



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
UNIVERSITY OF CRETE



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

Διπλωματική Εργασία

Διαλεύκανση του ρόλου των HSP90 στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος των Βρασσινοστεροειδών



Arabidopsis thaliana.

Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας: Γκριτζάς Ραφαήλ (Α.Μ. 1036)

Υπεύθυνος καθηγητής: Πολυδεύκης Χατζόπουλος (Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών)

Επιβλέποντες: Μιλιώνη Δήμητρα (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών)

Σαμακοβλή Δέσποινα (Επίκουρη Καθηγήτρια Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών)

Παναγιώτα Πλίτση (Υποψήφια διδάκτορας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών)

Εργαστήριο: Μοριακής Βιολογίας

Σχολή-Γμήμα: Σχολή Θετικών και τεχνολογικών επιστημών- Βιολογίας

Ακαδημαϊκό έτος: 2023-2024

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	5
1.Εισαγωγή.....	7
1.1 Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες ως μέλη της οικογένειας των μοριακών συνοδών.....	7
1.2 Η οικογένεια των HSP90.....	10
1.2.1 Η οικογένεια των HSP90 στο <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
1.2.2 Η δομή και ο λειτουργικός κύκλος των HSP90.....	11
1.3 Η ρύθμιση της λειτουργίας των HSP90.....	14
1.4 Ο ρόλος των HSP90.....	16
1.5 Οι HSP90 ως ρυθμιστής της ανάπτυξης του <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
1.5.1 Βρασσινοστεροειδή.....	19
1.5.2 Ο πολυεπίπεδος έλεγχος του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των βρασσινοστεροειδών από τις HSP90.....	25
1.5.3 Η απομεθυλάση των REF6 ως μέρος του σηματοδοτικού μονοπατιού των βρασσινοστεροειδών.....	27
1.6 Σκοπός.....	32
2.Μέθοδοι και υλικά.....	33
2.1 Συνθήκες ανάπτυξης φυτών.....	33
2.2 Αποστείρωση των σπερμάτων του <i>A. thaliana</i>	33
2.3 Φαρμακολογικοί χειρισμοί των σειρών του <i>A. thaliana</i>	34
2.4 Παρατήρηση των ριζών του φυτού <i>A. thaliana</i> μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας.....	34
2.5 Μετρήσεις έντασης φθορισμού και στατιστικός έλεγχος.....	35
2.6 Η κλωνοποίηση της άμινο- και καρβόξυτελικής περιοχής του REF6.....	36
2.6.1 Ενίσχυση των άμινο- και καρβόξυτελικών του REF6.....	36
2.6.3 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i>	42
2.6.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα <i>E.coli</i> (Μέθοδος αλκαλικής λύσης).....	42
2.6.5 Διαγνωστικές πέψεις για τις κατασκευές.....	43
2.6.6 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (GV3101)/ Freeze-thaw protocol.....	44
2.7 Αγροεμποτισμός και μέθοδος μοριακής συμπλήρωσης φθορισμού (Bimolecular Fluorescence Complementation- BiFC).....	45
2.8 Τεστ των δύο υβριδίων.....	47
3. Αποτελέσματα.....	52
3.1 Οι HSP90 εμπλέκονται στον έλεγχο των επιπέδων και του προτύπου κατανομής του BRI1 στο ακρορρίζιο.....	52
3.2 Η επίδραση του HSP90 στον καθορισμό της μοίρας του BRI1.....	54
3.3 Ο πολυεπίπεδος ρόλος των HSP90 στην μηχανή διακίνησης των μεμβρανικών πρωτεϊνών.....	58
3.4 Οι κυτταροπλασματικές HSP90 αλληλοεπιδρούν άμεσα με την απομεθυλάση REF6.....	62
3.4.1 Κλωνοποίηση της άμινο-τελικής επικράτειας και της καρβόξυ-τελικής επικράτειας του REF6.....	62
3.4.2 Πειραματικός έλεγχος της αλληλοεπίδρασης του REF6 με τις κυτταροπλασματικές HSP90.1 και HSP90.3.....	69

3. Συζήτηση	73
3.1 Τα επίπεδα των λειτουργικών HSP90 επιδρούν στην ομοίωση των επιπέδων του BRI1 στην ρίζα.	73
3.2 Οι HSP90 εμπλέκονται σε διαφορετικά επίπεδα του συστήματος διακίνησης μεμβρανών.	75
3.3 Οι HSP90 αλληλοεπιδρούν με την απομεθυλάση των ιστονών REF6.....	76
4.Βιβλιογραφία	79

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε ένα απαιτητικό έργο, αλλά συνάμα και ένα ταξίδι, μέσα από το οποίο απέκτησα εμπειρίες και πολύτιμα εφόδια, για την μετέπειτα προσωπική και επαγγελματική μου πορεία. Αποτελεί ευτύχημα, το γεγονός, ότι μέσα σε αυτό το ταξίδι συνάντησα ανθρώπους, οι οποίοι με τον τρόπο τους με στήριξαν σε πολλαπλά επίπεδα, πέραν των τυπικών αρμοδιοτήτων τους, και αποτέλεσαν την ακαδημαϊκή μου ‘οικογένεια’. Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω, τον καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να γίνω μέλος του εργαστηρίου του, και να εργαστώ σε ένα αξιοζήλευτο περιβάλλον, σε υλικοτεχνικό επίπεδο, αλλά και σε επίπεδο εγκαταστάσεων και ανθρώπινου δυναμικού. Θα ήθελα, επίσης να ευχαριστήσω την καθηγήτρια του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Δήμητρα Μιλιώνη, η οποία με την σειρά της με δέχτηκε στην εργαστηριακή της ομάδα και από την πρώτη στιγμή έδειξε την εμπιστοσύνη, δίνοντας μου την ελευθερία και την στήριξη, που απαιτούνταν για να καταφέρω να ολοκληρώσω την διπλωματική μου εργασία. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου, τις επιβλέπουσες μου, την επίκουρη καθηγήτρια του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου- κ. Δέσποινα Σαμακοβλή, και την υποψήφια διδάκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών- κ. Παναγιώτα Πλίτση, οι οποίες μου εμπιστεύτηκαν κομμάτια του προσωπικού τους ερευνητικού οράματος, με στήριξαν, με αγκάλιασαν, με έβαλαν στην ζωή τους, ενώ οφείλω να εξαιρώ την ιώβεια υπομονή που επέδειξαν στις μεταξύ μας συζητήσεις. Τέλος, δεν θα πρέπει να λησμονήσω να ευχαριστήσω, τα υπόλοιπα άτομα, που δραστηριοποιούνταν στο εργαστήριο, με τα οποία συνυπήρξαμε αρμονικά, αποτέλεσαν αναπόσπαστα κομμάτια του συνόλου, εργαζόμενοι σκληρά για την εύρυθμη λειτουργία του εργαστηρίου, στηρίζοντας την δουλειά μου είτε έμμεσα είτε άμεσα. Μπορεί για οικονομία χώρου και ψυχικών αποθεμάτων να μην τους αναφέρω ονομαστικά, αλλά θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου του κ. Χατζόπουλου, για όλες τις αναμνήσεις που δημιουργήσαμε μαζί, όλες τις φιλίες, για την στήριξη τους, για την καθημερινότητα που μου προσέφεραν στα πλαίσια μία διευρυμένης ακαδημαϊκής ‘οικογένειας’, καθώς και για την υπομονή τους απέναντι στην δίχως όρια γκρίνια μου.

Περίληψη

Οι HSP90 (HEAT SHOCK PROTEIN 90), διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στην λεπτή ρύθμιση των φυσιολογικών αποκρίσεων και αναπτυξιακών διαδικασιών στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Η επίτευξη του πολυεπίπεδου ρόλου των HSP90, επιτυγχάνεται από το ευρύ φάσμα των μοριακών δικτύων στα οποία συμπλέκονται, αποσυμπλέκονται αλλά και διασυνδέουν. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του μονοπατιού των βρασσινοστεροειδών, με τις HSP90 να αλληλοεπιδρούν φυσικά με τα μέλη του ετεροδιμερούς υποδοχέα BRI1/BAK1, την κινάση BIN2, και τους μεταγραφικούς παράγοντες BES1/BZR1. Η επίδραση των HSP90 στην διατήρηση των μεμβρανικών και ενδοκυτταρικών επιπέδων του BRI1, υποδηλώνουν την εμπλοκή των HSP90 στην ανακύκλωση του υποδοχέα και εν γένει στον μηχανισμό ανακύκλωσης, συνυπολογίζοντας δεδομένα, που υποστηρίζουν παρόμοια επίδραση και για τον μεταφορέα των αυξινών PIN1. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν, με τεχνικές συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού, παρατηρήσεις που αφορούν στην διαφορική υποκυττάρια τοποθέτηση και σε αλλαγές στα μεμβρανικά αλλά και συνολικά επίπεδα του υποδοχέα BRI1 στο ακρορρίζιο στο φυτό *A. thaliana*, ύστερα από φαρμακολογική ή γενετική μείωση της δράσης των HSP90. Παράλληλα επιδιώξαμε τον εντοπισμό των σημείων της ανακύκλωσης του υποδοχέα BRI1, στα οποία εμπλέκονται οι HSP90, με την συγκριτική φαινοτυπική ανάλυση με χρήση φαρμακευτικών ουσιών που μπλοκάρουν την ανακύκλωση (Concanamycin A και Wortmannin) σε εξειδικευμένα σημεία. Στην συνέχεια, ελέγχθηκε η πιθανότητα αλληλοεπίδρασης των κυτταροπλασματικών HSP90 με την απομεθυλάση των ιστονών H3K27, RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6), η οποία μεταξύ άλλων εμπλέκεται στην έκφραση των ελεγχόμενων από τα βρασσινοστεροειδή γονιδίων. Συνοψίζοντας το σύνολο των αποτελεσμάτων τον κεντρικό ρόλο των HSP90 στην λεπτή ρύθμιση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των βρασσινοστεροειδών, μέσω της εμπλοκής στα μονοπατια ανακύκλωσης του BRI1 και τον έλεγχο της επιγενετικής κατάστασης των αποκρινόμενων στα βρασσινοστεροειδή γονιδίων, αλληλοεπιδρώντας με το REF6.

Abstract

The HSP90 (HEAT SHOCK PROTEIN 90) play an active role in fine-tuning physiological responses and developmental processes in the plant *Arabidopsis thaliana*. The multifaceted function of HSP90 is achieved through a wide range of molecular networks in which they are involved, interacting, dissociating, and connecting. A notable example is the Brassinosteroid pathway, where HSP90 naturally interacts with members of the heterodimeric receptor BRI1/BAK1, the kinase BIN2, and the transcription factors BES1/BZR1. The impact of HSP90 on maintaining the membrane and intracellular levels of BRI1 suggests their involvement in receptor's recycling mechanism. This is supported by data indicating a similar effect on the auxin transporter PIN1. In the context of this thesis, observations were made using fluorescence confocal microscopy techniques, focusing on the differential subcellular localization and changes in membrane and overall levels of the BRI1 receptor in the *Arabidopsis* root after pharmacological or genetic reduction of HSP90 activity. Simultaneously, efforts were made to identify the points of BRI1 receptor recycling pathway involving HSP90 through comparative phenotypic analysis using drugs that block recycling (Concanamycin A and Wortmannin) at specific sites. In addition, the possibility of interaction between cytoplasmic HSP90 and the demethylation of histones H3K27, RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6), was investigated, which, among other things, is involved in the expression of brassinosteroid-regulated genes. Summarizing all results, HSP90 plays a central role in fine-tuning the brassinosteroid signal transduction pathway by engaging in the recycling pathways of BRI1 and controlling the epigenetic status of brassinosteroid-responsive genes, interacting with REF6.

1.Εισαγωγή

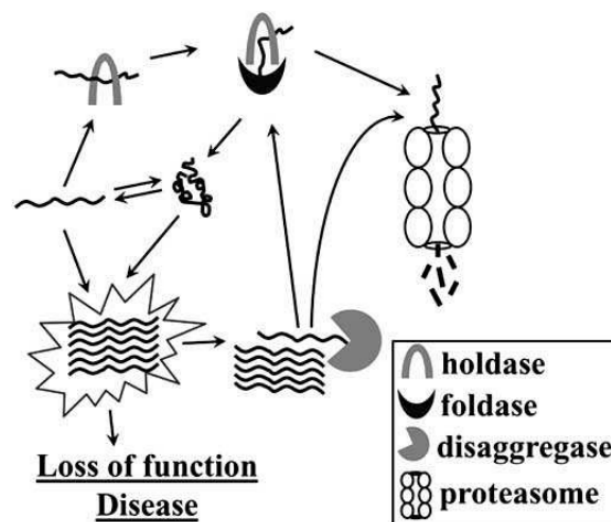
1.1 Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες ως μέλη της οικογένειας των μοριακών συνοδών.

Οι μοριακές σαπερόνες, αποτελούν μία ευρεία ομάδα πρωτεϊνών, οι οποίες δρουν στο επίπεδο της σταθεροποίησης και της απόκτησης της κατάλληλης λειτουργικής στερεοδιαμόρφωσης των πρωτεϊνών-στόχων τους, χωρίς να είναι απαραίτητα κομμάτι της τελικής αποκτηθείσας δομής. Τα πρωτεϊνικά μακρομόρια είναι αναγκαία για την πραγματοποίηση των βιολογικών διεργασιών, τόσο από την σκοπιά του ρόλου τους ως δομικά στοιχεία των κυττάρων όσο και από την σκοπιά της κατάλυσης ενζυμικών αντιδράσεων. Για να επιτελέσουν οι πρωτεΐνες τον ρόλο τους εντός του βιολογικού συστήματος είναι απαραίτητη η απόκτηση της κατάλληλης στερεοδιαμόρφωσης. Η τελική στερεοδιαμόρφωση μίας πρωτεΐνης καθορίζεται από ένα σύνολο μη-ομοιοπολικών αλληλοεπιδράσεων που αναπτύσσεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων που την απαρτίζουν, γεγονός που καθιστά τις πρωτεΐνες ένα πολύπλοκο θερμοδυναμικό σύστημα (Hartl et al., 2011).

Μπορούμε να φανταστούμε, πως σε κάθε νεοσυντιθέμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα αντιστοιχεί ένα ενεργειακό πέπλο, κάθε σημείο του οποίου αντιστοιχεί σε διαφορετική στερεοδιαμόρφωση της συγκεκριμένης αλυσίδας, η οποία συνεχώς μεταβαίνει σε καταστάσεις μικρότερης ενέργειας, μέχρι να φτάσει στο ενεργειακό ελάχιστο (τοπικό ή ολικό), που αντιστοιχεί στις τελικές πιθανές στερεοδιαμορφώσεις ή τις αποκαλούμενες μετασταθερές καταστάσεις. Οι στερεοδιαμορφώσεις κατά τις οποίες μία πρωτεΐνη μπορεί να επιτελέσει την λειτουργία της (Native state), μπορεί να αντιστοιχούν είτε σε τοπικά είτε σε ολικά ελάχιστα της Ελεύθερης Ενέργειας του μακρομορίου, ενώ υπάρχουν ελάχιστα Ελεύθερης ενέργειας τα οποία αντιστοιχούν σε στερεοδιαμορφώσεις, οι οποίες μπορεί να έχουν αρνητικές συνέπειες στην βιωσιμότητα των κυττάρων. Η λανθασμένη πορεία πάνω στο ενεργειακό πέπλο μπορεί να οδηγήσει σε μετασταθερές καταστάσεις, οι οποίες οδηγούν στον ολιγομερισμό των πρωτεϊνών προς σχηματισμό άμορφων και αδιάλυτων συσσωματωμάτων, αμυλοειδών ινιδίων, ή και σε μη ευνοϊκές αλληλοεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, παρεμποδίζοντας σε μεγάλο βαθμό το σύνολο των κυτταρικών λειτουργιών. Κατά την διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης, η σταδιακή απελευθέρωση της αναπτυσσόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας, μπορεί να οδηγήσει σε αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων που έχουν εξέλθει από το ριβόσωμα αλλά φυσιολογικά δεν απαντώνται στις μετασταθερές καταστάσεις που αντιστοιχούν στην native state της πρωτεΐνης. Τέλος η μετάβαση σε μη ευνοϊκές μετασταθερές καταστάσεις, μπορεί να επέλθει ως άμεση συνέπεια σε περιπτώσεις βιοτικού και αβιοτικού στρες, οι οποίες αλλάζουν άρδην τις συνθήκες που επικρατούν στον ενδοκυτταρικό χώρο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του θερμικού στρες που προσφέρει ουσιαστικά την απαραίτητη ενέργεια προκειμένου να ξεπεραστεί ο ενεργειακός σκόπελος που εμποδίζει την μετάβαση από την μία μετασταθερή κατάσταση σε μία άλλη (Hartl et al., 2011).

Από τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω καθίσταται αναγκαία η ύπαρξη ενός κυτταρικού συστήματος ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών, το οποίο θα ελέγχει την διαδικασία της αναδίπλωσης των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα θα φροντίζει η ήδη παραχθείσες λειτουργικές πρωτεΐνες να μην παραμένουν για

μεγάλο χρονικό διάστημα σε μη ευνοϊκές μετασταθερές καταστάσεις. Το σύστημα αυτό απαρτίζεται από το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και από ένα δίκτυο μοριακών συνοδών, μέλη του οποίου είναι γνωστά και ως πρωτεΐνες του θερμικού στρες ή πρωτεΐνες του στρες. Οι μοριακοί συνοδοί, συνήθως κατηγοριοποιούνται βάσει των μοριακών τους βαρών (HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 και χαμηλού μοριακού βάρους HSPs), και εμπλέκονται σε ένα σύνολο διαδικασιών, όπως είναι η *de novo* αναδίπλωση, η αναδίπλωση των αποδιατεταγμένων λόγω στρες πρωτεϊνών, η συγκρότηση ολιγομερικών δομών, η μεταφορά των πρωτεϊνών αλλά και η αποικοδόμηση των μη αναστρέψιμα αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών (Hartl et al., 2011). Οι παράγοντες, που απαρτίζουν το σύστημα των μοριακών συνοδών χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες βάσει του έργου που επιτελούν. Η μία κατηγορία περιλαμβάνει τις ‘holdases’, οι οποίες δεν απαιτούν για την λειτουργία τους ATP, αναγνωρίζουν, προσδένουν και σταθεροποιούν τις αποδιατεταγμένες ή τις μερικώς αναδιπλωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, παρεμποδίζοντας την δημιουργία συσσωματωμάτων, και τις μεταφέρουν στις ‘foldases’. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει πρωτεΐνες, που φέρουν επικράτειες για την πρόσδεση του ATP, το οποίο υδρολύουν για να εξασφαλίσουν την ενέργεια που απαιτείται για να βοηθήσουν στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών-στόχων. Τέλος έχουμε τις ‘disaggregases’, οι οποίες υδρολύουν ATP για να απομακρύνουν αποδιατεταγμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες από τα συσσωματώματα και να τις μεταφέρουν στις ‘holdases’/‘foldases’ για να αποκτήσουν την ‘native’ στερεοδιαμόρφωση (Εικόνα 1.1) (Tiroli-Cepeda & Ramos, 2011).



Εικόνα 1.1.1 Σύστημα ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών (Tiroli-Cepeda & Ramos, 2011).

Το σύστημα των μοριακών συνοδών απαντάται σε όλους τους οργανισμούς, παρόλα αυτά τα στοιχεία που το απαρτίζουν διαφέρουν μεταξύ των τριών επικρατειών (Αρχαία, Βακτήρια και Ευκαρυώτες), όπως περιγράφεται συνοπτικά στον πίνακα 1.1(Waters, 2014).

Κλάσεις των HSPs	Κατανομή στους έμβιους οργανισμούς	Λειτουργικά/ Βιοχημικά χαρακτηριστικά	Δομικά χαρακτηριστικά
HSP100/CipB A. CipBs B. HSP100s C. MT78s	Βακτήρια, Ευκαρυώτες(Απουσιάζουν από τα Αρχαία). Βακτήρια Ευκαρυώτες Μύκητες	1.Μέλη της υπερικογένειας AAA+ ATPάσες. 2.Αποφυγή πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων 3. Απαιτείται για την θερμοανεκτικότητα 4. Δρα συνεργηστικά με τις Hsp70/DnaK Κυτταροπλασματικές/Πυρηνικές Δεν αποτελούν προϊόν ενδοσυμβίωσης	Εξαμερικός δακτύλιος
HSP90 A. HtpG B. TRAP1 C. DRP94 D. HSP90CP E. HSP90 alpha Hsp90 beta	Βακτήρια και Ευκαρυώτες(Απουσιάζουν από Αρχαία) Βακτήρια Μιτοχόνδρια Ενδοπλασματικό δίκτυο(Απουσιάζουν από μύκητες) Χλωροπλάστες Ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα.	1.Κυτταρική ρύθμιση/Σηματοδότηση 2. Εξελικτική ρύθμιση Δεν αποτελεί προϊόν ενδοσυμβίωσης	Διμερή με ανοικτές και κλειστές καταστάσεις
HSP70/DnaK A. DnaK B. HSP70 C. ER Hsp70 D. MT HSP70 E. CP HSP70	Βακτήρια και Ευκαρυώτες(Απουσιάζουν από τα περισσότερα Αρχαία). Βακτήρια Ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα Ενδοπλασματικό δίκτυο Μιτοχόνδρια Χλωροπλάστες	1.Σαπερόνες που είναι υπεύθυνες για τον έλεγχο της ποιότητας των πρωτεϊνών 2. Συνεργασία με τις HSP100/ CipB Αποτελούν προϊόν ενδοσυμβίωσης Αποτελούν προϊόν ενδοσυμβίωσης	Δύο επικράτειες (πρόσδεση υποστρώματος και πρόσδεση νουκλεοτιδίου) με ανοικτές και κλειστές καταστάσεις
Σαπερόνες Ομάδα I : A. GroEL B. HSP60 C. Crn80 Ομάδα II : A.Θερμοσώματα B. TRiC/CCT	Βακτήρια,Ευκαρυώτες. Βακτήρια Μιτοχόνδρια Χλωροπλάστες Αρχαία Ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα	Σαπερόνες Αποτελούν προϊόν ενδοσυμβίωσης Αποτελούν προϊόν ενδοσυμβίωσης Σαπερόνες & δράση ATPάσης Σαπερόνες & δράση ATPάσης	Δύο επταμερικοί δακτύλιοι ομο-όλιγομερή Οκταμερικοί δακτύλιοι, ετερο-όλιγομερή
Μικρές HSPs/HSP20 A.Μικρές HSPs B.Alpha-crystallin C.Κυτταρόπλασμα/πυρήνας, οργανίδια	Βακτήρια, Αρχαία, ευκαρυώτες. Βακτήρια, Αρχαία, Ευκαρυώτες Οφθαλμός σπονδυλιτών Χερσαία φυτά	1.Σαπερόνες με δράση ανεξάρτητη του ATP 2.Παροδική αποθήκευση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών	Μεγάλα ολιγομερή(12-14)

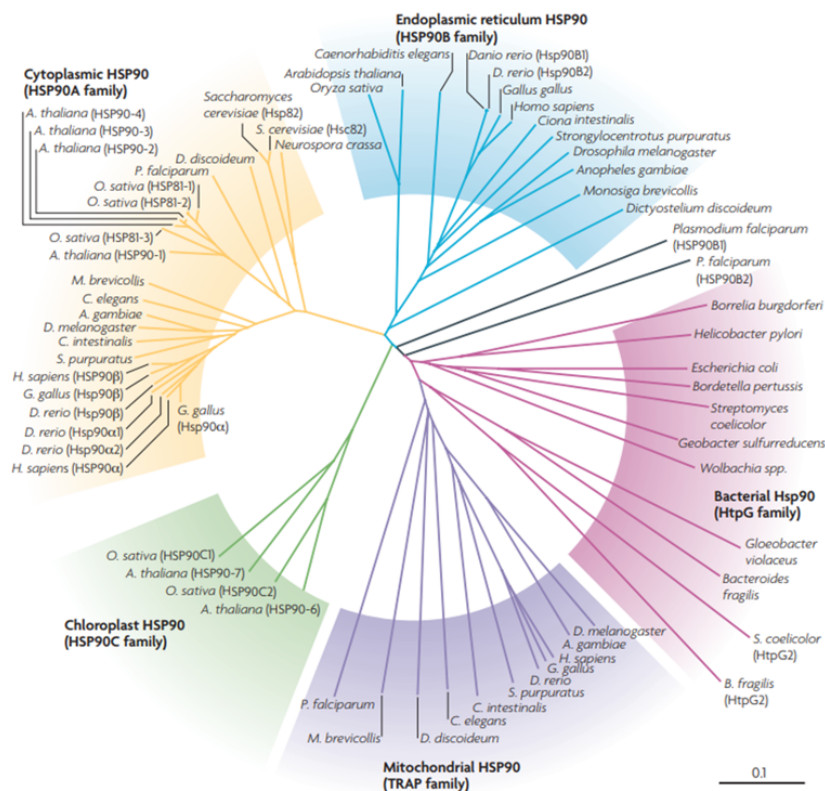
Πίνακας 1.1 Βασικές οικογένειες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών(Waters, 2014).

Οι Heat Shock Proteins HSP90s, HSP70s και HSP60s / μοριακοί συνοδοί, αποτελούν τους κύριους παράγοντες στο σύστημα ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών, που συμμετέχουν στην διαδικασία της αναδίπλωσης των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών αλλά και στην ανάκτηση της native στερεοδιαμόρφωσης των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι διαφορετικοί μηχανισμοί με τους οποίους οι τρεις αυτές κατηγορίες πρωτεϊνών επιτελούν την λειτουργία τους. Και οι τρεις αυτές κατηγορίες μοριακών συνοδών, αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες-στόχους μέσω της αναγνώρισης των υδρόφοβων πλευρικών αλυσίδων που εκτίθενται στην επιφάνεια των μερικώς ή πλήρως αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών, και υδρολύουν ATP για να πραγματοποιήσουν έναν κύκλο ανοικτής-κλειστής διαμόρφωσης, όπου εμφανίζουν μικρή ή μεγάλη συγγένεια προς τις πρωτεΐνες στόχους αντίστοιχα. Οι HSP70s λειτουργούν ως μονομερή και σε συνέργεια με τις HSP40s, οι οποίες είναι ‘holdases’, και με την υδρόλυση του ATP μεταβαίνουν στην

‘κλειστή’ στερεοδιαμόρφωση, στην οποία εγκλωβίζονται οι πρωτεΐνες στόχοι. Η ανταλλαγή του ADP με ATP, οδηγεί στην απόκτηση της ‘ανοικτής’ στερεοδιαμόρφωσης και στην απελευθέρωση των πρωτεϊνών στόχων προς αναδίπλωση στο κυτταρόπλασμα. Οι συνεχείς κύκλοι δέσμησης-αποδέσμησης των πρωτεϊνών στόχων, αποτρέπει την δημιουργία συσσωματωμάτων, και εξυπηρετεί την σωστή αναδίπλωση τους. Από την άλλη πλευρά οι HSP60s/ μοριακοί συνοδοί φαίνεται να λειτουργούν ως ολιγομερικοί δακτύλιοι, οι οποίοι σχηματίζουν κυλινδρικές δομές, που εσωκλείουν στο εσωτερικό τους μία μη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη, αποτρέποντας τον σχηματισμό συσσωματωμάτων. Ο περιορισμός των πρωτεϊνών πελατών στην κοιλότητα που σχηματίζεται στο εσωτερικό της κυλινδρικής δομής, προσφέρει τον απαραίτητο χώρο και χρόνο ώστε να λάβει την native στερεοδιαμόρφωση (Hartl et al., 2011).

1.2 Η οικογένεια των HSP90.

Ιστορικά, η πρώτη αναφορά στις HSP90 έγινε στα τέλη της δεκαετίας του 70’, στα πλαίσια της μελέτης της αντίκτυπου που έχει η απόκριση στο θερμικό στρες σε καλλιέργειες κυττάρων της Δροσόφιλας, όπου παρατηρήθηκε η αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών στο μέγεθος των 84kDa (McKenzie et al., 1975; Moran et al., 1978). Τα μέλη της οικογένειας των HSP90 είναι υψηλά συντηρημένα, και με εξαίρεση τα αρχαία, οργανισμοί από όλα τα βασίλεια της ζωής (Βακτήρια & ευκαρυώτες) διαθέτουν ένα ή περισσότερα γονίδια, που κωδικοποιούν για τις HSP90 (Chen et al., 2006). Η οικογένεια των HSP90 μπορεί να χωριστεί σε πέντε υποοικογένειες: τις κυτταροπλασματικές HSP90A, τις ενδοπλασματικές HSP90B, τις χλωροπλαστικές HSP90C, τις μιτοχονδριακές TNFR-associated πρωτεΐνες (TRAP) και τις βακτηριακές υψηλής θερμοκρασίας πρωτεΐνες G (High temperature protein G-HtpG) ;Εικόνα 1.2.1; (Taipale et al., 2010).



Εικόνα 1.2.1. Η διαειδική κατανομή των μελών της οικογένειας των HSP90 (Taipale et al., 2010).

1.2.1 Η οικογένεια των HSP90 στο *Arabidopsis thaliana*.

Στο γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana* απαντώνται συνολικά 7 γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν για τις HSP90. Από τα 7 μέλη των HSP90 του φυτού *Arabidopsis thaliana*, 4 είναι κυτταροπλασματικές (AtHsp90-1, AtHsp90-2, AtHsp90-3, AtHsp90-4), μία είναι χλωροπλαστική (AtHsp90-5), μία είναι μιτοχονδριακή (AtHsp90-6), και μία εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα γονίδια που τις κωδικοποιούν εδράζονται, αντίστοιχα, στα χρωμόσωμα V, II, III, IV (Πίνακας 1.2). Σε όλες τις κυτταροπλασματικές AtHsp90 εμφανίζονται σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), αλλά και σήματα εξόδου από τον πυρήνα (NES), κάτι που υποδεικνύει ότι βρίσκονται σε μία ισορροπία παρουσίας μεταξύ πυρήνα-κυτταροπλάσματος (Samakoni et al., 2014). Οι HSP90 του *Arabidopsis thaliana* εμφανίζουν μεταξύ τους ομοιότητα κατ' ελάχιστο της τάξεως του 45% , με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες να εμφανίζουν τουλάχιστον ομοιότητα της τάξεως του 95% (Krishna, 2001). Το γεγονός ότι τα γονίδια, που κωδικοποιούν για τις AtHsp90.2-AtHsp90.4, εδράζονται σε κοντινές περιοχές στο χρωμόσωμα V, σε συνδυασμό με τον μεγάλο βαθμό ομοιότητας που παρουσιάζουν μεταξύ τους, είναι ενδεικτικό της πρόσφατης εξελικτικής τους προέλευσης μέσω διπλασιασμού γονιδίων, αλλά και της πιθανής λειτουργικής αλληλοεπικάλυψης που αυτές μπορεί να παρουσιάζουν (Xu et al., 2012; Milioni & Hatzopoulos, 1997).

Ονοματολογία των HSP90	Μέγεθος (αριθμός a/a)	Χρωμόσωμα	Υποκυττάρια τοποθέτηση
AtHsp90-1	705	V	Κυτταρόπλασμα/πυρήνας
AtHsp90-2	699	V	Κυτταρόπλασμα/πυρήνας
AtHsp90-3	699	V	Κυτταρόπλασμα/πυρήνας
AtHsp90-4	699	V	Κυτταρόπλασμα/πυρήνας
AtHsp90-5	780	II	Χλωροπλάστης
AtHsp90-6	803	III	Μιτοχόνδριο
AtHsp90-7	823	IV	Ενδοπλασματικό δίκτυο

Πίνακας 1.2. Οι πρωτεΐνες HSP90 του *Arabidopsis thaliana* (Krishna, 2001).

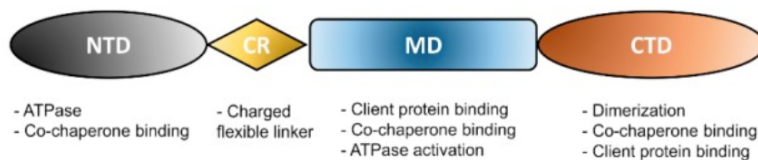
Οι HSP90 του *Arabidopsis thaliana*, εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης μεταξύ τους. Από τις κυτταροπλασματικές AtHsp90, οι AtHsp90.2-AtHsp90.4 εκφράζονται συνεχώς, σε αντίθεση με την AtHsp90.1, που εμφανίζει μικρότερη έκφραση υπό φυσιολογικές συνθήκες, και επάγεται σε συγκριτικά μεγαλύτερο βαθμό από τις υπόλοιπες σε καταστάσεις στρες (Haralampidis et al., 2002). Επιπλέον, αλλαγές στα επίπεδα της *AtHsp90.1* παρατηρούνται και κατά την διάρκεια διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων, όπως τα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ωρίμανσης (Prasinou et al., 2005). Από την άλλη πλευρά η χλωροπλαστική AtHsp90-5, εκφράζεται συνεχώς κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια, ενώ στα ώριμα φυτά η έκφραση της μειώνεται δραστικά (Cao et al., 2003). Τέλος η AtHsp90.7, αποτελεί μία συνεχώς εκφραζόμενη πρωτεΐνη (Ishiguro et al., 2002; Denecke et al., 1992).

1.2.2 Η δομή και ο λειτουργικός κύκλος των HSP90.

Προκειμένου να επιτελέσουν οι HSP90, την μοριακή τους λειτουργία ως μοριακοί συνοδοί, είναι αναγκαίος ο διμερισμός τους. Η μονομερής δομή των HSP90 απαρτίζεται από τρεις κύριες επικράτειες: α) τη αμινο-τελική επικράτεια, β) τη μεσαία επικράτεια και γ) τη καρβόξυ-τελική επικράτεια. Στην αμινο-τελική επικράτεια, βρίσκεται η θέση πρόσδεσης και υδρόλυσης του ATP (Obermann et al., 1998 Prodromou et al.,

1997). Στη μεσαία επικράτεια, γίνεται η αλληλοεπίδραση με τις περισσότερες πρωτεΐνες στόχους-πρωτεΐνες πελάτες, καθώς και με ένα σύνολο πρωτεϊνών που υποβοηθούν την λειτουργία των, των συνεργών των μοριακών συνοδών (cochaperones) (Huai et al., 2005). Η μεσαία επικράτεια συνδέεται με την άμινο-τελική επικράτεια μέσω μίας εγγενώς αποδιαταγμένης περιοχής-συνδέτη, όπου τα συστατικά του κατάλοιπα είναι φορτισμένα, και προσφέρει την απαραίτητη ευελιξία, που απαιτείται για τις αλλαγές που πραγματοποιούνται κατά την διάρκεια ενός λειτουργικού κύκλου των HSP90 (Tsutsumi et al., 2012).

Η καρβόξυ-τελική επικράτεια είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό του λειτουργικού διμερούς των HSP90 (Toft et al., 1996). Στην συγκεκριμένη επικράτεια βρίσκονται τα μοτίβα MEEVD, στην περίπτωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών (Xu et al., 2012). Το μοτίβο KDEL απαντάται στην HSP90.7 και είναι υπεύθυνο για την διατήρηση της στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Semenza et al., 1990; Denecke et al., 1992). Το μοτίβο MEEVD, είναι χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα, καθότι αποτελεί το σημείο αγκυροβόλησης αρκετών πρωτεϊνών που διαθέτουν το μοτίβο Tetratricopeptide repeat (TRP), το οποίο απαντάται σε βασικούς συνεργούς των HSP90 και καθορίζουν και υποβοηθούν την λειτουργία τους (Cervený et al., 2013; Garg et al., 2016).



Εικόνα 1.2.2. Η δομή των HSP90 και ο βιολογικός ρόλος των συστατικών επικρατειών (Hoter et al., 2018).

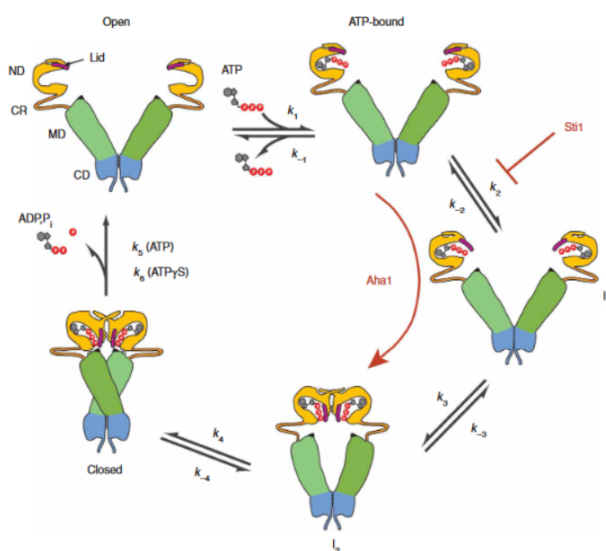
1.2.3 Ο λειτουργικός κύκλος των HSP90

Προκειμένου να επιτελέσουν οι HSP90 τον λειτουργικό τους ρόλο, είναι αναγκαίος ο διμερισμός τους, παρ'όλα αυτά οι HSP90 απαντώνται και σε διάφορες ολιγομερικές μορφές, ως μονομερή, διμερή αλλά και ολιγομερή (Cha et al., 2013). Στην διμερή τους μορφή, οι HSP90 αποκτούν μία χωροταξική διευθέτηση των δυο μονομερών, όπου σχηματίζεται μία δομή σχήματος 'V', η οποία μεταπίπτει στις διαφορετικές καταστάσεις ('ανοικτή'-'κλειστή'), φέρνοντας σε εγγύτητα τα άμινο-τελικά άκρα των μονομερών, κατά την διάρκεια ενός κύκλου που είναι γνωστός ως ο κύκλος της ATPάσης των HSP90 (Prodromou et al., 2000).

Ο λειτουργικός κύκλος των HSP90 περιλαμβάνει ένα σύνολο διαδοχικών αλλαγών στην στερεοδιαμόρφωση του διμερούς των HSP90, οι οποίες ελέγχονται από την πρόσδεση και την υδρόλυση του ATP. Αμέσως μετά το σχηματισμό του, το διμερές των HSP90 βρίσκεται στην ανοικτή στερεοδιαμόρφωση, η οποία και ονομάζεται apo-HSP90. Στην συνέχεια ακολουθεί η πρόσδεση του ATP, στην εσοχή που βρίσκεται στην άμινο-τελική επικράτεια των HSP90. Η πρόσδεση του ATP οδηγεί στο κλείσιμο της κοιλότητας που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του ATP, από την πρωτεϊνική περιοχή, που εντοπίζεται επίσης, στην άμινο-τελική επικράτεια, και είναι γνωστή ως ATP-lid, εγκλωβίζοντας το ATP στο εσωτερικό της κοιλότητας. Ως επακόλουθο των αλλαγών στην στερεοδιαμόρφωση έχουμε τον διμερισμό των άμινο-τελικών επικρατειών

των μονομερών, αλλά και την αλληλοεπίδραση των αμινο-τελικών επικρατειών, του κάθε πρωτομερούς, με την αντίστοιχη μεσαία επικράτεια. Κατά αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται η ‘κλειστή’ διαμόρφωση των διμερών των HSP90, που αποτελεί και την κατάσταση της ενεργής ATPάσης. Μετά την υδρόλυση, ακολουθεί η απομάκρυνση του ADP, και η επαναφορά του διμερούς στην πρότερη ‘ανοικτή’ κατάσταση (Εικόνα 1.2.3) (Hessling et al., 2009).

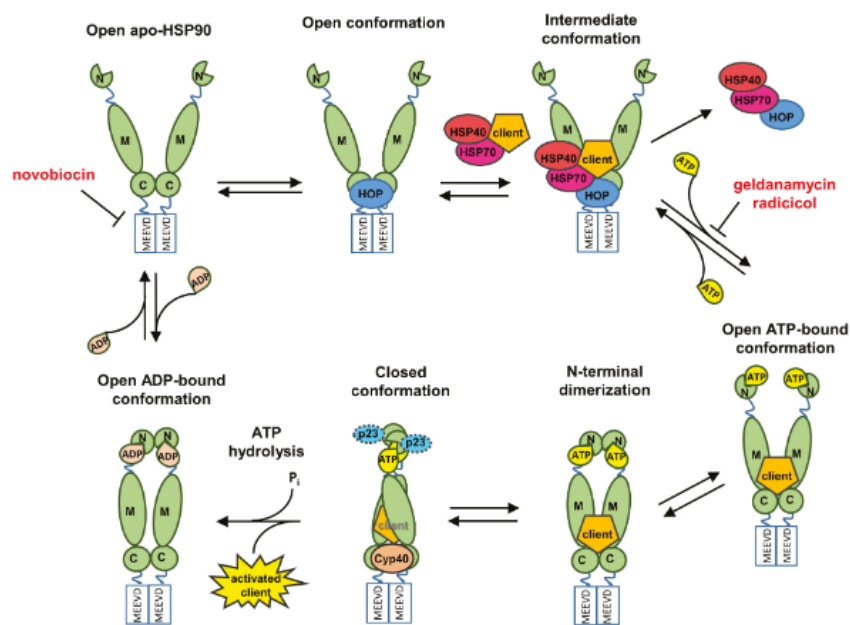
Η μετάβαση του διμερούς των HSP90 στις διαφορετικές πιθανές στερεοδιαμορφώσεις παρουσιάζει σημεία, που διαφέρουν ως προς την ταχύτητα με την οποία αυτά πραγματοποιούνται. Έχουν υπάρξει αναφορές, όπου ακόμη και απουσία ATP, υπάρχουν διμερή των HSP90 που απαντώνται τόσο στην ‘κλειστή’ όσο και στην ‘ανοικτή’ στερεοδιαμόρφωση, όπως συμβαίνει στο *E.coli* και στο *S.cerevisiae*, ενώ οι ανθρώπινες, στην αντίστοιχη περίπτωση, βρίσκονται ως επί το πλείστον στην ανοικτή στερεοδιαμόρφωση (Taipale et al., 2010). Αυτό σημαίνει ότι η πρόσδεση του ATP, αλλά και η αλληλοεπίδραση του συμπλόκου των HSP90 με διάφορα cochaperones, όπως η Aha1, καθιστούν πιο γρήγορη και πιο σταθερή, την απόκτηση της ‘κλειστής’ στερεοδιαμόρφωσης (Εικόνα 1.2.3) (Hessling et al., 2009).



Εικόνα 1.2.3. Μοντέλο για τον λειτουργικό κύκλο των HSP90 (Hessling et al., 2009).

Πέραν του κύκλου της ATPάσης των HSP90, απαραίτητη είναι και η συνέργεια βοηθητικών πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται cochaperones, για τον σχηματισμό μίας πολυπρωτεϊνικής μηχανής που θα επιτελέσει το έργο της σωστής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών στόχων. Το πρώτο βήμα για την συγκρότηση της πολυπρωτεϊνικής μηχανής, είναι η αλληλεπίδραση του διμερούς με την πρωτεΐνη HOP (HSP90/HSP70-Organizing protein). Η πρωτεΐνη HOP, διαθέτει TRP μοτίβα, τα οποία της δίνουν την δυνατότητα να αλληλοεπιδρά με τα μοτίβα EEVD και MEEVD, που απαντώνται στις HSP70 και στις HSP90 αντίστοιχα φέροντας τις δυο αυτές πρωτεΐνες σε εγγύτητα (Li et al., 2012). Το σύμπλοκο HSP70/HSP40, όπως έχουμε ήδη αναφέρει αλληλεπιδρά με μη-ορθά αναδιπλωμένες ή αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες εκμεταλλευόμενο την δράση της HSP40, ως ‘Holdase’, και την δράση της HSP70, ως ‘Foldase’ (Tiroli-Cepeda & Ramos, 2011). Το σύστημα HSP70/HSP40, ερχόμενο σε εγγύτητα με το διμερές των HSP90, λειτουργεί ως μεταφορέας των μη ορθά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο διμερές των HSP90 (Li et al., 2012) (Εικόνα 1.2.4).

