA export. *GENES & DEVELOPMENT*, **12**, 3303–3319.
246. Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Moazed, D. and Grewal, S.I.S. (2005) RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *PNAS*, **102**, 152–157.
247. Suzuki, M., Kato, A. and Komeda, Y. (2000) An RNA-binding protein, AtRBP1, is expressed in actively proliferative regions in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, **41**, 282-288.
248. Tabler, M. and Sanger, H.L. (1984) Cloned single- and double-stranded DNA copies of potato spindle tuber viroid (PSTV) RNA and co-inoculated subgenomic DNA fragments are infectious. *Embo J*, **3**, 3055-3062.
249. Taliansky, M., S.-H., K., Mayo, M., Kalinina, N., Fraser, G., McGeachy, K. and Barker, H. (2004) Escape of a plant virus from amplicon-mediated RNA silencing is associated with biotic or abiotic stress. *Plant J*, **39**, 194-205.
250. Tang, W. and Leisner, S. (1998) Methylation of Nonintegrated Multiple Copy DNA in Plants. *BBRC*, **245**, 403–406.
251. Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. and Zamore, P.D. (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *GENES & DEVELOPMENT*, **17**, 49-63.
252. Tenllado, F. and Diaz-Ruiz, J.R. (2001) Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *J Virol*, **75**, 12288-12297.

253. Tenllado, F., Llave, C. and Diaz-Ruiz, J.R. (2004) RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research*, **102**, 85–96.
254. Thomas, C.L., Jones, L., Baulcombe, D.C. and Maule, A.J. (2001) Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J*, **25**, 417-425.
255. Tomitaa, R., Hamadab, T., Horiguchic, G., Ibad, K. and Kodama, H. (2004) Transgene overexpression with cognate small interfering RNA in tobacco. *FEBS Letters*.(doi:10.1016/j.febslet.2004.07.063)
256. Turnage, M.A., Muangsan, N., Peele, C. and Robertson, D. (2002) Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant J*, **30**, 107-114.
257. Tzfira, T., Jensen, C.S., Wang, W., Zuker, A., Vinocur, B., Altman, A. and Vainstein, A. (1997) Transgenic *Populus tremula*: a step-by-step protocol for its *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol Biol Reporter*, **15**, 219–235.
258. Unnamalai, N., Kang, B.G. and Lee, W.S. (2004) Cationic oligopeptide-mediated delivery of dsRNA for post-transcriptional gene silencing in plant cells. *FEBS Letters*, **566**, 307–310.
259. Vaistij, F.E., Jones, L. and Baulcombe, D.C. (2002) Spreading of RNA Targeting and DNA Methylation in RNA Silencing Requires Transcription of the Target Gene and a Putative RNA-Dependent RNA Polymerase. *Plant Cell*, **14**, 857–867.
260. van Eldik, G.J., Litiere, K., Jacobs, J.J., Van Montagu, M. and Cornelissen, M. (1998) Silencing of beta-1,3-glucanase genes in tobacco correlates with an increased abundance of RNA degradation intermediates. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 5176–5181.
261. Van Houdt, H., Ingelbrecht, I., Van Montagu, M. and Depicker, A. (1997) Post-transcriptional silencing of a neomycin phosphotransferase II transgene correlates with the accumulation of unproductive RNAs and with increased cytosine methylation of 3' flanking regions. *Plant J*, **12**, 379-392.
262. Van Houdt, H., Kovarik, A., Van Montagu, M. and Depicker, A. (2000) Cross-talk between posttranscriptionally silenced neomycin