Η απομάκρυνση της πρωτεΐνης HOP αυξάνει τη συγγένεια του διμερούς των HSP90 με το ATP, το οποίο εισέρχεται στις κοιλότητες πρόσδεσης του ATP. Ως συνέπεια, το διμερές καταλήγει σε μία ενδιάμεση στερεοδιαμόρφωση, που ευνοεί η αλληλοεπίδραση με ένα σύνολο άλλων cochaperones. Χαρακτηριστικά το cochaperone CYCLOPHILIN 40, προσδένεται στο καρβόξυ-τελική επικράτεια μέσω του TRP μοτίβου που διαθέτει, επάγοντας τις απαραίτητες δομικές αλλαγές στο διμερές των HSP90 (Prodromou et al., 1999). Από την άλλη πλευρά το cochaperone p23, προσδένεται στην άμινο-τελική επικράτεια, μειώνοντας την δράση ATPάσης του διμερούς των HSP90, φέρνοντας σε εγγύτητα την άμινο- και μεσαία επικράτεια, και κατ' επέκταση σταθεροποιεί το σύμπλοκο HSP90/Πρωτεΐνη πελάτης (Cintrón & Toft, 2006; Cunningham et al., 2008). Με την πρόσδεση του p23, αποκτάται η στερεοδιαμόρφωση του διμερούς που είναι σε θέση να υδρολύσει το ATP, και είναι πιθανό η μείωση της δράσης της ATPάσης να οφείλεται στο μπλοκάρισμα του διμερούς στην συγκεκριμένη στερεοδιαμόρφωση και στον επακόλουθο εγκλωβισμό του παραγόμενου ADP (Ali et al., 2006). Στο τελευταίο στάδιο του κύκλου, έχουμε την απομάκρυνση του παραγόμενου ADP, τον αποδιμερισμό των άμινο-τελικών επικρατειών των HSP90, και την απελευθέρωση των πρωτεϊνών στόχων (Εικόνα 1.2.4) (Tichá et al., 2020).



Εικόνα 1.2.4. Λειτουργικός κύκλος του συμπλόκου HSP90/Συν-σαπερονών. Ο κύκλος των διμερών των HSP90, περιλαμβάνει ένα σύνολο μεταβολών της στερεοδιαμόρφωσής τους, που εξυπηρετείται από την πρόσδεση και υδρόλυση του ATP και των δυναμικά μεταβαλλόμενων αλληλοεπιδράσεων του διμερούς, με το σύστημα HSP40/HSP70/πρωτεΐνη πελάτης και των συν-σαπερονών: HOP(HSP70/HSP90-Organizing protein), p23, CYCLOPHILIN 40 (CYP40) (Tichá et al., 2020).

1.3 Η ρύθμιση της λειτουργίας των HSP90

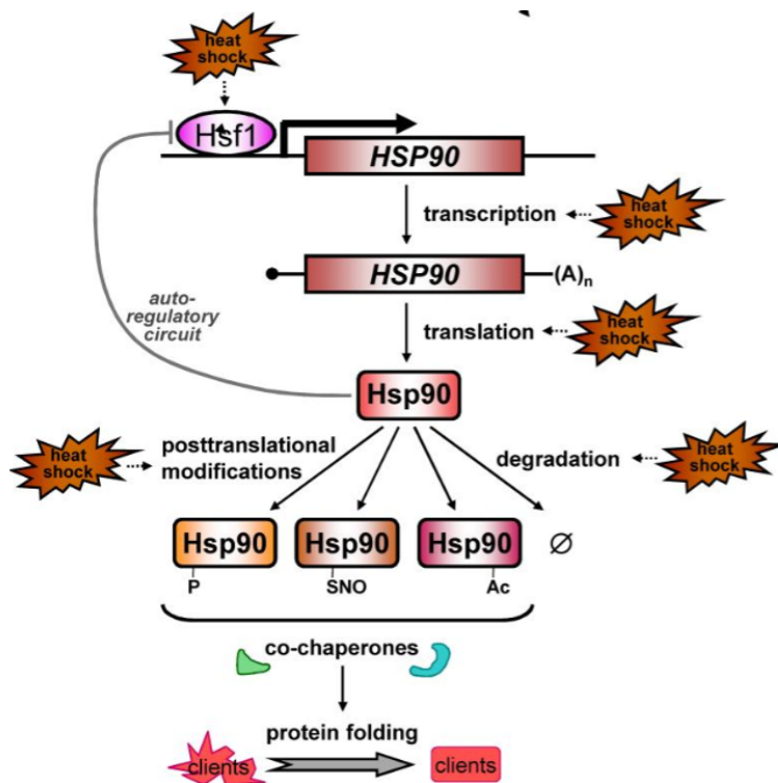
Η λειτουργία των HSP90, ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα, από την έκφραση των γονιδίων που τις κωδικοποιούν, μέχρι και την παρουσία του σπλοστασίου των cochaperone.

Η έκφραση των HSP90, όπως έχουμε προαναφέρει, μπορεί να είναι είτε συνεχής είτε επαγόμενη παρουσία περιβαλλοντικού στρες, ενώ όπως έχουμε δει μπορεί να ελέγχεται αναπτυξιακά (Yabe et al., 1994; Prasinos et al., 2005; Cao et al., 2003; Haralampidis et al., 2002). Η επαγωγή της έκφρασης των HSP90, παρουσία του περιβαλλοντικού στρες, γίνεται από τον μεταγραφικό παράγοντα- HEAT SHOCK FACTOR1 (HSF1), ο οποίος αποτελεί και πρωτεΐνη στόχο των HSP90. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο HSF1 διατηρείται σε ανενεργή μορφή συμπλοκοποιημένος με τις HSP70 και HSP90 (Nadeau et al., 1993). Παρουσία ενός περιβαλλοντικού στρες, οδηγεί στην απελευθέρωση του HSF1 και στην ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα, μεταξύ των οποίων βρίσκονται και τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις HSP90 (Sorger & Pelham, 1987; Whitesell & Lindquist, 2009). Επιπλέον, προκειμένου να καταστεί εφικτή η επιστράτευση του HSF1, στα στοιχεία (cis elements) που βρίσκονται σε υποκινητές γονιδίων που εκφράζονται παρουσία θερμικού στρες (HSEs-Heat Shock Elements), είναι αναγκαία η απομάκρυνση ενός ειδικού τύπου ιστόνης, που καταλαμβάνει τις κωδικές περιοχές των γονιδίων, της H2A.Z (Cortijo et al., 2017). Στην απομάκρυνση των νουκλεοσωμάτων που φέρουν τις ειδικές ιστόνες H2A.Z φαίνεται να συμμετέχουν πάλι έμμεσα οι HSP90, ελέγχοντας την λειτουργία του χρωματινικού αναδιαμορφωτή SWR-C, ο οποίος εξυπηρετεί την συγκεκριμένη απομάκρυνση (Zhao et al., 2005).

Τα cochaperones και τα συστατικά του στοιχείου, αποτελούν ένα σύνολο πρωτεϊνών που καθορίζουν διαφορετικές πτυχές της λειτουργίας των HSP90. Τα cochaperones, φαίνεται να ρυθμίζουν την δράση των HSP90 σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα: i) Στο συντονισμό της συνεργασίας μεταξύ του συστήματος των HSP90 και άλλων συστημάτων σαπερονών, όπως το σύστημα HSP70/HSP40, ii) στην επαγωγή ή αναστολή της δράσης της ATPάσης, iii) στην εξειδίκευση του σύμπλοκου των HSP90 ως προς τις πρωτεΐνες στόχους, και iv) στη ρύθμιση διαφόρων σταδίων του κύκλου των σαπερονών, μέσω της ενζυμικής τους δράσης (Taipale et al., 2010).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα cochaperones αποτελούν οι πρωτεΐνες HOP, που είναι υπεύθυνες για την διασύνδεση των συστημάτων HSP70/40 και HSP90, ενώ παράλληλα μειώνουν και την δράση της ATPάσης (Cintrón & Toft, 2006; Prodromou et al., 1999). Η Aha1, επιταχύνει αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση που αποτελούν τον περιοριστικό παράγοντα για την απόκτηση της στερεοδιαμόρφωσης που είναι υπεύθυνη υδρόλυση του ATP, και κατ' επέκταση αυξάνει την δράση της ATPάσης του συμπλόκου των HSP90 (Hessling et al., 2009). Η πρωτεΐνη 23, με την πρόσδεση της στην άμινο-τελική επικράτεια μειώνει την δομική ευελιξία της και οδηγεί σε μειωμένη δράση της ATPάσης και μαζί με το cochaperone CYP40, σταθεροποιούν το σύμπλοκο HSP90/πρωτεΐνη στόχος, πριν την υδρόλυση του ATP και την ολοκλήρωση του κύκλου της ATPάσης των HSP90 (Cintrón & Toft, 2006; Ali et al., 2006). Τέλος, ένα αρκετά μελετημένο μέλος των cochaperones που ρυθμίζουν τον λειτουργικό κύκλο των HSP90, αποτελεί η Cdc37. Το συγκεκριμένο cochaperone, πέραν του γεγονότος ότι είναι υπεύθυνο για την σύνδεση των κινασών-πρωτεϊνών στόχων με το σύμπλοκο των HSP90 (Shao et al., 2003), φαίνεται να επιδρά αρνητικά στην δράση της ATPάσης του συμπλόκου (Roe et al., 2004).

Τέλος, αρκετά σημαντικό ρόλο για την ρύθμιση του λειτουργικού κύκλου των HSP90 παίζουν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίστανται οι HSP90. Οι HSP90 υφίστανται μία σειρά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση/αποφωσφορυλίωση, ακετυλίωση, S-νιτροζυλίωση, και σουμουλίωση διαμορφώνοντας έναν κώδικα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των HSP90, με σαφή επίδραση στην ενεργότητα τους, στην αλληλοεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες πελάτες και τα cochaperones (Leach et al., 2012; Mayer & Le Breton, 2015).



Εικόνα 1.3.1 Σχεδιαγραμματική απεικόνιση των πολλαπλών επιπέδων ρύθμισης των επιπέδων και της ενεργότητας των HSP90 (Leach et al., 2012).

1.4 Ο ρόλος των HSP90

Για να κατανοήσουμε τον βιολογικό ρόλο των HSP90 είναι αναγκαίο να ριζούμε μία γενική ματιά στο σύνολο των πρωτεϊνών στόχων αλλά και των cochaperones, με τις οποίες αλληλοεπιδρούν. Στον άνθρωπο, οι HSP90, έχουν βρεθεί να αλληλοεπιδρούν, ως επί το πλείστον, με κινάσες και με τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών. Το 60% των συνολικών κινασών φαίνεται να αποτελούν πρωτεΐνες πελάτες των HSP90, όπως επίσης και 7% των μεταγραφικών παραγόντων και το 30 % του συνόλου των E3-λιγασών ουβικιτίνης (Taipale et al., 2012). Γενικότερα, οι HSP90 αποτελούν τον κόμβο, μέσα από τον οποίο ελέγχεται η πρωτεϊνική ομοιοστάση μίας πλειάδας διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Συνολικά, η πλειοτροπική δράση των HSP90 ελέγχει σε πολλαπλά επίπεδα την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την διατήρηση των τελομερών των χρωμοσωμάτων, την απόπτωση, την μεταγωγή σημάτων της μίτωσης, την μεμβρανική μεταφορά και έκκριση, την εγγενή ανοσία και την στοχευμένη αποικοδόμηση/αναδίπλωση πρωτεϊνών (Taipale et al., 2012).

Παρόλο που είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε αρκετές πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν πρωτεΐνες πελάτες των HSP90, εντούτοις δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε με ακρίβεια τη μοριακή βάση της αναγνώρισης των πρωτεϊνών-πελατών από τις HSP90. Ενδεχομένως, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην αναγνώριση των πρωτεϊνών στόχων τα cochaperones, που λειτουργούν ως προσαρμογείς στην διασύνδεση των πρωτεϊνών στόχων με τις HSP90. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα cochaperones- Cdc37, που προσδέουν την κινάση πρωτεΐνη στόχο, με το άμινο-τελικό τους άκρο και το σύμπλοκο των HSP90 με το καρβόξυ-τελικό τους άκρο, αλλά και η SGT1 (Suppressor of the G2 allele of skp1), η οποία λειτουργεί ως διαμεσολαβητής της πρόσδεσης των HSP90 με πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν Leucine-rich repeat (LRR) επικράτειες (Taipale et al., 2010). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο προς αυτή την κατεύθυνση έχει και το σύστημα HSP70/HSP40.

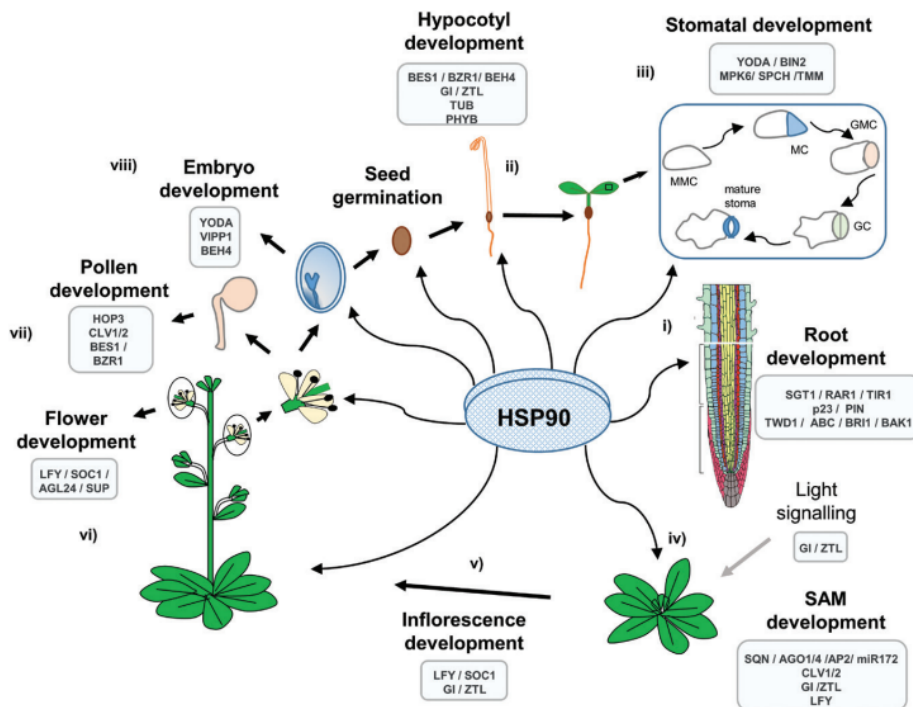
1.5 Οι HSP90 ως ρυθμιστές της ανάπτυξης του *Arabidopsis thaliana*

Ο κεντρικός ρόλος των HSP90, ως ρυθμιστή του συνόλου της αναπτυξιακής διαδικασίας του φυτού *Arabidopsis thaliana*, καταδεικνύεται από τους πλειοτροπικούς φαινότυπους που εμφανίζουν τα μεταλλάγματα των HSP90. Οι παρατηρούμενοι φαινότυποι στα μεταλλάγματα των HSP90 ποικίλουν με δυσμορφίες στο επίπεδο του εμβρύου, της ρίζας, των κοτυληδόνων, της αρχιτεκτονικής της ροζέτας, του αριθμού των φύλλων που την απαρτίζουν, του χρόνου άνθησης και δημιουργίας κεντρικού ανθοφόρου (Samakovli et al., 2007).

Οι HSP90 αλληλοεπιδρούν με μία σωρεία από cochaperones, αλλά και πρωτεΐνες στόχους, αποκτώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τον ρόλο του ρυθμιστή της ανάπτυξης του *Arabidopsis thaliana* (Tichá et al., 2020). Τα cochaperones, και οι πρωτεΐνες στόχοι των HSP90 στο *Arabidopsis thaliana*, φαίνεται να συσχετίζονται με πλήθος διαφορετικών μονοπατιών, μερικά εξ' αυτών είναι: i) μεταφορά/σηματοδότηση αυξινών, ii) σηματοδότηση βρασσινοστεροειδών, iii) κικκαδικό ρολόι, iv) αποκρίσεις στο βιοτικό και στο αβιοτικό στρες, v) συγκρότηση του RISC συμπλόκου, vi) οργάνωση του κυτταροσκελετού, vii) καθορισμός του χρόνου άνθησης, και διαμόρφωση του προτύπου οργάνωσης των ανθικών δομών, viii) ομοιοστάση της μεριστωματικής ζώνης, ix) η μετακίνηση μεμβρανών εντός του ενδοκυτταρικού μεμβρανικού συστήματος, καθώς και x) η μεταφορά πρωτεϊνών προς εξειδικευμένα οργανίδια (Πίνακας 1.4.1; Tichá et al., 2020).

Η διασύνδεση όλων αυτών των μονοπατιών στις HSP90, οι οποίες λειτουργούν ως ρυθμιστές ενός πολυδαίδαλου δικτύου επικοινωνίας διαφορετικών μονοπατιών, οδηγεί στην εμπλοκή των HSP90, μεταξύ άλλων, στην ανάπτυξη της ρίζας, του υποκοτυλίου, των στομάτων, στην μετάβαση στην αναπαραγωγική φάση, αλλά και στην γονιμοποίηση και τον σχηματισμό του εμβρύου (Εικόνα 1.4.1) (Tichá et al., 2020).

Όνομα	Σηματοδοτικό μονοπάτι
Συν-σαπερόνες: CO-CHAPERONE p23 GIGANTEA(GI)	Μεταφορά αυξίνης/ Σηματοδότηση Βρασσινοστεροειδών Κιρκαδικό ρολόι
Συν-σαπερόνες με TRP επικράτεια: E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE CHIP HSP90/HSP70 ORGANIZING PROTEIN 3 (HOP3) OUTER MEMBRANE 64(OM64) SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 5 (PP5) CYSTEIN AND HISTIDINE-RICH DOMAIN- CONTAINING PROTEIN (RAR1) SUPPRESSOR OF G2 ALLELE SKP1 (SGT1) SQUINT, CYCLOPHILIN 40 (SNQ) TRANSLOCON AT THE INNER ENVELOPE MEMBRANE OF CHLOROPLASTS 64 (TOC64) TRANSLOCON AT THE OUTER ENVELOPE MEMBRANE OF CHLOROPLASTS 64 (TOC75) TWISTED DWARF 1 (TWD1)	Απόκριση στο ABA Θερμοανεκτικότητα/απόκριση στο στρες μεσολαβούμενη από το ενδοπλασματικό δίκτυο Είσοδος πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια Απόκριση στο στρες Σηματοδότηση αυξίνης, ανοσοαπόκριση Σηματοδότηση αυξίνης, ανοσοαπόκριση RNA σίγηση Είσοδος πρωτεϊνών στους χλωροπλάστες Είσοδος πρωτεϊνών στους χλωροπλάστες Μεταφορά Αυξίνης/Σηματοδότηση Βρασσινοστεροειδών
Πρωτεΐνες πελάτες-κινάσες: BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2) CLAVATA PROTEINS (CLV1,2,3) MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE4 (YODA, MAPKKK4)	Σηματοδότηση Βρασσινοστεροειδών Ομοιόσταση μεριστωματικών κυττάρων MAPK μονοπάτι σηματοδότησης
Πρωτεΐνες πελάτες-E3 λιγάσες: TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) ZEITLUPE (ZTL)	Σηματοδότηση Αυξίνης Κιρκαδικό ρολόι
Πρωτεΐνες πελάτες- μεταγραφικοί παράγοντες: AGAMOUS LIKE 24 (AGL4) BRASSINOZOLE- RESISTANT 1 (BZR1) BES1/BZR1 HOMOLOG (BEH4) BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR (HSFs) LEAFY (LFY) SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) SUPPRESSOR OF CONSANS OVEREXPRESSOR 1 (SOC1)	Χρόνος άνθησης, σχηματισμός προτύπου άνθους Σηματοδότηση Βρασσινοστεροειδών Σηματοδότηση Βρασσινοστεροειδών Σηματοδότηση Βρασσινοστεροειδών Έκφραση των HSP90 Χρόνος άνθησης, σχηματισμός προτύπου άνθους
Πρωτεΐνες πελάτες (Μη συσχετιζόμενες): ARGONAUTE 1 AND 4 (AGO1,4) MG-PROTOPORPHYRIN IX (Mg-ProtoIX) SYNTAXIN OF PLANTS (SYP31,32,41,42,43,111,121,132) TUBULIN (TUBb) VESICLE-INDUCING PROTEIN IN PLASTIDS1 (VIPP1)	RNA σίγηση Βιοσύνθεση Τετραπυρολίου Ενδοσωμική μεταφορά πρωτεϊνών Κυτταροσκελετός και εξαρτώμενη από τον κυτταροσκελετό μεταφορά Βιογένεση των μεμβρανών των θυλακοειδών



Εικόνα 1.5.1. Σχηματική αναπαράσταση της δράσης των HSP90, των συν-σαπερονών, και των πρωτεϊνών πελατών στο σύνολο της αναπτυξιακής διαδικασίας του *Arabidopsis thaliana*. i) Ανάπτυξη της ρίζας: έλεγχος της σηματοδότησης/μεταφοράς της αυξίνης και της σηματοδότησης από τα βρασσινοστεροειδή; ii) Επιμήκυνση υποκοτυλίου: έλεγχος σηματοδότησης των βρασσινοστεροειδών, των μονοπατιών αντίληψης των φωτεινών σημάτων, του κερκαδικού ρυθμού και της οργανωσης των μικροσωληνίσκων; iii) Ανάπτυξη στομάτων: Ρύθμιση του καταρράκτη σηματοδότησης που ελέγχεται από την MPK6, και έλεγχος στην σηματοδότηση των βρασσινοστεροειδών; iv) Ανάπτυξη ακραίου μεριστώματος του βλαστού: έλεγχος του κερκαδικού ρυθμού, του συστήματος CLV1/2, της έκφρασης και της λειτουργίας του LFY; v) Έκπτυξη κεντρικού ανθοφόρου: Έλεγχος του κερκαδικού ρυθμού, της έκφρασης και της λειτουργίας των LFY, SOC1; vi) Σχηματισμός προτύπου άνθους: Έλεγχος της έκφρασης και της λειτουργίας των LFY, SOC1, AGL24 και SUP; vii) Ανάπτυξη γύρης: Επίδραση στους CLV υποδοχείς, και στην σηματοδότηση των βρασσινοστεροειδών; viii) Ανάπτυξη εμβρύου: Έλεγχος του σηματοδοτικού καταρράκτη που ελέγχεται από την MPK6, της σηματοδότησης των βρασσινοστεροειδών και της βιογένεσης των χλωροπλαστών (Tichá et al., 2020).

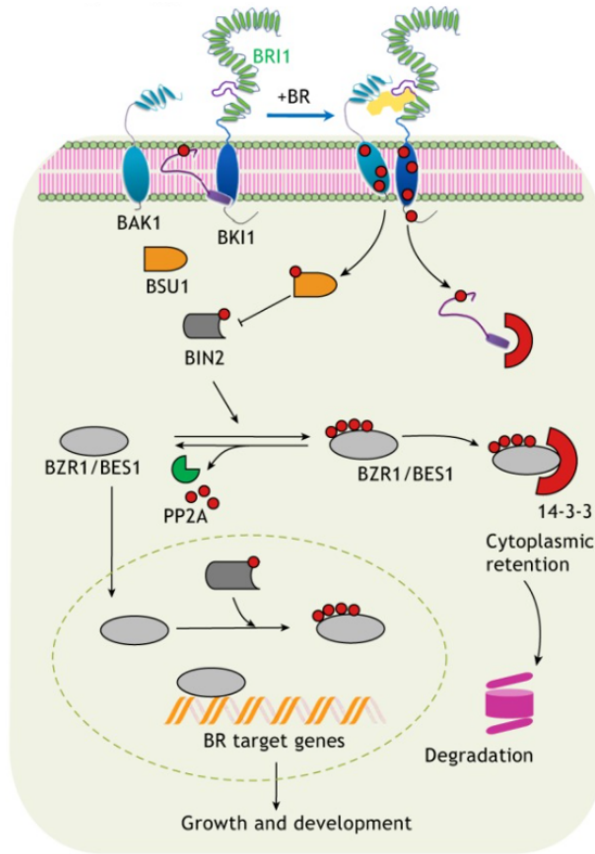
1.5.1 Βρασσινοστεροειδή

Τα βρασσινοστεροειδή αποτελούν φυτικές στεροειδείς ορμόνες, όπου επάγουν την ανάπτυξη και εμφανίζονται ευρέως σε όλο το φυτικό βασίλειο, ελέγχοντας μία πλειάδα από φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες. Η δράση των βρασσινοστεροειδών φαίνεται να ελέγχει, μεταξύ άλλων, την κυτταρική επιμήκυνση και διαίρεση, την φωτομορφογένεση, την διαφοροποίηση του ξυλώματος, την γήρανση, την γονιμότητα των αρσενικών μερών του άνθους, την ανάπτυξη της γύρης, την ωρίμανση των καρπών, ενώ παράλληλα ρυθμίζει ένα μεγάλο εύρος φυσιολογικών αποκρίσεων έναντι διαφορετικών περιβαλλοντικών σημάτων, όπως και τις αποκρίσεις παρουσία βιοτικού και αβιοτικού στρες (Mandava, 1988; Nolan et al., 2020; Manghwar et al., 2022). Τα βρασσινοστεροειδή απαντώνται σε όλα τα μέρη του φυτού, όπως στα φύλλα, στους βλαστούς, στις ρίζες, στην γύρη, στους ανθήρες, στα σπόρια, αλλά και γενικότερα σε όλους τους αναπτυσσόμενους ιστούς (Bajguz, 2011; Ohnishi, 2018).

Ο υποδοχέας των βρασσινοστεροειδών είναι ο BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 (BRI1), και αποτελεί μέλος μίας ευρείας οικογένειας πρωτεϊνών, των leucine-rich repeat receptor-like kinases (LRR RLKs) (Belkhadir & Chory, 2006). Ο υποδοχέας των βρασσινοστεροειδών απαρτίζεται από μία εξωκυττάρια επικράτεια (LRR), που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση των βρασσινοστεροειδών, μία διαμεμβρανική επικράτεια, και μία κυτταροπλασματική επικράτεια κινάσης καθώς και από ορισμένες ρυθμιστικές περιοχές: όπως η καρβόξυτελική περιοχή και η περιοχή που βρίσκεται σε εγγύτητα με την μεμβράνη (Vert et al., 2005). Τα μεταλλάγματα του BRI1, εμφανίζουν έντονο νανισμό, αλλαγή στην μορφολογία των φύλλων, διαταραχές στον αγωγό ιστό, αργοπορημένη άνθηση, καθυστέρηση στην γήρανση, και μειωμένη αρρενογονιμότητα (Clouse et al., 1996; Kauschmann et al., 1996; Li and Chory, 1997 ; Noguchi et al., 1999; Friedrichsen et al., 2000).

Για την πλήρη ενεργοποίηση του υποδοχέα BRI1 απαιτείται ο ετεροδιμερισμός του με μέλη υποοικογένειας των LRR RLKs, η οποία είναι γνωστή και ως SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES (SERKs) (Hecht et al., 2001). Η πρόσδεση των βρασσινοστεροειδών στο BRI1 ενεργοποιεί την βασική ενεργότητα κινάσης του BRI1, η οποία φωσφορυλιώνει τον αρνητικό ρυθμιστή BKI1, προωθώντας κατ' επέκταση την αλληλοεπίδραση του BRI1 με την SERK3, που είναι γνωστή και ως BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1 (BAK1), ή με τα ομόλογα της όπως η BAK1-LIKE (BKK1) και το SERK1 (He et al., 2007; Wang and Chory, 2006). Μετά τον σχηματισμό του ετεροδιμερούς BRI1/BAK1, πραγματοποιείται μία σειρά διασταυρούμενων φωσφορυλίσεων, σε συγκεκριμένα ρυθμιστικά πρωτεϊνικά κατάλοιπα, μεταξύ του BRI1 και του BAK1, ενισχύοντας την σηματοδοτική ικανότητα της BRI1, η οποία οδηγεί στην φωσφορυλίωση της BR SIGNALING KINASE1 (BSK1), και τελικώς στην ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής φωσφατάσης BRI1-SUPPRESSOR 1 (BSU1) (Wang et al., 2008; Kim et al., 2009; Tang et al., 2008; Mora-García et al., 2004). Στην συνέχεια, η ενεργοποιημένη BSU1, αποφωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την κινάση BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2) (Kim et al., 2009).

Η κινάση BIN 2, αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της μεταγραφικής ενεργότητας των μεταγραφικών παραγόντων BRI-EMS SUPPRESSOR 1 (BES1) και BRASSINOZOLE RESISTANT 1 (BZR1). Απουσία των βρασσινοστεροειδών, η ενεργή κινάση BIN2 φωσφορυλιώνει του μεταγραφικούς παράγοντες BES1/BZR1, οι οποίοι στην συνέχεια αναγνωρίζονται από το σύμπλοκο πρωτεϊνών 14-3-3, και καταλήγουν στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση (Bai et al., 2007; Gampala et al., 2007). Παρουσία των βρασσινοστεροειδών οι μεταγραφικοί παράγοντες BES1/BZR1, αποφωσφορυλιώνονται από την κυτταροπλασματική φωσφατάση Protein Phosphatase 2A (PP2A) και εν συνεχεία εισέρχονται στον πυρήνα για τον έλεγχο της έκφρασης των ελεγχόμενων από τα βρασσινοστεροειδή γονιδίων (Tang et al., 2011; Wang et al., 2002; Yin et al., 2002).



Εικόνα 1.5.2. Σχηματική αναπαράσταση του καταρράκτη μεταγωγής σήματος των βρασσινοστεροειδών (Planas-Riverola et al., 2019).

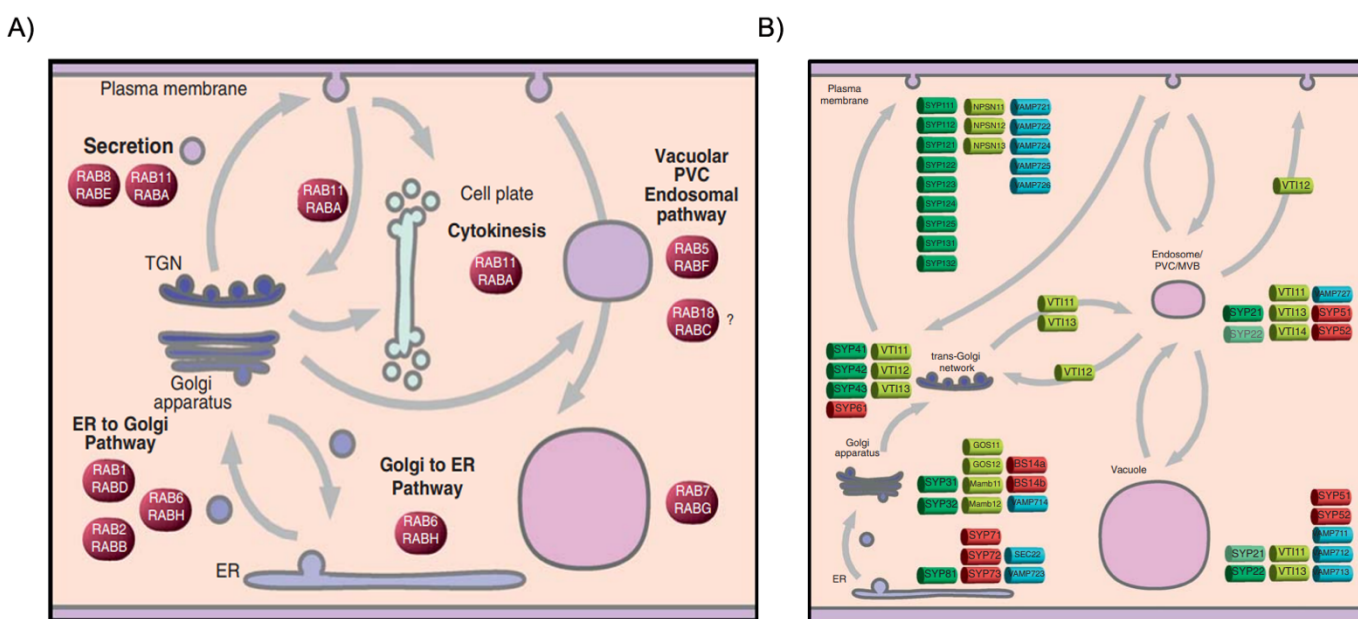
1.5.1.1 Το μονοπάτι ενδοκύττωσης των υποδοχέων των βρασσινοστεροειδών

Συνολικά υπάρχουν τρία βασικά μονοπάτια διακίνησης μεμβρανών στον ενδοκυττάριο χώρο, το βιοσυνθετικό μονοπάτι/εκκριτικό μονοπάτι, το μονοπάτι της ενδοκύττωσης, καθώς και το μονοπάτι το οποίο εμπλέκεται στην μεταφορά των πρωτεϊνών στα χυμοτόπια. Το πρώτο μονοπάτι είναι υπεύθυνο για την μεταφορά των πρωτεϊνών της πλασματικής μεμβράνης από το Ενδοπλασματικό δίκτυο, στο Golgi και εν συνεχεία στο Trans-Golgi και τελικώς στην πλασματική μεμβράνη (Jürgens & Geldner, 2002). Στο μονοπάτι της ενδοκύττωσης, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες εισέρχονται στον ενδοκυττάριο χώρο, στο επίπεδο του Trans-Golgi, όπου και γίνεται η διαλογή για των πρωτεϊνών που θα επαναπροωθηθούν στην πλασματική μεμβράνη (ανακύκλωση), ή θα οδηγηθούν στα λυτικά χυμοτόπια για αποικοδόμηση (Saito & Ueda, 2009). Το τρίτο μονοπάτι εμπλέκει αρκετούς μηχανισμούς, όπου μπορεί να εξυπηρετούνται από διαφορετικές οδούς: α) Ενδοπλασματικό δίκτυο/Golgi/Trans-Golgi/ όψιμα ενδοσώματα-πολυκυστιδικά σωμάτια/ χυμοτόπιο, και β) απευθείας διασύνδεση του χυμοτοπίου με το σύμπλεγμα Golgi (Viotti, 2014; Hara-Nishimura et al., 1998).

Οι διαδικασίες της ενδοκύττωσης, της εξοκύττωσης είναι υπεύθυνες σε μεγάλο βαθμό για την λειτουργία και τον δυναμικό έλεγχο της παρουσίας των μεμβρανικών πρωτεϊνών και εν γένει για τον έλεγχο του βαθμού απόκρισης διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών. Οι δύο αυτές διαδικασίες ρυθμίζουν συνεργιστικά την δυναμική των μεμβρανικών πρωτεϊνών σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο ως απόκριση στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, ενώ παράλληλα ελέγχουν πολλές πτυχές της αύξησης και ανάπτυξης του φυτού,

όπως είναι η αύξηση του ακροριζίου, η ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα, η αρχιτεκτονική του κυτταρικού τοιχώματος, η ανοσοποιητική απόκριση καθώς και η εγκαθίδρυση της κυτταρικής πολικότητας (Zhang et al., 2019; Kanazawa & Ueda, 2017; Fan et al., 2015). Η ενδοκύττωση των υποδοχέων, που αποτελούν το πρώτο σημείο της κυτταρικής σηματοδότησης, φαίνεται να έχει σαφή ρυθμιστικό ρόλο στην υποκυττάρια τοποθέτησή τους, και κατ'επέκταση στην λειτουργία και στην ενεργότητα τους. Η ισορροπία μεταξύ των δυο αυτών διεργασιών ελέγχεται τόσο από περιβαλλοντικά σιγνάλα όσο και από αναπτυξιακά ερεθίσματα (Zhang et al., 2019).

Κεντρικό ρόλο για την λειτουργία της μηχανής διακίνησης των μεμβρανικών πρωτεϊνών διαδραματίζει η διαφορική τοποθέτηση ειδικών παραγόντων στα διάφορα σημεία-οργανίδια που συμμετέχουν σε αυτήν, όπως είναι: α) SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor): πρωτεΐνες υπεύθυνες για την αναγνώριση και την σύντηξη δύο μεμβρανικών δομών. Η κατανομή των συμπληρωματικών SNAREs στα διάφορα οργανίδια ή υπό-περιοχές αυτών υποδηλώνει εξειδίκευση σε ότι αφορά την εν δυνάμει σύντηξη ως μεμβράνη στόχος ή μεμβράνη δότης (González-Solís et al., 2022), β) RAB GTPάσες & ARF GTPάσες: μικρές GTPάσες όπου εμπλέκονται στην επιλογή φορτίου, τον σχηματισμό του πρωτεϊνικού καλύμματος των κυστιδίων, την μεταφορά του κυστιδίου, την απομάκρυνση του πρωτεϊνικού καλύμματος των κυστιδίων, την συγκράτηση της μεμβράνης δότη με την μεμβράνη δέκτη και την μεμβρανική σύντηξη. Επιστρατεύουν ειδικές πρωτεΐνες τελεστές που αναδιαμορφώνουν την μεμβράνη οδηγώντας στην δημιουργία των κυστιδίων (Hutagalung & Novick, 201; González-Solís et al., 2022), και γ) Ενδοσωμικά σύμπλοκα: ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), συσχετίζονται με την αποικοδόμηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών, το σύμπλοκο Retromer, που είναι υπεύθυνο για την επαναφορά των νεοσυντιθέμενων μεμβρανικών πρωτεϊνών στο TGN/Golgi και των ενδοκυττωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη, και το σύμπλοκο Retriever (González-Solís et al., 2022).



Εικόνα 1.5.3. Υποκυτταρική κατανομή των μελών της οικογένειας των RAB-GTPασών (A), και των μελών της οικογένειας SNARE (B) στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Saito & Ueda, 2009).

Τόσο τα μέλη τη οικογένειας των SNARE πρωτεϊνών, όσο και τα μέλη των RAB-GTPάσεων, εμφανίζουν διαφορική υποκυττάρια τοποθέτηση, η οποία τους επιτρέπει τον έλεγχο διακίνησης των μεμβρανών, αλλά και αποτελούν τα αναγνωριστικά στοιχεία για την ερευνητική μελέτη της πορείας μεταφοράς των μεμβρανών (Εικόνα 1.5.3) (Saito & Ueda, 2009). Χαρακτηριστικό παραδείγμα αποτελεί η περίπτωση ωρίμανσης των πρώιμων ενδοσωμάτων σε όψιμα ενδοσώματα/πολυκυστικά σωματίδια και προχυμοτοπιακές μεμβρανικές δομές. Στα ενδοσώματα κυριαρχεί η παρουσία της οικογένειας των RAB5-GTPασών, και πιο συγκεκριμένα των RabF2b/ARA 7 και RabF1/ARA6. Η παρουσία του ARA7 υποδηλώνει την ταυτότητα ενδοσωμάτων, όπου σχετίζονται με την ενδοκύττωση και την μεταφορά προς το χυμοτόπιο, ενώ η παρουσία του ARA6 υποδηλώνει την ταυτότητα ενδοσωμάτων που εξυπηρετούν την διακίνηση μεμβρανών από τα όψιμα ενδοσώματα προς την πλασματική μεμβράνη (Ueda et al., 2004). Πριν την σύντηξη τους τα πολυκυστιδιακά σωματίδια περνούν και αυτά μία διαδικασία ‘ωρίμανσης’, κατά την οποία οι RAB5-GTPάσες, αντικαθίστανται από τις RAB7-GTPάσες (González-Solís et al., 2022)

Παράλληλα και άλλοι παράγοντες εκτός των SNAREs και το RAB-GTPασών εμφανίζουν συγκεκριμένη υποκυττάρια τοποθέτηση και συμμετέχουν στο σύστημα διακίνησης των μεμβρανών. Για παράδειγμα, η V-ATPάσης VHA-1a, είναι υπεύθυνη για την άντληση πρωτονίων και την όξυνιση του pH στο εσωτερικό των πρώιμων ενδοσωμάτων (TGN/EE), ενώ δευτερογενώς συμμετέχει στην διαδικασία μετατροπής τους σε όψιμα ενδοσώματα. Μία διαφορετική ισομορφή της VHA, η VHA-3a εντοπίζεται στα λυτικά χυμοτόπια (Wong, 2020; Reguera et al., 2015). Η πρωτεΐνη GNOM, που λειτουργεί ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων για τις ARF-GTPάσες, εντοπίζεται στο σύμπλεγμα Golgi, παρά τα αρχικά δεδομένα που την τοποθετούσαν στα πρώιμα ενδοσώματα, όπου και ασκεί ρυθμιστικό ρόλο στην ανακύκλωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών (Naramoto et al., 2014; Geldner et al., 2003). Το σύμπλοκο ESCRT, εντοπίζεται στα όψιμα ενδοσώματα και είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό κυστιδίων τα οποία βρίσκονται στο εσωτερικό των προχυμοτοπιακών κυστιδίων, πριν την σύντηξη με το λυτικό χυμοτόπιο (Fan et al., 2015).

Κατά την πορεία τους προς και από την μεμβράνη, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες και εν προκειμένω οι μεμβρανικοί υποδοχείς, μεταβαίνουν σε διαφορετικά μεμβρανικά διαμερίσματα-μέρη ενός πολύπλοκου κυτταρικού μεμβρανικού συστήματος. Χαρακτηριστικό μοντέλο για την μελέτη της διακίνησης εντός του ενδοκυτταρικού δικτύου αποτελεί η μελέτη της ενδοκύττωσης και υποκυττάριας τοποθέτησης του BRI1. Δεδομένης της δυναμικής σχέσης που εμφανίζουν μεταξύ τους τα διάφορα μεμβρανικά οργανίδια που ανήκουν στο πολύπλοκο ενδοκυτταρικό σύστημα διακίνησης των μεμβρανών, για την μελέτη της μοίρας και της ενδοκυτταρικής πορείας που ακολουθούν οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, χρησιμοποιούνται φαρμακευτικές ενώσεις, οι οποίες μπλοκάρουν την πορεία τους σε συγκεκριμένα σημεία (Robinson et al., 2008; Claus et al., 2018).

Οι δύο κυρίαρχοι μηχανισμοί που εξυπηρετούν την συνεχή ενδοκύττωση του BRI1 (Russinova et al., 2004), είναι το μονοπάτι το οποίο είναι εξαρτώμενο από την κλαθρίνη (Paez Valencia et al., 2016), και το μονοπάτι το οποίο είναι ανεξάρτητο της κλαθρίνης. Το τελευταίο σχετίζεται με την οργάνωση των υποδοχέων σε συγκεκριμένες μεμβρανικές μικροεπικράτειες και τον συνεντοπισμό των προς ενδοκύττωση μεμβρανικών

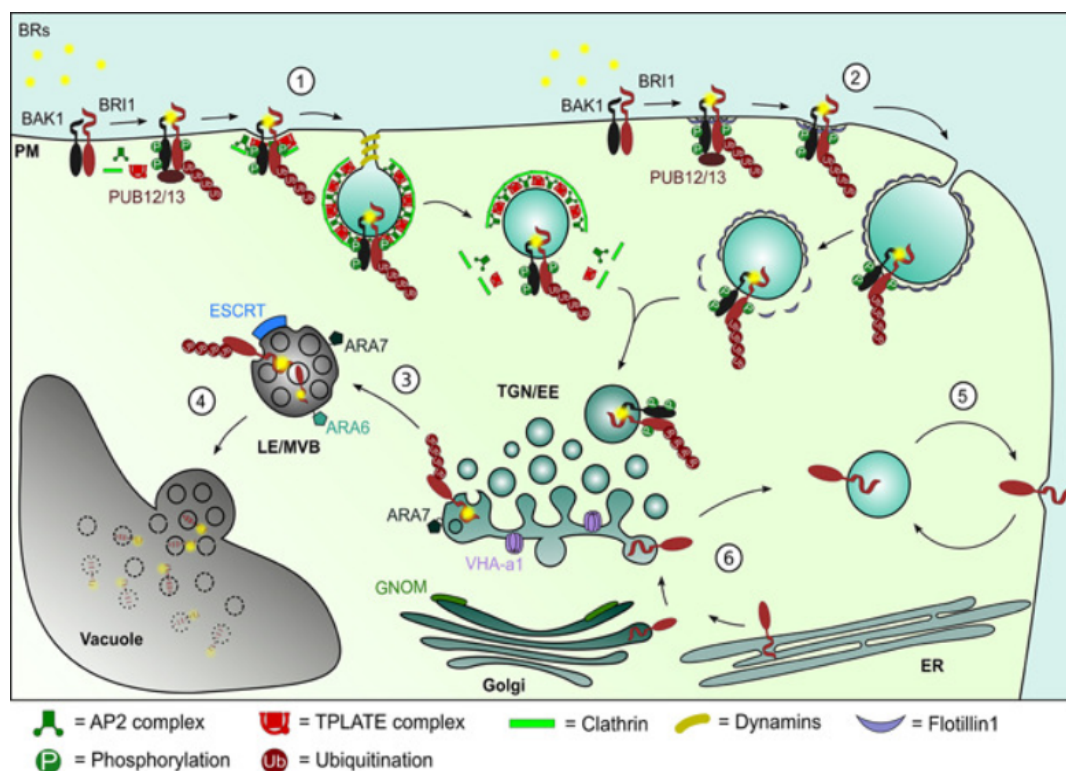
πρωτεϊνών με την πρωτεΐνη flottilin (FLOT1) (Ott, 2017; Li et al., 2012). Η ρύθμιση της ενδοκύττωσης ενός μεμβρανικού υποδοχέα, μέσω μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως είναι η φωσφορυλίωση, η ουβικιτινυλίωση και η ακετυλίωση, έχει δειχθεί ευρέως στα συστήματα των θηλαστικών (Bakker et al., 2017);. Η ουβικιτινυλίωση διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην ενδοκύττωση των μεμβρανικών υποδοχέων τόσο στα θηλαστικά όσο και στα φυτικά συστήματα (Conte & Sigismund, 2016; Martins et al., 2015). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πολυουβικιτινυλίωση, από ειδικές E3 λιγάσες (PUB12 και PUB13), του μεμβρανικού υποδοχέα BRI1, η οποία οδηγεί στην ενδοκύττωση του υποδοχέα και αποτελεί σήμα για την στόχευση του προς αποικοδόμηση σε συγκεκριμένα ενδοκυτταρικά οργανίδια (Zhou et al., 2018)(Εικόνα 1.5.4).

Μετά την ενδοκύττωση, ο μεμβρανικός υποδοχέας BRI1 εντοπίζεται στην επιφάνεια ενός αθροίσματος από μεμβρανικά κυστίδια, τα οποία ονομάζονται πρώιμα ενδοσώματα (Early endosomes- EEs) ή δίκτυο trans-Golgi (trans-Golgi Network- TGN). Το TGN, αποτελεί το σημείο όπου γίνεται η διαλογή των μεμβρανικών πρωτεϊνών που έχουν ενδοκυττωθεί, και λαμβάνονται οι αποφάσεις για το εάν θα μεταβεί η πρωτεΐνη στα λυτικά χυμοτόπια (lytic vacuoles), ή θα ανακυκλωθούν πάλι πίσω στην πλασματική μεμβράνη. Στην περίπτωση της ανακύκλωσης το BRI1 γίνεται αποουβικιτινυλίωση και μεταφορά σε μία ειδική υπό-επικράτεια του TGN, η οποία είναι γνωστή και ως ανακυκλωτικό ενδόσωμα και στην συνέχεια καταλήγει στην πλασματική μεμβράνη. Στην περίπτωση της πορείας της αποικοδόμησης, κυστίδια από το TGN/EEs, τα οποία φέρουν στην επιφάνεια τους μόρια του υποδοχέα περνάνε μία διαδικασία ωρίμανσης, κατά την οποία τμήματα της επιφάνειας των κυστιδίων εισέρχονται στο εσωτερικό των ενδοσωμάτων, με μία διαδικασία παρόμοια με την ενδοκύττωση, οδηγώντας τελικώς στον σχηματισμό των πολυκυστιδικών σωματίων (Multivesicular bodies- MVBs), τα οποία είναι αλλιώς γνωστά και ως όψιμα ενδοσώματα ή προχυμοτοπιακό διαμέρισμα. Τα όψιμα ενδοσώματα, στην συνέχεια συντήκονται με το κεντρικό ή τα μικρότερα περιφερειακά λυτικά χυμοτόπια, απελευθερώνοντας στο εσωτερικό των χυμοτοπίων το περιεχόμενο τους προς αποικοδόμηση (Εικόνα 1.5.4) (Claus et al., 2018;Zhang et al., 2019).

Αρκετές είναι οι αναφορές που σχετίζουν την δράση των HSP90 με την μεταφορά των υποδοχέων στην μεμβράνη αλλά και με το σύστημα διακίνησης των μεμβρανών. Οι HSP90 φαίνεται ότι συμμετέχουν στον λειτουργικό κύκλο των RAB-GTPασών, αλληλοεπιδρώντας με πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτό το σύστημα (Tairale et al., 2010). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ένας αναστολέας της ανταλλαγής του GDP των RAB πρωτεϊνών, ο RhoGDIa, στα κύτταρα των θηλαστικών ο οποίος, με την σειρά του ελέγχει τον λειτουργικό κύκλο αρκετών RAB-GTPασών, που σχετίζονται με την μεμβρανική μεταφορά (Chen & Balch, 2006; Lotz et al., 2008).

Παράλληλα, άλλες μελέτες στα θηλαστικά, έδειξαν ότι οι HSP90 φαίνεται να συσχετίζονται και με την σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων (Wu et al., 2020), σύνδεση με πρωτεΐνες κινητήρες στους μικροσωληνίσκους και στα ινίδια ακτίνης (Young, Barral, & Ulrich Hartl, 2003), με την δράση του ESCRT συμπλόκου μέσω αλληλεπίδρασης με την ESCRT-I υπομονάδα (Giordano et al., 2019), αλλά και με την ρύθμιση της ενδοκύττωσης και της αποικοδόμησης μεμβρανικών υποδοχέων, όπως ο ErbB2 (Human

Epidermal Growth Factor Receptor 2) και ο EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Ahsan & Ramanand, 2012). Το μοντέλο, όπως αυτό προτείνεται στην περίπτωση της ενδοκύττωσης του ErbB2, υποδεικνύει ότι οι HSP90 προστατεύουν την διαμεμβρανική πρωτεΐνη όταν βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη, ενώ παράλληλα ελέγχουν την σταθερότητα και την μεταφορά του νεοσυντιθέμενου ErbB2. Η φαρμακευτική αναστολή της δράσης των HSP90 οδηγεί σε αλληλοεπίδραση του ErbB2 με το τις HSP70, σε ουβικιτινίωση και τελικώς σε στόχευση στα λυσοσώματα ή/και στο πρωτεάσωμα (Bertelsen & Stang, 2014; Xu et al., 2002; Kreitman et al., 2018).



Εικόνα 1.5.4. Οι οδοί διακίνησης του BRI1:1, Ενδοκύττωση που εξυπηρετείται από την κλαθρίνη; 2, Ενδοκύττωση που είναι ανεξάρτητη της κλαθρίνης; 3, Ωρίμανση του TGN/EE προς τον σχηματισμό των MVBs; 4, Σύντηξη των MVBs με το χυμοτόπιο; 5, Ανακύκλωση; 6, Εκκριτική οδός(Claus et al., 2018).

1.5.2 Ο πολυεπίπεδος έλεγχος του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των βρασσινοστεροειδών από τις HSP90.

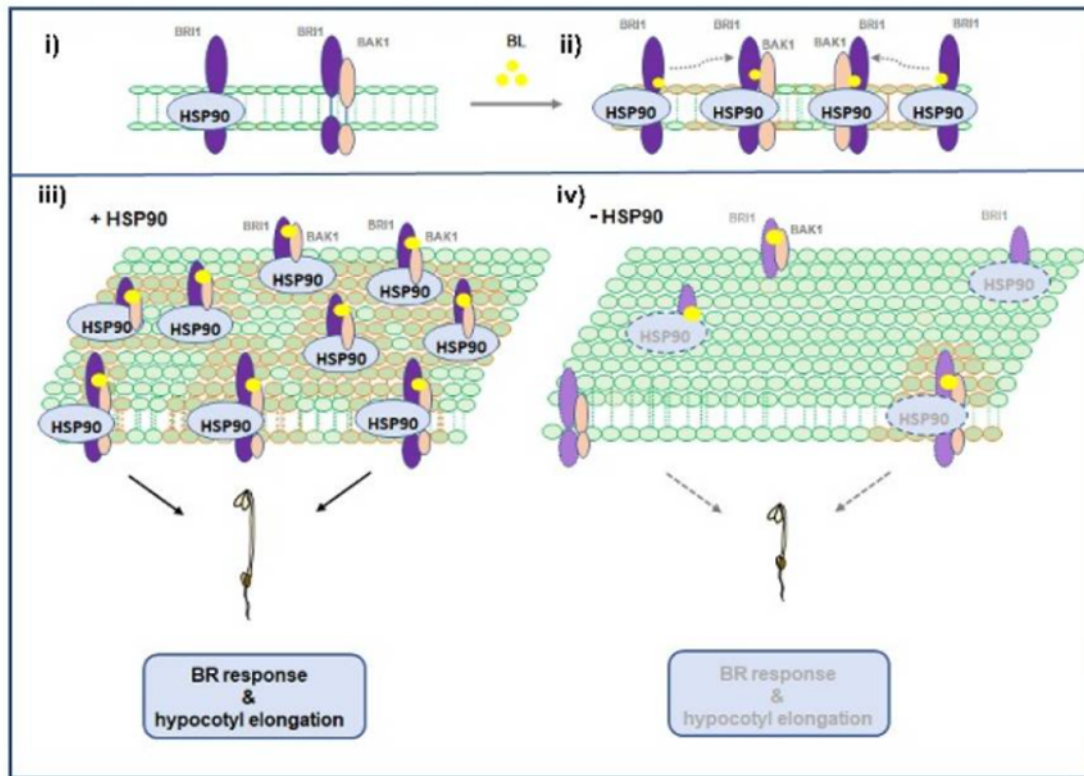
Οι HSP90 προκειμένου να επιτελέσουν τον ρόλο τους ως ένας κεντρικός παράγοντας διαμόρφωσης του στερεοτυπικού προτύπου ανάπτυξης, αλληλοεπιδρούν, έμμεσα ή άμεσα, με ένα σύνολο πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε διαφορετικές κυτταρικές και φυσιολογικές διεργασίες, αλλά και σηματοδοτικά μονοπάτια (Πίνακας 1.5.1) (Tichá et al., 2020). Ωστόσο, σε ένα μονοπάτι ή διεργασία στην οποία εμπλέκονται, οι HSP90 μπορούν δυνητικά, να δρουν σε διαφορετικά επίπεδα του συγκεκριμένου μονοπατιού, όπως χαρακτηριστικά συμβαίνει στο μονοπάτι στο οποίο εξετάζουμε, αυτό της μεταγωγής του σήματος των βρασσινοστεροειδών.

Αρχικά, στο επίπεδο του υποδοχέα των βρασσινοστεροειδών, οι κυτταροπλασματικές HSP90 αλληλοεπιδρούν άμεσα τόσο με το BRI1, όσο και με το BAK1, ρυθμίζοντας τα επίπεδά τους στην μεμβράνη

των κυττάρων του υποκοτυλίου, την δυναμική του σχηματισμού του ετεροδιμερούς BRI1/BAK1, αλλά και την χωροταξική τους διεύθυνση πάνω στην μεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα, οι HSP90 φαίνεται να ασκούν θετικό έλεγχο στα μεμβρανικά επίπεδα του BRI1 και του BAK1, καθώς έχουν παρατηρηθεί μειωμένα επίπεδα BRI1 και BAK1 στην μεμβράνη και συγκέντρωση τους στο κυτταρόπλασμα, σε μελέτες όπου έγινε είτε γενετική είτε φαρμακολογική αναστολή της λειτουργίας των HSP90 (Samakovli et al., 2022). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι το BRI1 οργανώνεται ετερογενώς πάνω στην μεμβράνη, δηλαδή οργανώνεται σε ανεξάρτητα λειτουργικά σημεία- μεμβρανικές υπό-περιοχές, των οποίων η δυναμική ελέγχεται από την αντίληψη των βρασσινοστεροειδών (Wang et al., 2015). Οι μεμβρανικές υπο περιοχέςστις οποίες εδράζεται ο υποδοχέας BRI1 σχετίζονται με την ενεργοποίηση του μεταγραφικού προγράμματος των βρασσινοστεροειδών και με τον έλεγχο της ενδοκύττωσης των μεμβρανικών πρωτεϊνών (Grossmann et al., 2008;Liang et al., 2018).

Στο μοντέλο, όπως αυτό φαίνεται και στην εικόνα 1.5.3, περιγράφονται οι σχέσεις των HSP90 με τα μέρη του ετεροδιμερούς υποδοχέα BRI1/BAK1, που καθορίζουν την δυναμική της οργάνωσης των μερών αυτών σε συγκεκριμένες υπο-μεμβρανικές περιοχές. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο μοντέλο, οι HSP90 φαίνεται να αλληλοεπιδρούν, σε συνθήκες ηρεμίας, με το BRI1, μία αλληλοεπίδραση που φαίνεται να περιορίζει, σε κάποιο βαθμό, την αλληλοεπίδραση του ανενεργού BRI1 με το BAK1, διαχωρίζοντας το BRI1 και το BAK1 χωροταξικά (i). Μετά την πρόσδεση του βρασσινοστεροειδούς, μεταβαίνουμε σε παρόμοια πρότυπα πλευρικής μεμβρανικής οργάνωσης των συμπλόκων HSP90/BRI1 και BRI1/BAK1, υποδηλώνοντας την εισχώρηση του συμπλόκου HSP90/BRI1 στο ενεργοποιημένο σύμπλοκο με το BAK1 (ii), οδηγώντας τελικά στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού προγράμματος των βρασσινοστεροειδών (iii). Τέλος, η μειωμένη παρουσία ή/και ενεργότητα των HSP90, φαίνεται να οδηγεί σε μείωση των επιπέδων του μεμβρανικού BRI1, σε παράλληλη αύξηση του χωρικού διαχωρισμού των συμπλοκων HSP90/BRI1 και BRI1/BAK1, και τελικά σε μειωμένη απόκριση στα βρασσινοστεροειδή (iv) (Samakovli et al., 2022).

Δεδομένα υπάρχουν και για την εμπλοκή των HSP90, στα πυρηνικά γεγονότα που αφορούν στην μεταγωγή του σήματος των βρασσινοστεροειδών, δηλαδή στον λειτουργικό έλεγχο των μεταγραφικών παραγόντων BES1 και BZR1. Ειδικότερα οι HSP90, φαίνεται να αλληλοεπιδρούν άμεσα με την κινάση BIN2, ρυθμίζοντας την είσοδο και την έξοδο της από τον πυρήνα, παρουσία και απουσία βρασσινοστεροειδών. Δεδομένα δείχνουν σαφή επίδραση των HSP90 στην ικανότητα του BIN2 να φωσφορυλιώνει και να απενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες των αποκρινόμενων στα βρασσινοστεροειδή γονιδίων (Samakovli et al., 2014;Zhang et al., 2022). Σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο του ρόλου των HSP90 στην λειτουργία του BIN2, οι HP90 συγκρατούν το BIN2 εντός του πυρήνα, απουσία βρασσινοστεροειδών, ενώ παρουσία βρασσινοστεροειδών μειώνεται η πυρηνική παρουσία των HSP90, γεγονός που οδηγεί στην μειωμένη πυρηνική παρουσία , και κατ'επέκταση στην μειωμένη δράση του BIN2 (Samakovli et al., 2014).



Εικόνα 1.5.3. Προτεινόμενο μοντέλο για τον ρόλο των HSP90 στην ενεργοποίηση του BRI1 στην πλασματική μεμβράνη (Samakonli et al., 2022).

Επιπλέον, οι HSP90 αλληλοεπιδρούν άμεσα τόσο με το BES1 (Shigeta et al., 2014; Shigeta et al., 2015; Samakonli et al., 2019), όσο και με το BZR1 (Plitsi et al., 2022). Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν ότι οι HSP90 σχηματίζουν διαφορετικά ετεροσύμπλοκα, μετά την αντίληψη του βρασσινοστεροειδών, και αυτό οδηγεί συν τοις άλλοις στον σχηματισμό είτε του ετεροσυμπλοκου HSP90-BES1, είτε του HSP90-BZR1, με τρόπο εξαρτώμενο από την δράση της ATPάσης των HSP90 (Shigeta et al., 2014; Shigeta et al., 2015). Επιπλέον, η χρήση -Τζελνταμυκίνης (GDA), που οδηγεί αναστέλλει τη δράση της ATPάσης των HSP90, έχει ως αποτέλεσμα την υπερφωσφορυλίωση του BES1 και την απενεργοποίησή του. Τέλος, οι μεταβολές στο χωροταξικό πρότυπο αλληλοεπίδρασης των HSP90 με το BES1, επιδεικνύουν την αναγκαιότητα αλληλεπίδρασης εντός του πυρήνα για την απόκτηση της κατάλληλης στερεοδιαμόρφωσης του BES1, και τον ρόλο που έχουν οι HSP90 στις μεταβάσεις του BES1 από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα παρουσία και απουσία των βρασσινοστεροειδών (Samakonli et al., 2019).

1.5.3 Η απομεθυλάση των REF6 ως μέρος του σηματοδοτικού μονοπατιού των βρασσινοστεροειδών.

Η έκφραση ορισμένων εκ των αποκρινόμενων στα βρασσινοστεροειδή γονιδίων, απαιτεί την συνέργεια επιγενετικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων και την τροποποίηση των ιστονών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περιπτωση της δι- και τρι-μεθυλίωσης His-3 Lys-27 (H3K27me2/H3K27me3). Ο μεταγραφικός παράγοντας BES1 αλληλεπιδρά άμεσα, μέσω της αμινο-τελικής του επικράτειας, με την κραβόξυ-τελική επικράτεια δύο απομεθυλασών, της EARLY FLOWER 6 (ELF6) και της RELATIVE EARLY FLOWER 6 (REF6), οι οποίες λειτουργούν ως θετικοί ρυθμιστές του μονοπατιού των βρασσινοστεροειδών, αφαιρώντας τις κατασταλτικές σημάνσεις της χρωματίνης H3K27me2/H3K27me3 (Yu

et al., 2008; Lu et al., 2011). Το REF6 μέσω της αλληλεπιδράσης με τον χρωματινικό αναδιαμορφωτή, της οικογένειας των SWI/SNF, BRAHMA (Li et al., 2016) εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης των ελεγχόμενων από τα βρασσινοστεροειδή γονιδίων. Κατά αντιστοιχία, ο μεταγραφικός παράγοντας BZR1, αλληλοεπιδρά άμεσα με τον χρωματινικό αναδιαμορφωτή PICKLE, με στόχο τον περιορισμό της H3K27me3 μεθυλίωσης στους υποκινητές των επαγόμενων από τα βρασσινοστεροειδή γονιδίων (Zhang et al., 2014). Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το γεγονός της επιστράτευσης από το BES1 της μεθυλατρανσφεράσης SDG8, και την επακόλουθη αύξηση των επιπέδων της H3K36 δι- και τριμεθυλίωσης στις περιοχές στόχους, καταδεικνύουν την αναγκαιότητα της συνεργιστικής δράσης μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων και τροποποιητών της χρωματίνης για την ενεργοποίηση των αποκρινόμενων στα βρασσινοστεροειδή γονιδίων (Wang et al., 2014).

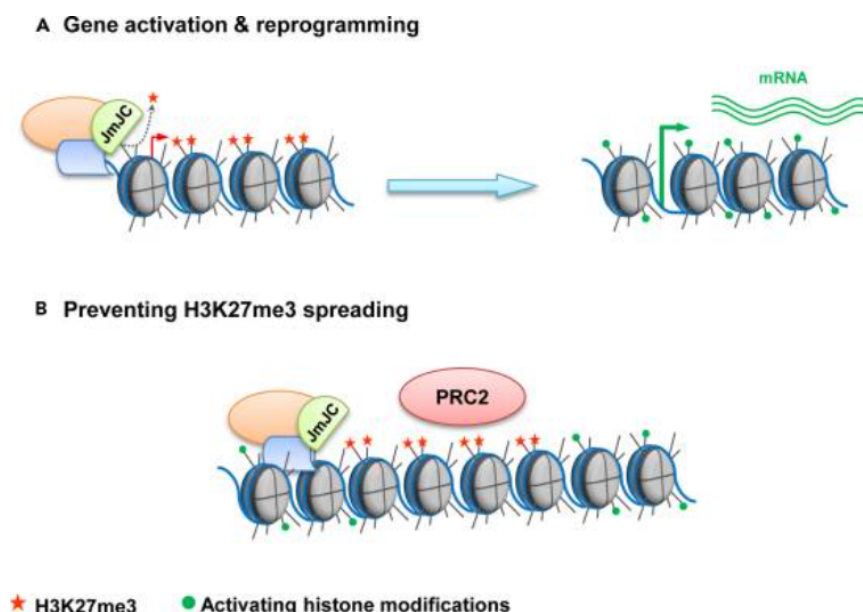
1.5.3.1 Το REF6 ως ανταγωνιστικός παράγοντας της δράσης του PRC2 συμπλοκου

Οι άμινο-τελικές ουρές των ιστονών αποτελούν στόχος μίας σωρείας μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως η ακετυλίωση, η ουβικιτινυλίωση, και η μεθυλίωση σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα (Kouzarides, 2007). Το σύνολο των μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών, ο λειτουργικός τους ρόλος, και η δυναμική με την οποία εμφανίζονται στην χρωματίνη, απαιτεί την συνέργεια αρκετών παραγόντων που χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες: ‘Writer’, ‘Readers’, ‘Erasers’. Οι ‘Writers’ αποτελούν τα ένζυμα που προσθέτουν τις μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι ‘Readers’ αποτελούν πρωτεΐνες τελεστές που διαβάζουν τον κώδικα των ιστονών, και οι ‘Erasers’ αποτελούν πρωτεΐνες που αφαιρούν τις μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών. Ο κώδικας των ιστονών είναι άμεσα συνδεδεμένος με την μεταγραφική κατάσταση των γονιδίων κατά μήκος του γονιδιώματος των ευκαρυωτικών οργανισμών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα του ιστονικού κώδικα, αποτελούν η H3K27me3, η οποία σχετίζεται με την μεταγραφική καταστολή, και η H3K36me3, η οποία σχετίζεται με την αυξημένη μεταγραφή (Li et al., 2007).

Η δράση της μεθυλ-τρανσφεράσης που εντοπίζεται στο κατασταλτικό σύμπλοκο Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) είναι υπεύθυνη για την τριμεθυλίωση της λυσίνης 27 των ιστονών H3 (Förderer et al., 2016). Στο *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν 3 διαφορετικά PRC2 σύμπλοκα τα οποία διαφέρουν στη μεθυλατρανσφεράση, που μεθυλιώνει την H3K27 και είναι: Curly Leaf (CLF), Swinger (SWN) και Medea (MEA) (Pu & Sung, 2015). Τα φυτικά PRC2 σύμπλοκα εξυπηρετούν την ρύθμιση των αναπτυξιακών μεταβάσεων, όπως είναι η άνθηση και ο σχηματισμός των σπόρων, ενώ φαίνεται να παίζουν κεντρικό ρόλο και σε άλλες αναπτυξιακές διαδικασίες που απαιτούν την διατήρηση της μεριστωματικής κατάστασης των κυττάρων ή την διαφοροποίηση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ρύθμιση του χρόνου άνθησης, μέσω του ελέγχου έκφρασης κεντρικών αναπτυξιακών γονιδίων της ανθικής μετάβασης όπως το FLOWERING LOCUS T (FT), του SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1) και του αναστολέα της άνθησης FLOWERING LOCUS C (FLC)(Crevillén, 2020).

Ανταγωνιστικά στην δράση του PRC2, στο επίπεδο της H3K27me3, φαίνεται να λειτουργούν ορισμένα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών που διαθέτουν JumonjiC (JmjC) επικράτεια (πρωτεΐνες Jumonji/JMJ). Η JmjC επικράτεια είναι υπεύθυνη για την ενζυμική ενεργότητα της απομεθυλάσης. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχουν αναγνωρισθεί 21 JmjC πρωτεΐνες, πέντε έχουν αναφερθεί για ενεργότητα απομεθυλάσης στην H3K27me3: οι MJ30(AT3G20810), MJ32 (AT3G45880), MJ11(ELF6/ AT5G0424), MJ12 (REF6/ AT3G48430), MJ13(AT5G46910) (Crevillén, 2020). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση γονιδίων, σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια ή/και με ιστοειδικό τρόπο, αναγκαία για μεγάλο εύρος αναπτυξιακών διαδικασιών, όπως η άνθηση, η ορμονική σηματοδότηση και ο έλεγχος του κερκαδικού κύκλου (Yan W et al., 2018). Σε αντίθεση με τις MJ30,31,32, οι πρωτεΐνες REF6, ELF6 και MJ13 διαθέτουν πέραν της JmjC επικράτειας, την επικράτεια JmjN, μία αμινο-τελική επικράτεια που είναι συντηρημένη σε αρκετές πρωτεΐνες που φέρουν επικράτειες Jmj και η δράση της σχετίζεται με την αναγνώριση του υποστρώματος και την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Επιπλέον στο καρβόξυ-τελικό άκρο των απομεθυλασών REF6 και ELF6 εντοπίζονται 4 N-terminal C2H2-type ZnFn (zinc fingers) μοτίβα (Crevillén, 2020).

Οι MJ πρωτεΐνες φαίνεται να λειτουργούν στο επίπεδο του γονιδιώματος με δύο διαφορετικούς τρόπους: A) Στην ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων, ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ή εγγενή ερεθίσματα, μέσω της απομάκρυνση της κατασταλτικής σήμανσης των ιστονών H3K27me3, ως αποτέλεσμα της δράσης του συμπλόκου PRC2, και B) Στην αποτροπή της ανεξέλεγκτης επέκτασης της κατασταλτικής επιγενετικής σήμανσης κατά μήκος του γονιδίου στόχου (Εικόνα 1.5.6) (Crevillén, 2020).



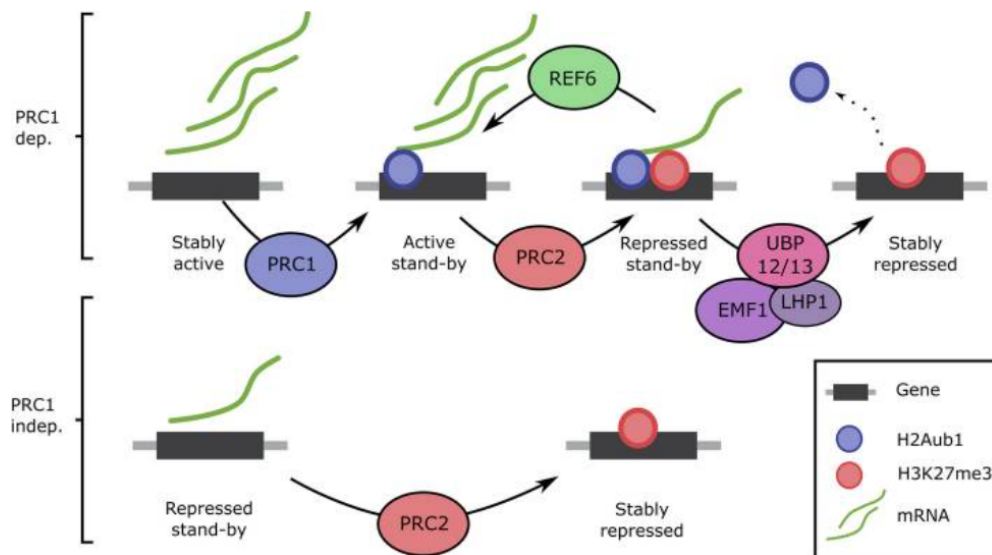
Εικόνα 1.5.6. Ο λειτουργικός ρόλος των MJ πρωτεϊνών στο επίπεδο του γονιδιώματος (Crevillén, 2020).

1.5.3.2 Ο ρόλος του REF6 στην ανάπτυξη του φυτού *A.thaliana*

Το PRC2 και το REF6 δρουν ανταγωνιστικά σε αρκετές περιοχές της ευχρωματίνης ελέγχοντας την αποσιώπηση ή την ενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με σύνολο αναπτυξιακών διαδικασιών. Οι

ευχρωματινικές περιοχές της ανταγωνιστικής δράσης του PRC2 και REF6, έχει δειχθεί ότι καθορίζονται, μερικώς από την δράση του PRC1 συμπλόκου (BRmann LEM et al., 2020). Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν πέντε διαφορετικά ομόλογα συστατικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών του PRC1 *Arabidopsis thaliana* RING 1A (At RING1A), AtRING 1B (AtRING 1A/B) και *Arabidopsis thaliana* B lymphoma Mo-MLV insertion region 1A/B/C (AtBMI1A/B/C) (Bratzel F et al., 2010); (Chen D et al., 2010). Από αυτά, οι AtRING1A/B και AtBMI1A/B/C αποτελούν ενεργές E3 λιγάσες ουβικιτίνης, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την μονοουβικιτινυλίωση της λυσίνης H2AK119, ενώ η απώλεια της ενεργής AtBMI1 οδηγεί σε καταστολή της H2Aub τροποποίησης *in vivo* (Yang C et al., 2013); (Bratzel F et al., 2010). Πέραν της ουβικιτινυλίωσης των ιστονών, υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι συστατικές πρωτεΐνες του συμπλόκου PRC1 μπορούν να οδηγήσουν και στην συμπύκνωση της χρωματίνης, όπως συμβαίνει στην περίπτωση συμμετοχής του Embryonic Flower 1 (EMF1) σε μία παραλλαγή του PRC1, όπου δεν είναι παρούσα η δράση των AtRING1/AtBMI1 λιγασών ουβικιτίνης. Στα περισσότερα γονίδια στα οποία στη ρύθμιση της, έκφρασης τους εμπλέκονται τα PRC1, και PRC2 σύμπλοκα φαίνεται να έχουμε είτε διαδοχική δράση (PRC1→PRC2), είτε ανεξάρτητη δράση των δύο συμπλόκων (Pu L & Sung ZR, 2015).

Η μονοουβικιτινυλίωση H2Aub1, αποτελεί μία ιστονική τροποποίηση, που οδηγεί στη μείωση της έκφρασης των γονιδίων στόχων, υ κατά την μεταβολή των εγγενών ή των περιβαλλοντικών συνθηκών (Kralemann LEM et al., 2020; Li et al., 2016). Τα γονίδια τα οποία βρίσκονται υπό καθεστώς άμεσης μεταβολής της μεταγραφικής τους κατάστασης, ως απόκριση στις περιβαλλοντικές και εγγενείς μεταβολές, απαιτούν την παρουσία της H2Aub1, η οποία επιστρατεύει το REF6 για την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων, και παράλληλα επιτρέπει την σίγηση μέσω της δράσης του PRC2 συμπλόκου (Kralemann LEM et al., 2020). Το PRC2 απαιτεί για την επιστράτευση του στα μεταγραφικά ενεργά γονίδια την δράση του PRC1, λόγω της ικανότητας πρόσδεσης του PRC2 με το νεοσυντιθέμενο RNA στις μεταγραφικά ενεργές περιοχές, και της επακόλουθης μείωσης της δραστηριότητάς του (Beltran M et al., 2016). Επιπλέον, το PRC2 σύμπλοκο προσελκύει, τις πρωτεΐνες Like Heterochromatin Protein1 (LHP1) και EMF1 (μέρη του συμπλόκου PRC1), τα οποία με την σειρά τους επιστρατεύουν τις ubiquitin-specific proteases 12 και 13 (UBP12 και UBP13), προκειμένου να απομακρυνθεί η H2Aub1 τροποποίηση, με αποτέλεσμα την σταθερή απενεργοποίηση του γονιδίου στόχου (Εικόνα 1.5.7) (Kralemann LEM et al., 2020).



Εικόνα 1.5.7. Η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων- στόχων των συμπλόκων PRC1/PRC2 (Kralemann LEM et al., 2020).

Η συμμετοχή του REF6 σε ένα σύστημα ελέγχου της έκφρασης των αποκρινόμενων σε διάφορα ερεθίσματα γονιδίων, βρίσκεται σε συμφωνία με την εμπλοκή της δράσης του REF6 με αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια. Το REF6 συμμετέχει: α) στην μεταφορά των αυξινών, ελέγχοντας την έκφραση των μεταφορέων της αυξίνης PIN1/3/7 (Wang X et al., 2019), β) στον καταβολισμό του αποκοπτικού οξέος, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης δύο βασικών γονιδίων της διαδικασίας του καταβολισμού του αποκοπτικού οξέος CYP707A1 και CYP707A3 (Chen H et al., 2020), γ) στο σηματοδοτικό μονοπάτι του αιθυλενίου, ρυθμίζοντας την έκφραση του κεντρικού ρυθμιστή του σηματοδοτικού μονοπατιού ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2) (Zander M et al., 2019), δ) Στο μονοπάτι των βρασσινοστεροειδών, μέσω της άμεσης αλληλοεπίδρασης με τον BES1 (Yu X et al., 2008). Στο επίπεδο της φυτικής αύξησης και ανάπτυξης το REF6 φαίνεται να έχει ρυθμιστικό ρόλο στην ρύθμιση του χρόνου άνθησης και της συστημικής άμυνας (Noh B et al., 2004);(Lu F et al., 2011);(Zulkarnain Chowdhury et al., 2020), στον καθορισμό των ορίων των οργάνων (Cui X et al., 2016), στον σχηματισμό πλευρικών ριζών (Wang X et al., 2019), στην γήρανση των φύλλων (Wang X et al., 2019), στον λήθαργο των σπόρων (Chen H et al., 2020), στην ρύθμιση της θερμο-μορφογένεσης (He K et al., 2021), και στην ανάμνηση της θερμικής καταπόνησης (Antunez-Sanchez J et al., 2020; Liu J et al., 2019).

Το REF6 έχει κεντρικό ρόλο στην μετάβαση από την βλαστητική φάση στην αναπαραγωγική φάση κατά την πορεία της ανάπτυξης του φυτού. Στα *ref6* μεταλλάγματα έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση του *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, και κατά συνέπεια αργοπορία στην άνθηση (Noh B et al., 2004). Το γονίδιο του FLC κωδικοποιεί για μία MADS-box πρωτεΐνη η οποία καταστέλλει την έκφραση του ανθογόνου *FT (FLOWERING LOCUS T)* και, του MADS-box μεταγραφικού παράγοντα *SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1)* (Corbesier L et al., 2007; Searle I et al., 2006; Hepworth SR et al., 2002). Η ρύθμιση της έκφρασης του *SOC1* και του *FT* είναι καθοριστικής σημασίας για την ανθική μετάβαση, και αποτελεί το ενοποιητικό σημείο στο οποίο συναντώνται αρκετά μονοπάτια ελέγχου της άνθησης, όπως είναι το αυτόνομο, το μονοπάτι των γιββερελινών και της εαρινοποίησης. Το αυτόνομο μονοπάτι της άνθησης,

απαρτίζεται από ένα σύνολο μεταλλαγμάτων, των οποίων η ανθική μετάβαση είναι αργοπορημένη, ανεξαρτήτως της φωτοπεριόδου λόγω της αρνητικής ρύθμισης που ασκούν στην έκφραση του *FLC* (Simpson GG, 2004). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών των παραγόντων αποτελούν οι παράγοντες με ικανότητα πρόσδεσης RNA, όπως ο FLOWERING LOCUS KH DOMAIN (FLK), όπου ελέγχουν μέτα-μεταγραφικά την αφθονία των *FLC* μεταγράφων, αλλά και παράγοντες που μεταβάλλουν την κατάσταση της χρωματίνης, όπως είναι το REF6 (Simpson GG, 2004). Χαρακτηριστικό παράδειγμα ρύθμισης του χρόνου άνθησης, αποτελεί η επαγωγή του REF6, από το δευτερογενή μεταβολίτη, Dehydroabietinal (DA), ο οποίος επάγει μεταξύ άλλων και τους μηχανισμούς της συστημικής άμυνας. Τα επίπεδα και η διασυστημική μεταφορά του DA, μπορεί να ελέγχονται τόσο από την αντίληψη του παθογόνου όσο και από αναπτυξιακά ερεθίσματα. Η αύξηση των επιπέδων DA στα φύλλα και στο μερίστωμα οδηγεί σε αύξηση του REF6 και κατ' επέκταση αύξηση των μεταγράφων *SOC1* και *FT* (Zulkarnain Chowdhury et al., 2020).

Κάτωθεν της ενεργοποίησης της έκφρασης του *SOC1* και του *FT*, το REF6 αλληλοεπιδρά με το *SOC1* για να ενεργοποιήσουν την έκφραση άλλων μεταγραφικών παραγόντων των οποίων η δράση σχετίζεται με την ανθική μετάβαση και την ανάπτυξη των ανθικών οργάνων, όπως είναι το FRUITFULL (FUL) (Hyun Y et al., 2016), το TARGET OF FLC AND SVP1 (TFS1) (Richter R et al., 2019), αλλά και του miR172b (Hyun Y et al., 2016). Τέλος, το REF6 έχει βρεθεί να αλληλοεπιδρά με αρκετούς MADS-box μεταγραφικούς παράγοντες όπου ελέγχουν την διαδικασία ανάπτυξης του άνθους όπως είναι το AGAMOUS (AG), SEPALLATA3 (SEP3), APETALA3 (AP3) και APETALA1 (AP1) (Smaczniak C et al., 2012; Yan W et al., 2018).

1.6 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η περαιτέρω διαλεύκανση των μηχανισμών, μέσα από τους οποίους οι HSP90 ρυθμίζουν το ορμονικό μονοπάτι μεταγωγής των βρασσινοστεροειδών. Για τον σκοπό αυτό διενεργήθηκε διερευνητική μελέτη της επίδρασης της φαρμακευτικής και της γενετικής μείωσης της δράσης των HSP90 στα επίπεδα και την υποκυτάρια τοποθέτηση του υποδοχέα των βρασσινοστεροειδών BRI1 στην περιοχή του ακορριζίου στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Επιπλέον, στα πλαίσια της εύρεσης και αναγνώρισης νέων αλληλοεπιδρατών για τις HSP90, από ορμονικό μονοπάτι των βρασσινοστεροειδών επιβεβαιώθηκε η αλληλοεπίδραση δυο κυτταροπλασματικών HSP90 (HSP90.1 και HSP90.3) με την απομεθυλάση των ιστονών RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6).

2. Μέθοδοι και υλικά

2.1 Συνθήκες ανάπτυξης φυτών

Για τις πειραματικές ανάγκες της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής σειρές του φυτού *Arabidopsis thaliana*, οικότυπου Heynh Columbia (Col-0) : Διαγονιδιακή σειρά, στην οποία εκφράζεται η κατασκευή pBRI1::BRI1-GFP σε Col-0 γενετικό υπόβαθρο; Σειρές που προέκυψαν από την διασταύρωση της διαγονιδιακής σειράς που εκφράζει την κατασκευή pBRI1::BRI1-GFP με μεταλλάγματα για τις κυτταροπλασματικές HSP90.1 & HSP90.3 μέσω T-DNA εισδοχής (hsp90.1/SALK_007614; hsp90.3/SALK_038646), BRI1-GFP x hsp90.1 & BRI1-GFP x hsp90.3; Σειρά που προέκυψε από την διασταύρωση της διαγονιδιακής σειράς που εκφράζει την κατασκευή pBRI1::BRI1-GFP και της διαδομισιακής σειράς που εκφράζει την κατασκευή pAtRAC2:: Hsp90^{RNAi}, στις οποίες πραγματοποιείται RNA-σίγηση για τα γονίδια των κυτταροπλασματικών HSP90 υπό την δράση του υποκινητή του AtRAC2/ROP7, όπου εμφανίζει μικρά επίπεδα έκφρασης στους περισσότερους ιστούς του *Arabidopsis thaliana*, με την πιο έντονη έκφραση να εμφανίζεται στην ρίζα, στο υποκοτύλιο και στον βλαστό, BRI1-GFP x pAtRAC2:: Hsp90^{RNAi} (RAC10H) (Samakovli D et al., 2021); (Brembu T et al., 2005). Όλες οι σειρές *Arabidopsis thaliana*, καθώς και φυτά καπνού (*Nicotiana benthamiana*) αναπτύχθηκαν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας 22°C, και σε συνθήκες φωτισμού μακράς ημέρας 16 ώρες φως; 8 ώρες σκοτάδι.

2.2 Αποστείρωση των σπερμάτων του *A. thaliana*.

Για την ανάπτυξη των σπερμάτων του *A. thaliana* στο στερεό θρεπτικό μέσο Murashige–Skoog (MS), απαιτείται ένα στάδιο αποστείρωσης προκειμένου να αποφευχθούν οι μολύνσεις, από την στιγμή της τοποθέτησής τους στο θρεπτικό μέχρι την ημέρα της παρατήρησής τους. Αρχικά σπέρματα των σειρών που αναφέραμε παραπάνω τοποθετήθηκαν σε erpendorfs παρουσία 1mL H₂O, και εν συνεχεία στους 4°C απουσία φωτός για 24 ώρες, προκειμένου να επιτύχουμε την διακοπή του ληθάργου. Στην συνέχεια αποστειρώσαμε τα σπέρματα, σε θαλάμους νηματικής ροής (Laminar flow), και έχοντας αποστειρώσει όλα τα υλικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, προς εξασφάλιση των ασηπτικών συνθηκών.

Η διαδικασία της απολύμανσης περιλάμβανε τα εξής διαδοχικά βήματα: 1) Αφαίρεση του H₂O, 2) Προσθήκη 70% διαλύματος αιθανόλης (EtOH), ανακίνηση για 10-20 δευτερόλεπτα, 3) Απομάκρυνση του διαλύματος Αιθανόλης και προσθήκη διαλύματος χλωρίνης 30 % και επώαση για 2 λεπτά (κατά την διάρκεια των 2 λεπτών πραγματοποιούνται ελαφριές ανακινήσεις των 10 δευτερολέπτων), 4) Απομάκρυνση του διαλύματος χλωρίνης και πραγματοποίηση 5 διαδοχικών πλύσεων με αποστειρωμένο και διπλά απιονισμένο νερό (sterile ddH₂O).