- phosphotransferase II transgenes. *FEBS Lett*, **467**, 41-46.
263. Van Houdt, H., Bleys, A. and Depicker, A. (2003) RNA target sequences promote spreading of RNA silencing. *Plant Physiol*, **131**, 245-253.
264. Vanitharani, R., Chellappan, P. and Fauquet, C.M. (2003) Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. *PNAS*, **100**, 9632-9636.
265. Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I. and Moazed, D. (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, **303**, 672-676.
266. Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (1998) Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, **95**, 177-187.
267. Voinnet, O. (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *TRENDS in Genetics*, **17**, 449-459.
268. Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J*, **33**, 949-956.
269. Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I.S. and Martienssen, R.A. (2002) Regulation of Heterochromatic Silencing and Histone H3 Lysine-9 Methylation by RNAi. *Science*, **297**, 1833-1837.
270. Wassenegger, M., Spieker, R.L., Thalmeir, S., Gast, F.U., Riedel, L. and Sanger, H.L. (1996) A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for nicotiana tabacum. *Virology*, **226**, 191-197.
271. Waterhouse, P.M., Graham, M.W. and Wang, M.B. (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13959-13964.
272. Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.-B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G. and Waterhouse, P.M. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal*, **27**, 581-590.

273. Winston, F. and Allis, D. (1999) The bromodomain: A chromatin targeting module? *Nature Structural Biology*, **6**, 601-604.
274. Woo, Y.M., Itaya, A., Owens, R., Tang, L., Hammond, R., Chou, H.C., Lai, M. and Ding, B. (1999) Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *Plant J.*, **17**, 627-635.
275. Wroblewski, T., Tomczak, A. and Michelmore, R. (2005) Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal*, **3**, 1-15.
276. Wu, X., Weigel, D. and Wigge, P.A. (2002) Signaling in plants by intercellular RNA and protein movement. *GENES & DEVELOPMENT*, **16**, 151-158.
277. Wu, X., Dinneny, J.R., Crawford, K.M., Rhee, Y., Citovsky, V., Zambryski, P.C. and Weigel, D. (2003) Modes of intercellular transcription factor movement in the Arabidopsis apex. *Development*, **130**, 3735-3745.
278. Xie, Z., Fan, B., Chen, C. and Chen, Z. (2001) An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *PNAS*, **98**, 6516-6521.
279. Xie, Z., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (2003) Negative Feedback Regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-Guided mRNA Degradation. *Current Biology*, **13**, 784-789.
280. Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. and Carrington, J.C. (2004) Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants. *PLoS Biology*, **2**, 5, 0001-0011 (DOI: 10.1371/journal.pbio.0020104).
281. Yang, Y., Li, R. and Qi, M. (2000) In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J.*, **22**, 543-551.
282. Yang, X.-J. (2004) Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *BioEssays*, **26**, 1076-1087.
283. Yang, S.-J., Carter, S.A., Cole, A.B., Cheng, N.-H. and Nelson, R.S. (2004) A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *PNAS*, **101**, 6297-6302.
284. You, J., Croyle, J.L., Nishimura, A., Ozato, K. and Howley, P.M.

- (2004) Interaction of the Bovine Papillomavirus E2 Protein with Brd4 Tethers the Viral DNA to Host Mitotic Chromosomes. *Cell*, **117**, 349–360.
285. Yu, D., Fan, B., MacFarlane, S.A. and Chen, Z. (2003) Analysis of the involvement of an inducible Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol Plant Microbe Interact*, **16**, 206-216.
286. Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E. and Filipowicz, W. (2002) Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo J*, **21**, 5875-5885.
287. Zhang, H., Christoforou, A., Aravind, L., Emmons, S.W., van den Heuvel, S. and Haber, D.A. (2004) The *C. elegans* Polycomb Gene *sop-2* Encodes an RNA Binding Protein. *Molecular Cell*, **14**, 841–847.
288. Zhao, Y., Owens, R.A. and Hammond, R.W. (2001) Use of a vector based on Potato virus X in a whole plant assay to demonstrate nuclear targeting of Potato spindle tuber viroid. *J Gen Virol*, **82**, 1491-1497.
289. Zhu, Y., Green, L., Woo, Y.M., Owens, R. and Ding, B. (2001) Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology*, **279**, 69-77.
290. 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 Physiol*, **130**, 138-146.
291. Zilberman, D., Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2003) ARGONAUTE4 Control of Locus-Specific siRNA Accumulation and DNA and Histone Methylation. *Science*, **299**, 716-719.