Μετά την αποστείρωση τους τα σπέρματα επιστρώνονται σε αποστειρωμένο στερεό θρεπτικό μέσο MS σε τρυβλία petri, κατά σειρά και με ορισμένη απόσταση μεταξύ τους προκειμένου να διευκολυνθεί η παρατήρησή τους μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού. Στην συνέχεια τα τρυβλία σφραγίζονται με parafilm, και τοποθετούνται κατακόρυφα στον θάλαμο ανάπτυξης.

2.3 Φαρμακολογικοί χειρισμοί των σειρών του *A. thaliana*

Στα πλαίσια της παρατήρησης των ριζών σειρών του *A. thaliana* μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού, και της επίδρασης που έχει η μείωση των λειτουργικών HSP90 στην ενδοκύττωση και την διακίνηση του υποδοχέα των βρασσινοστεροειδών BRI1, πραγματοποιήθηκαν φαρμακευτικοί χειρισμοί με την φαρμακευτική ουσία geldanamycin (GDA), αλλά και με τις φαρμακευτικές ουσίες Concanamycin A (ConcA) και Wortmannin (Wort).

Στο επίπεδο του GDA πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί χειρισμοί, σε ότι αφορά την διάρκεια έκθεσης των φυτών στην φαρμακευτική ουσία αλλά και την συγκέντρωση της φαρμακευτικής ουσίας στην οποία εκτέθηκαν. Στον μακράς διαρκείας χειρισμό με GDA (Short GDA treatment), τα σπέρματα της διαγονιδιακής σειράς, όπου γινόταν έκφραση της κατασκευής pBRI1::BRI1-GFP σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο, αναπτύχθηκαν μετά την αποστείρωση τους σε 25mL στερεό θρεπτικό μέσο MS στα οποία είχαμε αραιώσει το GDA σε τελική συγκέντρωση 2μM (αρχική συγκέντρωση 8,93mM, διαλυμένο σε DMSO). Τα φυτά στην συνέχεια τοποθετήθηκαν κάθετα στον θάλαμο ανάπτυξης. Στον βραχείας διάρκειας χειρισμό με GDA, τα σπέρματα της διαγονιδιακής σειράς, όπου γινόταν έκφραση της κατασκευής pBRI1::BRI1-GFP σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο αναπτύχθηκαν για 5 ημέρες μετά την βλάστηση τους σε 25 mL στερεό θρεπτικό μέσο MS, και εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε 2mL υγρό θρεπτικό μέσο MS, στο οποίο είχαμε αραιώσει το GDA σε τελική συγκέντρωση 10μM (αρχική συγκέντρωση 8,93mM, διαλυμένο σε DMSO), για 12 ώρες.

Για τους χειρισμούς με τις φαρμακευτικές ουσίες ConcA και Wort, τα σπέρματα της διαγονιδιακής σειράς, όπου γινόταν έκφραση της κατασκευής pBRI1::BRI1-GFP σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο αναπτύχθηκαν για 6 ημέρες μετά την βλάστηση τους σε 25 mL στερεό θρεπτικό μέσο MS, και εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε 2mL υγρό θρεπτικό μέσο MS, στο οποίο είχαμε αραιώσει την ConcA ή την Wort σε τελική συγκέντρωση 1μM και 33μM αντίστοιχα για 2 ώρες (αρχικές συγκεντρώσεις: ConcA (230mM, διαλυμένο σε DMSO); Wort (20mM, διαλυμένο σε DMSO)).

2.4 Παρατήρηση των ριζών του φυτού *A. thaliana* μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας

Για την *in vivo* παρατήρηση του ριζικού BRI1-GFP στις σειρές που αναφερθήκαμε παραπάνω 6 μέρες μετά την βλάστηση τους καθώς και μετά από τους φαρμακευτικούς χειρισμούς, χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού Zeiss LSM 800 confocal microscope. Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση του ξηρού αντικειμενικού φακού Plan-Apochromat 20x/0.8 M27. Για την παρατήρηση του BRI-GFP χρησιμοποιήθηκε η ακτίνα διέγερσης στα 488 nm έντασης 2%, ενώ το εύρος ανίχνευσης ορίστηκε στα 488nm-557nm, ενώ για την παρατήρηση της χρωστικής των κυτταρικών τοιχωμάτων Propidium Iodide (PI), χρησιμοποιήθηκε η ακτίνα διέγερσης στα 586 nm έντασης 2%, και το εύρος ανίχνευσης ορίστηκε στα 561 nm-624 nm. Τα τυπικά φάσματα των σημάτων της παρουσίας του GFP και του PI, η περεταίρω ψηφιακή ανάλυση τους και η ανασύσταση της τελικής εικόνας, πραγματοποιήθηκαν από το λογισμικό ZEN blue edition 3.7 by Carl Zeiss.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων προς παρατήρηση, 200μL από υγρό MS μέσα στο οποίο είχαμε αραιώσει PI σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL (αρχική συγκέντρωση 1mg/mL), απλώνεται στην επιφάνεια μίας

αντικειμενοφόρου πλάκας, και στην συνέχεια τοποθετούνται 4 άτομα στην επιφάνεια της αντικειμενοφόρου , ενώ στο τέλος τοποθετείται η καλυπτρίδα.

Η εξαγωγή των εικόνων έγινε με την βοήθεια του προγράμματος Zen blue edition 3.7 by Carl Zeiss, διατηρώντας ίδιες τις ρυθμίσεις ψηφιακής τροποποίησης του φθορισμού της εικόνας (Dark:0, White:3000 ,Gamma:1).

2.5 Μετρήσεις έντασης φθορισμού και στατιστικός έλεγχος

Για τις μετρήσεις της έντασης του φθορισμού του BRI1-GFP χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Zen blue edition 3.7 by Carl Zeiss. Πιο συγκεκριμένα οι μετρήσεις του συνολικού φθορισμού του BRI1-GFP στο ακρορρίζιο των σειρών, BRI1-GFP με αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο, BRI1-GFP x hsp90.1 ή hsp90.3 ή pAtRAC2: Hsp90^{RNAi} , και στο ακρορρίζιο φυτών BRI1-GFP με αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο στα οποία πραγματοποιήθηκε μακράς ή βραχείας διάρκειας χειρισμός με GDA, πραγματοποιήθηκαν με την χρήση ενός πλαισίου- περιοχή ROI- με σταθερό εμβαδόν (31.000 μm^2). Παράλληλα για τις ίδιες σειρές και φαρμακευτικούς χειρισμούς πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του συνολικού φθορισμού, που αντιστοιχεί στο BRI1-GFP στην περιοχή της ρίζας που αντιστοιχεί στην ζώνη μετάβασης, με την χρήση ενός πλαισίου- περιοχή ROI- με σταθερό εμβαδόν (11.000 μm^2). Με την βοήθεια του προγράμματος λάβαμε την μέση τιμή του απόλυτου φθορισμού του BRI1-GFP, που υπολογίζεται από το σύνολο των pixels που εσωκλείονται εντός του πλαισίου, έχοντας ως μονάδα μέτρησης το Airy Units (A.U) * μm^{-2} . Το σύνολο των ατόμων που μετρήθηκαν, αναγράφονται στις εικόνες των αποτελεσμάτων κάτωθεν.

Για τις μετρήσεις του φθορισμού του μεμβρανικού BRI1-GFP στα επιδερμικά κύτταρα της ζώνης μετάβασης της ρίζας, το πλαίσιο-περιοχή ROI- με σταθερό εμβαδόν (5,372 μm^2) τοποθετήθηκε στις κορυφαίες μεμβράνες των επιδερμικών κυττάρων, δηλαδή αυτών που βρίσκονται παράλληλα με το εγκάρσιο επίπεδο της ρίζας. Παράλληλα για τις μετρήσεις του φθορισμού του ενδοκυτταρικού BRI1-GFP στα επιδερμικά κύτταρα της ζώνης μετάβασης της ρίζας, το πλαίσιο-περιοχή ROI- με σταθερό εμβαδόν (12,943 μm^2) τοποθετήθηκε στον ενδοκυτταρικό χώρο. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν σε εικόνες που είχαν ληφθεί με την ρύθμιση της μεγένθυσης στο 1.8, και αφορούσαν όλες τις σειρές (BRI1-GFP, BRI1-GFP x hsp90.1 ή hsp90.3 ή pAtRAC2:: Hsp90^{RNAi}), καθώς και τους φαρμακευτικούς χειρισμούς της διαγονιδιακής σειράς που εκφράζει την κατασκευή pBRI1::BRI1-GFP, με το GDA, την ConcA και την Wort. Με την βοήθεια του προγράμματος λάβαμε την μέση τιμή του απόλυτου φθορισμού του BRI1-GFP, που υπολογίζεται από το σύνολο των pixels που εσωκλείονται εντός του πλαισίου, έχοντας ως μονάδα μέτρησης το Airy Units (A.U) * μm^{-2} . Το σύνολο των ατόμων που μετρήθηκαν, αναγράφονται στις εικόνες των αποτελεσμάτων κάτωθεν.

Όλες τις τιμές της έντασης του φθορισμού που αντιστοιχούσαν στο μεμβρανικό BRI1-GFP και στο ενδοκυτταρικό BRI1-GFP, για το κάθε κύτταρο σε κάθε σειρά ή φαρμακευτικό χειρισμό, χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του λόγου $\text{BRI1-GFP}_{[\text{μεμβρανικό}]} / \text{BRI1-GFP}_{[\text{ενδοκυτταρικό}]}$.

Τα γραφήματα στήλης, και τα θηκογράμματα δημιουργήθηκαν με την βοήθεια του Microsoft Excel, μέρος του πακέτου Microsoft Office 2019. Οι στατιστικές παράμετροι όλων των πειραμάτων, αναγράφονται στις

περιγραφές των αντίστοιχων εικόνων αλλά και στο κείμενο των αποτελεσμάτων (Αριθμός δειγμάτων [n], το είδος της στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε, και η στατιστική σημαντικότητα η οποία αποδίδεται με την παρουσία του ‘*’[*:0.01<p-value<0.05; **:0.001<p-value<0.01; ***:p-value<0.001]).

Για την σύγκριση των τιμών των εντάσεων φθορισμού για το BRI1-GFP, όπως αυτές μετρήθηκαν για την εκάστοτε συνθήκη στην εκάστοτε πειραματική διάταξη, πραγματοποιήθηκε Kruskal-Wallis test (two-way non-parametric ANOVA), καθώς δεν ακολουθούσαν σε όλες τις συνθήκες οι τιμές της έντασης του φθορισμού που αντιστοιχεί στο BRI1-GFP κανονική κατανομή, με την χρήση του ιστοτόπου <https://www.statskingdom.com/kruskal-wallis-calculator.html>. Με την βοήθεια του Kruskal-Wallis test, μπορούμε να δούμε επί της ουσίας ένα υπάρχουν συνολικά στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές τριών ή περισσότερων ανεξάρτητων ομάδων, οι οποίες δηλώνονται από το συνολικό p-value που αντιστοιχεί στην στατιστική σημαντικότητα των διαφορών. Εάν το αποτέλεσμα του Kruskal- Wallis test υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά επί του συνόλου των ομάδων, προχωράμε σε μία Post-hoc ανάλυση η οποία ονομάζεται Dunn’s test. Η ανάλυση μέσω του Dunn’s test, οδηγεί στην αναγνώριση των ζευγών ομάδων που διαφέρουν μεταξύ τους, και επιστρέφει για το κάθε ζεύγος ομάδων το p-value που αντιστοιχεί στο μέγεθος της στατιστικής σημαντικότητας της διαφοράς των ομάδων αυτών.

Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη του φυτού *A.thaliana*:

0,44 % MS (MURASHIGE & SKOOG MEDIUM INCLUDING VITAMINS, Duchefa Biochemie

0,05 % MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)

2% Sucrose

Όταν χρειαζόμαστε στερεό θρεπτικό : 0,6 % Αγαρόζη (Όταν γίνεται χρήση φαρμακευτικής ουσίας όπως το GDA) ή 0,3 % Phytigel™ (Όταν δεν γίνεται χρήση φαρμακευτικής ουσίας)

2.6 Η κλωνοποίηση της άμινο- και καρβόξυτελικής περιοχής του REF6.

2.6.1 Ενίσχυση των άμινο- και καρβόξυτελικών περιοχών του REF6.

Για την κλωνοποίηση της άμινο- και καρβόξυτελικής περιοχής είναι αναγκαία η ενίσχυση των άμινο- και καρβόξυ-τελικών περιοχών πραγματοποιήσαμε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR). Για την PCR χρησιμοποιήθηκε ως DNA μήτρα η πλασμιδιακή κατασκευή pGBKT7::REF6, η οποία είχε δημιουργηθεί στα πλαίσια προηγούμενων εργασιών του εργαστηρίου. Για την ενίσχυση των επιθυμητών περιοχών χρησιμοποιήθηκε η υψηλής πιστότητας KAPA HiFi DNA πολυμεράση (KR0368) της εταιρίας KAPABIOSYSTEMS το πρωτόκολλο της οποίας όπως δίνεται από την εταιρεία είναι (https://static.igem.org/mediawiki/2015/9/9e/PCR_hifi.pdf):

Αντιδρώντα	Ποσότητες αντιδρώντων για (1X) μία αντίδραση PCR τελικού όγκου 50μL
5X KAPA HiFi Buffer	10 μL
10mM KAPA dNTP Mix	1.5 μL
10μM Forward Primer	1.5 μL
10μM Reverse Primer	1.5 μL
DNA μήτρα	Όσο απαιτείται
1 U/μL KAPA HiFi DNA πολυμεράση	1 μL
ddH ₂ O	Up to 50 μL

Πίνακας 2.1. Γενικό πρωτόκολλο της προετοιμασίας του μίγματος των αντιδραστηρίων που περιλαμβάνονται σε μία τυπική αντίδραση με την πολυμεράση KAPA HiFi (KR0368) της εταιρείας KAPABIOSYSTEMS.

Βήμα	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική απόδιάταξη	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη	98°C	20 sec	15-35
Υβριδισμός εκκινητών	60-75°C	25 sec	
Επιμήκυνση	72°C	15-60 sec/kb	
Τελική επιμήκυνση	72°C	1 min/kb	1

Πίνακας 2.2. Γενικό πρότυπο θερμοκύκλων σε μία τυπική αντίδραση με την πολυμεράση KAPA HiFi (KR0368) της εταιρείας KAPABIOSYSTEMS.

Πέραν της επιδίωξης της ενίσχυσης αυτής καθαυτής, για την κλωνοποίηση των επιθυμητών τμημάτων ήταν αναγκαία η προσθήκη ειδικών προσαρμογέων(Adapters)-αλληλουχιών στα άκρα των τελικών προϊόντων. Οι προσαρμογείς αυτοί φέρουν αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από ειδικά ένζυμα περιορισμού και απαντώνται στους τελικούς φορείς έκφρασης σε περιοχές οι οποίες ονομάζονται MCS (Multiple cloning sites). Παρακάτω δίδεται ο πίνακας των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν με τα αντίστοιχα T_m.

Για την ενίσχυση της αμινο-τελικής περιοχής που κλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης pSPYNE(REF6-N BiFC):

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή	Συνολικό T _m	T _m στην περιοχή υβριδοποίησης με την αλληλουχία στόχο
REF6-N (Forward)	ATA <u>GTCTGAC</u> CTATGGCGGTTTCAGAGCAG	66.37 °C	55.73 °C

REF6-N (Reverse)	ATAG <u>GGTACCT</u> GGAGGGTAATTTATAGCAGCTC	64.1 °C	55.42 °C
---------------------	--	---------	----------

Πίνακας 2.3 Αλληλουχίες και τα Tm των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της καρβόξυ-τελικής περιοχής του REF6. Τα σημεία των εκκινήτων που περιέχουν τις αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιορισμού εμφανίζονται με έντονη γραμματοσειρά και υπογραμμίζονται (REF-N(F):Sall/ REF-N(R):KpnI)

Για την ενίσχυση της καρβόξυ-τελικής περιοχής που κλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης pSPYNE(REF6-C BiFC):

Εκκινήτης	Αλληλουχία εκκινήτη	Συνολικό Tm	Tm στην περιοχή υβριδοποίησης με την αλληλουχία στόχο
REF6-C (Forward)	ATAG <u>TCGACCT</u> ATGTATGGAGACTCTTCTGATTCC	65.43 °C	56.63 °C
REF6-C (Reverse)	ATAG <u>GTACC</u> CCTTTTGTGGTCTTCTTAACC	63.45 °C	52.96 °C

Πίνακας 2.4 Αλληλουχίες και τα Tm των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της άμινο-τελικής περιοχής του REF6. Τα σημεία των εκκινήτων που περιέχουν τις αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιορισμού εμφανίζονται με έντονη γραμματοσειρά και υπογραμμίζονται (REF-C(F):Sall/ REF-C(R):KpnI)

Για την ενίσχυση της καρβόξυ-τελικής περιοχής που κλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης pGBKT7 (REF6-C Y2H):

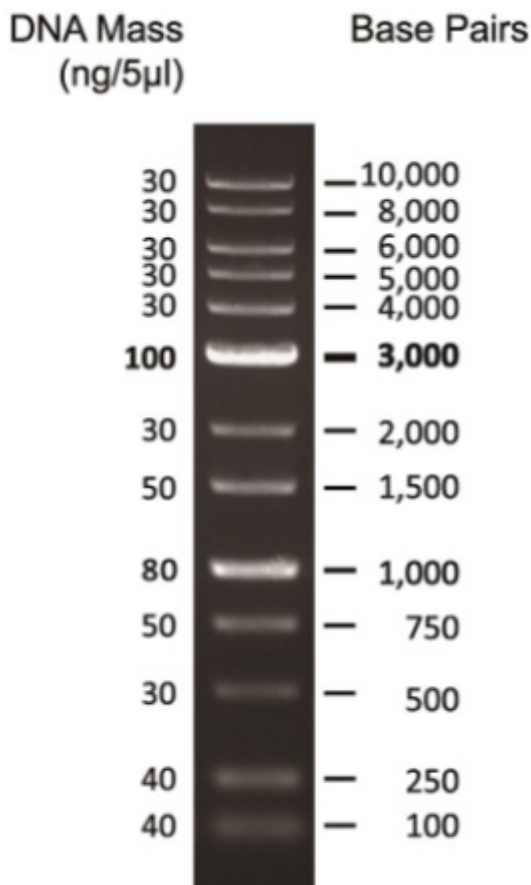
Εκκινήτης	Αλληλουχία εκκινήτη	Συνολικό Tm	Tm στην περιοχή υβριδοποίησης με την αλληλουχία στόχο
REF6-C (Forward)	ATAG <u>TCGACCT</u> ATGTATGGAGACTCTTCTGATTCC	65.43 °C	56.63 °C
REF6-C (Reverse)	ATAG <u>CGGCCGCT</u> CACCTTTTGTGGTCTTCTTAAC	70.6 °C	55.43 °C

Πίνακας 2.4 Αλληλουχίες και τα Tm των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της άμινο-τελικής περιοχής του REF6. Τα σημεία των εκκινήτων που περιέχουν τις αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιορισμού εμφανίζονται με έντονη γραμματοσειρά και υπογραμμίζονται (REF-C(F):Sall/ REF-C(R):NotI)

Το πρωτόκολλο της PCR, όπως αυτό διαμορφώθηκε για τα βήματα, την Ta (Annealing Temperature), και το σύνολο των κύκλων συνοψίζεται στον παρακάτω πίνακα:

Βήμα	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική απόδιάταξη	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη	98°C	20 sec	35
Υβριδισμός εκκινητών	62 °C	25 sec	
Επιμήκυνση	72°C	2:30 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	4 min	1
Τερματισμός	4 °C	10 min	

Μετά την ενίσχυση των επιθυμητών αλληλουχιών, οι αλληλουχίες αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%, με την χρήση του 1kb DNA ladder, Nippon genetics, του οποίου το πρότυπο παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.1.



Εικόνα 2.1. 1kb DNA ladder, Nippon genetics.

Αφού λάβαμε τα προϊόντα στο επιθυμητό μέγεθος προχωρήσαμε σε απομόνωση και καθαρισμό των ζωνών που βρίσκονταν στο επιθυμητό μέγεθος από την πηκτική αгарόζης. Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για 30-45 λεπτά σε πηκτική αгарόζης 1%, σε χαμηλής τάσης ρεύμα (90v), για τον καλύτερο διαχωρισμό του δείγματος. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η περιοχή της πηκτικής αгарόζης όπου βρίσκεται η ζώνη στο επιθυμητό μέγεθος, κόβεται με την βοήθεια της τράπεζας U.V. του εργαστηρίου, και τοποθετείται σε ένα Eppendorf. Η εκχύλιση του DNA από την πηκτική αгарόζης γίνεται με βάση το πρωτόκολλο Nucleospin®Geland PCR Cleanupkit, της Macherey-Nagel. DNA extraction from agarose gel(<https://www.mn-net.com/media/pdf/02/1a/74/Instruction-NucleoSpin-Gel-and-PCR-Clean-up.pdf>). Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων μετά την εκχύλιση από το πήκτωμα αгарόζης έγινε με την βοήθεια φασματοφωτόμετρου (nanodrop) και οι συγκεντρώσεις που λάβαμε ήταν οι εξής: (REF6-C BiFC: 66,7 ng/μL, RREF6-N BiFC: 66 ng/μL, REF6-C Y2H: 38,4 ng/μL).

Για την δημιουργία των επιθυμητών κατασκευών pSPYNE::REF6-C, pSPYNE::REF6-N, και pGAT7::REF6-N, απαραίτητη είναι η δημιουργία συμπληρωματικών άκρων μεταξύ του εν δυνάμει ενθέματος και του αντίστοιχου φορέα έκφρασης. Για τον λόγο αυτό προχωρήσαμε σε πέψεις τόσο των προϊόντων όσο και των φορέων έκφρασης. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων με ένζυμα περιορισμού, χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα της εταιρείας New England Biolabs (NEB). Στους πίνακες 2.5 και 2.6, γίνεται η συνοπτική περιγραφή του πρωτοκόλλου των διπλών ενζυμικών αντιδράσεων όπως αυτό δίδεται από την εταιρία (<https://international.neb.com/protocols/2021/03/24/double-digest-protocol-with-standard-restriction-enzymes>) και το σύνολο των αντιδράσεων με τα υποστρώματα και τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα:

Αντιδρώντα	Ποσότητες αντιδρώντων για (1X) μία αντίδραση PCR τελικού όγκου 25μL
DNA	1μg
10X CutSmartBuffer	5μL
Ένζυμο (1)	1μL
Ένζυμο (2)	1μL
ddH ₂ O	Up to 25 μL

Πίνακας 2.5 Γενικό πρωτόκολλο της προετοιμασίας του μίγματος των αντιδραστηρίων που περιλαμβάνονται σε μία τυπική αντίδραση διπλής περιοριστικής πέψης με τα ένζυμα της εταιρείας NEB.

Υπόστρωμα	Ένζυμα	Συγκέντρωση DNA (Μετά την εκχύλιση από την πηκτική αγαρόζης)
REF6-N BiFC	Sall, KpnI	19,5 ng/μL
REF6-C Y2H	Sall, NotI	16,3 ng/μL
REF6-C BiFC	Sall, KpnI	41,5 ng/μL
pSPYNE-35S	Sall, KpnI	12,3 ng/μL
PGBKT7-BD	Sall, NotI	40,6 ng/μL

Πίνακας 2.6 Σύνοψη των υποστρωμάτων, των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν και της τελικής συγκέντρωσης των προϊόντων μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό των επιθυμητών ζωνών.

1% Agarose gel: 1% w/v agarose, 1XTAE, 0,005% v/v EtBr

Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης: 1XTAE, 0,005% v/v EtBr

TAE 50X: 24,2g (w/v) Tris-base, 100 ml 0,5 EDTA pH= 8 (Ethylene- Diamine-Tetracetic Acid disodium salt), 57 ml CH₃COOH για 1 L διαλύματος.

Ethidium Bromide (EtBr): 10 mg/ml H₂O.

2.6.2 Αντιδράσεις λιγοποίησης για την δημιουργία των κατασκευών.

Για την δημιουργία των τελικών πλασμδιακών κατασκευών pSPYNE::REF6-C, pSPYNE::REF6-N, και pGBKT7:: REF6-N, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις λιγοποίησης παρουσία του ενζύμου T4 DNA ligase (M1801) της εταιρίας Promega. Ο υπολογισμός της ποσότητας (ng) DNA για το ένθεμα αλλά και για τον φορέα στην εκάστοτε περίπτωση πραγματοποιήθηκε προσεγγιστικά από τον μαθηματικό τύπο που περιγράφεται στην Εικόνα 2.2.

ng of insert	$\frac{[(\text{ng of vector} * \text{kb size of insert}) / \text{kb size of vector}] / \text{molar ratio of insert/vector}(3:1)}$
--------------	---

Εικόνα 2.2 Υπολογισμός της ποσότητας ενθέτου για την αντίδραση της λιγοποίησης.

Η ποσότητα του ανοικτού φορέα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 50 ng, ενώ η αναλογία μεταξύ φορέα και ενθέματος ήταν 1:3. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4 °C, για 12 ώρες. Οι υπολογισμοί των μιγμάτων της εκάστοτε αντίδρασης περιγράφονται στον Πίνακα 2.7.

Αντιδρώντα	pSPYNE::REF6-N	pSPYNE::REF6-C	pGBKT7::REF6-C
Ένθεμα	1 μL	0,5 μL	3 μL
Φορέας έκφρασης	4,5 μL	4,5 μL	1 μL
T4 λιγάση	1 μL	1 μL	1 μL
Buffer 10X	1 μL	1 μL	1 μL
ddH ₂ O	2,5 μL	3 μL	4 μL

Πίνακας 2.7 Αναλυτική περιγραφή των μιγμάτων αντίδρασης με T4 λιγάση για την κάθε κατασκευή.

2.6.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli*

Μετά την αντίδραση της λιγοποίησης, προχωρήσαμε στον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* (στέλεχος DH5a), με τις κατασκευές που δημιουργήσαμε. Για τον μετασχηματισμό των δεκτικών κυττάρων ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Σε 200 μl DH5a δεκτικών κυττάρων προστίθενται 10-15 ng πλασμιδιακού DNA
2. Αναμειγνύονται και επώάζονται στον πάγο για 30 min.
3. Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος για 2 min στους 42 °C.
4. Προστίθεται 1 ml θρεπτικού μέσου LB στο δείγμα, ενώ αυτό βρίσκεται στους 42 °C
5. Ανακινούμε τα κύτταρα με το θρεπτικό 3-4 φορές και πραγματοποιείται επώαση στους 37 °C για 1.30 hr. (Ανά 20-30 λεπτά ανακινούμε το eppendorf)
6. Φυγοκέντριση του διαλύματος στις 13000 rpm για 1 min και απομάκρυνση 1ml υπερκειμένου.
7. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 200 μl θρεπτικού μέσου και επίστρωση κατάλληλης ποσότητας σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB που περιέχει και κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής
8. Επώαση των τρυβλίων για 12-16 hrs σε θάλαμο στους 37 °C.

2.6.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα *E.coli* (Μέθοδος αλκαλικής λύσης)

1. Μονή βακτηριακή αποικία, που περιέχει το προς απομόνωση πλασμίδιο, εμβολιάζεται σε 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB στους 37 °C για 16 ώρες
2. Μεταφορά 1.5 ml από την υγρή βακτηριακή καλλιέργεια σε φιαλίδιο eppendorf και φυγοκέντριση για 1min στις 13000rpm.
3. Απομάκρυνση υπερκειμένου ώστε το ίζημα να μείνει όσο το δυνατό στεγνότερο.
4. Προσθήκη 200 μl διαλύματος P1 και επαναιώρηση του ιζήματος.
5. Προσθήκη 200 μl διαλύματος P2, ανάδευση ελαφρά (6-7 φορές) μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.
6. Επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 3 min.
7. Προσθήκη 200μl παγωμένου διαλύματος P3 (3M CH₃COOK/5M CH₃COOH) και ελαφριά ανάδευση 6-7 φορές.
8. Επώαση στον πάγο για 15min.
9. Φυγοκέντριση για 15 min στους 13000 rpm (στους 4 °C).
10. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο eppendorf, χωρίς προσθήκη ιζήματος.
11. Προσθήκη δύο όγκων παγωμένης αιθανόλης 100% EtOH και ανάμιξη.

12. Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 15 min.
14. Απομάκρυνση της αιθανόλης ώστε το ίζημα να μείνει όσο το δυνατόστεγνότερο.
15. Προσθήκη 30 µl ddH₂O και επαναδιάλυση του ιζήματος.
16. Αποθήκευση στους -20°C.

LB ΥΓΡΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ:

0,5% w/v yeast extract

1% w/v NaCl

1% w/v peptone

*Στην περίπτωση στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται 1,4% w/v agar.

P1 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΠΑΝΑΔΙΑΛΥΣΗΣ:

50 mM Tris-HCl pH= 8,0

10 mM EDTA pH= 8,0

100 µg/ml RNaseA

P2 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΔΙΑΛΥΜΑ ΛΥΣΗΣ:

0,2 N NaOH

1% (w/v) SDS

P3 (3M CH₃COOK/5M CH₃COOH):

60 ml 5M CH₃COOK pH= 4.8-5.2 αναμιγνύονται με 11,5 ml CH₃COOH και

28,5 ml ddH₂O

RNAaseA:

Διάλυμα RNaseA 10 mg/ml σε 10 mM Tris-HCl pH= 7,4 15 mM NaCl.

Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

2.6.5 Διαγνωστικές πέψεις για τις κατασκευές

Για την κάθε κατασκευή, pSPYNE::REF6-N, pSPYNE::REF6-C, pGBKT7::REF6-N, την οποία κλωνοποιήσαμε και απομονώσαμε από τα μετασχηματισμένα E.coli-στελέχη DH5a, πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις, για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού ενθέματος, αλλά και της κατεύθυνσης την ένθεσης. Για τις διαγνωστικές πέψεις χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα περιοριστικής κοπής της εταιρίας New

England Biolabs, και το πρωτόκολλο το οποίο ακολουθήθηκε για τα μίγματα των ενζυμικών αντιδράσεων περιγράφεται στον Πίνακα 2.5. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1%, παρουσία EtBr, με την βοήθεια του 1kb DNA ladder Nippon genetics. Τα αποτελέσματα των περιοριστικών πέψεων, σχολιάζονται εκτενώς στην Ενότητα 3.4.1. Οι ενζυμικές αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν για την κάθε κατασκευή με τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην εκάστοτε περίπτωση παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 2.8.

Πλασμιδιακή κατασκευή	Ένζυμα περιορισμού (Έλεγχος ενθέματος)	Ένζυμα περιορισμού (Fine mapping)
pSPYNE::REF6-N	SalI, KpnI	SalI, NdeI
pSPYNE::REF6-C	SalI, KpnI	BamHI, NdeI
pGBKT7::REF6-C	SalI, NotI	EcoRV

Πίνακας 2.8 Σύνοψη των υποστρωμάτων, των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν για τις διαγνωστικές πέψεις των πλασμιδιακών κατασκευών

2.6.6 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101)/ Freeze-thaw protocol.

1. Βγάζουμε από τους -80 °C, τα δεκτικά κύτταρα του *A. tumefaciens* (200μL ανά αντίδραση μετασηματισμού), τα τοποθετούμε στον πάγο και περιμένουμε μέχρι να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου
2. Προσθέτουμε 1-5μg πλασμιδιακού DNA, πραγματοποιούμε ελαφριά ανακίνηση και επανατοποθετούμε το μίγμα της αντίδρασης στο πάγο για 5 λεπτά.
3. Μεταφορά της αντίδρασης σε υγρό άζωτο (-196°C)
4. Επώαση της αντίδρασης για 5 λεπτά στους 37°C
5. Προσθήκη 1mL LB στην αντίδραση και μεταφορά του μίγματος για επώαση στους 28°C για 2-4 ώρες, και ανακίνηση κάθε 30 λεπτά.
6. Φυγοκέντριση στις 13.000 στροφές (rpm) για πέντε λεπτά και απομάκρυνση 1 mL LB και επαναδιάλυση της κυτταρικής πελέτας.
7. Επίστρωση των κυττάρων σε επιλεκτικό θρεπτικό μέσο LB, με τριπλή επιλογή στα αντιβιοτικά, Rifampicin (Rif: Τελική συγκέντρωση 50μg/mL), Gentamicin (Gent: Τελική συγκέντρωση 25μg/mL), Kanamycin (Kan: Τελική συγκέντρωση 50μg/mL).
8. Επώαση στους 28°C για 36-48 ώρες.

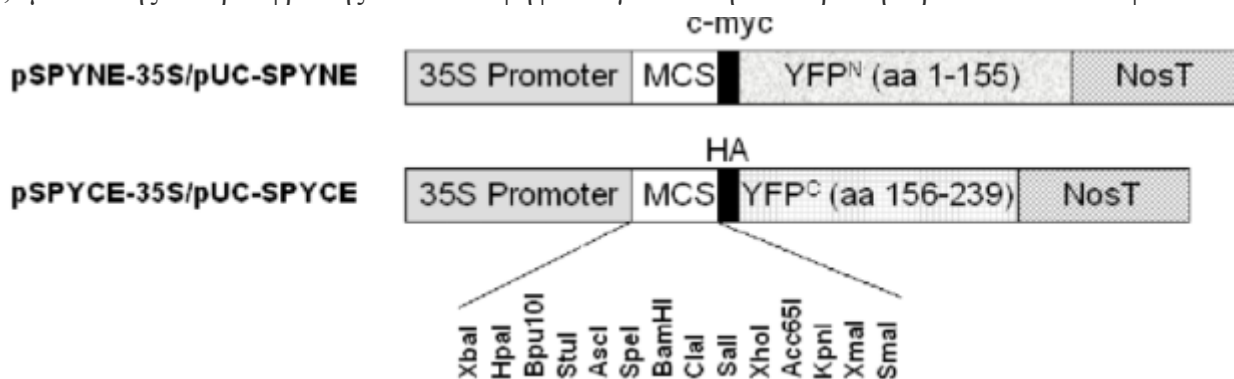
Rifampicin: Διαλύεται σε καθαρή μεθανόλη MeOH και αποθηκεύεται στους -20 °C (Stock concentration: 50mg/mL).

Gentamicin: Διαλύεται σε διπλά απιονισμένο αποστειρωμένο νερό ddH₂O και αποθηκεύεται στους -20 °C (Stock concentration: 25mg/mL)

Kanamycin: Διαλύεται σε διπλά απιονισμένο αποστειρωμένο νερό ddH₂O και αποθηκεύεται στους -20°C (Stock concentration: 50 mg/mL)

2.7 Αγροεμποτισμός και μέθοδος μοριακής συμπλήρωσης φθορισμού (Bimolecular Fluorescence Complementation- BiFC)

Η μέθοδος της μοριακής συμπλήρωσης φθορισμού αποτελεί μία μεθοδολογία που επιτρέπει την διερεύνηση της δυνατότητας αλληλοεπίδρασης μεταξύ δυο πρωτεϊνών, *in planta*, μέσω της υπερέκφρασης των υποψηφίων για αλληλοεπίδραση πρωτεϊνών στα φύλλα κάπνου



Εικόνα 2.3 Γραφική αναπαράσταση του multiple cloning site (MCS) των φορέων έκφρασης pSPYCE και pSPYNE.

Nicotiana benthamiana. Η μέθοδος βασίζεται σε δύο φορείς έκφρασης, τον pSPYNE και pSPYCE, στους οποίους κλωνοποιούνται οι κωδικές αλληλουχίες των υπό έλεγχο για αλληλοεπίδραση πρωτεϊνών, οι οποίες συγχονεύονται με την αλληλουχία της άμινο- και καρβόξυ-τελικής περιοχής του GFP. Παραδείγματος χάριν, αν επιδιώκουμε να δούμε την δυνατότητα αλληλοεπίδρασης μεταξύ δύο πρωτεϊνών A και B, κλωνοποιούμε την κωδική αλληλουχία της πρωτεΐνης A στον pSPYNE, και την πρωτεΐνη B στον pSPYCE. Οι παραγόμενες πρωτεΐνες από τους φορείς έκφρασης pSPYNE και pSPYCE, η A-N terminal GFP και B-C terminal GFP, ελέγχονται για την δυνατότητα αλληλοεπίδρασης μέσω της δυνατότητας ανίχνευσης του φθορισμού που αντιστοιχεί στο GFP. Στην περίπτωση που οι πρωτεΐνες A και B αλληλοεπιδρούν φέρουν σε εγγύτητα την άμινο- και καρβόξυ περιοχή του GFP, προς σχηματισμό ολόκληρης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP).

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής επιδιώχθηκε η διερεύνηση της αλληλοεπίδρασης της άμινο- και καρβόξυ-τελικής περιοχής της απομεθυλάσης REF6 με τις κυτταριπλασματικές HSP90, HSP90.1 και HSP90.3. Στο εργαστήριο διαθέταμε ήδη τις κατασκευές pSPYCE::HSP90.1 και pSPYCE::HSP90.3, ενώ, όπως περιγράψαμε στην ενότητα 2.6, προχωρήσαμε στην δημιουργία των κατασκευών pSPYNE::REF6-N και pSPYNE::REF6-C. Αντίστοιχα για την κάθε κατασκευή διαθέταμε μετασηματισμένα κύτταρα *A.tumefaciens*. Για την παροδική έκφραση στα φύλλα του καπνού *Nicotiana benthamiana*, ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο του Αγροεμποτισμού:

1. Καλλιέργεια μετασηματισμένων κυττάρων *A.tumefaciens* , για τις κατασκευές pSPYNE::A, pSPYCE::B (όπου A: REF6-N, REF6-C και B: HSP90.1, HSP90.3, empty) και p19 (κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη που δρα ανταγωνιστικά στην RNA σίγηση), σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία αντιβιοτικών (Rifampicin: Τελική συγκέντρωση 50μg/mL, Kanamycin: Τελική συγκέντρωση 50 μg/mL, Gentamicin: Τελική συγκέντρωση 25μg/mL) στους 28°C για 36 ώρες (1-2 ημέρες).

2. Φυγοκέντριση στις 12.500 στροφές (rpm) για 2 λεπτά, και απομάκρυνση του υπερκείμενου LB.

3. Επαναδιάλυση της κυτταρικής πελέτας σε 1mL Dilution buffer (10mM MgCl₂; 10mM MES [pH 5.6])

4. Φωτομέτρηση με την βοήθεια φασματοφωτομέτρου για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των καλλιιεργειών στα 600 nm (OD600).

5. Για την κάθε αλληλοεπίδραση δημιουργείται διαφορετικό διάλυμα εμποτισμού σε συνολικό όγκο 10 mL (Dilution buffer (10mM MgCl₂; 10mM MES [pH 5.6]); 100μM acetosyringone; OD600=0.7 *A. tumefaciens* μετασηματισμός με την κατασκευή pSPYNE::A; OD600=0.7 *A. tumefaciens* μετασηματισμός με την κατασκευή pSPYCE::B; OD600 *A. tumefaciens* που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της πρωτεΐνης p19).

6. Επώαση του μίγματος εμποτισμού στους 28°C για 3 με 4 ώρες και ανακίνηση του κάθε 15 λεπτά.

7. Έκχυση του μίγματος εμποτισμού με την χρήση μίας σύριγγας σε φύλλα καπνού *N. benthamiana*, 5-6 εβδομάδων.

8. Διατήρηση των φυτών για 38-72 ώρες σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού, υγρασίας και θερμοκρασίας.

Για την παρατήρηση του φυλλικού ιστού του καπνού, που αντιστοιχεί στις περιοχές που έγινε η παροδική έκφραση των υποψήφιων για αλληλοεπίδραση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού LSM 750 /Axio Observer.Z1 /7 (Carl Zeiss). Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση του ξηρού αντικειμενικού φακού Plan-Apochromat 20x/0.8 M27. Για την παρατήρηση του GFP χρησιμοποιήθηκε η ακτίνα διέγερσης στα 488 nm έντασης 2%, ενώ το εύρος ανίχνευσης ορίστηκε στα 488nm-557nm, για την παρατήρηση της χρωστικής των κυτταρικών τοιχωμάτων Propidium Iodide (PI), χρησιμοποιήθηκε η ακτίνα διέγερσης στα 586 nm έντασης 2%, και το εύρος ανίχνευσης ορίστηκε στα 561 nm-624 nm, ενώ για την παρατήρηση της χρωστικής των πυρήνων DAPI, χρησιμοποιήθηκε η ακτίνα διέγερσης στα 405 nm και 488 nm έντασης 0,2%, και το εύρος ανίχνευσης ορίστηκε στα 400 nm-470 nm. Τα τυπικά φάσματα των σημάτων της παρουσίας του GFP, του PI και του DAPI, η περαιτέρω ψηφιακή ανάλυση τους και η ανασύσταση της τελικής εικόνας, πραγματοποιήθηκαν από το λογισμικό ZEN blue edition 3.7 by Carl Zeiss.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων προς παρατήρηση, 200μL από υγρό MS μέσα στο οποίο είχαμε αραιώσει PI σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL (αρχική συγκέντρωση 1mg/mL) και DAPI σε τελική συγκέντρωση 0,1μM (Αρχική συγκέντρωση 2 μM), απλώνεται στην επιφάνεια μίας αντικειμενοφόρου πλάκας, και στην συνέχεια τοποθετούνται 5 κομμάτια φυλλικού ιστού, ενώ στο τέλος τοποθετείται η καλυπτρίδα.

Η εξαγωγή των εικόνων έγινε με την βοήθεια του προγράμματος Zen blue edition 3.7 by Carl Zeiss, διατηρώντας ίδιες τις ρυθμίσεις ψηφιακής τροποποίησης του φθορισμού της εικόνας (Dark:0, White:1.500, Gamma:1).

2.8 Τεστ των δύο υβριδίων

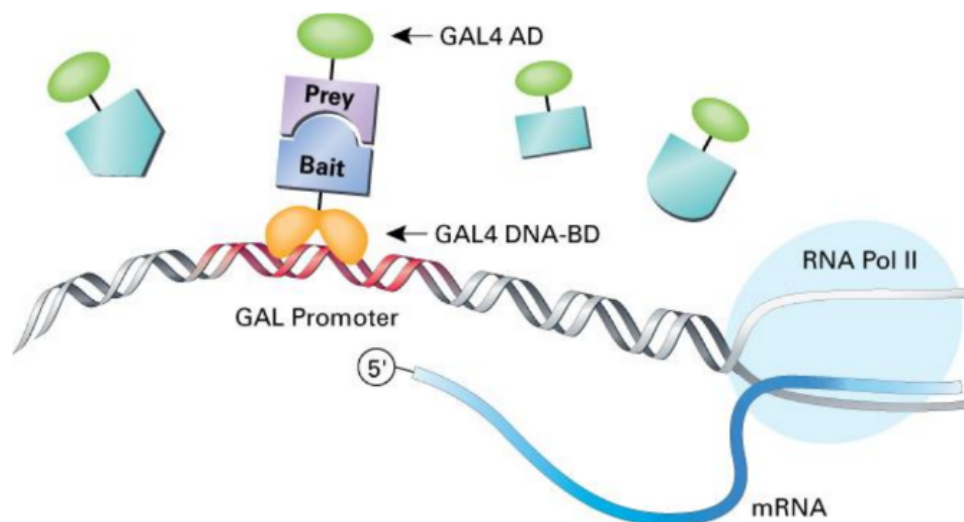
Το τεστ των δύο υβριδίων γνωστό και ως σύστημα δυο υβριδίων ζύμης (Yeast two hybrid system-Y2H), αποτελεί μία μέθοδος για τον έλεγχο της αλληλοεπίδρασης μεταξύ δύο πρωτεϊνών.

Η δοκιμή πραγματοποιείται σε στελέχη του είδους ζύμης *Sacharomyce scereviceae* και επιτρέπει τον έλεγχο αλληλεπιδράσεων σε ένα σύστημα *in vivo*, όπου οι πρωτεΐνες μπορούν να αποκτήσουν τη σωστή τριτοταγή τους δομή, παρέχοντας ουδέτερο pH και άλλα χαρακτηριστικά σημαντικά για την διατήρηση της φυσικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης.

Η αρχή της μεθόδου του Y2H έγκειται στην ανίχνευση της αλληλεπίδρασης δύο πρωτεϊνών μέσω ανασύστασης ενός μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος ενεργοποιεί ένα ή περισσότερα γονίδια αναφοράς. Η τεχνική βασίζεται στην παρατήρηση ότι οι λειτουργικές περιοχές μιας πρωτεΐνης μπορούν να διαχωριστούν και όταν έρθουν σε κοντινή απόσταση να ανασυστήσουν μια λειτουργική πρωτεΐνη (Εικόνα 2.5).

Αναλυτικότερα στο σύστημα των δύο υβριδίων χρησιμοποιείται ένας μεταγραφικός παράγοντας της ζύμης ο GAL4, ο οποίος αποτελείται από δύο λειτουργικές περιοχές, την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (Binding Domain, DB) και στην περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (Activation Domain, AD). Για τη διερεύνηση των πιθανών αλληλεπιδρώντων μορίων μίας πρωτεΐνης X (αναφέρεται σαν «bait protein»), αυτή η πρωτεΐνη συντήκεται μεταγραφικά με την περιοχή BD του, GAL4. Αντίστοιχα, το δεύτερο μόριο που εξετάζεται ως πιθανός συνέταιρος της πρωτεΐνης X, η πρωτεΐνη Y (αναφέρεται σαν «prey protein») κλωνοποιείται σε μεταφραστική σύντηξη με την AD περιοχή του GAL4. Η πρώτη χιμαιρική πρωτεΐνη (bait-GAL4 BD), έχει την ικανότητα να προσδένεται σε ρυθμιστικές αλληλουχίες ενεργοποίησης (UAS Upstream Activating Sequence) αλλά δεν μπορεί να ενεργοποιήσει από μόνη της τη μεταγραφή, ενώ αντίστοιχα η δεύτερη (prey-GAL4 AD) μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή αλλά δεν μπορεί να προσδεθεί σε ρυθμιστικές περιοχές του υποκινητή. Εάν οι δύο πρωτεΐνες bait και prey πράγματι αλληλεπιδρούν, τότε οι δομικές περιοχές του

μεταγραφικού παράγοντα GAL4 θα έρθουν κοντά ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων δεικτών. Με αποτέλεσμα μόνο όταν οι δύο πρωτεΐνες (bait και prey) που εκφράζονται στο σύστημα αλληλεπιδράσουν τότε μπορούν να φέρουν κοντά τις δομικές περιοχές (AD και BD) και να δημιουργήσουν την λειτουργική πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να ξεκινήσει τη μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς.



Εικόνα 2.5 Σχηματική αναπαράσταση της αρχής του συστήματος δύο υβριδίων στον σακχαρομύκητα. Η μία (bait protein) έχει κλωνοποιηθεί σε μεταφραστική σύντηξη με την περιοχή BD πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα της ζύμης GAL4 και η δεύτερη (prey protein) κλωνοποιείται σε μεταφραστική σύντηξη με την AD περιοχή ενεργοποίησης του GAL4. Όταν οι δύο πρωτεΐνες (bait και prey) που εκφράζονται στο σύστημα αλληλεπιδράσουν τότε μπορούν να φέρουν κοντά τις δομικές περιοχές του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (AD και BD) και να δημιουργήσουν την λειτουργική πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να ξεκινήσει τη μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς (Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual).

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος ζύμης Y2HGold (Cat. Nos. 630498 PT4084-1 (071519), γονότυπος στελέχους: MATa, trp1-901, leu2-3.112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2:: GAL1UAS-Gal1TATA-His3, GAL2UAS-Gal2TATA-Ade2, URA3:: MEL1UAS-Mel1TATA AUR1-C MEL1). Το στέλεχος Y2HGold αδυνατεί να συνθέσει τρυπτοφάνη και λευκίνη, άρα όταν ο μετασχηματισμός είναι επιτυχής δηλαδή η ζύμη έχει μετασχηματιστεί και με τα δύο πλασμίδια, στην συγκεκριμένη περίπτωση pGADT7 και pGBKT7, τα κύτταρα ζύμης μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο απουσία των δύο αμινοξέων (Trp, Leu).

Το στέλεχος Y2HGold διαθέτει τέσσερα γονίδια αναφοράς για την ανίχνευση των αλληλεπιδράσεων. Τα γονίδια αυτά είναι τα (AUR1-C, HIS3, ADE2, MEL1). Αυτά τα γονίδια βρίσκονται ενσωματωμένα στο γονιδίωμα της ζύμης και βρίσκονται υπό τον έλεγχο τριών διακριτών υποκινητών που αναγνωρίζονται και επάγεται η έκφρασή τους από τον μεταγραφικό παράγοντα GAL4 (Εικόνα 2.4).

HIS3: Το στέλεχος Y2HGold δεν μπορεί να συνθέσει ιστιδίνη και επομένως δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που δεν έχει αυτό το απαραίτητο αμινοξύ. Όταν οι πρωτεΐνες bait και prey αλληλεπιδρούν, η έκφραση του His3 που ενεργοποιείται από το Gal4, επιτρέπει στα κύτταρα να βιοσυνθέτουν ιστιδίνη και να μπορούν να αναπτυχθούν απουσία του αμινοξέος στο θρεπτικό μέσο.

ADE2: Το στέλεχος Y2HGold δεν μπορεί επίσης να αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει αδερίνη. Όταν οι δύο πρωτεΐνες bait και prey αλληλεπιδρούν, η έκφραση του Ade2 ενεργοποιείται, επιτρέποντας στα κύτταρα να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει αδερίνη.

MEL1: Το MEL-1 κωδικοποιεί για την α-γαλακτοσιδάση, ένα ένζυμο που απαντάται φυσικά σε πολλά στελέχη ζυμομύκητα. Ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων δύο υβριδίων, η α-γαλακτοσιδάση (MEL1) εκφράζεται και εκκρίνεται από τα κύτταρα ζυμομύκητα. Οι αποικίες ζυμομύκητα που εκφράζουν το Mel1 γίνονται μπλε παρουσία του χρωμογόνου υποστρώματος X-alpha-Gal (X-α-Gal).

AUR1-C: Το AUR1-C κωδικοποιεί για το ένζυμο συνθάση της φωσφορυλο κεραμιδικής ινοσιτόλης. Εκφράζεται στο Y2HGold ως απόκριση στην αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που φέρνουν τους τομείς μεταγραφικής ενεργοποίησης (AD) και δέσμησης DNA (BD) του GAL4 σε κοντινή απόσταση, η έκφρασή του προσδίδει ανθεκτικότητα στο εξαιρετικά τοξικό φάρμακο Aureobasidin A.

Συνεπώς η μελέτη αλληλεπίδρασης μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω αυτών των γονιδίων αναφοράς.

Μετά την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης σε θρεπτικό μέσο SD2, γίνονται διαδοχικές επιστρώσεις σε θρεπτικά μέσα αυστηρότερης επιλογής. Αρχικά γίνεται επιστροφή στο θρεπτικό μέσο SD3 από το οποίο απουσιάζει το αμινοξύ ιστιδίνη (SD /-Trp/-Leu/-His). Εάν οι δύο πρωτεΐνες (bait και prey) αλληλεπιδρούν το κύτταρο βιοσυνθέτει ιστιδίνη και αναπτύσσεται στο SD3. Σε SD3 θρεπτικό μέσο απουσία ιστιδίνης, μπορεί να υπάρξει ανάπτυξη που οφείλεται σε ψευδώς θετική ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς της ιστιδίνης.

Ένας ακόμα τρόπος να ανιχνευτεί η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών είναι με την επιστροφή σε θρεπτικό μέσο SD2 ή SD3 που περιέχει το χρωμογόνο υπόστρωμα X- alpha-Gal. Εάν οι δύο πρωτεΐνες (bait και prey) αλληλεπιδρούν, το ένζυμο α-γαλακτοσιδάση εκφράζεται και εκκρίνεται από τα κύτταρα της ζύμης. Οι αποικίες που εκφράζουν το γονίδιο MEL1 χρωματίζονται μπλε κάτι που υποδηλώνει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης. Τέλος, ο αυστηρότερος έλεγχος για την αλληλεπίδραση δύο πρωτεϊνών είναι η επιστροφή των μετασχηματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο υψηλής πίεσης από το οποίο λείπουν και τα τέσσερα αμινοξέα της τρυπτοφάνης, λευκίνης, αδερίνης και ιστιδίνης (SD4). Η ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων σε αυτό το θρεπτικό μέσο υποδηλώνει και ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών που μελετούνται.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής επιδιώχθηκε η διερεύνηση της αλληλοεπίδρασης της αμινο- και καρβόξυ-τελικής περιοχής της απομεθυλάσης REF6 με τις κυτταριπλασματικές HSP90, HSP90.1 και HSP90.3. Στο εργαστήριο διαθέταμε ήδη τις κατασκευές pGBKT7:: HSP90.1 και pGBT7::HSP90.3, ενώ, όπως περιγράψαμε στην ενότητα 2.6, προχωρήσαμε στην δημιουργία της κατασκευής pGBKT7::REF6-C. Για τον έλεγχο των αλληλοεπιδράσεων πραγματοποιήθηκε συνδυαστικά ο διπλός μετασχηματισμός κυττάρων Y2HGold με τις κατασκευές pGBKT7:: HSP90.1 ή HSP90.3 και τις κατασκευές pGBKT7:: REF6 ή pGBT7 (empty), ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Σε τρυβλίο με κατάλληλο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης επιστρώνεται καλλιέργεια του στελέχους Y2HGold από stock στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ και επωάζουμε σε κλίβανο με $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 3 -5 ημέρες ώστε να αναπτυχθεί η ζύμη.

2. Από το τρυβλίο παίρνουμε μονές αποικίες και εμβολιάζουμε υγρό θρεπτικό ζύμης και επωάζουμε με ανάδευση στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως ότου η ανάπτυξη της ζύμης φτάσει σε εκθετική φάση και το θρεπτικό είναι πλέον θολό.

3. Από κάθε υγρή καλλιέργεια μεταφέρουμε 1ml σε erpedorf tube και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 2.000 rpm

4. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και κρατάμε το pellet των κυττάρων της ζύμης. Επαναιωρούμε σε 1ml 100Mm LiAC και επωάζουμε για 5 λεπτά στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$

5. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 2.000 rpm και αφαιρούμε το υπερκείμενο

6. Προσθέτουμε διάλυμα (Πίνακας 2.9) στο erpedorf tube επάνω στο pellet κυττάρων

7. Κάθε erpedorf tube το ανακινούμε με την χρήση vortex για περίπου 1 λεπτό ώστε να επαναιωρήσουμε τα κύτταρα της ζύμης στο transformation mix και επωάζουμε για 50 λεπτά στους $42\text{ }^{\circ}\text{C}$

8. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 5.000 rpm και αφαιρούμε το υπερκείμενο χρησιμοποιώντας πιπέτα

9. Επαναιωρούμε το pellet κυττάρων σε 200-400 μl (YPD)

10. Στρώνουμε σε σε τρυβλίαστο θρεπτικό μέσο SD2 και επωάζουμε στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τρεις με πέντε ημέρες.

Για τον έλεγχο της αλληλοεπίδρασης μέσω της διαφορικής ανάπτυξης σε επιλεκτικό θρεπτικό μέσο αλλά και της ικανότητας αποικοδόμησης το X-a-gal, μοναδιαίες αποικίες από τα θρεπτικά SD2 μετά τον διπλό μετασχηματισμό διαλύθηκαν σε 1 mL ddH₂O. Στην συνέχεια για το κάθε γεγονός μετασχηματισμού πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 1:100 και 1:1000. Τέλος 5 μL από τις αραιώσεις επιστρώθηκαν σε SD2 και SD3(παρουσία X-a-Gal), και αναπτυχθηκαν στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 5 ημέρες. Οι εικόνες που χρησιμοποιήθηκαν στα αποτελέσματα στις Εικόνες 2.4.6 ii) και 2.4.7 ii), αντιστοιχούν στις αποικίες της κάθε αλληλοεπίδρασης στην αραιώση 1:100.

240μl of Peg (50% w/v)
36μl of 1M LiAC
20μl of ss-DNA (10mg/ml)
20μl of plasmid DNA (100ng to 5μg)
20μl of plasmid DNA (100ng to 5μg)
30μl of ddH₂O (10mg/ml)
350 Total

Πίνακας 2.9 Μίγμα αντίδρασης για τον μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης.

Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας κυττάρων ζύμης.

Θρεπτικό μέσο YPDA:

1% (w/v) yeast extract
2% (w/v) D-glucose
2% (w/v) peptone
120 mg/L Adenine
2% (w/v) agar (για στερεό θρεπτικό μέσο)

Θρεπτικό μέσο SD-2 (SD/-Leu/-Trp):

0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids(1)
2% (w/v) D-glucose
0,14% (w/v) Yeast Synthetic Drop-out Media(2)
75mg/L Histidine
120 mg/L Adenine
Ρύθμιση pH στο 5,8 με KOH 1N
2% (w/v) agar (για στερεό θρεπτικό μέσο)

Θρεπτικό μέσο SD-3 (SD/-Leu/-Trp/-His):

0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids
2% (w/v) D-glucose
0,14% (w/v) Yeast Synthetic Drop-out Media
120 mg/L Adenine
Ρύθμιση pH στο 5,8 με KOH 1N
2% (w/v) agar (για στερεό θρεπτικό μέσο)

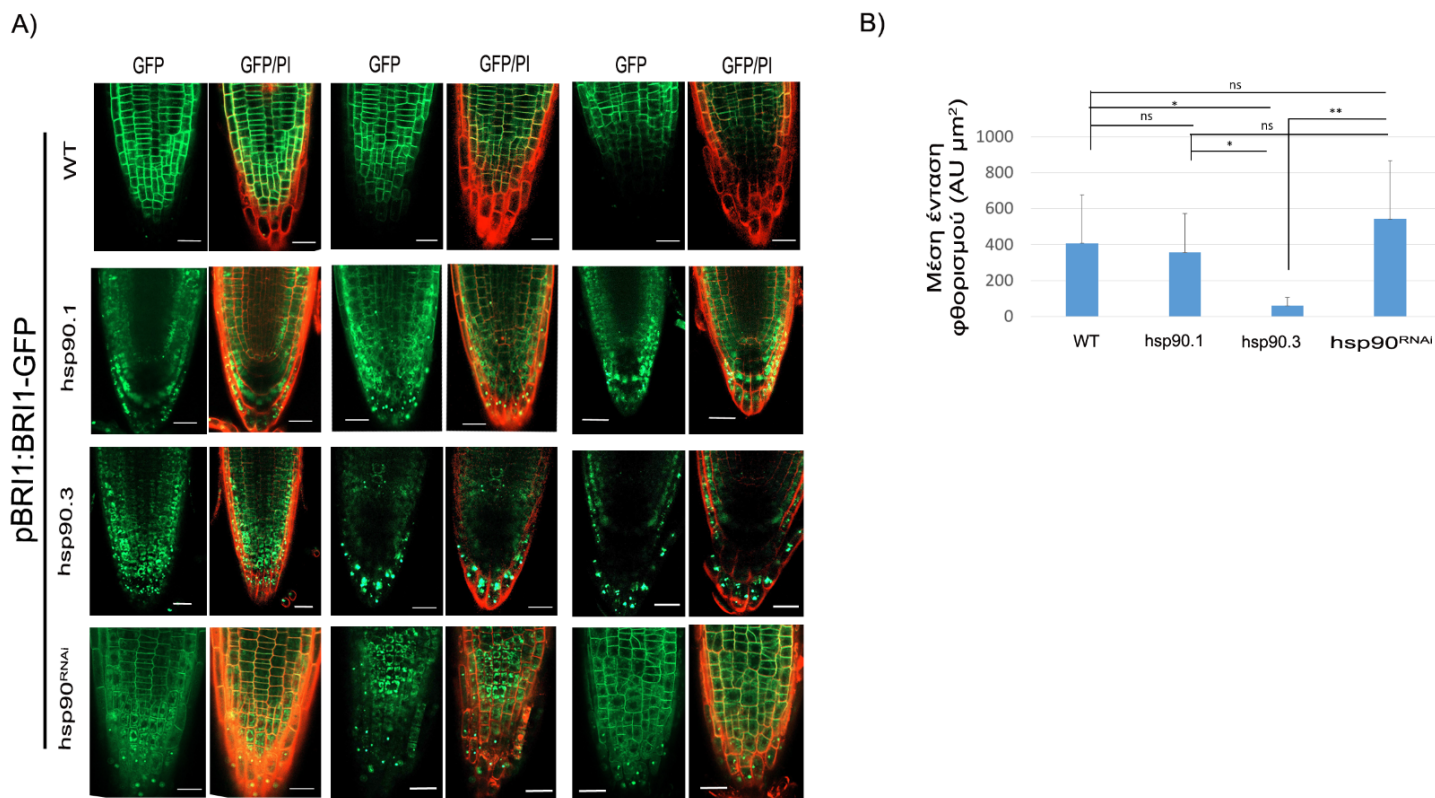
3. Αποτελέσματα

Προηγούμενες μελέτες που αφορούσαν τον ρόλο των HSP90 στο μονοπάτι των βρασσινοστεροειδών, ανέδειξαν τον ρόλο των HSP90, τόσο στο επίπεδο των υποδοχέων BRI1 και BAK1, όσο και στο επίπεδο της κινάσης BIN2 και των μεταγραφικών παραγόντων BES1/BZR1. Δύο κυτταροπλασματικά μέλη των HSP90, η HSP90.1 και η HSP90.3 βρέθηκαν να αλληλοεπιδρούν με τα μέρη του ετεροδιμερούς υποδοχέα των βρασσινοστεροειδών BRI1/BAK1, καθορίζοντας τα επίπεδα του BRI1 στην μεμβράνη και το πρότυπο οργάνωσης του BRI1 πάνω στην μεμβράνη. Η συσσώρευση του BRI1 στον ενδοκυττάριο χώρο σε κύτταρα υποκοτυλίου, παρατηρήθηκε μετά από γενετική ή φαρμακολογική παρεμπόδιση των HSP90, υποδεικνύει τον άμεσο ρόλο των HSP90 στην διαδικασία της ανακύκλωσης του BRI1 υποδοχέα.

3.1 Οι HSP90 εμπλέκονται στον έλεγχο των επιπέδων και του προτύπου κατανομής του BRI1 στο ακρορρίζιο.

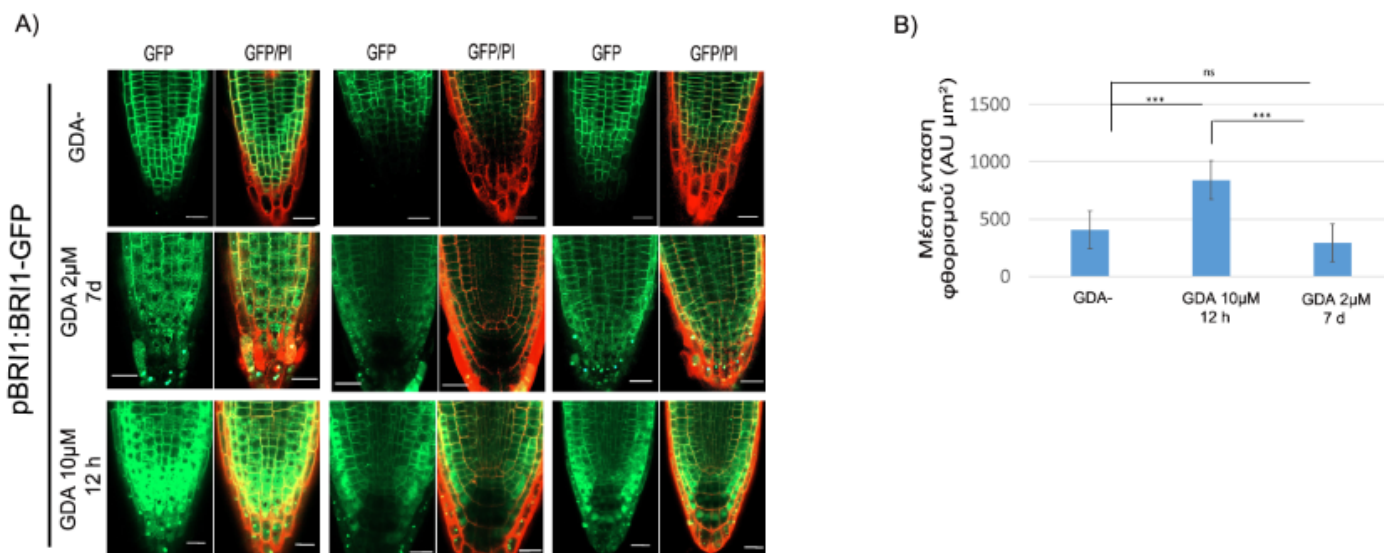
Προκειμένου να μελετήσουμε τις συνέπειες που μπορεί να έχει η μειωμένη παρουσία λειτουργικών HSP90 στον πρότυπο οργάνωσης και τοποθέτησης του BRI1 υποδοχέα στο ακρορρίζιο, χρησιμοποιήθηκαν φυτά που εκφράζουν την κατασκευή $pBRI1::BRI1-GFP$ και έγινε ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέα BRI1 μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού στις ρίζες αρτίβλαστων φυτών 6-7 ημερών. Για να καθοριστεί ο αντίκτυπος της μεταλλαγής των κυτταροπλασματικών HSP90, για την παρατήρηση χρησιμοποιήθηκαν σειρές $pBRI1::BRI1-GFP$ σε γενετικό υπόβαθρο Col-0 (WT), $pBRI1::BRI1-GFP$ σε γενετικό υπόβαθρο *hsp90.1* ή *hsp90.3*, όσο και σειρές $pBRI1-GFP$ στις οποίες είχαμε μειωμένη έκφραση των HSP90 μέσω RNAi σίγησης σε *hsp90^{RNAi}* σειρές. Η ανάλυση μας έδειξε ότι σε φυτά αγρίου τύπου το BRI-GFP εμφανίζει ένα χαρακτηριστικό πρότυπο κατά το οποίο τοποθετείται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων στο ακρορρίζιο, ενώ στα μεταλλάγματα *hsp90.1*, *hsp90.3* και *HSP90^{RNAi}* φυτά παρουσιάζεται ένα διαταραγμένο πρότυπο υποκυτταρικής κατανομής του BRI-GFP στα κύτταρα του ακρορρίζιου, με τα *hsp90.1* και *hsp90.3* να εμφανίζουν τον πιο έντονο φαινότυπο (Εικόνα 3.1.1 A).

Πέραν από τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν στο πρότυπο κατανομής του BRI-GFP, αλλαγές παρατηρήθηκαν και στο επίπεδο της συνολικής έντασης φθορισμού για το BRI-GFP, που αντικατοπτρίζει την συνολική ποσότητα του BRI-GFP. Στα μεταλλάγματα *hsp90.1* και το *hsp90^{RNAi}*, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλλαγή στον συνολικό φθορισμό για το BRI-GFP σε σχέση με το WT ($p\text{-value}_{hsp90.1}:0,9727$, $p\text{-value}_{hsp90RNAi}:0,647$), ενώ στο *hsp90.3* παρατηρήθηκε δραματική μείωση του συνολικού φθορισμού που αντιστοιχεί στο BRI-GFP. Η ομοιότητα που εμφανίζουν οι σειρές *hsp90.1*, *hsp90.3* αλλά και η *hsp90^{RNAi}*, στην διαταραχή του προτύπου κατανομής του BRI-GFP στα κύτταρα του ακρορρίζιου είναι ενδεικτική της αναγκαιότητας της απρόσκοπτης λειτουργίας των HSP90, για την ορθή τοποθέτηση στην πλασματική μεμβράνη και την ανακύκλωση του BRI1 υποδοχέα, σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης ως προς το φωτισμό και τη θερμοκρασία και βρίσκεται σε συμφωνία με αναφορές που θέλουν να διαταράσσεται η υποκυτταρική κατανομή και τοποθέτηση του BRI-GFP στην ρίζα των φυτών που εκτίθενται σε καταστάσεις στρες. Επιπλέον, η δραματική μείωση του συνολικού φθορισμού του BRI GFP, στις σειρές *hsp90.3*, αλλά όχι στο *hsp90.1*, καταμαρτυρά την λειτουργική διαφοροποίηση που μπορεί να εμφανίζουν οι κυτταροπλασματικές HSP90 σε ότι αφορά στην σταθεροποίηση και αποικοδόμηση του BRI1.



Εικόνα 3.1.1. Εικόνες ακροριζίου μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού και μετρήσεις μέσης έντασης φθορισμού για το BRI-GFP. A) Παρατήρηση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού στην περιοχή του ακροριζίου σε σειρές όπου εκφράζεται η κατάσκευη pBRI1::BRI1-GFP σε διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο: WT: Γενετικό υπόβαθρο Col-0, hsp90.1: μετάλλαγμα για την κυτταροπλασματική HSP90.1, hsp90.3: μετάλλαγμα για την κυτταροπλασματική HSP90.3, hsp90^{RNAi}: σειρά η οποία εκφράζει την κατασκευή rac::hsp90^{RNAi}, για RNA σίγηση των γονιδίων των HSP90. Για την χρώση των κυτταρικών τοιχωμάτων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Propidium iodide (PI) σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL B) Μετρήσεις του συνολικού φθορισμού στην περιοχή του ακροριζίου: WT(n:8), hsp90.1(n:10), hsp90.3(n:8), hsp90^{RNAi}(n:7)/ Το p-value του στατιστικού ελέγχου όπως αυτό προέκυψε από το non-parametric Annona analysis p-value: 0,0026966/ n: ο αριθμός των ατόμων που καταμετρήθηκαν/κλίμακα λευκής μπάρας: 20um.

Στην συνέχεια επαναλάβαμε την παρατήρηση στο επίπεδο του ακροριζίου, ύστερα από φαρμακευτική παρεμπόδιση της ATPάσης των HSP90 με την χρήση GDA. Για τη φαρμακολογική μελέτη, παρατηρήθηκαν, φυτά *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0 6-7 ημέρων μετά την βλάστηση, τα οποία εκφράζουν την κατασκευή pBRI1::BRI1-GFP αναπτύχθηκαν στους 22 °C. Οι χειρισμοί που πραγματοποιήθηκαν: 1) Στερεό θρεπτικό μέσο MS (Συνθήκη ελέγχου), 2) Στερεο θρεπτικό μέσο MS παρουσία GDA με τελική συγκέντρωση 2 μM (μακράς διάρκειας εφαρμογή GDA), 3) Στερεό θρεπτικό μέσο MS για 5 ημέρες και στην συνέχεια 12 h σε υγρό θρεπτικό μέσο παρουσία GDA με τελική συγκέντρωση 10 μM (Βραχείας διάρκειας εφαρμογή GDA). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν διαφορετικό πρότυπο υποκυτταρικής κατανομής του BRI1 στα φυτά που υπέστησαν χειρισμό με GDA (μακράς και βραχείας διάρκειας), σε σχέση με την συνθήκη ελέγχου (Εικόνα 3.1.2 A).



Εικόνα 3.1.2 . Εικόνες ακροριζίου μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού και μετρήσεις μέσης έντασης φθορισμού για το BRI-GFP. A) Παρατήρηση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού στην περιοχή του ακροριζίου σε σειρές όπου εκφράζεται η κατασκευή pBRI1::BRI1-GFP ύστερα από επώαση σε θρεπτικό μέσο MS στο οποίο έχει προστεθεί GDA: GDA-: ανάπτυξη για 6-7 ημέρες *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0 σε στερεοθρεπτικό μέσο MS, GDA 2µM 7d: Ανάπτυξη για 6-7 ημέρες *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0 σε στερεό θρεπτικό μέσο MS παρουσία GDA(Τελική συγκέντρωση 2µM),GDA 10µM 12h: Ανάπτυξη για 5 ημέρες του *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0 σε στερεοθρεπτικό μέσο MS, και επώαση των νεαρών φυτών σε συνολικό όγκο 2mL υγρού MS παρουσία GDA(Τελική συγκέντρωση 10µM). Για την χρώση των κυτταρικών τοιχωμάτων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Propidium iodide (PI) σε τελική συγκέντρωση 100µg/mL B) Μετρήσεις του συνολικού φθορισμού στην περιοχή του ακροριζίου: GDA-(n:8), GDA 2µM 7d(n:13), GDA 10µM 12h(n:11) Το p-value του στατιστικού ελέγχου όπως αυτό προέκυψε από το non-parametric Annona analysis p-value: 0,00234/ n: ο αριθμός των ατόμων που καταμετρήθηκαν/κλίμακα λευκής μπάρας: 20µm/GDA: geldanamycin.

Παράλληλα ,παρατηρήθηκε και αύξηση του φθορισμού συνολικού φθορισμού στο ακροριζίο των φυτών, στα οποία έγινε βραχεία εφαρμογή του GDA σε σχέση με την συνθήκη ελέγχου (p-value_{shortGDA}=0,00871), ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυτών όπου έγινε μακράς διάρκειας εφαρμογή του GDA και της συνθήκης ελέγχου (p-value_{longGDA}=0,814). Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλλαγή στον συνολικό φθορισμό μεταξύ των φυτών που υπέστησαν βραχείας και μακράς διάρκειας εφαρμογή GDA (p-value=0,007856). Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με παρόμοια πειράματα, που είχαν εκπονηθεί στο εργαστήριο και αφορούσαν στον ρόλο των HSP90 στην πολική κατανομή του μεταφορέα των αυξινών, PIN1, μίας άλλης πρωτεΐνης που τοποθετείται στην πλασματική μεμβράνη. Η διαφορετική απόκριση στο επίπεδο του συνολικού BRI1-GFP στην ρίζα, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μειωμένη παρουσία λειτουργικών HSP90 οδηγεί σε πρώτο στάδιο, σε αυξημένη παρουσία του BRI1-GFP στο ακροριζίο, ενώ στη συνεχή αναστολή της δράσης των HSP90, ισορροπείται η παρουσία του BRI1-GFP στα επίπεδα παρόμοια με την συνθήκη ελέγχου, χωρίς ωστόσο να έχουμε επαναφορά του αρχικού προτύπου κατανομής του BRI-GFP.

3.2 Η επίδραση του HSP90 στον καθορισμό της μοίρας του BRI1

Αρκετές είναι οι αναφορές οι οποίες εμπλέκουν τις HSP90 στην διαδικασία της ενδοκύττωσης αλλά και της μεταφοράς στο ενδοκυτταρικό μεμβρανικό σύστημα μεταφοράς των μεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως στην περίπτωση των υποδοχέων EGFR και ErbB2 στα συστήματα των θηλαστικών. Συνοπτικά, η μειωμένη δράση των HSP90 οδηγεί σε αποσταθεροποίηση των νεοσυντιθέμενων υποδοχέων και δευτερογενώς στην στόχευση

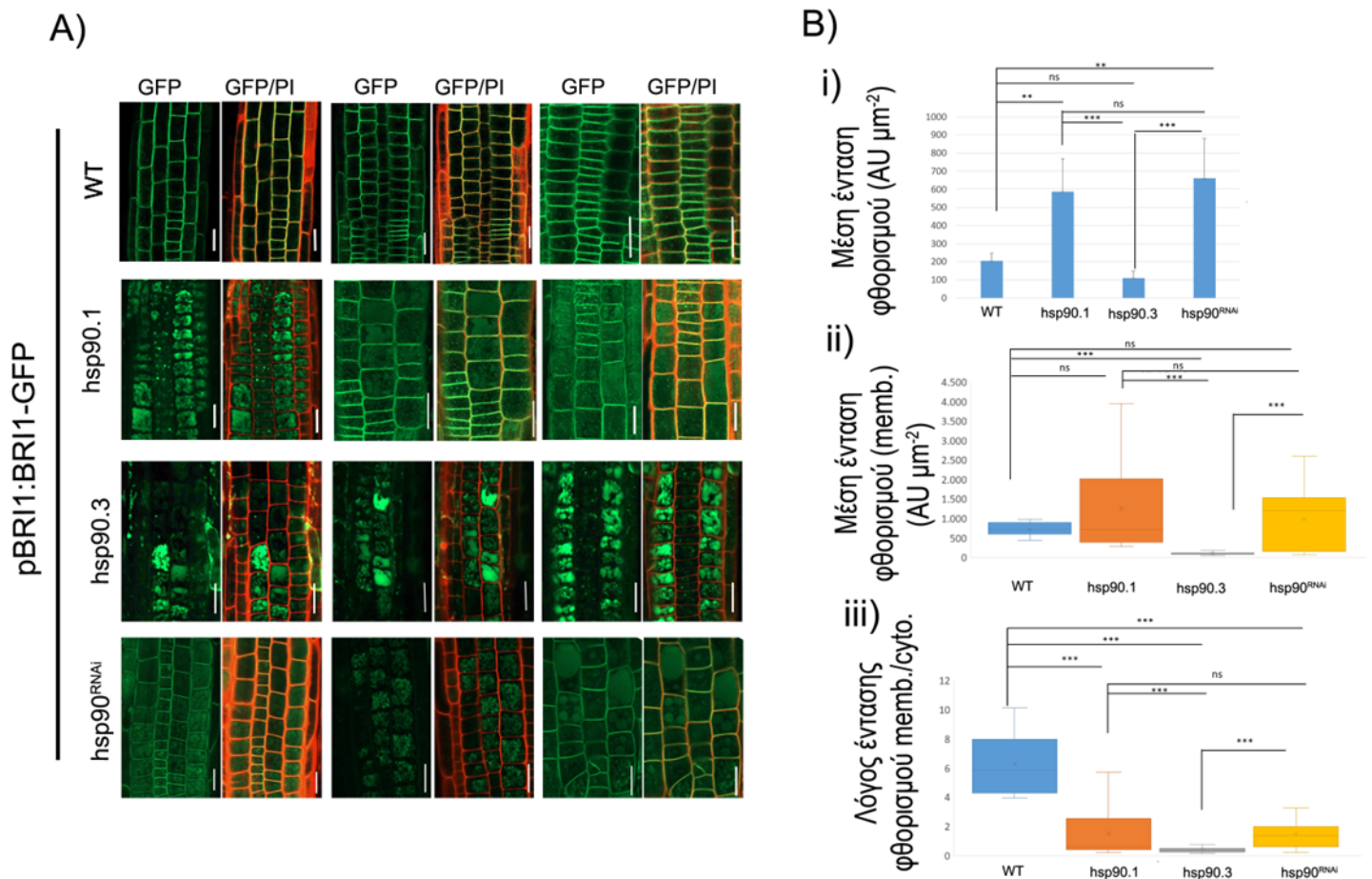
τους προς αποικοδόμηση ή/και σε αυξημένους ρυθμούς ενδοκύττωσης και μεταφορά τους προς τα λυσοσώματα για την τελική τους αποικοδόμηση. Παράλληλα έχειδειχθεί ότι στην περίπτωση των κυττάρων υποκοτυλίου στο *Arabidopsis thaliana*, όπου έχει γίνει φαρμακευτικός ή γενετικός περιορισμός των HSP90, παρουσιάζεται αυξημένη παρουσία του BRI1 στον ενδοκυττάριο χώρο. Η συγκεκριμένη παρατήρηση συνδυαστικά με την παρούσα ανάλυση (Εικόνα 3.1.1 και Εικόνα 3.1.2), όπου παρατηρείται αλλαγή στο πρότυπο κατανομής του BRI1 σε κύτταρα ακρορριζίου μετά από παρεμπόδιση της λειτουργίας των HSP90 οδήγησε σε δυο κεντρικά ερωτήματα: 1) Ποιος είναι ο αντίκτυπος της μειωμένης λειτουργικότητας των HSP90 στην παρουσία του BRI1 στην πλασματική μεμβράνη και στο ισοζύγιο BRI1(πλασματικής μεμβράνης)/ BRI1(κυτταροπλάσματος) στην ρίζα;, και 2) Σε ποια σημεία του μηχανισμού ανακύκλωσης του μεμβρανικού υποδοχέα BRI1 εμπλέκονται οι HSP90;

Για να απαντήσουμε το πρώτο ερώτημα καταφύγαμε στην παρατήρηση του προτύπου έκφρασης του BRI1-GFP σε επιδερμικά κύτταρα της μεταβατικής ζώνης της ρίζας φυτών 6-7 ημερών μετά την βλάστηση, στα οποία υπήρχε γενετική ή φαρμακολογική παρεμπόδιση των HSP90, μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού. Για την γενετική παρεμπόδιση της λειτουργίας των HSP90, χρησιμοποιήθηκαν τα μονά μεταλλάγματα *hsp90.1*, *hsp90.3* (για τις αντίστοιχες κυτταροπλασματικές HSP90.1 και HSP90.3), της και η διαγονιδιακή σειρά *hsp90^{RNAi}*, καθώς και φυτά αγρίου τύπου. Όλες οι παραπάνω σειρές εκφράζαν την κατασκευή *pBRI1::BRI1-GFP*. Η ανάλυση μας έδειξε ότι το BRI1-GFP τοποθετείται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων σε φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 3.2.1). Αυξημένη παρουσία του BRI1-GFP στον ενδοκυττάριο χώρο στα μεταλλάγματα *hsp90.1* και *hsp90.3* αλλά και στα φυτά *hsp90^{RNAi}*. Πιο συγκεκριμένα, τα μεταλλάγματα *hsp90.1*, εμφάνισαν πλειοτροπικούς φαινοτύπους καθώς παρατηρήθηκαν περιπτώσεις όπου όλο το BRI1-GFP βρισκόταν στον ενδοκυττάριο χώρο ενώ υπήρχαν και περιπτώσεις που το BRI1-GFP βρισκόταν και στην μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα, σε δομές που προσομοιάζουν με τα λυτικά χυμοτόπια. Στα μεταλλάγματα *hsp90.3*, σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν το σύνολο του BRI1-GFP, βρισκόταν στον ενδοκυττάριο χώρο και εντοπιζόταν σε δομές όμοιες με τα λυτικά χυμοτόπια. Τέλος, στα φυτά όπου γινόταν *hsp90^{RNAi}*, παρατηρήθηκε επίσης ένα εύρος διαφορετικών φαινοτύπων, παρόμοιων με αυτούς που παρατηρήσαμε και στα μεταλλάγματα των *hsp90.1*.

Για να διερευνηθεί ο ρόλος των HSP90, στην σταθερότητα του BRI1 στα επιδερμικά κύτταρα της ζώνης μετάβασης των ριζών, προχωρήσαμε στην μέτρηση του συνολικού φθορισμού στην συγκεκριμένη περιοχή για τις σειρές όπου εξετάσαμε παραπάνω WT, *hsp90.1*, *hsp90.3*, *hsp90^{RNAi}*. Στο μετάλλαγμα *hsp90.3*, παρατηρήθηκε μείωση του συνολικού φθορισμού για το BRI1-GFP συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου, η οποία ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντική (p-value: 0.843). Στις περιπτώσεις των *hsp90.1* και *hsp90^{RNAi}*, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στον συνολικό φθορισμό για το BRI1-GFP σε σχέση με την συνθήκη ελέγχου (p-value_{hsp90.1}: 0,008116, p-value_{Hsp90^{RNAi}}: 0.001747), ωστόσο δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (p-value: 0,7381)(Εικόνα 3.2.1 B i)).

Στην συνέχεια, για να διερευνήσουμε τον ρόλο των HSP90 στην τοποθέτηση του BRI1 στην πλασματική μεμβράνη, αλλά και στην διατήρηση του ισοζυγίου BRI1-GFP_[μεμβρανικό]/ BRI1-GFP_[κυτταροπλασματικό],

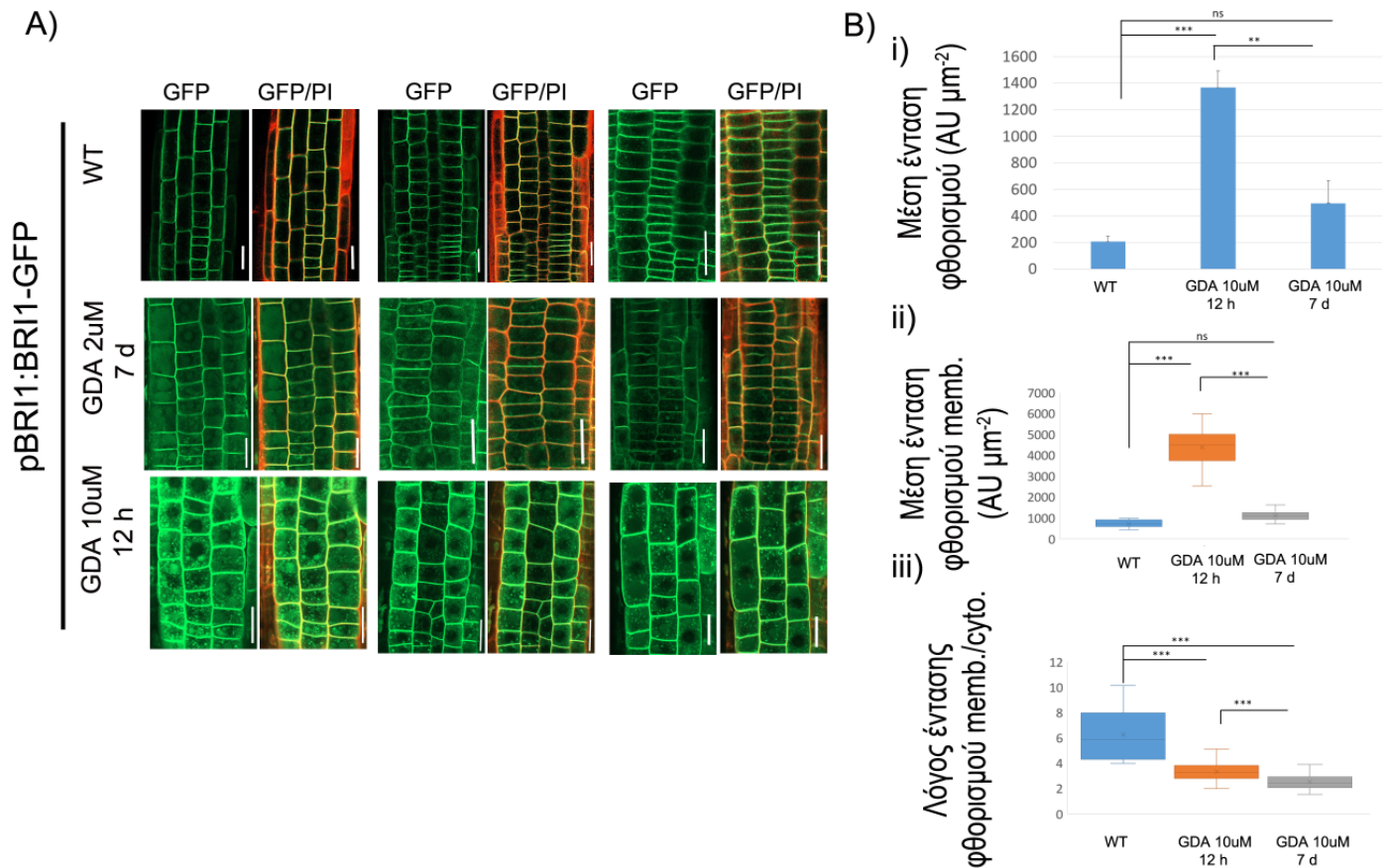
προχωρήσαμε σε μετρήσεις του φθορισμού του BRI1-GFP στην πλασματική μεμβράνη και στον ενδοκυττάριο χώρο επιδερμικών κυττάρων της ζώνης μετάβασης των φυτών WT, *hsp90.1*, *hsp90.3*, *hsp90^{RNAi}*. Στο μετάλλαγμα *hsp90.1* αλλά και τα φυτά *hsp90^{RNAi}*, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στον φθορισμό του BRI1-GFP στην πλασματική μεμβράνη σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου ($p\text{-value}_{hsp90.1}: 0.3536; p\text{-value}_{Hsp90^{RNAi}}: 0.9056$). Παρόλα αυτά, όπως προέκυψε και από τις παρατηρήσεις στην Εικόνα 3.2.1 A, οι μετρήσεις στις περιπτώσεις των *hsp90.1* και *hsp90^{RNAi}* εμφάνισαν μεγαλύτερο εύρος κατανομής (Εικόνα 3.2.1 B ii)). Στο επίπεδο του ισοζυγίου $BRI1\text{-GFP}_{[μ\text{εμβρανικό}]} / BRI1\text{-GFP}_{[ενδοκυττάριο]}$, παρατηρήθηκε μείωση του λόγου του μεμβρανικού BRI1-GFP προς το ενδοκυττάριο BRI1-GFP στις σειρές *hsp90.3*, *hsp90.1*, *hsp90^{RNAi}* σε σχέση με την συνθήκη ελέγχου (WT) ($p\text{-value}_{hsp90.1}: 2,96E-07; p\text{-value}_{hsp90.3}: 0; p\text{-value}_{Hsp90^{RNAi}}: 2,45E-05$), ενώ παράλληλα στο *hsp90.3*, εμφανίστηκε η πιο έντονη μείωση του ισοζυγίου $BRI1\text{-GFP}_{[μ\text{εμβρανικό}]} / BRI1\text{-GFP}_{[ενδοκυττάριο]}$ συγκριτικά με τα *hsp90.1* και *hsp90^{RNAi}* ($p\text{-value}_{hsp90.1}: 2,58E-04; p\text{-value}_{Hsp90^{RNAi}}: 3,53E-05$) (Εικόνα 3.2.1 B iii)).



Εικόνα 3.2.1. Εικόνες επιδερμικών κυττάρων της μεταβατικής ζώνης της ρίζας μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού και μετρήσεις μέσης έντασης φθορισμού για το BRI-GFP. A) Παρατήρηση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού στην περιοχή των επιδερμικών κυττάρων της μεταβατικής ζώνης της ρίζας σε σειρές όπου εκφράζεται η κατάσχεση pBRI1::BRI1-GFP σε διαφορετικό γενετικό υπόβαρθο: WT: Γενετικό υπόβαρθό Col-0, *hsp90.1*: μετάλλαγμα για την κυτταροπλασματική HSP90.1, *hsp90.3*: μετάλλαγμα για την κυτταροπλασματική HSP90.3, *hsp90^{RNAi}*: σειρά η οποία εκφράζει την κατασκευή *rac::hsp90^{RNAi}*, για RNA σίγηση των γονιδίων των HSP90. Για την χρώση των κυτταρικών τοιχωμάτων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Propidium iodide (PI) σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B) i) Μετρήσεις του συνολικού φθορισμού του BRI1-GFP στην ζώνη μετάβασης της ρίζας WT(n:3), *hsp90.1*(n:12), *hsp90.3*(n:7), *hsp90^{RNAi}*(n:10)/ Το p-value του στατιστικού ελέγχου όπως αυτό προέκυψε από το non-parametric Annona analysis p-value: 5,65E-02, B) ii) Μετρήσεις φθορισμού του BRI-GFP στην μεμβράνη των κυττάρων της μεταβατικής ζώνης WT(n:27), *hsp90.1*(n:68), *hsp90.3*(n:57), *hsp90^{RNAi}*(n:54)/ Το p-value του στατιστικού ελέγχου όπως αυτό προέκυψε από το non-parametric Annona analysis p-value: 0, B) iii) Αναλογία φθορισμού του μεμβρανικό προς κυτταροπλασματικό BRI-GFP στην μεμβράνη των κυττάρων της μεταβατικής ζώνης WT(n:27), *hsp90.1*(n:68), *hsp90.3*(n:57), *hsp90^{RNAi}*(n:54)/ Το p-value του στατιστικού ελέγχου όπως αυτό προέκυψε από το non-parametric Annona analysis p-value: 0 / n: ο αριθμός των ατόμων που καταμετρήθηκαν/κλίμακα λευκής μπάρας: 20 μm .

Στην συνέχεια επαναλάβουμε τις παρατηρήσεις στα επιδερμικά κύτταρα της ζώνης μετάβασης της ρίζας ύστερα από φαρμακευτική αναστολή της δράσης της ATPάσης των HSP90 με εφαρμογή της φαρμακευτικής ένωσης GDA. Ως συνθήκη ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου *Arabidopsis thaliana*, τα οποία αναπτύχθηκαν για 6-7 ημέρες μετά την βλάστηση σε ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας (22 °C). Παράλληλα, παρατηρήθηκαν φυτά *Arabidopsis thaliana*, τα οποία υποβλήθηκαν σε χειρισμό βραχείας και μακράς διάρκειας εφαρμογής με GDA, ακολουθώντας τα ίδια βήματα όπως αυτά περιγράφηκαν παραπάνω. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε και στην Εικόνα 3.2.2 A, τόσο η μακράς διάρκειας όσο και η βραχείας διάρκειας εφαρμογή του GDA οδήγησαν σε διαταραγμένο πρότυπο της υποκυττάριας τοποθέτησης του BRI1-GFP συγκριτικά με την συνθήκη ελέγχου, με αύξηση του BRI1-GFP στον ενδοκυττάριο χώρο, σε μεμβρανικές δομές, οι οποίες ομοιάζουν με λυτικά χυμοτόπια καθώς και σε άλλες ενδοκυττάριας κυστιδικές δομές, όπως είχαμε και στις περιπτώσεις γενετικής καταστολής των HSP90.

Στο επίπεδο του συνολικού φθορισμού του BRI1-GFP στην περιοχή των επιδερμικών κυττάρων της μεταβατικής ζώνης της ρίζας, παρατηρήθηκε αύξηση στον συνολικό φθορισμό, στην περίπτωση της βραχείας εφαρμογής GDA (p-value: 0.0005739), αλλά και στην περίπτωση της μακράς εφαρμογής του GDA (p-value: 0.1513), όπου στην τελευταία περίπτωση η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.2.2 B i)). Σε ότι αφορά στα επίπεδα του BRI1-GFP στην πλασματική μεμβράνη, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στην περίπτωση της βραχείας διάρκειας εφαρμογής GDA (p-value: 0), αλλά και στην περίπτωση της μακράς διάρκειας εφαρμογής GDA (p-value: 0.002312), συγκριτικά με την συνθήκη ελέγχου, με την αύξηση στην πρώτη περίπτωση να είναι σαφώς μεγαλύτερη (p-value: 5,32E-06) (Εικόνα 3.2.2 B ii)). Τέλος, στο επίπεδο του ισοζυγίου $\text{BRI1-GFP}_{[\text{μεμβρανικό}]} / \text{BRI1-GFP}_{[\text{ενδοκυττάριο}]}$, παρατηρήθηκε μείωση του λόγου και στις δύο περιπτώσεις χειρισμού με GDA (βραχείας εφαρμογής και μακράς εφαρμογής) (p-value_{shortGDA}: 6,57E-05 ; p-value_{longGDA}: 8,88E-13) συγκριτικά με την συνθήκη ελέγχου, με το μέγεθος της μείωσης του λόγου να διαφέρει ανάμεσα στους δύο χειρισμούς (p-value: 0.0003792) (Εικόνα 3.2.2 B iii)).

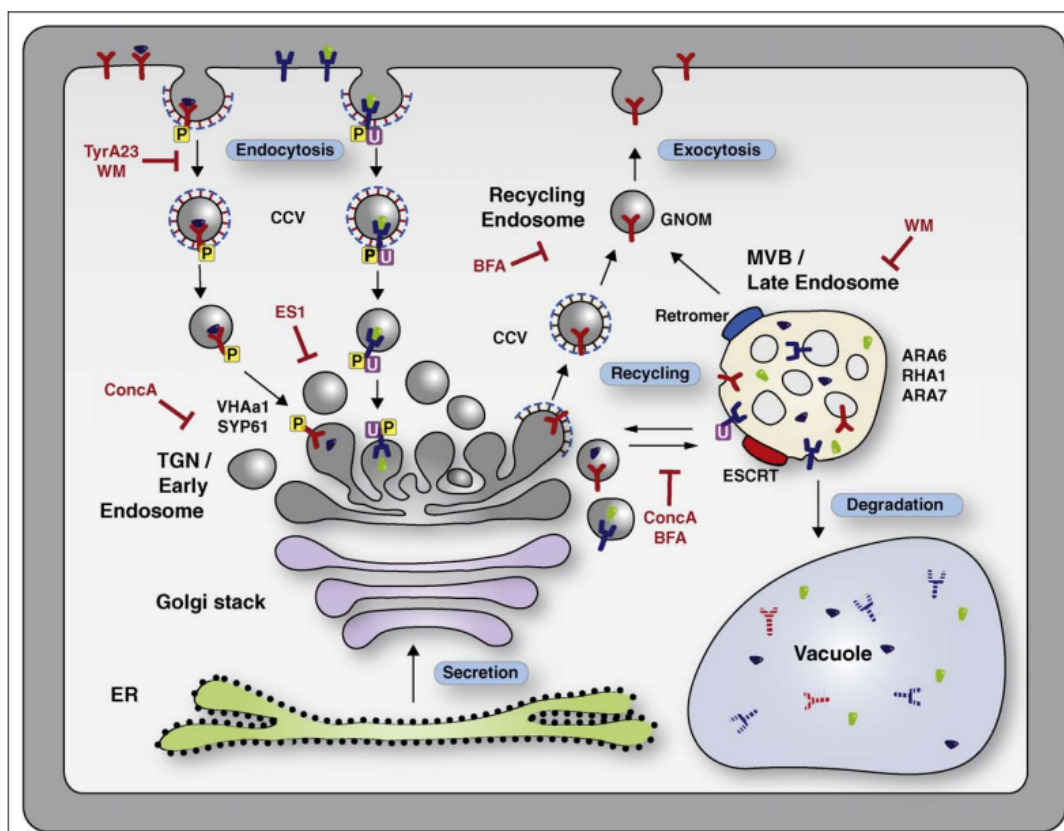


Εικόνα 3.2.2. Εικόνες επιδερμικών κυττάρων της μεταβατικής ζώνης της ρίζας μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού και μετρήσεις μέσης έντασης φθορισμού για το BRI-GFP A) Παρατήρηση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού στην περιοχή των επιδερμικών κυττάρων της ζώνης μετάβασης στην ρίζα σε σειρές όπου εκφράζεται η κατασκευη $\rho\text{BRI1}::\text{BRI1-GFP}$ ύστερα από επώαση σε θρεπτικό μέσο MS στο οποίο έχει προστεθεί GDA: GDA-: ανάπτυξη για 6-7 ημέρες *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0 σε στερεοθρεπτικό μέσο MS, GDA 2uM 7d: Ανάπτυξη για 6-7 ημέρες *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0 σε στερεό θρεπτικό μέσο MS παρουσία GDA(Τελική συγκέντρωση 2uM), GDA 10uM 12h: Ανάπτυξη για 5 ημέρες του *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0 σε στερεοθρεπτικό μέσο MS, και επώαση των νεαρών φυτών σε συνολικό όγκο 2mL υγρού MS παρουσία GDA(Τελική συγκέντρωση 10uM). Για την χρώση των κυτταρικών τοιχωμάτων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Propidium iodide (PI) σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B) i) Μετρήσεις του συνολικού φθορισμού στην μεταβατική ζώνη της ρίζας: GDA-(n:3), GDA 2uM 7d(n:7), GDA 10uM 12h(n:7) Το p-value του στατιστικού ελέγχου όπως αυτό προέκυψε από το non-parametric Annona analysis p-value: 0.001046, ii) Μετρήσεις φθορισμού του BRI-GFP στην μεμβράνη των κυττάρων της μεταβατικής ζώνης: GDA-(n:27), GDA 2uM 7d (n:31), GDA 10uM 12h (n:47)/ Το p-value του στατιστικού ελέγχου όπως αυτό προέκυψε από το non-parametric Annona analysis p-value: 0, B) iii)Αναλογία φθορισμού του μεμβρανικό προς ενδοκυττάριο BRI-GFP στην μεμβράνη των κυττάρων της μεταβατικής ζώνης GDA-(n:27), GDA 2uM 7d (n:31), GDA 10uM 12h (n:47)/ Το p-value του στατιστικού ελέγχου όπως αυτό προέκυψε από το non-parametric Annona analysis p-value: 5,88E-12 / n: ο αριθμός των ατόμων που καταμετρήθηκαν/κλίμακα λευκής μπάρας: 20um / n: ο αριθμός των ατόμων που καταμετρήθηκαν/κλίμακα λευκής μπάρας: 20um/GDA: geldanamycin

3.3 Ο πολυεπίπεδος ρόλος των HSP90 στην μηχανή διακίνησης των μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων που αναλύθηκαν παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι HSP90 παίζουν καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής ομοιόστασης του BRI1, και στον τρόπο με τον οποίο κατανέμεται το BRI1 στις κυτταρικές μεμβράνες. Ο εντοπισμός του BRI1 στα λυτικά χυμοτόπια καθώς και σε άλλες ενδοκυτταρικές μεμβρανικές δομές, κατά την μείωση της παρουσίας των λειτουργικών HSP90, υποδηλώνει ανωμαλίες στο επίπεδο του μηχανισμού ανακύκλωσης και διακίνησης του μεμβρανικού υποδοχέα BRI1, όπως περιεγράφηκε συνολικά στην εισαγωγή.

Για την μελέτη των διαφόρων ενδοκυτταρικών μονοπατιών που ακολουθούν οι πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης των οποίων η υποκυττάρια τοποθέτηση εξαρτάται από την λειτουργία, αυτού του μηχανισμού χρησιμοποιούνται φαρμακευτικές ενώσεις οι οποίες μπλοκάρουν την πορεία των μεμβρανικών πρωτεϊνών σε συγκεκριμένα σημεία των μονοπατιών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων φαρμακευτικών ενώσεων αποτελούν η Κονκαναμικίνη Α (Concanamycin A/ConcA) και η Γορτμανίνη(Wortmannin/Wort). Πιο συγκεκριμένα η ConcA, αποτελεί αναστολέας της V-ATPάσης, και δρα με δύο διαφορετικούς τρόπους, από την μία μπλοκάρει τα πρώιμα ενδοσώματα, με αποτέλεσμα την δημιουργία πολλαπλών κυστιδίων τα οποία σταδιακά διογκώνονται και συσσωματώνονται (Dettmer et al., 2006), από την άλλη οδηγεί ένα μέρος των πρωτεϊνών στα λυτικά χυμοτόπια (Tamura et al., 2003; Kleine-Vehn et al., 2008). Η Wort, από την άλλη πλευρά, είναι αναστολέας της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (phosphatidylinositol-3 kinase; PI-3 kinase), η αναστολή της επιδρά αρνητικά στον σχηματισμό του καλύμματος κλαθρίνης και οδηγεί σε διόγκωση των όψιμων ενδοσωμάτων αποτρέποντας τη σύντηξή τους με τα λυτικά χυμοτόπια, καθώς και σε μορφολογικές αλλαγές στο Trans-Golgi και σε μείωση της ενδοκύτωσης (Εικόνα 3.3.1).



Εικόνα 3.3.1. Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών της ενδοκύτωσης, της εξοκύτωσης/εκκρισης/ανακύκλωσης και της αποικοδόμησης. Στην συγκεκριμένη εικόνα αναπαρίσταται γραφικά τα σημεία τα οποία μπλοκάρουν οι φαρμακευτικές ενώσεις Κονκαναμυσίνη Α (ConcA) και η Γορτμανίνη (WM) (Irani & Russinova, 2009).

Στα πλαίσια της διαλεύκανσης του ρόλου των HSP90 στο μηχανισμό διακίνησης του BRI1 υποδοχέα, πραγματοποιήσαμε φαρμακολογικούς χειρισμούς, με ConcA και Wort. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη των προτύπων υποκυτταρικής κατανομής του BRI1 μετά από φαρμακευτική αναστολή της δράσης των HSP90 με χρήση GDA και των προτύπων που προέκυψαν μετά τους χειρισμούς με ConcA και Wort. Στα πλαίσια των αλλαγών αναλύθηκε η υποκυττάρια τοποθέτηση του BRI1, η παρουσία του BRI1

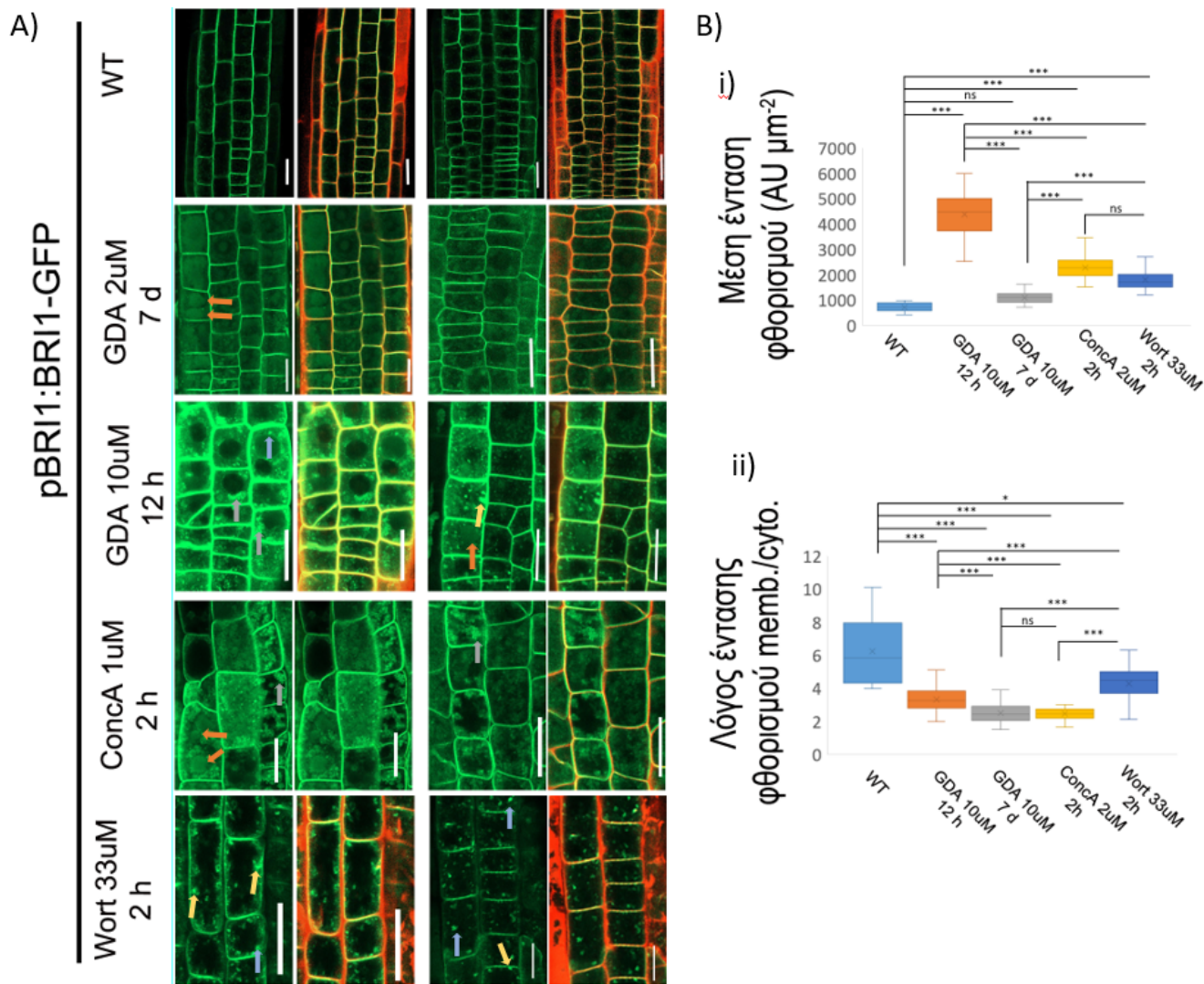
στην μεμβράνη, καθώς και στην διατήρηση του ισοζυγίου ισοζυγίου $BRI1-GFP_{[μεμβρανικό]}/ BRI1-GFP_{[ενδοκυττάριο]}$.

Για τον σκοπό αυτό, αναπτύχθηκαν φυτά *Arabidopsis thaliana*, οικοτύπου Col-0, στα οποία γινόταν έκφραση της κατασκευής $pBRI1::BRI1-GFP$, σε ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας (22 °C), για 6-7 ημέρες μετά την τη βλάστησή τους σε στερεό θρεπτικό μέσο MS. Ως συνθήκη ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο MS. Για την φαρμακολογική αναστολή μέσω βραχείας ή μακράς διάρκειας εφαρμογής του GDA, πραγματοποιήθηκαν οι ίδιοι χειρισμοί, όπως αυτοί περιγράφησαν παραπάνω. Για τους χειρισμούς που αφορούν την παρεμπόδιση της διακίνησης των μεμβρανικών πρωτεϊνών, πραγματοποιήσαμε, πριν την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, επώαση των φυτών σε υγρό θρεπτικό μέσο MS παρουσία ConcA (Τελική συγκέντρωση: 1 μ M) για 2 ώρες και παρουσία Wort (Τελική συγκέντρωση: 33 μ M) για 2 ώρες. Τόσο οι χειρισμοί με ConcA και Wort, όσο και οι χειρισμοί με το GDA σε φυτά αγρίου τύπου, οδήγησαν σε αυξημένο εντοπισμό του $BRI1-GFP$ στον ενδοκυττάριο σε σχέση με την συνθήκη ελέγχου (Εικόνα 3.3.1 A). Στην περίπτωση του χειρισμού με ConcA, παρατηρήσαμε εντοπισμό του $BRI1-GFP$ τόσο σε λυτικά χυμοτόπια, αλλά και σε δομές οι οποίες ομοιάζουν με κυστιδικά ενδοκυτταρικά συσσωματώματα, παρουσιάζοντας ομοιότητες με αντίστοιχες δομές οι οποίες παρατηρήθηκαν ύστερα από τον χειρισμό με GDA. Στην περίπτωση της Wort, παρατηρήσαμε φθορίζουσες δομές σε επαφή με την πλασματική μεμβράνη, δηλωτικές της διαταραχής της διαδικασίας της ενδοκύτωσης, αλλά και ενδοσωμικές δομές. Οι παρατηρούμενες δομές, παρουσιάστηκαν και στις περιπτώσεις χειρισμού με GDA.

Στο επίπεδο της ποσοτικοποίησης του $BRI1-GFP$ στην πλασματική μεμβράνη, η επώαση με την ConcA, αλλά και με την Wort, οδήγησαν σε στατιστικά σημαντική αύξηση του φθορισμού του $BRI1-GFP$, συγκριτικά με την συνθήκη ελέγχου (WT) (p -value_{ConcA}: 4,51E-08);(p -value_{Wort}: 9,42E-05). Κατά αναλογία, παρατηρήθηκε αυξημένος φθορισμός για το μεμβρανικό $BRI1-GFP$ στις περιπτώσεις χειρισμού με ConcA και Wort, συγκριτικά με την περίπτωση της μακράς διάρκειας εφαρμογής GDA(p -value_{ConcA}: 0.000001721);(p -value_{Wort}: 0.0007811), και μειωμένος φθορισμός συγκριτικά με τη βραχείας διάρκειας εφαρμογή GDA (p -value_{ConcA}: 0.0001484);(p -value_{Wort}: 6.73e-10)(Εικόνα 2.3.1 B i)).

Στο επίπεδο του ισοζυγίου $BRI1-GFP_{[μεμβρανικό]}/ BRI1-GFP_{[ενδοκυττάριο]}$, η επώαση με ConcA, αλλά και με Wort, οδήγησε σε μείωση του λόγου του φθορισμού του $BRI1-GFP$ που εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη προς το ενδοκυττάριο $BRI1-GFP$, σε σχέση με την συνθήκη ελέγχου (WT), (p -value_{ConcA}: 6,66E-13);(p -value_{Wort}: 0.01012), με τη μείωσή στη περίπτωση της Wort να εμφανίζεται ελαφρώς ασθενέστερη σε σχέση με την ConcA. Επιπλέον, στην περίπτωση της βραχείας διάρκειας εφαρμογής του GDA παρατηρήθηκε μείωση του λόγου $BRI1-GFP_{[μεμβρανικό]}/ BRI1-GFP_{[ενδοκυττάριο]}$, κατά την επώαση με την ConcA (p -value_{ConcA}: 0.0002347), και αύξηση κατά την επώαση με Wort (p -value_{Wort}: 0.001948). Τέλος, στην περίπτωση της μακράς διάρκειας εφαρμογής του GDA, παρατηρήθηκε αύξηση του λόγου, κατά την επώαση με Wort (p -value_{Wort}: 5,56E-07), ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή, κατά την επώαση με ConcA (p -value_{ConcA}: 0.8439) (Εικόνα 3.3.1 B ii)). Το σύνολο των παραπάνω δεδομένων, υποδεικνύουν την πολυεπίπεδη δράση των HSP90, στην μηχανή ενδοκυτταρικής μεταφοράς των μεμβρανικών πρωτεϊνών,

καθώς πέρα από την ομοιότητα στην διατήρηση του ισοζυγίου BRI1-GFP_[μεμβρανικό]/ BRI1-GFP_[ενδοκυττάριο], μεταξύ της μακράς διάρκειας εφαρμογής GDA και της ConcA, και των αυξητικών τάσεων της παρουσίας του BRI1-GFP στην πλασματική μεμβράνη, παρατηρήθηκαν και φαινοτυπικές ομοιότητες στο επίπεδο της υποκυττάριας τοποθέτησης του BRI1-GFP, μεταξύ των φυτών όπου έγινε χειρισμός με ConcA ή Wort και των φυτών όπου έγινε χειρισμός με GDA.



Εικόνα 3.3.1 Εικόνες επιδερμικών κυττάρων την μεταβατικής ζώνης της ρίζας, μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού και μετρήσεις μέσης έντασης φθορισμού για το BRI1-GFP. A) Παρατήρηση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού στην περιοχή των επιδερμικών κυττάρων της ζώνης μετάβασης στην ρίζα σε σειρές όπου εκφράζεται η κατασκευή pBRI1::BRI1-GFP ύστερα από επώαση σε θρεπτικό μέσο MS στο οποίο έχει προστεθεί GDA: GDA-: ανάπτυξη για 6-7 ημέρες *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0 σε στερεοθρεπτικό μέσο MS, GDA 2uM 7d: Ανάπτυξη για 6-7 ημέρες *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0 σε στερεό θρεπτικό μέσο MS παρουσία GDA(Τελική συγκέντρωση 2uM),GDA 10uM 12h: Ανάπτυξη για 5 ημέρες του *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0 σε στερεοθρεπτικό μέσο MS, και επώαση των νεαρών φυτών σε συνολικό όγκο 2mL υγρού MS παρουσία GDA(Τελική συγκέντρωση 10uM), ConcA 1uM 2h: Ανάπτυξη για 6-7 ημέρες του *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0 σε στερεοθρεπτικό μέσο MS, και επώαση (2 ώρες) των νεαρών φυτών σε συνολικό όγκο 2mL υγρού MS παρουσία ConcA(Τελική συγκέντρωση 1uM), Wort 33uM 2h: Ανάπτυξη για 6-7 ημέρες του *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0 σε στερεοθρεπτικό μέσο MS, και επώαση (2 ώρες) των νεαρών φυτών σε συνολικό όγκο 2mL υγρού MS παρουσία Wort(Τελική συγκέντρωση 33uM). Για την χρώση των κυτταρικών τοιχωμάτων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Propidium iodide (PI) σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL B) i) Μετρήσεις φθορισμού του BRI-GFP στην μεμβράνη

των κυττάρων της μεταβατικής ζώνης: GDA-(n:27), GDA 2uM 7d (n:31), GDA 10uM 12h (n:47), ConcA 1uM 2h(n:29), Wort 33uM 2h (n:40), (p-value: 0) B) iii)Αναλογία φθορισμού του μεμβρανικό προς κυτταροπλασματικό BRI-GFP στην μεμβράνη των κυττάρων της μεταβατικής ζώνης GDA-(n:27), GDA 2uM 7d (n:31), GDA 10uM 12h (n:47) ConcA 1uM 2h(n:29), Wort 33uM 2h (n:40)(p-value) / n: ο αριθμός των ατόμων που καταμετρήθηκαν/κλίμακα λευκής μπάρας: 20um / n: ο αριθμός των ατόμων που καταμετρήθηκαν/κλίμακα λευκής μπάρας: 20um/GDA: geldanamycin/ Βέλη: (Κόκκινο: λυτικά χυμοτόπια),(Κίτρινο: Παρεμπόδιση ενδοκύττωσης),(Γκρι: κυστιδικά συσσωματώματα), (Γαλάζιο: Ενδοσωμικές δομές).

3.4 Οι κυτταροπλασματικές HSP90 αλληλοεπιδρούν άμεσα με την απομεθυλάση REF6.

Προηγούμενες αναφορές της δράσης των HSP90, στην ρύθμιση της έκφρασης των αποκρινόμενων στα βρασσινοστεροειδή γονιδίων, αφορούσαν στην φυσική σύνδεση των HSP90 με αρκετούς παράγοντες του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των βρασσινοστεροειδών: BRI1, BAK1, BIN2, BZR1/BES1. Παράλληλα έχουν δημοσιευθεί εργασίες στις οποίες ενσωματώνονται στην ρύθμιση της έκφρασης των αποκρινόμενων στα βρασσινοστεροειδή γονιδίων, οι απομεθυλάσεις REF6 και ELF6, με το καρβόξυ-τελικό άκρο του REF6 να αλληλοεπιδρά άμεσα με την BES1. Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα, επιδιώξαμε να εξετάσουμε το ενδεχόμενο της άμεσης αλληλοεπίδρασης κυτταροπλασματικών HSP90.1 και HSP90.3, με τα διαφορετικές με την καρβόξυ-ή/και την άμινοτελική επικράτεια του REF6.

Για τον σκοπό αυτό, εξετάσαμε την πιθανότητα αλληλοεπίδρασης μεταξύ των HSP90.1 και HSP90.3 μελών και του REF6 χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές πειραματικές μεθόδους, το τεστ των δύο υβριδίων (Yeast two hybrid-Y2H) και την μοριακής συμπλήρωσης φθορισμού (Bimolecular fluorescent complementation-BiFC) μετά από παροδική έκφραση σε φύλλα καπνού (*Nicotiana benthamiana*).

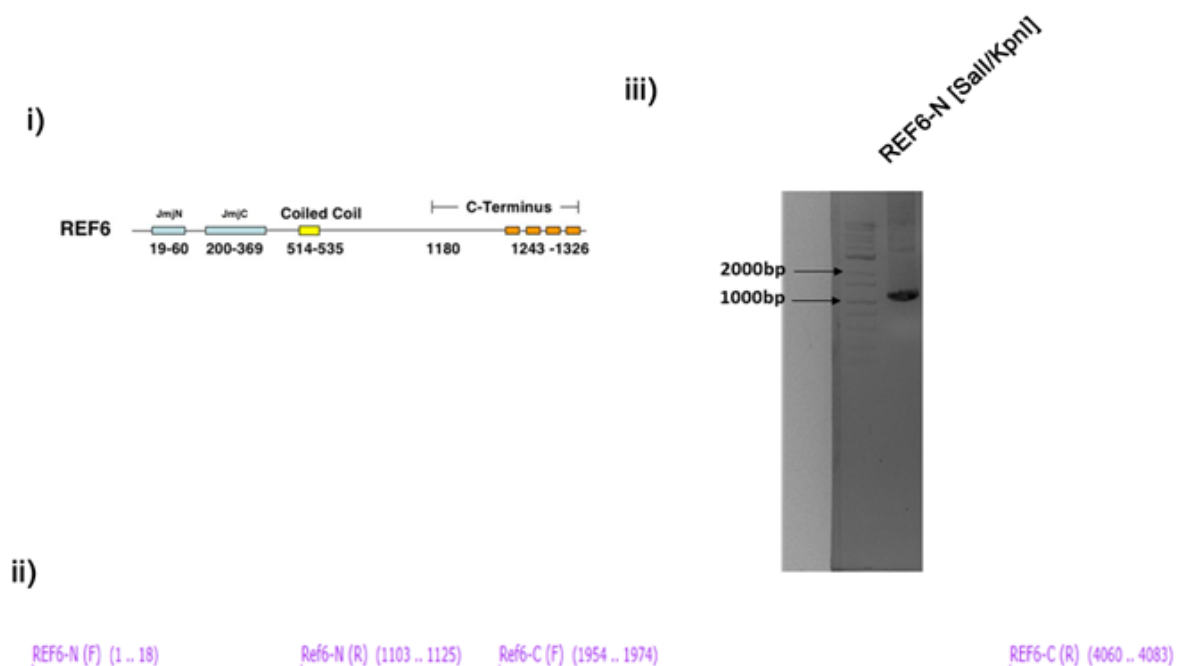
3.4.1 Κλωνοποίηση της άμινο-τελικής επικράτειας και της καρβόξυ-τελικής επικράτειας του REF6

Στο τεστ των δύο υβριδίων χρησιμοποιούνται δύο φορείς, ο φορέας pGBKT7, στον οποίο η προς εξέταση για αλληλοεπίδραση πρωτεΐνη συνδέεται με την επικράτεια πρόσδεσης του DNA του μεταγραφικού ενεργοποιητή GAL4, και ο φορέας pGADT7, στον οποίο η προς εξέταση για αλληλοεπίδραση πρωτεΐνη συνδέεται με την επικράτεια της ενεργοποίησης της μεταγραφής του GAL4. Η επιβεβαίωση της αλληλοεπίδρασης μεταξύ μίας πρωτεΐνης που εκφράζεται από τον pGBKT7 και μίας πρωτεΐνης που εκφράζεται από τον pGADT7, επιβεβαιώνεται από την διαφορεική ικανότητα ανάπτυξης κυττάρων ζύμης, στα οποία έχει γίνει διπλός μετασχηματισμός με τις δύο κατασκευές, σε επιλεκτικά θρεπτικά υλικά. Για το τεστ των δύο υβριδίων, διαθέταμε ήδη κλωνοποιημένες τις κυτταροπλασματικές HSP90.1 και HSP90.3, στον φορέα έκφρασης pGADT7, και την άμινο-τελική επικράτεια του REF6 στον φορέα έκφρασης pGBKT7. Για τον λόγο αυτό προχωρήσαμε στην κλωνοποίηση της καρβόξυ-τελικής επικράτειας του REF6 στον φορέα έκφρασης pGBKT7.

Στην μέθοδο της μοριακής συμπλήρωσης φθορισμού μετά από παροδική έκφραση σε φύλλα καπνού, χρησιμοποιούνται κατά αναλογία δύο φορείς, ο φορέας pSPYNE, στον οποίο η προς εξέταση για αλληλοεπίδραση πρωτεΐνη συνδέεται με την άμινο-τελική επικράτεια της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης

(Green Fluorescent Protein-GFP), και ο φορέας pSPYCE, στον οποίο η προς εξέταση για αλληλοεπίδραση πρωτεΐνη συνδέεται με την καρβόξυ-τελική περιοχή του GFP. Η ανίχνευση της αλληλοεπίδρασης βασίζεται στην παρουσία φθορισμού, ύστερα από ταυτόχρονη παροδική έκφραση σε φύλλα καπνού, των δύο κατασκευών στις οποίες έχουν κλωνοποιηθεί οι προς εξέταση για αλληλοεπίδραση πρωτεΐνες. Για το BiFC, διαθέταμε ήδη κλωνοποιημένες τις κυτταροπλασματικές HSP90.1 και HSP90.3 στον φορέα έκφρασης pSPYNE. Για τον λόγο αυτό προχωρήσαμε στην κλωνοποίηση της καρβόξυ- και της αμινο-τελικής επικράτειας του REF6, στον φορέα έκφρασης pSPYNE.

Ο διαχωρισμός της απομεθυλάσης REF6, σε αμινο- και καρβόξυ- περιοχές πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές (Yu et al., 2008). Η αμινο-τελική περιοχή περιλαμβάνει την ρυθμιστική JmjN επικράτεια και την JmjC επικράτεια, η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργότητα απομεθυλάσης του REF6 (Yu et al., 2008). Η καρβόξυ-τελική περιοχή περιλαμβάνει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localisation Signal /NLS), και τις zinc finger επικράτειες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση του REF6 στις αλληλουχίες στόχους (Yu et al., 2008; Εικόνα 3.4.1 i) & ii)). Για την αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδρασης (Polymerase Chain Reaction-PCR) για την αμινο-τελική περιοχή, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές REF6-N(Forward)[SalI] (Tm=65°C) και REF6-N(reverse-R)[KpnI] (Tm=65°C) (Εικόνα 3.4.1 ii)), ενώ ως DNA μήτρα χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή

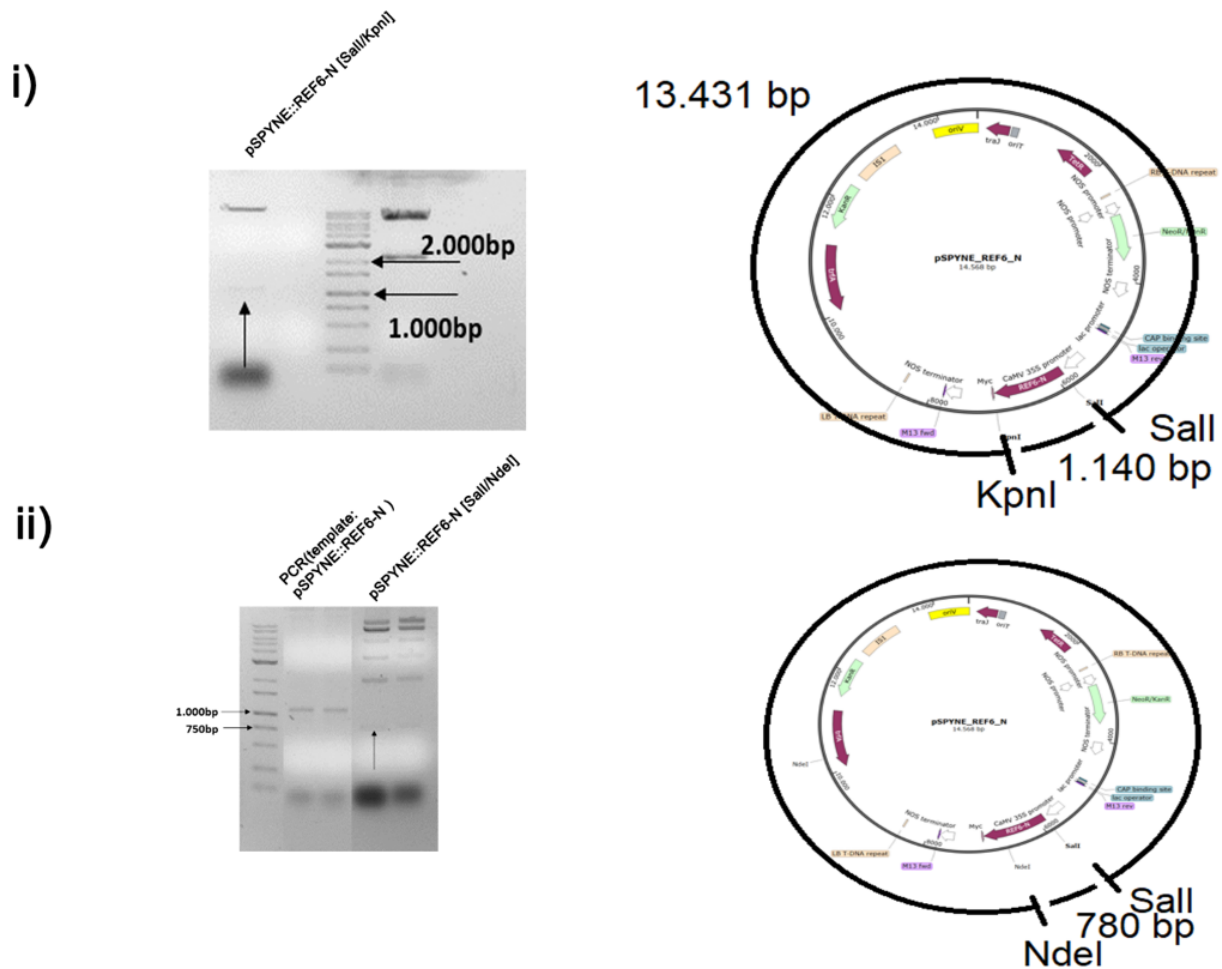


Εικόνα 3.4.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το N-τελικό άκρο της απομεθυλάσης των ιστονών REF6, χρησιμοποιώντας ως DNA μήτρα την πλασμιδιακή κατασκευή pGBKT::REF6. i) Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης REF6. Οι λειτουργικές επικράτειες προβλέφθηκαν χρησιμοποιώντας την εφαρμογή SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), ii) Το CDS του γονιδίου REF6, στο οποίο παρουσιάζονται γραφικά τα σημεία αγκυροβόλησης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, καθώς και οι διατηρημένες επικράτειες, όπως αυτές δίδονται από την UniProt, iii) Ανάλυση σε πηκτή Αγαρόζης 1% (Δείκτης μοριακών βαρών 1kb Opti-DNA Marker), των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για το N-τελικό άκρο του REF6. Η εικόνα αντιστοιχεί στο τμήμα DNA, όπου για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές: REF6-N-Forward [SalI], που φέρει την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιοριστικής κοπής SalI/ REF6-N-Reverse[KpnI] που φέρει την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιοριστικής κοπής KpnI (Αναμενόμενο μέγεθος 1.140 ζ.β.) .

pGBKT7::REF6. Το προϊόν της PCR αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%, όπου και εξακριβώθηκε η ύπαρξη του προϊόντος στο επιθυμητό μέγεθος, 1.140 ζ.β. (Εικόνα 3.4.1 iii)).

Στην συνέχεια προχωρήσαμε στην περιοριστική πέψη του φορέα pSPYNE αλλά και του προϊόντος της PCR, με τα ένζυμα περιορισμού KpnI και Sall, και στην επώαση των προϊόντων της περιοριστικής κοπής παρουσία T4 λιγάσης, προς σχηματισμό της κατασκευής pSPYNE::REF6-N. Για να ελέγξουμε ότι ο φορέας pSPYNE, έχει λάβει το επιθυμητό ένθεμα REF6-N, πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη με την χρήση των περιοριστικών ενζύμων KpnI και Sall, και το προϊόν της περιοριστικής πέψης αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1%. Το πρότυπο των τμημάτων DNA ήταν και το επιθυμητό, μία ζώνη στο μέγεθος των 13.431 ζ.β. και μία ζώνη στο μέγεθος των 1.140 ζ.β.(Εικόνα 3.4.2 i)).

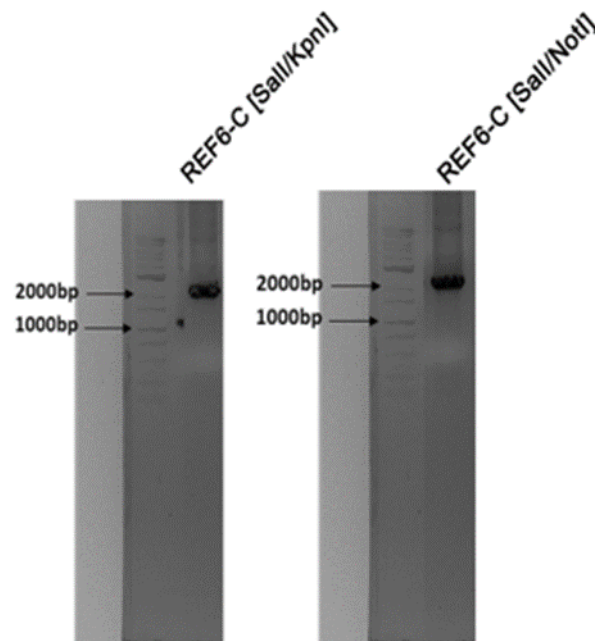
Κατά την διαγνωστική πέψη της κατασκευής pSPYNE::REF6-N, όπου πραγματοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της ορθότητας του ενθέματος αλλά και της κατεύθυνσης με την οποία έχει εντεθεί στον φορέα, χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού Sall και NdeI, και το προϊόν της περιοριστικής πέψης αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1%, όπου και παρατηρήθηκε και η επιθυμητή σε μέγεθος ζώνη των 780 ζ.β. (Εικόνα 3.4.2 ii)).



Εικόνα 2.4.2. Διαγνωστικές πέψεις και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον έλεγχο της κατασκευής pSPYNE::REF6-N. a) Διαγνωστικές πέψεις για την κατασκευή pSPYNE::REF6-N: i) Ανάλυση σε πηκτή Αγαρόζη 1% (Δείκτης μοριακών βαρών 1kb Opti-DNA Marker) των προϊόντων ύστερα από πέψη, του pSPYNE::REF6-N, με τα ένζυμα περιορισμού [SalI/KpnI] (Αναμενόμενα μεγέθη τμημάτων DNA: 13.447 bp, 1.140 bp- Συνολικό μέγεθος κατασκευής: 14.568 bp), ii) Ανάλυση σε πηκτή Αγαρόζη 1% (Δείκτης μοριακών βαρών 1kb Opti-DNA Marker) των προϊόντων ύστερα από πέψη, του pSPYNE::REF6-N, με τα ένζυμα περιορισμού [SalI/NdeI] (Αναμενόμενα μεγέθη τμημάτων DNA: 780 bp), και των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με την χρήση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του SYD-N, χρησιμοποιώντας ως DNA μήτρα την κατασκευή pSPYNE::REF6-N (Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος της PCR: 1.140 bp).

Για την PCR για την καρβόξυ-τελική περιοχή, δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών: α) REF6-C(Forward)[SalI] ($T_m=51,09^{\circ}\text{C}$) και REF6-C(reverse-R)[KpnI] ($T_m=52,96^{\circ}\text{C}$), και β) οι εκκινητές REF6-C(Forward)[SalI] ($T_m=51,09^{\circ}\text{C}$) και REF6-C(reverse-R)[NotI] ($T_m=55,43^{\circ}\text{C}$) (Εικόνα 3.4.1 ii)), ενώ ως DNA μήτρα χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή pGBKT7::REF6. Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%, όπου και εξακριβώθηκε η ύπαρξη του προϊόντος στο επιθυμητό μέγεθος, 2.150 ζ.β. (Εικόνα 3.4.3).

Για την κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR με το πρώτο ζεύγος εκκινητών, REF6-C[SalI/KpnI], στον pSPYNE, προχωρήσαμε στην περιοριστική πέψη με τα ένζυμα περιορισμού SalI και KpnI, τόσο του pSPYNE όσο και του προϊόντος της PCR. Τα προϊόντα των περιοριστικών πέψεων, επώαστηκαν παρουσία T4 λιγάσης για την δημιουργία της κατασκευής pSPYNE::REF6-C.

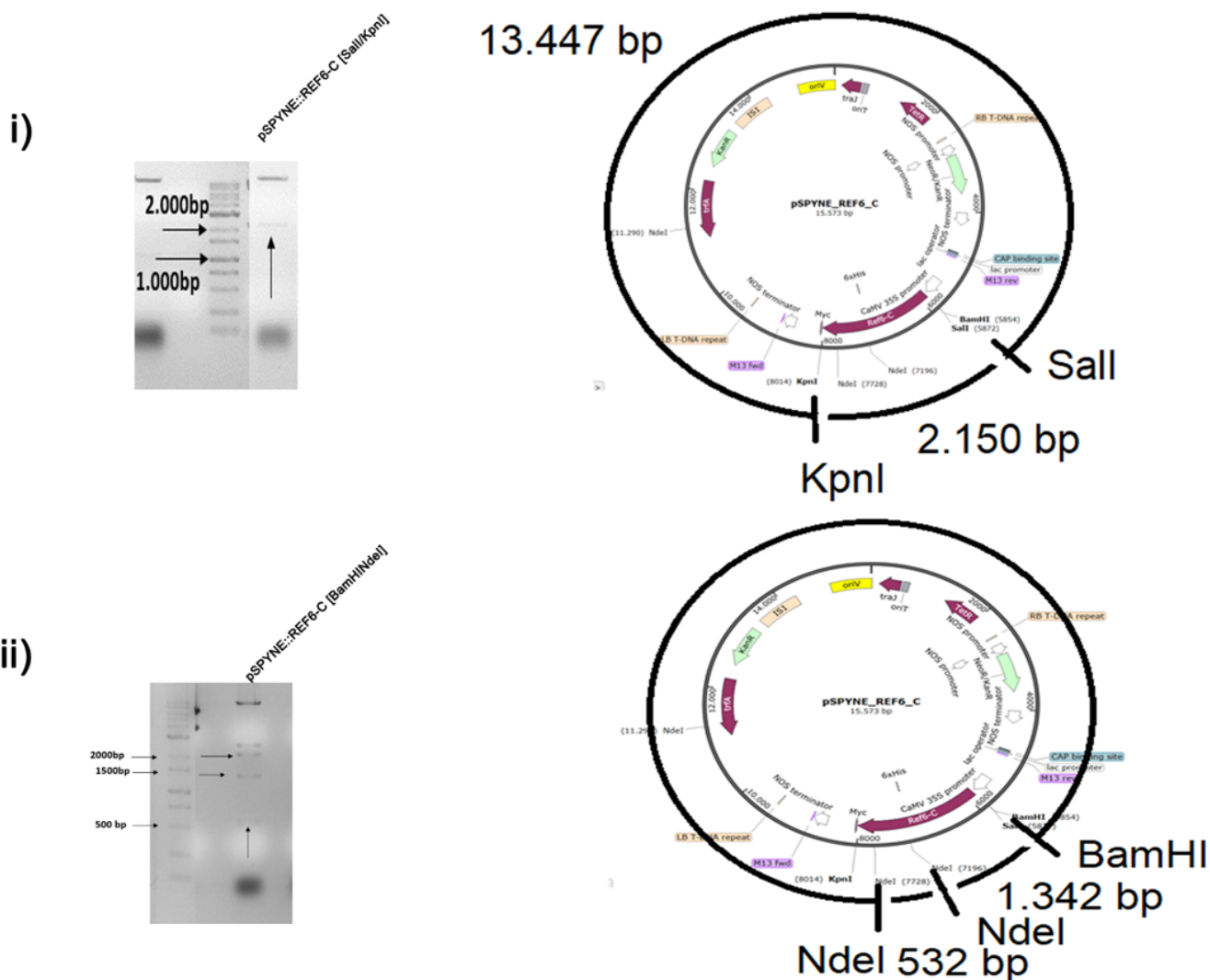


Εικόνα 2.4.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το C-τελικό άκρο της απομεθυλάσης των ιστονών REF6, χρησιμοποιώντας ως DNA μήτρα την πλασμιδιακή κατασκευή pGBKT::REF6: Ανάλυση σε πηκτή Αγαρόζης 1% (Δείκτης μοριακών βαρών 1kb Opti-DNA Marker), των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για το C-τελικό άκρο του REF6. Η αριστερή εικόνα αντιστοιχεί στο τμήμα DNA, όπου για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές: REF6-C-Forward [SmaI], που φέρει την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιοριστικής κοπής SmaI/ REF6-C-Reverse[KpnI] που φέρει την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιοριστικής κοπής KpnI. Στην δεξιά εικόνα αντιστοιχεί το τμήμα DNA, όπου για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές : REF6-C-Foward[SalI] και REF6-C-Reverse[NotI], που φέρουν θέσεις που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιοριστικής κοπής SalI και NotI, αντίστοιχα. Τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων της PCR είναι 2.150 bp.

Στην συνέχεια προχωρήσαμε σε διαγνωστικές πέψεις ένζυμα περιορισμού SalI και KpnI για την κατασκευή pSPYNE::REF6-C, για να εξακριβώσουμε ότι ο φορέας έκφρασης έχει λάβει το επιθυμητό ένθετο, . Το προϊόν

της πέψης περιορισμού αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1%, και παρατηρήθηκε το αναμενόμενο πρότυπο, μία ζώνη στο μέγεθος των 13.447 ζ.β. και μία ζώνη στο μέγεθος των 2.150 ζ.β. (Εικόνα 3.4.4 i)).

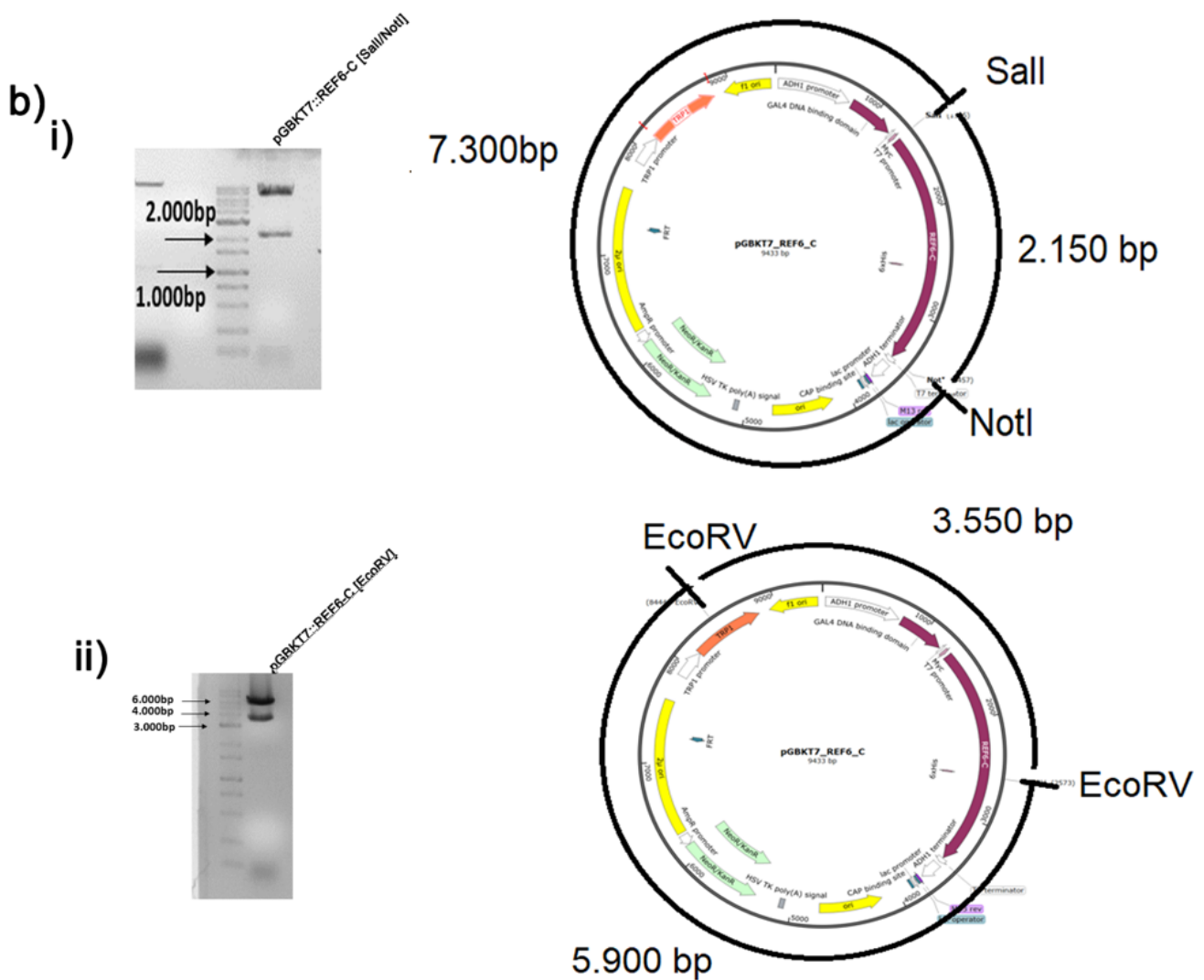
Κατά την δεύτερη διαγνωστική πέψη της κατασκευής pSPYNE::REF6-C, όπου πραγματοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της ορθότητας του ενθέτου, αλλά και της κατεύθυνσης με την οποία έχει εισέλθει στον φορέα, χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού BamHI και NdeI. Το προϊόν της περιοριστικής πέψης αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% , όπου και παρατηρήθηκαν και οι αναμενόμενες ζώνες DNA, μία στο μέγεθος των 1.342 ζ.β., και μία στο μέγεθος των 532 ζ.β.(Εικόνα 3.4.4 ii)).



Εικόνα 3.4.4. Διαγνωστικές πέψεις της κατασκευής pSPYNE::REF6-C:i) Ανάλυση σε πηκτή Αγαρόζης 1% (Δείκτης μοριακών βαρών 1kb Opti-DNA Marker) των προϊόντων ύστερα από πέψη, του pSPYNE::REF6-C, με τα ένζυμα περιορισμού [SalI/KpnI] (Αναμενόμενα μεγέθη τμημάτων DNA: 13.447 bp, 2.150 bp- Συνολικό μέγεθος κατασκευής: 15.573 bp), ii) Ανάλυση σε πηκτή Αγαρόζης 1% (Δείκτης μοριακών βαρών 1kb Opti-DNA Marker) των προϊόντων ύστερα από πέψη, του pSPYNE::REF6-C, με τα ένζυμα περιορισμού [BamHI/NdeI] (Αναμενόμενα μεγέθη τμημάτων DNA: 1.342 bp, 532 bp).

Για την κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR με το δεύτερο ζεύγος εκκινήτων, REF6-C[SalI/NotI], (Εικόνα 2.4.3) στον φορέα έκφρασης pGBKT7, προχωρήσαμε στην περιοριστική πέψη με τα ένζυμα περιορισμού SalI και NotI, του pGBKT7 και του προϊόντος της PCR. Τα προϊόντα των περιοριστικών πέψεων, επώαστηκαν παρουσία T4 για την δημιουργία της κατασκευής pGBKT7::REF6-C.

Προκειμένου να εξακριβώσουμε ότι ο φορέας έκφρασης έχει λάβει το επιθυμητό ένθετο, πραγματοποιήσαμε αντίδραση περιορισμού της κατασκευής pGBKT7::REF6-C με τα ένζυμα SalI και NotI . Το προϊόν της περιοριστικής πέψης αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1%, όπου και παρατηρήθηκε το αναμενόμενο πρότυπο τμημάτων DNA, μία ζώνη στο μέγεθος 7.300 ζ.β. και μία ζώνη στο μέγεθος των 2.150 ζ.β (Εικόνα 3.4.5 i)). Κατά την δεύτερη διαγνωστική πέψη ελέγχου της κατασκευής pGBKT7::REF6-C, όπου πραγματοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της ορθότητας του ενθέτου και της κατεύθυνσης με την οποία έχει εισέλθει στον φορέα, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού EcoRV. Το προϊόν της περιοριστικής πέψης αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1%, όπου και παρατηρήθηκε το αναμενόμενο πρότυπο θραυσμάτων DNA, μία ζώνη στο μέγεθος των 5.900 ζ.β. και μία ζώνη στο μέγεθος των 3.550 ζ.β (Εικόνα 3.4.5 ii)).



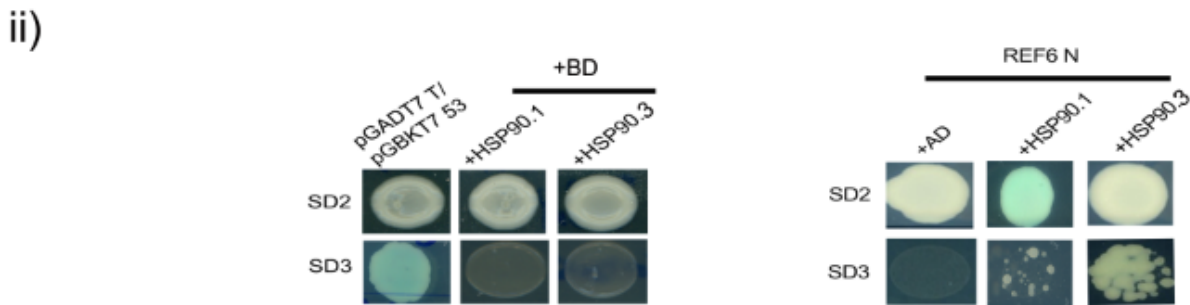
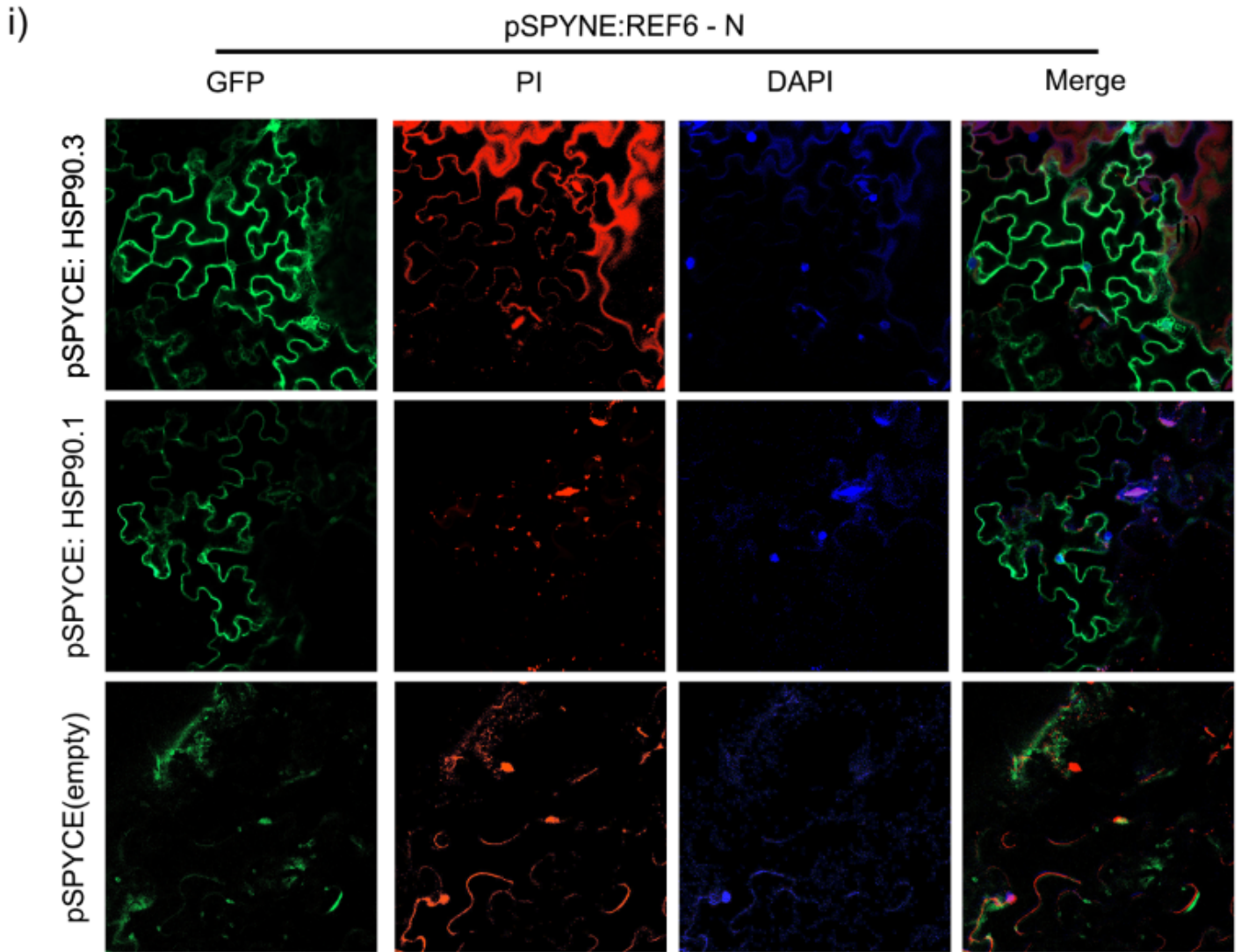
Εικόνα 3.4.5. Διαγνωστικές πέψεις της κατασκευής pGBKT7::REF6-C: i) Ανάλυση σε πηκτή Αγαρόζης 1% (Δείκτης μοριακών Βαρών 1kb Optic-DNA Marker) των προϊόντων ύστερα από την πέψη, του pGBKT7::REF6-C, με τα ένζυμα περιορισμού [SalI/NotI] (Αναμενόμενα μεγέθη: 7.304 bp, 2.150 bp- Συνολικό μέγεθος κατασκευής: 9.433 bp), ii) Ανάλυση σε πηκτή Αγαρόζης 1% (Δείκτης μοριακών Βαρών 1kb Optic-DNA Marker) των προϊόντων ύστερα από την πέψη, του pGBKT7::REF6-C, με τα ένζυμο περιορισμού [EcoRV] (Αναμενόμενα μεγέθη: 5.900 bp, 3.550 bp- Συνολικό μέγεθος κατασκευής: 9.433 bp)

3.4.2 Πειραματικός έλεγχος της αλληλοεπίδρασης του REF6 με τις κυτταροπλασματικές HSP90.1 και HSP90.3

Η δυνατότητα της αλληλοεπίδρασης της άμινο- και καρβόξυ- τελικών περιοχών του REF6 με τις κυτταροπλασματικές HSP90.1 και HSP90.3, ελέγχθηκε με δύο μεθοδολογίες: α) Τεστ των δύο υβριδίων (Yeast-two-hybrid/Y2H), και β) Μέθοδος φθορισμού μέσω μοριακής συμπλήρωσης (Bimolecular Fluorescence Complementation/ BiFC).

Για τον έλεγχο της αλληλοεπίδρασης μέσω BiFC, με την άμινο-τελική περιοχή του REF6, χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή pSPYNE::REF6-N, για να μετασχηματίσουμε το στέλεχος GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*. Αγροβακτήρια που είχαν μετασχηματιστεί για μία από τις κατασκευές pSPYNE::REF6-N, pSPYCE::HSP90.1, pSPYCE::HSP90.3 και pSPYCE (empty) χρησιμοποιήθηκαν συνδυαστικά για τον ταυτόχρονο μετασχηματισμό κυττάρων φύλλου καπνού (*Nicotiana benthamiana*) έξι εβδομάδων, με την μέθοδο του αγροεμποτισμού. Οι μολύνσεις έγιναν με τους εξής συνδυασμούς: pSPYNE::REF6-N x pSPYCE::HSP90.1, pSPYNE::REF6-N x pSPYCE::HSP90.3, pSPYNE::REF6-N x pSPYCE (empty). Ο έλεγχος της αλληλοεπίδρασης, μεταξύ των παροδικά συν-εκφραζόμενων πρωτεϊνών, παρατηρήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού, 38-40 ώρες μετά την εκτέλεση του αγρο-εμποτισμού. Η ύπαρξη φθορισμού με κυτταρικό, αλλά και πυρηνικό εντοπισμό, είναι δηλωτική της δυνατότητας των HSP90.1 και HSP90.3 να αλληλοεπιδρούν με την άμινο-τελική περιοχή του REF6 (Εικόνα 3.4.6 i)). Παράλληλα μπορούμε να παρατηρήσουμε διαφορά ως προς την ένταση του φθορισμού ανάμεσα στις διαφορετικές υπό εξέταση αλληλοεπιδράσεις, με τον φθορισμό της αλληλοεπίδρασης της HSP90.3 με την REF6-N να είναι εμφανώς εντονότερος, υποδηλώνοντας την λειτουργική διαφοροποίηση των κυτταροπλασματικών HSP90 λόγω της διαφορετικής συγγένειας τους με τον με την άμινο-τελική περιοχή του REF6-N (Εικόνα 3.4.6 i)).

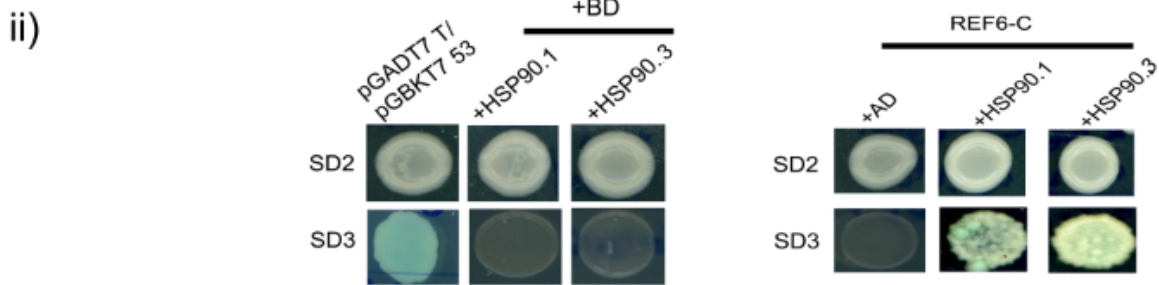
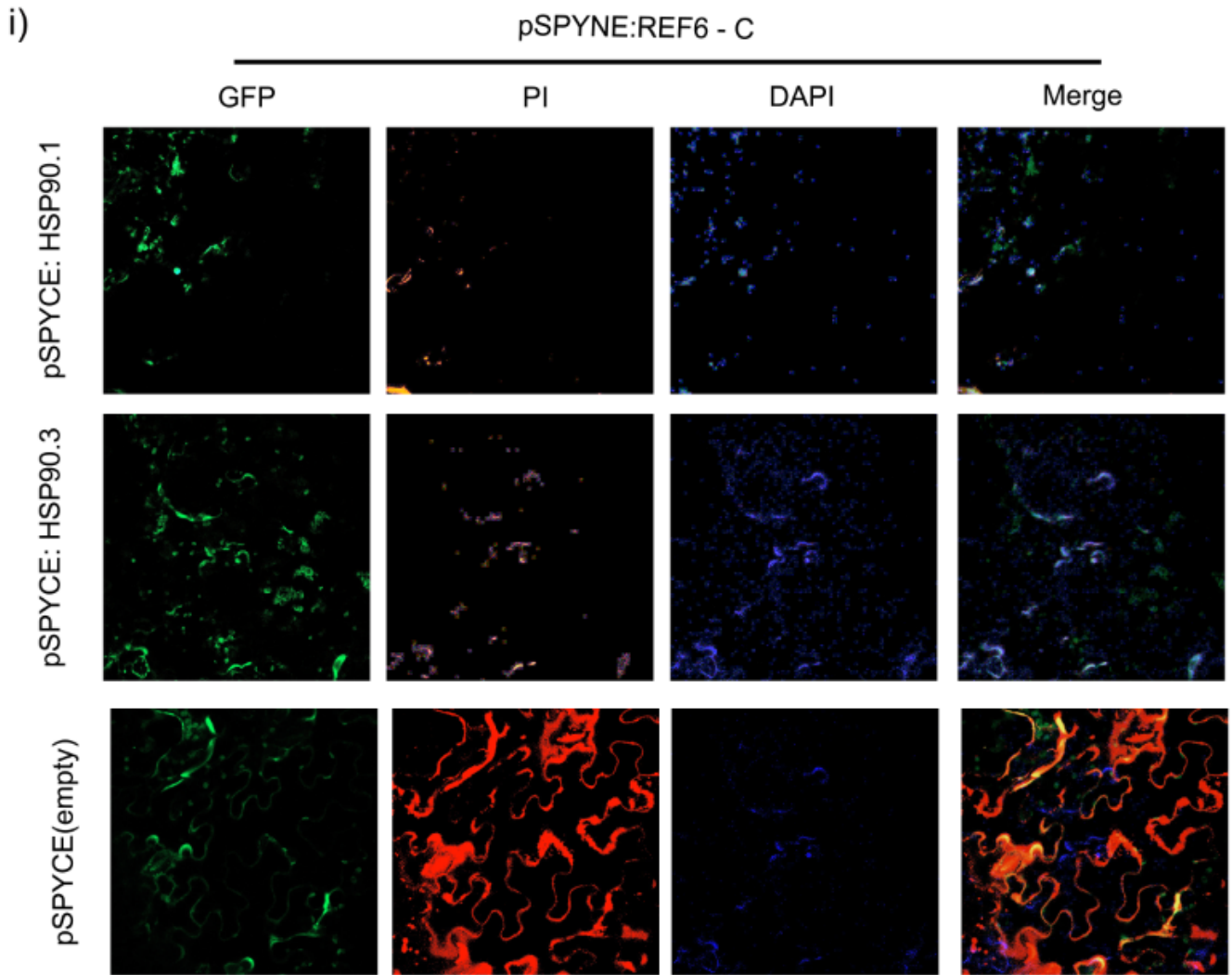
Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα που του εργαστηρίου, όπου εξετάστηκε η αλληλοεπίδραση των HSP90 με την άμινο-τελική επικράτεια του REF6, με το τεστ των δύο υβριδίων. Συνοπτικά, για το τεστ των δύο υβριδίων, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος μετασχηματισμός του στελέχους Y2HGOLD του *Saccharomyces cerevisiae*, με τους εξής συνδυασμούς κατασκευών: pGBKT7::REF6-N//pGADT7::HSP90.1 ή pGADT7::HSP90.3 ή pGADT7 (empty), pGBKT7::53//pGADT7::T (Θετικό control), pGBKT7 (empty)//pGADT7:: HSP90.1 ή pGADT7::HSP90.3. Η αξιολόγηση της αλληλοεπίδρασης πραγματοποιήθηκε μέσω της διαφορετικής ικανότητας που εμφανίζουν τα αυξοτροφικά στελέχη Y2HGOLD, που φέρουν τις κατασκευές pGBKT7 και pGADT7, να αναπτύσσονται στο επιλεκτικό θρεπτικό μέσο SD3 (SD/-Trp/-Leu/-His) και από την ικανότητα τους να διασπούν το X-a-gal, με αποτέλεσμα την μπλε χρώση των αποικιών. Στην περίπτωση που οι υπό εξέταση παράγοντες αλληλοεπιδρούν οδηγούν σε αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων μαρτύρων HIS3 (συμπλήρωση της αυξοτροφίας στο επίπεδο της βιοσύνθεσης της ιστιδίνης) και MEL1 (κωδικοποιεί για την α-γαλακτοσιδάση). Όπως μπορούμε να δούμε στην Εικόνα 2.4.6 ii), το REF6-N φαίνεται να αλληλοεπιδρά τόσο με τις HSP90.1, όσο και με την HSP90.3, με την οποία φαίνεται να αλληλοεπιδρά πιο ισχυρά.



Εικόνα 3.4.6. Έλεγχος αλληλοεπίδρασης των κυτταροπλασματικών HSP90.1 και HSP90.3 με την άμινο-τελική περιοχή της απομεθυλάσης των ιστονών REF6: i) Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού από φύλλα καπνού (*N. benthamiana*) 6 εβδομάδων, στα οποία πραγματοποιήθηκε αγροεμποτισμός/ταυτόχρονος παροδικός μετασχηματισμός των κυττάρων των φύλλων με την ταυτόχρονη επιμόλυνση των φύλλων από καλλιέργειες του αγροβακτηρίου *A. tumefaciens*, όπου έφεραν τις κατασκευές pSPYNE:: REF6-N, και καλλιέργειες *A. tumefaciense*, οι οποίες έφεραν μία από τις κατασκευές pSPYCE::HSP90.1, pSPYCE::HSP90.3, pSPYCE (empty). Η λήψη των εικόνων πραγματοποιήθηκε 38 ώρες μετά τον αγροεμποτισμό. Για την χρώση των κυτταρικών τοιχωμάτων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Propidium iodide (PI) σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL, ενώ για την χρώση των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική DAPI σε τελική συγκέντρωση 0,1 μg/mL. ii) Εικόνες αποικιών κυττάρων ζύμης (*Saccharomyces cerevisiae*), του εμπορικού αυξοτροφικού στελέχους Y2HGOLD, στα οποία πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος μετασχηματισμός για την κατασκευή pGBKT7::REF6-N και μία από τις κατασκευές pGADT7::HSP90.1, pGADT7::HSP90.3, pGADT7 (empty). Η αξιολόγηση της αλληλοεπίδρασης πραγματοποιείται μέσω της διαφορικής ικανότητας ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων σε επιλεκτικό θρεπτικό μέσο (SD3) αλλά και της ικανότητα διάσπασης του χρωμογόνου υποστρώματος X-alpha-Gal (X-a-Gal). +BD: pGBKT7 (empty), +AD: pGADT7(empty), SD2: SD/-Trp/-Leu, SD3: SD/-Trp/-Leu/-His X-a-gal

Με παρόμοιο τρόπο πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της αλληλοεπίδρασης των κυτταροπλασματικών HSP90 με την καρβόξυ-τελική περιοχή του REF6, μέσω του Y2H και του BiFC. Για το Y2H, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος μετασχηματισμός του Y2HGOLD, με τους εξής συνδυασμούς πλασμιδιακών κατασκευών: pGBKT7::REF6-C//pGADT7::HSP90.1 ή pGADT7::HSP90.3 ή pGADT7 (empty), pGBKT7::53//pGADT7::T (Θετικό control), pGBKT7 (empty)//pGADT7:: HSP90.1 ή pGADT7::HSP90.3. Μετά τον μετασχηματισμό, τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο SD2 (SD/-Trp/-Leu) και αναπτύχθηκαν για 5 ημέρες στους 30°C, για την επιλογή των κυττάρων που έχουν προσλάβει τους φορείς pGBKT7 και pGADT7, οι οποίοι φέρουν γονίδια όπου συμπληρώνουν τις αυξοτροφίες του στελέχους Y2HGOLD, για την βιοσύνθεση της τρυπτοφάνης και της λευκίνης. Επαναδιαλυσαμε τις θετικές αποικίες που αντιστοιχούσαν σε έναν από τους προαναφερθέντες συνδυασμούς κατασκευών σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό (5μL) και στη συνέχεια τις αναπτύξαμε επιστρώθηκαν σε SD2 και SD3+X-a-gal επιλεκτικά θρεπτικά μέσα για 7 ημέρες στους 30°C. Κατόπιν ο έλεγχος της αλληλοεπίδρασης πραγματοποιήθηκε μέσω της διαφορικής ικανότητας ανάπτυξης στο επιλεκτικό μέσο SD3 αλλά και μέσω της ικανότητας διάσπασης της χρωμογόνου ουσίας X-a-gal. Όπως μπορούμε να δούμε στην Εικόνα 3.4.7 i), το REF6-C φαίνεται να αλληλοεπιδρά τόσο με τις HSP90.1 όσο και με τις HSP90.3, καθώς τα αντίστοιχα διπλά μετασχηματισμένα στελέχη εμφανίζουν μπλε χρώση αλλά και έντονη ανάπτυξη στο επιλεκτικό θρεπτικό μέσο SD3.

Για τον έλεγχο της αλληλοεπίδρασης μέσω BiFC, με την άμινο-τελική περιοχή του REF6, χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή pSPYNE::REF6-N, για να μετασχηματίσουμε το στέλεχος GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*. Αγροβακτήρια που είχαν μετασχηματιστεί για μία από τις κατασκευές pSPYNE::REF6-C, pSPYCE::HSP90.1, pSPYCE::HSP90.3 και pSPYCE (empty) χρησιμοποιήθηκαν συνδυαστικά για τον ταυτόχρονο μετασχηματισμό κυττάρων φύλλου καπνού (*Nicotiana benthamiana*) έξι εβδομάδων, με την μέθοδο του αγροεμποτισμού. Οι μολύνσεις έγιναν με τους εξής συνδυασμούς: pSPYNE::REF6-C x pSPYCE::HSP90.1, pSPYNE::REF6-C x pSPYCE::HSP90.3, pSPYNE::REF6-N x pSPYCE (empty). Ο έλεγχος της αλληλοεπίδρασης, μεταξύ των παροδικά συν-εκφραζόμενων πρωτεϊνών, παρατηρήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού, 38-40 ώρες μετά την εκτέλεση του αγροεμποτισμού. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στην Εικόνα 3.4.7 i), το θετικό αποτέλεσμα της αλληλοεπίδρασης των HSP90 με την καρβόξυ-τελική περιοχή του REF6, στο τεστ των δύο υβριδίων, δεν επιβεβαιώθηκε από την μέθοδο του φθορισμού μέσω μοριακής συμπλήρωσης.



Εικόνα 3.4.7. Έλεγχος αλληλοεπίδρασης των κυτταροπλασματικών HSP90.1 και HSP90.3 με την καρβόξυ-τελική περιοχή της απομεθυλάσης των ιστονών REF6: i) Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού από φύλλα καπνού (*N. benthamiana*) 6 εβδομάδων, στα οποία πραγματοποιήθηκε αγροεμποτισμός/ταυτόχρονος παροδικός μετασχηματισμός των κυττάρων των φύλλων με την ταυτόχρονη επιμόλυνση των φύλλων από καλλιέργειες του αγροβακτηρίου *A. tumefaciens*, όπου έφεραν τις κατασκευές pSPYNE:: REF6-, και καλλιέργειες *A.tumefaciense*, οι οποίες έφεραν μία από τις κατασκευές pSPYCE::HSP90.1,pSPYCE::HSP90.3,pSPYCE (empty). Η λήψη των εικόνων πραγματοποιήθηκε 38 ώρες μετά τον αγροεμποτισμό. Για την χρώση των κυτταρικών τοιχωμάτων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Propidium iodide (PI) σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL, ενώ για την χρώση των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική DAPI σε τελική συγκέντρωση 0,1 μg/mL.ii) Εικόνες αποικιών κυττάρων ζύμης (*Saccharomyces cerevisiae*), του εμπορικού αυξοτροφικού στελέχους Y2HGOLD, στα οποία πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος μετασχηματισμός για την κατασκευή pGBKT7::REF6-N και μία από τις κατασκευές pGADT7::HSP90.1, pGADT7::HSP90.3, pGADT7 (empty). Η αξιολόγηση της αλληλοεπίδρασης πραγματοποιείται μέσω της διαφορικής ικανότητας ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων σε επιλεκτικό θρεπτικό μέσο (SD3) αλλά και της ικανότητα διάσπασης του χρωμογόνου υποστρώματος X-alpha-Gal (X-a-Gal). +BD: pGBKT7 (empty), +AD: pGADT7(empty), SD2: SD/-Trp/-Leu, SD3: SD/-Trp/-Leu/-His X-a-gal

3. Συζήτηση

Το σηματοδοτικό μονοπάτι των βρασσινοστεροειδών διαδραματίζει ενεργητικό ρόλο σε μία πλειάδα αναπτυξιακών διεργασιών, όπως είναι η ανάπτυξη των σπερμάτων, ο χρόνος άνθησης, η ανάπτυξη της γύρης, η διαφοροποίηση του ξηλώματος, η γήρανση, η ανάπτυξη των στομάτων, της ρίζας, ενώ παράλληλα ρυθμίζει ένα μεγάλο εύρος φυσιολογικών αποκρίσεων έναντι διαφορετικών περιβαλλοντικών σημάτων, όπως και τις αποκρίσεις παρουσία βιοτικού και αβιοτικού στρες (Mandava, 1988); (Nolan et al., 2020); (Manghwar et al., 2022). Παρά την συνολική πρόοδο που έχει σημειωθεί, δεν υπάρχει σαφής εικόνα για τον τρόπο με τον οποίο τα βρασσινοστεροειδή ελέγχουν την μεταγραφική ικανότητα ενός τεράστιου εύρους γονιδίων, το χρόνο στον οποίο ενεργοποιούνται ή καταστέλλονται αυτά τα γονίδια σε επίπεδο ιστού για να ελέγξουν την εξαρτώμενη από τα βρασσινοστεροειδή αύξηση, ανάπτυξη καθώς και την απόκριση στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Επιπλέον από τα υπάρχοντα δεδομένα καθίσταται σαφές ότι το μονοπάτι των βρασσινοστεροειδών δεν λειτουργεί κατά τρόπο γραμμικό και απομονωμένο από τα υπόλοιπα μονοπάτια, αλλά επικοινωνεί με διαφορετικά ορμονικά και εν γένει σηματοδοτικά μονοπάτια (Nolan T et al., 2017).

Από την άλλη πλευρά οι HSP90 μοριακοί συνοδοί, όντας μέρος του συστήματος ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών φαίνεται να διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε πολλαπλές πτυχές της αναπτυξιακής και κυτταρικής σηματοδότησης διαφόρων οργανισμών (van Oosten-Hawle P, 2023). Το μεγάλο εύρος των συν-σαπερονών των HSP90, η εξειδίκευση που αυτές εμφανίζουν ως προς τις πρωτεΐνες πελάτες, και η εμπλοκή των τελευταίων στα διάφορα αναπτυξιακά και κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια στο φυτό *A.thaliana*, υποδεικνύει τον ρόλο των HSP90, ως έναν κεντρικό παράγοντα της καναλοποίησης της ανάπτυξης. Οι HSP90 τελικά συμμετέχουν στη διαμόρφωση του στερεοτυπικού προτύπου ανάπτυξης του *A.thaliana*, ενάντια στην ποικιλομορφία όπου μπορεί να εισάγεται ως αποτέλεσμα της στοχαστικότητας των περιβαλλοντικών συνθηκών και των κυτταρικών διεργασιών (Tichá et al., 2020). Η πολυεπίπεδη δράση των HSP90 στα διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια καταδεικνύεται με ευκρίνεια, στο μονοπάτι των Βρασσινοστεροειδών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν : α) ο έλεγχος των επιπέδων των μονομερών του ετεροδιμερούς υποδοχέα των βρασσινοστεροειδών BRI1/BAK1 στην πλασματική μεμβράνη, και της κατανομής που εμφανίζουν οι τελευταίοι στις μικροεπικράτειες της πλασματικής μεμβράνης (Samakovli et al., 2022), β) η ρύθμιση της νουκλεο/πλασματικής ισοροπίας της και κατ' επεκταση της λειτουργίας της κινάσης BIN2 (Samakovli et al., 2014;Zhang et al., 2022), γ) η άμεση αλληλοεπίδραση των HSP90 με τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες των αποκρινόμενων στα βρασσινοστεροειδή γονιδίων BES1/BZR1 (Shigeta et al., 2014;Shigeta et al., 2015;Samakovli et al., 2019).

3.1 Τα επίπεδα των λειτουργικών HSP90 επιδρούν στην ομοιόσταση των επιπέδων του BRI1 στην ρίζα.

Ορμώμενοι από τα αυξημένα ενδοκυτταρικά και τα μειωμένα μεμβρανικά επίπεδα του BRI1, σε συνθήκες μειωμένης παρουσίας λειτουργικών HSP90, σε κύτταρα του υποκοτυλίου (Samakovli et al., 2022), επιδιώξαμε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, την διαλεύκανση της σχέσης που συνδέει την λειτουργία των HSP90 με τα επίπεδα και την εν γένει υποκυτταρική διακίνηση του BRI1 στο ακρορρίζιο, καθώς και στα επιδερμικά κύτταρα της ζώνης μετάβασης στην ρίζα. Από τις μετρήσεις που

πραγματοποιήθηκαν στην περιοχή του ακρορριζίου, φαίνεται ότι παρά την μεταβολή στο πρότυπο της χωροταξικής κατανομής του BRI1, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα πρωτεϊνικά επίπεδα του BRI1 στο ακρορριζίο στο μετάλλαγμα *hsp90.1*, καθώς και σε φυτά *hsp90^{RNAi}* όπου έχει γίνει σίγηση της έκφρασης των κυτταροπλασματικών. Δραστική μείωση στα επίπεδα του BRI1 εμφανίστηκε ωστόσο στην περίπτωση του μεταλλάγματος *hsp90.3*, γεγονός που καταμαρτυρά την λειτουργική διαφοροποίηση που μπορεί να εμφανίζουν οι κυτταροπλασματικές HSP90. Με την φαρμακολογική αναστολή της δράσης των HSP90 με GDA, παρατηρήσαμε αύξηση του BRI1 σε βραχείας διάρκειας χειρισμούς με GDA, ενώ δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην περίπτωση του μακράς διάρκειας χειρισμού με GDA. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν τον διττό ρόλο που εμφανίζουν οι HSP90, στο πρότυπο χωροταξικής κατανομής του BRI1 στην περιοχή του ακρορριζίου, και στον έλεγχο των επιπέδων του συνολικού BRI1 στο ακρορριζίο.

Από τις μετρήσεις του συνολικού BRI1 στην περιοχή των επιδερμικών κυττάρων της περιοχής της ζώνης μετάβασης της ρίζας, παρατηρήθηκε μία αναστροφή της συμπεριφοράς του συστήματος, καθότι παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα BRI1 στην περίπτωση του *hsp90.1* μεταλλάγματος και της σειράς *hsp90^{RNAi}*, ενώ παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα BRI1 στην περίπτωση του *hsp90.3*, χωρίς αυτή η μείωση ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική. Το αποτέλεσμα αυτό καταδεικνύει την ιστοειδική διαφοροποίηση του ελέγχου του υποδοχέα BRI1 από τις HSP90. Παρά ταύτα οι φαρμακολογικοί χειρισμοί με GDA δεν εμφάνισαν διαφορές με τις αντίστοιχες μετρήσεις σε συνθήκες ελέγχου στο επίπεδο του ακρορριζίου. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο πολύπλοκο λειτουργικό δίκτυο του συστήματος των HSP90 και των σχέσεων λειτουργικού πλεονασμού-διαφοροποίησης-ιστοειδικότητας που αναπτύσσονται μεταξύ των μελών του συστήματος.

Οι μετρήσεις που αντιστοιχούν στο μεμβρανικό BRI1, στις περιπτώσεις της γενετικής καταστολής κυτταροπλασματικών HSP90 δείχνουν στατιστικά σημαντική μείωση μόνο στην περίπτωση του μεταλλάγματος *hsp90.3*, εντούτοις αλλαγές παρατηρούνται και στις περιπτώσεις του *hsp90.1* και των *hsp90^{RNAi}* μεταλλαγμάτων. Οι αλλαγές στα μεμβρανικά επίπεδα του BRI1 ωστόσο, που διαφαίνονται από τις παρατηρήσεις, δεν είναι στατιστικά σημαντικές γεγονός που μπορεί να αντικατοπτρίζει την παρουσία πλειοτροπικών φαινοτύπων. Σε αυτές τις δύο περιπτώσεις, η οποία μπορεί να οδηγεί σε εκτεταμένες και τελικώς αλληλοεπικαλυπτόμενες κατανομές. Για παράδειγμα και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκαν άτομα στα οποία το σύνολο του BRI1 βρισκόταν στον ενδοκυττάριο χώρο, και άτομα στα οποία το BRI1 εντοπιζόταν τόσο στην πλασματική μεμβράνη όσο και στον ενδοκυττάριο χώρο. Στην φαρμακευτική αναστολή της ATPάσης των HSP90, με την χρήση του GDA, αύξηση στα επίπεδα του μεμβρανικού BRI1 παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση της βραχείας εφαρμογής του GDA, ενώ στην μακράς διάρκειας εφαρμογή, δεν παρατηρήθηκε αλλαγή, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα βασιζόμενοι επί του συνόλου των αποτελεσμάτων ότι στην μακράς διάρκειας εφαρμογή, ενεργοποιούνται προσαρμοστικοί μηχανισμοί ως προς τη διατήρηση των ολικών αλλά μεμβρανικών επιπέδων του BRI1 σε φυσιολογικά επίπεδα. Σε ότι αφορά στο μεμβρανικό BRI1, οι μετρήσεις για το μετάλλαγμα *hsp90.3* έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τις αντίστοιχες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στα κύτταρα του υποκοτυλίου, ενώ έρχονται σε αντίθεση με

τα αποτελέσματα στο μετάλλαγμα *hsp90.1* καθώς και τους φαρμακολογικούς χειρισμούς με GDA (Samakovli et al., 2022). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την δυναμικότητα και τον ιστοειδικό χαρακτήρα που μπορεί να εμφανίζουν ο λειτουργικός πλεονασμός και η λειτουργική εξειδίκευση των μελών του πολύπλοκου δικτύου των κυτταροπλασματικών HSP90.

3.2 Οι HSP90 εμπλέκονται σε διαφορετικά επίπεδα του συστήματος διακίνησης μεμβρανών.

Αρκετές είναι οι αναφορές που συνδέουν την δράση των HSP90 με την μηχανή διακίνησης των μεμβρανών, και τον ρόλο που αυτή διαδραματίζει στην υποκυττάρια τοποθέτηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Στην ζύμη έχουν αναγνωριστεί συνολικά 202 διαφορετικές πρωτεΐνες, οι οποίες είτε αλληλοεπιδρούν άμεσα με τις κυτταροπλασματικές HSP90, είτε η λειτουργία τους συνδέεται γενετικά με την λειτουργία των HSP90, και ελέγχουν διαφορετικές πτυχές της ενδοκυτταρικής μεταφοράς και έκκρισης, όπως η εξωκύττωση, η κυστιδιακή μεταφορά από το Golgi, η ενδοσωμική μεταφορά, η ενδοκύττωση και η σύντηξη των μεμβρανών (Mankovich AG and Freeman BC, 2022). Μεταξύ αυτών των παραγόντων εντοπίζονται αρκετοί διαφορετικοί παράγοντες, με καίριο ρόλο στην κυστιδιακή μεταφορά, όπως είναι οι , Rab πρωτεΐνες του καλύμματος, πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο συμπλεγμα Golgi, οι SNARE πρωτεΐνες, η ακτίνη, καθώς και πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την διαλογή των πρωτεϊνών μετά την ενδοκύττωση (Mankovich AG and Freeman BC, 2022). Παράλληλα, υπάρχουν αναφορές, που συσχετίζουν την δράση των HSP90 με τον έλεγχο της ανακύκλωσης των Rab-GTPασών, και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Προκειμένου οι HSP90 να επιτελέσουν τον ρόλο αυτό αλληλοεπιδρούν άμεσα τόσο με ρυθμιστές του κύκλου της GTPάσης όσο και με τις ίδιες τις Rab-GTPάσες (Chen CY and Balch WE, 2006).

Οι παρατηρήσεις μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού κατέδειξαν αλλαγή στο πρότυπο της υποκυττάριας τοποθέτησης του BRI1, ως αποτέλεσμα της μειωμένης παρουσίας λειτουργικών HSP90. Πιο συγκεκριμένα τόσο στα μεταλλάγματα *hsp90.1* και *hsp90.3*, όσο και στην περίπτωση των *hsp90^{RNAi}* φυτών, παρατηρήθηκε αυξημένος εντοπισμός σε χυμοτοπιακές δομές. Ωστόσο έντονη παρουσία του μεμβρανικού BRI1 παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση του *hsp90.1* μεταλλάγματος και στα *hsp90^{RNAi}* φυτά. Επιπλέον, αυξημένος εντοπισμός σε χυμοτοπιακές δομές παρατηρήθηκε και στις περιπτώσεις των μακρά και βραχείας διάρκειας χειρισμών με GDA, με την τελευταία περίπτωση να εμφανίζει αυξημένο εντοπισμό του BRI1 σε διαφορετικές ενδοκυτταρικές μεμβρανικές δομές. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν τον κεντρικό ρόλο των κυτταροπλασματικών HSP90 στην διακίνηση του υποδοχέα BRI1, αλλά και την λειτουργική διαφοροποίηση μεταξύ των κυτταροπλασματικών HSP90.1 και HSP90.3, με το HSP90.3 να διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην διατήρηση του BRI1 στην μεμβράνη, όπως φαίνεται από την αδυναμία διατήρησης του μεμβρανικού BRI1 στην μεμβράνη στο μετάλλαγμα *hsp90.3*. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε πλήρη συμφωνία με προηγούμενες μελέτες σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, όπου η φαρμακευτική αναστολή της δράσης της ATPάσης των HSP90 φαίνεται να οδηγεί σε αυξημένη ενδοκύττωση του μεμβρανικού υποδοχέα ErbB2, σε αποσταθεροποίηση του νεοσυντιθέμενου ErbB2, και στον αυξημένο εντοπισμό του στα

πρώιμα/ώψιμα ενδοσώματα και τελικώς στα λυσοσώματα (Kreitsen & Stang, 2014; Xu et al., 2002; Kreitman et al., 2018).

Η συσσώρευση του BRI1-GFP στην μήτρα των λυτικών χυμοτοπίων, και η δυνατότητα παρατήρησης του μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού, πέραν του γεγονότος ότι αποτελεί ένδειξη συμμετοχής των HSP90 στην ενδοκυτταρική διακίνηση του, αποτελεί και ένδειξη της αδυναμίας από πλευράς των χυμοτοπίων να υδρολύσουν το BRI1-GFP (Cardona-López X et al., 2015). Η συσσώρευση και η σταθεροποίηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών στα λυτικά χυμοτόπια μπορεί να προκληθεί είτε ως αποτέλεσμα της απουσίας φωτός είτε με φαρμακολογικό χειρισμό, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του χειρισμού με Concanamycin A (ConA), όπου αποτελεί φαρμακευτικό αναστολέα της δράσης των χυμοτοπιακών V-ATPασών και οδηγεί σε μείωση της όξυνσης των λυτικών διαμερισμάτων και κατά συνέπεια σε μειωμένη αποικοδόμηση του περιεχομένου τους (Páli T et al., 2004); (Tamura K et al., 2003). Ο εντοπισμός του BRI1 στα λυτικά χυμοτόπια, σε συνθήκες μειωμένης παρουσίας των κυτταροπλασματικών HSP90 είναι δηλωτικός της δράσης των HSP90 στην εύρυθμη λειτουργία των λυτικών χυμοτοπίων, γεγονός που αποτελεί ένδειξη της εμπλοκής των HSP90 είτε στο μονοπάτι της μεταφοράς των χυμοτοπιακών πρωτεϊνών είτε στην λειτουργία των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν το pH των λυτικών χυμοτοπίων.

Για την αναζήτηση των σημείων του μηχανισμού διακίνησης του BRI1 υποδοχέα όπου εμπλέκονται οι HSP90 στο *A.thaliana*, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη μεταξύ των φυτών που υπέστησαν χειρισμό με GDA και φυτών όπου έγινε χειρισμός με Concanamycin A ή Wortmannin. Οι φαινοτυπικές ομοιότητες στο επίπεδο της συσσώρευσης του BRI1 σε παρόμοιες ενδοκυτταρικές μεμβρανικές δομές, συνδυαστικά με την αυξημένη παρουσία του BRI1 και τον μειωμένο λόγο $BRI1_{[μεμβρανικό]}/BRI1_{[ενδοκυτταρικό]}$ μεταξύ των περιπτώσεων της εφαρμογής του GDA και των περιπτώσεων με την εφαρμογή του ConA και της Wort, υποδεικνύουν την εμπλοκή της δράσης των HSP90 σε διαφορετικά σημεία στο φυτό *A.thaliana*. Το γεγονός ότι οι HSP90 ασκούν τον έλεγχο της ενδοκυτταρικής μεμβρανικής μεταφοράς έχει δειχθεί τόσο σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές όσο και στην ζύμη (Mankovich AG and Freeman BC, 2022).

3.3 Οι HSP90 αλληλοεπιδρούν με την απομεθυλάση των ιστονών REF6.

Οι HSP90 αποτελούν το 2% των συνολικών πρωτεϊνών ενός κυττάρου, ενώ η παρουσία ενός παράγοντα καταπόνησης οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού στο 10%. Ο συσχετισμός της δράσης των HSP90 στο επίπεδο της μεταγραφής των γονιδίων, ήρθε ως συνέπεια της παρατήρησης HSP90 πρωτεϊνών σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές των πολυτενικών χρωμοσωμάτων στην *Drosophila*, αλλά και μελετών που ανέδειξαν την αλληλοεπίδραση των HSP90 με τη χρωματίνη, μέσω πρόσδεσης τους στις ιστόνες (Schneider T et al., 1999; Csermely P et al., 1994; Morcillo G et al., 1993). Η διαλεύκανση των μηχανισμών με τους οποίους οι HSP90 ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων στόχων αποτελεί αντικείμενο ενεργής μελέτης. Οι HSP90 φαίνεται να ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων με διαφορετικούς τρόπους. Παραδείγματος χάριν, στην *Drosophila*, σε φυσιολογικές συνθήκες παρατηρείται παύση της επιμήκυνσης της μεταγραφής στα γονίδια-στόχους, η οποία αίρεται σε συνθήκες αναστολής της λειτουργίας των HSP90, γεγονός που υποδηλώνει την άμεση εμπλοκή των HSP90 στην επιστράτευση και στην σταθερότητα της RNA pol II στις περιοχές-στόχους

(Jamrich M et al., 1977). Παράλληλα, τόσο στον άνθρωπο, όσο και στο *A.thaliana* έχει δειχθεί η άμεση αλληλοεπίδραση των HSP90, με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες με χαρακτηριστικότερα παραδείγματα να αποτελούν ο πυρηνικός υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (Baker JD et al., 2019) στον άνθρωπο και οι μεταγραφικοί παράγοντες των αποκρινόμενων στα βρασσινοστεροειδή γονιδίων BZR1/BES1 (Shigeta et al., 2014; Shigeta et al., 2015; Samakovli et al., 2019; Plitsi et al., 2022).

Οι HSP90 παίζουν ρόλο και στην επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στόχων. Οι ευχρωματινικές περιοχές στις οποίες απαντώνται οι HSP90, εμφανίζουν αλληλοεπικάλυψη με τις περιοχές που καταλαμβάνονται και ελέγχονται από της πρωτεΐνες της ομάδας Polycomb (Polycomb group proteins-PcG). Παροδική μειωμένη ενεργότητα των HSP90 φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων, ενώ η παρατεταμένη μείωση της ενεργότητας οδηγεί στην μείωση της έκφρασης ορισμένων από τα γονίδια στόχους (Sawarkar R and Paro R, 2013). Παρόλα αυτά δεν γνωρίζουμε αρκετά για τους μηχανισμούς με τους οποίους οι HSP90 επηρεάζουν το επιγενετικό τοπίο των συγκεκριμένων γονιδίων στόχων. Τόσο στο φυτό *A.thaliana* όσο και στην *Drosophila*, οι PcG πρωτεΐνες συμμετέχουν σε δύο βασικά υπερσύμπλοκα, PRC1 και PRC2, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ουβικιτινυλίωση της λυσίνης H2AK119 και για την τριμεθυλίωση H3K27me3 αντίστοιχα, έχοντας δράση κυρίως ανασταλτική (Pu L and Sung ZR, 2015).

Η απομεθυλάση των ιστονών REF6, μέλος της οικογένειας των Jumonji πρωτεϊνών, αποτελεί ένα από τα πέντε μέλη που είναι υπεύθυνα απομάκρυνση της H2K27me3 και λειτουργεί ανταγωνιστικά της δράσης του PRC2 συμπλόκου (Kralemann LEM et al., 2020); (Crevillén, 2020). Η επικράτεια που της προσδίδει την ικανότητα της απομεθυλάσης, JmjC, βρίσκεται, μαζί με την ρυθμιστική επικράτεια JmjN, εγγύτερα στο άμινοτελικό της πρωτεΐνης, ενώ εγγύτερα στο καρβόξυ-τελικό άκρο εντοπίζονται οι διαδοχικές zinc finger επικράτειες που της προσδίδουν την ικανότητα της αναγνώρισης των αλληλουχιών στόχων, CTCTGYTY,Y=T ή C (Lu et al., 2011; Cui et al., 2016). Η αναγνώριση των περιοχών αυτών από την απομεθυλάση REF6, είναι αναγκαία για την επιστράτευση του SWI/SNF χρωματινικού αναδιαμορφωτή BRAHMA (BRM), στις περιοχές όπου ρυθμίζονται από τον συγκεκριμένο χρωματινικό αναδιαμορφωτή (Li et al., 2016). Το σύστημα REF6- PRC1-PRC2 λειτουργεί στο επίπεδο του ελέγχου της χωροχρονικής έκφρασης άμεσα αποκρινόμενων, σε εγγενή και εξωτερικά ερεθίσματα, γονιδίων της ευχρωματινής (Kralemann LEM et al., 2020; Li et al., 2016).

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας καταφέραμε να δείξουμε την αλληλοεπίδραση της άμινοτελικής περιοχής του REF6, με τις κυτταροπλασματικές HSP90.1 και HSP90.3. Η απομεθυλάση REF6, εμφανίζει στις επικράτειες JmjN και JmjC ομολογία με τις ανθρώπινες KDM4 (Lysine-specific Demethylase 4) πρωτεΐνες, οι οποίες διαθέτουν H3K9me2/3 και H3K36me2/3 ενεργότητα απομεθυλάσης ωστόσο δεν διαθέτουν τις επικράτειες zinc fingers στην καρβόξυ-τελική περιοχή τους (Lu F et al., 2008). Οι HSP90 φαίνεται να αλληλοεπιδρούν άμεσα με την απομεθυλάση KDM4B, ελέγχοντας την σταθεροποίηση της, καθώς αναστολή της δράσης των HSP90 οδηγεί σε αποσταθεροποίηση και αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα (Irenberg I et al., 2013). Παράλληλα, τον ίδιο ρόλο εμφανίζεται να διαδραματίζουν οι HSP90 και με την απομεθυλάση των ιστονών KDM5B (Xu W et al., 2018). Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα αυτά θα

μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι HSP90, ασκούν στο φυτό *A.thaliana* έναν συντηρημένο έλεγχο της δράσης των απομεθυλασών των ιστονών μέσω της αποτροπής της αποικοδόμησης τους από το πρωτεάσωμα, με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν που παρουσιάζεται στον άνθρωπο.

Παράλληλα, η αλληλοεπίδραση των HSP90 με την απομεθυλάση των ιστονών REF6, αποτελεί το σημείο το οποίο μας επιτρέπει να εξηγήσουμε ως ένα βαθμό την μειωμένη έκφραση του μεμβρανικού μεταφορέα των αυξινών, PIN1, που παρατηρείται από σε συνθήκες μειωμένης παρουσίας λειτουργικών HSP90 (Samakovli D et al., 2021; Wang X et al., 2019). Η αλληλοεπίδραση αυτή, προσθέτει ένα επιπλέον επίπεδο ελέγχου από τις HSP90 των αποκρίσεων του μονοπατιού της ελεγχόμενης από τα βρασσινοστεροειδή, καθώς η απομεθυλάση REF6, και η ομόλογή της ELF6, αλληλοεπιδρούν άμεσα με τον μεταγραφικό ενεργοποιητή BES1 (Yu X et al., 2008; Lu et al., 2011).

Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές που συνδέουν την δράση των HSP90 με την διαγενεαλογική κληρονομία της επιγενετικής κατάστασης της χρωματίνης στην *Drosophila* (Ruden DM and Lu X, 2008). Στο φυτό *A.thaliana*, έχει προταθεί μοντέλο κατά το οποίο εξυπηρετείται η διαγενεαλογική πληροφορία της παρατεταμένης έκθεσης σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (Θερμομνήμη/Thermomemory), μέσω της αμοιβαίας ρύθμισης μεταξύ του REF6 και του HEAT SHOCK FACTOR A2 (HSFA2) (Liu J et al., 2019). Δεδομένης της αλληλοεπίδρασης, της REF6 με τις κυτταροπλασματικές HSP90, όπως αυτή φάνηκε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, και του γεγονότος ότι ο μεταγραφικός παράγοντας HSFA2 αποτελεί πρωτεΐνη πελάτη των HSP90, αναδεικνύεται ένα μέρος του μηχανιστικού πλαισίου μέσα από το οποίο οι HSP90 μπορούν να συμμετάσχουν στην διαγενεαλογική κληρονομία της επιγενετικής κατάστασης της χρωματίνης (Meiri D et al., 2010; Liu J et al., 2019; Antunez-Sanchez J et al., 2020). Επιπλέον, το σύστημα HSP90- REF6 θα μπορούσε να συμμετέχει στην ρύθμιση του συνόλου των αναπτυξιακών αλλαγών, στα πλαίσια της θέρμο-μορφογένεσης συρρυθμίζοντας την έκφραση θερμοεπαγόμενων γονιδίων ως μέρος του συμπλόκου PIF4 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4)- BES1 (Nolan TM et al., 2020; Zeng Y et al., 2023; Somers DE, 2023).

Η δυνατότητα αλληλοεπίδρασης των HSP90 με την απομεθυλάση REF6 προστίθεται στο συνολικό οπλοστάσιο των πρωτεϊνών που αλληλοεπιδρούν με τις HSP90, και καθορίζουν το μεγάλο εύρος των διαφορετικών ρόλων που αυτές διαδραματίζουν στις διάφορες αναπτυξιακές διεργασίες. Ο σχηματισμός του συμπλόκου REF6-HSP90, μπορεί να εξηγήσει μερικώς την αργοπορημένη μετάβαση στην αναπαραγωγική φάση που εμφανίζουν διαγονιδιακές σειρές *pLEAFY:HSP90^{RNAi}* (Margaritopoulou T et al., 2016). Οι HSP90 λειτουργούν το σημείο διασύνδεσης του δικτύου των μοριακών παραγόντων που ελέγχουν το σύνολο της ανθικής ανάπτυξης, αλληλοεπιδρώντας άμεσα με βασικά στοιχεία της ανθικής μετάβασης, με χαρακτηριστικότερα τους μεταγραφικούς παράγοντες LEAFY (LFY) και SOC1 (Margaritopoulou T et al., 2016). Από την άλλη πλευρά το REF6, φαίνεται να αλληλοεπιδρά επίσης με τον μεταγραφικό παράγοντα SOC1, για την κάτωθεν ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που συμμετέχουν στην ανθική μετάβαση (Richter R et al., 2019).

4.Βιβλιογραφία

- Ali MM, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature*. 2006 Apr 20;440(7087):1013-7. doi: 10.1038/nature04716. PMID: 16625188; PMCID: PMC5703407.
- Antunez-Sanchez J, Naish M, Ramirez-Prado JS, Ohno S, Huang Y, Dawson A, Opasathian K, Manza-Mianza D, Ariel F, Raynaud C, Wibowo A, Daron J, Ueda M, Latrasse D, Slotkin RK, Weigel D, Benhamed M, Gutierrez-Marcos J. A new role for histone demethylases in the maintenance of plant genome integrity. *Elife*. 2020 Oct 27;9:e58533. doi: 10.7554/eLife.58533. PMID: 33107825; PMCID: PMC7671693.
- Ahsan A, Ramanand SG, Whitehead C, Hiniker SM, Rehemtulla A, Pratt WB, Jolly S, Gouveia C, Truong K, Van Waes C, Ray D, Lawrence TS, Nyati MK. (2012). Wild-type EGFR is stabilized by direct interaction with HSP90 in cancer cells and tumors. *Neoplasia*, 14(8), 670-677. doi: 10.1593/neo.12986.
- Bai MY, Zhang LY, Gampala SS, Zhu SW, Song WY, Chong K, Wang ZY. Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 21;104(34):13839-44. doi: 10.1073/pnas.0706386104. Epub 2007 Aug 15. PMID: 17699623; PMCID: PMC1959469.
- Bajguz A. Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: 2011. Brassinosteroids—occurrence and chemical structures in plants; pp. 1–27.
- Bakker J, Spits M, Neefjes J, Berlin I. The EGFR odyssey - from activation to destruction in space and time. *J Cell Sci*. 2017 Dec 15;130(24):4087-4096. doi: 10.1242/jcs.209197. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29180516.
- Belkhadir Y, Chory J. Brassinosteroid signaling: a paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface. *Science*. 2006 Dec 1;314(5804):1410-1. doi: 10.1126/science.1134040. PMID: 17138891.
- Beltran M, Yates CM, Skalska L, Dawson M, Reis FP, Viiri K, Fisher CL, Sibley CR, Foster BM, Bartke T, Ule J, Jenner RG. The interaction of PRC2 with RNA or chromatin is mutually antagonistic. *Genome Res*. 2016 Jul;26(7):896-907. doi: 10.1101/gr.197632.115. Epub 2016 May 9. PMID: 27197219; PMCID: PMC4937559
- Bertelsen V, Stang E. The Mysterious Ways of ErbB2/HER2 Trafficking. *Membranes (Basel)*. 2014 Aug 6;4(3):424-46. doi: 10.3390/membranes4030424. PMID: 25102001; PMCID: PMC4194043.
- Bratzel F, López-Torrejón G, Koch M, Del Pozo JC, Calonje M. Keeping cell identity in Arabidopsis requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. *Curr Biol*. 2010 Oct 26;20(20):1853-9. doi: 10.1016/j.cub.2010.09.046. Epub 2010 Oct 7. PMID: 20933424.
- Brembu T, Winge P, Bones AM. The small GTPase AtRAC2/ROP7 is specifically expressed during late stages of xylem differentiation in Arabidopsis. *J Exp Bot*. 2005 Sep;56(419):2465-76. doi: 10.1093/jxb/eri239. Epub 2005 Aug 1. PMID: 16061508.
- Cardona-López X, Cuyas L, Marín E, Rajulu C, Irigoyen ML, Gil E, Puga MI, Bligny R, Nussaume L, Geldner N, Paz-Ares J, Rubio V. ESCRT-III-Associated Protein ALIX Mediates High-Affinity Phosphate Transporter Trafficking to Maintain Phosphate Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2015 Sep;27(9):2560-81. doi: 10.1105/tpc.15.00393. Epub 2015 Sep 4. Erratum in: *Plant Cell*. 2022 Jul 4;34(7):2809. PMID: 26342016; PMCID: PMC4815105.
- Cao D, Froehlich JE, Zhang H, Cheng CL. 2003. The chlorate-resistant and photomorphogenesis-defective mutant cr88 encodes a chloroplast-targeted HSP90. *The Plant Journal* 33, 107–118.
- Cervený, L., Strásková, A., Danková, V., Hartlová, A., Cecková, M., Staud, F., & Stulík, J. (2013, March). Tetratricopeptide Repeat Motifs in the World of Bacterial Pathogens: Role in Virulence Mechanisms. *Infection and Immunity*, 81(3), 629–635.
- Cha JY, Ahn G, Kim JY, Kang SB, Kim MR, Su'udi M, Kim WY, Son D. 2013. Structural and functional differences of cytosolic 90-kDa heat-shock proteins (Hsp90s) in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology and Biochemistry* 70, 368–373.
- Chen CY, Balch WE. (2006). The Hsp90 chaperone complex regulates GDI-dependent Rab recycling. *Molecular Biology of the Cell*, 17(8), 3494-3507. doi: 10.1091/mbc.e05-12-1096

- Chen B., Zhong D., Monteiro A. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genom.* 2006;7:156. doi: 10.1186/1471-2164-7-156.
- Chen D, Molitor A, Liu C, Shen WH. The Arabidopsis PRC1-like ring-finger proteins are necessary for repression of embryonic traits during vegetative growth. *Cell Res.* 2010 Dec;20(12):1332-44. doi: 10.1038/cr.2010.151. Epub 2010 Nov 9. PMID: 21060339
- Chen H, Tong J, Fu W, Liang Z, Ruan J, Yu Y, Song X, Yuan L, Xiao L, Liu J, Cui Y, Huang S, Li C. The H3K27me3 Demethylase RELATIVE OF EARLY FLOWERING6 Suppresses Seed Dormancy by Inducing Abscisic Acid Catabolism. *Plant Physiol.* 2020 Dec;184(4):1969-1978. doi: 10.1104/pp.20.01255. Epub 2020 Oct 9. PMID: 33037128; PMCID: PMC7723082.
- Cintron NS, Toft D. Defining the requirements for Hsp40 and Hsp70 in the Hsp90 chaperone pathway. *J Biol Chem.* 2006 Sep 8;281(36):26235-44. doi: 10.1074/jbc.M605417200. Epub 2006 Jul 19. PMID: 16854979.
- Claus LAN, Savatin DV, Russinova E. The crossroads of receptor-mediated signaling and endocytosis in plants. *J Integr Plant Biol.* 2018 Sep;60(9):827-840. doi: 10.1111/jipb.12672. Epub 2018 Aug 21. PMID: 29877613.
- Clouse SD, Langford M, McMorris TC. A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol.* 1996 Jul;111(3):671-8. doi: 10.1104/pp.111.3.671. PMID: 8754677; PMCID: PMC157882.
- Conte A, Sigismund S. Chapter Six - The Ubiquitin Network in the Control of EGFR Endocytosis and Signaling. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2016;141:225-76. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.03.002. Epub 2016 Apr 20. PMID: 27378759.
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, Coupland G. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science.* 2007 May 18;316(5827):1030-3. doi: 10.1126/science.1141752. Epub 2007 Apr 19. PMID: 17446353.
- Cortese K, Howes MT, Lundmark R, Tagliatti E, Bagnato P, Petrelli A, Bono M, McMahon HT, Parton RG, Tacchetti C. The HSP90 inhibitor geldanamycin perturbs endosomal structure and drives recycling ErbB2 and transferrin to modified MVBs/lysosomal compartments. *Mol Biol Cell.* 2013 Jan;24(2):129-44. doi: 10.1091/mbc.E12-04-0282. Epub 2012 Nov 14. PMID: 23154999; PMCID: PMC3541960.
- Cortijo S, Charoensawan V, Brestovitsky A, Buning R, Ravarani C, Rhodes D, van Noort J, Jaeger KE, Wigge PA. Transcriptional Regulation of the Ambient Temperature Response by H2A.Z Nucleosomes and HSF1 Transcription Factors in Arabidopsis. *Mol Plant.* 2017 Oct 9;10(10):1258-1273. doi: 10.1016/j.molp.2017.08.014. Epub 2017 Sep 8. PMID: 28893714; PMCID: PMC6175055
- Crevillén P. Histone Demethylases as Counterbalance to H3K27me3 Silencing in Plants. *iScience.* 2020 Oct 20;23(11):101715. doi: 10.1016/j.isci.2020.101715. PMID: 33205025; PMCID: PMC7649346.
- Csermely P, Kajtár J, Hollósi M, Oikarinen J, Somogyi J. The 90 kDa heat shock protein (hsp90) induces the condensation of the chromatin structure. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Aug 15;202(3):1657-63. doi: 10.1006/bbrc.1994.2124. PMID: 8060353.
- Cui X, Lu F, Qiu Q, Zhou B, Gu L, Zhang S, Kang Y, Cui X, Ma X, Yao Q, Ma J, Zhang X, Cao X. REF6 recognizes a specific DNA sequence to demethylate H3K27me3 and regulate organ boundary formation in Arabidopsis. *Nat Genet.* 2016 Jun;48(6):694-9. doi: 10.1038/ng.3556. Epub 2016 Apr 25. PMID: 27111035.
- Cunningham, C. N., Krukenberg, K. A., & Agard, D. A. (2008, July). Intra- and Intermonomer Interactions Are Required to Synergistically Facilitate ATP Hydrolysis in Hsp90. *Journal of Biological Chemistry*, 283(30), 21170–21178. <https://doi.org/10.1074/jbc.m800046200>
- David G. Robinson and others, The Endosomal System of Plants: Charting New and Familiar Territories, *Plant Physiology*, Volume 147, Issue 4, August 2008, Pages 1482–1492, <https://doi.org/10.1104/pp.108.120105>

- Denecke J, De Rycke R, Botterman J. Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *EMBO J.* 1992 Jun;11(6):2345-55. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05294.x. PMID: 1376250; PMCID: PMC556702.
- Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K. Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2006 Mar;18(3):715-30. doi: 10.1105/tpc.105.037978. Epub 2006 Feb 3. PMID: 16461582; PMCID: PMC1383645.
- Elizabeth R. Waters; Conservative innovation: The mixed-up evolutionary history of the heat-shock proteins. *Biochem (Lond)* 1 February 2014; 36 (1): 9–14. doi: <https://doi.org/10.1042/BIO03601009>
- Fan L, Li R, Pan J, Ding Z, Lin J. Endocytosis and its regulation in plants. *Trends Plant Sci.* 2015 Jun;20(6):388-97. doi: 10.1016/j.tplants.2015.03.014. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25914086.
- Förderer A, Zhou Y, Turck F. The age of multiplexity: recruitment and interactions of Polycomb complexes in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2016 Feb;29:169-78. doi: 10.1016/j.pbi.2015.11.010. Epub 2016 Jan 28. PMID: 26826786.
- Friedrichsen DM, Joazeiro CA, Li J, Hunter T, Chory J. Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiol.* 2000 Aug;123(4):1247-56. doi: 10.1104/pp.123.4.1247. PMID: 10938344; PMCID: PMC59084.
- Gampala SS, Kim TW, He JX, Tang W, Deng Z, Bai MY, Guan S, Lalonde S, Sun Y, Gendron JM, Chen H, Shibagaki N, Ferl RJ, Ehrhardt D, Chong K, Burlingame AL, Wang ZY. An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis. *Dev Cell.* 2007 Aug;13(2):177-89. doi: 10.1016/j.devcel.2007.06.009. PMID: 17681130; PMCID: PMC2000337.
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jürgens G. The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell.* 2003 Jan 24;112(2):219-30. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00003-5. PMID: 12553910.
- Giordano C, Gelsomino L, Barone I, Panza S, Augimeri G, Bonofiglio D, Rovito D, Naimo GD, Leggio A, Catalano S, Andò S. Leptin Modulates Exosome Biogenesis in Breast Cancer Cells: An Additional Mechanism in Cell-to-Cell Communication. *J Clin Med.* 2019 Jul 12;8(7):1027. doi: 10.3390/jcm8071027. PMID: 31336913; PMCID: PMC6678227.
- González-Solís, A., Berryman, E., & Otegui, M. S. (2022). Plant endosomes as protein sorting hubs. *FEBS Letters*, 596(17), 2288–2304. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14425>
- Grossmann G., Malinsky J., Stahlschmidt W., Loibl M., Weig-Meckl I., Frommer W.B., Opekarová M., Tanner W. Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J. Cell Biol.* 2008;183:1075–1088. doi: 10.1083/jcb.200806035
- Hara-Nishimura I, Shimada T, Hatano K, Takeuchi Y, Nishimura M. Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell.* 1998 May;10(5):825-36. doi: 10.1105/tpc.10.5.825. PMID: 9596640; PMCID: PMC144021.
- Haralampidis K, Milioni D, Rigas S, Hatzopoulos P. 2002. Combinatorial interaction of cis elements specifies the expression of the Arabidopsis AtHsp90-1 gene. *Plant Physiology* 129, 1138–1149
- Hartl, F., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324–332 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature10317>
- He K, Gou X, Yuan T, Lin H, Asami T, Yoshida S, Russell SD, Li J. BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways. *Curr Biol.* 2007 Jul 3;17(13):1109-15. doi: 10.1016/j.cub.2007.05.036. PMID: 17600708.
- He K, Mei H, Zhu J, Qiu Q, Cao X, Deng X. The histone H3K27 demethylase REF6/JMJ12 promotes thermomorphogenesis in Arabidopsis. *Natl Sci Rev.* 2021 Nov 25;9(5):nwab213. doi: 10.1093/nsr/nwab213. PMID: 35591912; PMCID: PMC9113104.

- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt ED, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries SC. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* 2001 Nov;127(3):803-16. Erratum in: *Plant Physiol* 2002 Jan;128(1):314. PMID: 11706164; PMCID: PMC129253.
- Hepworth SR, Valverde F, Ravenscroft D, Mouradov A, Coupland G. Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO J.* 2002 Aug 15;21(16):4327-37. doi: 10.1093/emboj/cdf432. PMID: 12169635; PMCID: PMC126170.
- Hessling M, Richter K, Buchner J. Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 Mar;16(3):287-93. doi: 10.1038/nsmb.1565. Epub 2009 Feb 22. PMID: 19234467.
- Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2018 Aug 29;19(9):2560. doi: 10.3390/ijms19092560. PMID: 30158430; PMCID: PMC6164434.
- Huai Q., Wang H., Liu Y., Kim H.Y., Toft D., Ke H. Structures of the N-terminal and middle domains of E. coli Hsp90 and conformation changes upon ADP binding. *Structure.* 2005;13:579–590. doi: 10.1016/j.str.2004.12.018
- Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev.* 2011 Jan;91(1):119-49. doi: 10.1152/physrev.00059.2009. PMID: 21248164; PMCID: PMC3710122.
- Hyun Y, Richter R, Vincent C, Martinez-Gallegos R, Porri A, Coupland G. Multi-layered Regulation of SPL15 and Cooperation with SOC1 Integrate Endogenous Flowering Pathways at the Arabidopsis Shoot Meristem. *Dev Cell.* 2016 May 9;37(3):254-66. doi: 10.1016/j.devcel.2016.04.001. Epub 2016 Apr 28. PMID: 27134142.
- Ipenberg I, Guttman-Raviv N, Khoury HP, Kupershmit I, Ayoub N. Heat shock protein 90 (Hsp90) selectively regulates the stability of KDM4B/JMJD2B histone demethylase. *J Biol Chem.* 2013 May 24;288(21):14681-7. doi: 10.1074/jbc.C113.462770. Epub 2013 Apr 15. PMID: 23589305; PMCID: PMC366349
- Irani NG, Russinova E. Receptor endocytosis and signaling in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2009 Dec;12(6):653-9. doi: 10.1016/j.pbi.2009.09.011. Epub 2009 Oct 21. PMID: 19850509.
- Ishiguro S, Watanabe Y, Ito N, Nonaka H, Takeda N, Sakai T, Kanaya H, Okada K. 2002. SHEPHERD is the Arabidopsis GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *The EMBO Journal* 21, 898–908.
- Jamrich M, Greenleaf AL, Bautz EK. Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 May;74(5):2079-83. doi: 10.1073/pnas.74.5.2079. PMID: 405671; PMCID: PMC431078.
- Jürgens G, Geldner N. Protein secretion in plants: from the trans-Golgi network to the outer space. *Traffic.* 2002 Sep;3(9):605-13. doi: 10.1034/j.1600-0854.2002.30902.x. PMID: 12191012.
- Kanazawa T, Ueda T. Exocytic trafficking pathways in plants: why and how they are redirected. *New Phytol.* 2017 Aug;215(3):952-957. doi: 10.1111/nph.14613. Epub 2017 May 25. PMID: 28543308.
- Kauschmann, A., Jessop, A., Koncz, C., Szekeres, M., Willmitzer, L., & Altmann, T. (1996). Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *Plant Journal*, 9(5), 701–713. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1996.9050701.x>
- Kleine-Vehn J, Leitner J, Zwiewka M, Sauer M, Abas L, Luschig C, Friml J. Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 18;105(46):17812-7. doi: 10.1073/pnas.0808073105. Epub 2008 Nov 12. PMID: 19004783; PMCID: PMC2584678.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):693-705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005. PMID: 17320507
- Kraleman LEM, Liu S, Trejo-Arellano MS, Muñoz-Viana R, Köhler C, Hennig L. Removal of H2Aub1 by ubiquitin-specific proteases 12 and 13 is required for stable Polycomb-mediated gene repression in Arabidopsis. *Genome Biol.* 2020 Jun 16;21(1):144. doi: 10.1186/s13059-020-02062-8. PMID: 32546254; PMCID: PMC7296913.

- Kreitman M, Noronha A, Yarden Y. Irreversible modifications of receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett.* 2018 Jul;592(13):2199-2212. doi: 10.1002/1873-3468.13095. Epub 2018 May 28. PMID: 29790151.
- Krishna, P. (2001). The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. PubMed Central (PMC). [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2001\)006](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2001)006)
- Kim TW, Guan S, Sun Y, Deng Z, Tang W, Shang JX, Sun Y, Burlingame AL, Wang ZY. Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol.* 2009 Oct;11(10):1254-60. doi: 10.1038/ncb1970. Epub 2009 Sep 6. PMID: 19734888; PMCID: PMC2910619.
- Leach MD, Klipp E, Cowen LE, Brown AJ. Fungal Hsp90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Oct;10(10):693-704. doi: 10.1038/nrmicro2875. PMID: 22976491; PMCID: PMC3660702.
- Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):707-19. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.015. PMID: 17320508.
- Li J, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell.* 1997 Sep 5;90(5):929-38. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80357-8. PMID: 9298904.
- Li R, Liu P, Wan Y, Chen T, Wang Q, Mettbaach U, Baluska F, Samaj J, Fang X, Lucas WJ, Lin J. A membrane microdomain-associated protein, *Arabidopsis* Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development. *Plant Cell.* 2012 May;24(5):2105-22. doi: 10.1105/tpc.112.095695. Epub 2012 May 15. PMID: 22589463; PMCID: PMC3442590.
- Li J, Soroka J, Buchner J. 2012. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research* 1823, 624–635.
- Li C, Gu L, Gao L, Chen C, Wei CQ, Qiu Q, Chien CW, Wang S, Jiang L, Ai LF, Chen CY, Yang S, Nguyen V, Qi Y, Snyder MP, Burlingame AL, Kohalmi SE, Huang S, Cao X, Wang ZY, Wu K, Chen X, Cui Y. Concerted genomic targeting of H3K27 demethylase REF6 and chromatin-remodeling ATPase BRM in *Arabidopsis*. *Nat Genet.* 2016
- Liang P., Stratil T.F., Popp C., Marín M., Folgmann J., Mysore K.S., Wen J., Ott T. Symbiotic root infections in *Medicago truncatula* require remorin mediated receptor stabilization in membrane nanodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018;115:5289–5294. doi: 10.1073/pnas.1721868115.
- Lotz GP, Brychzy A, Heinz S, Obermann WM. A novel HSP90 chaperone complex regulates intracellular vesicle transport. *J Cell Sci.* 2008 Mar 1;121(Pt 5):717-23. doi: 10.1242/jcs.015610. Epub 2008 Feb 12. PMID: 18270269.
- Lu F, Cui X, Zhang S, Jenuwein T, Cao X. *Arabidopsis* REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nat Genet.* 2011 Jun 5;43(7):715-9. doi: 10.1038/ng.854. PMID: 21642989.
- Lu F, Li G, Cui X, Liu C, Wang XJ, Cao X. Comparative analysis of JmjC domain-containing proteins reveals the potential histone demethylases in *Arabidopsis* and rice. *J Integr Plant Biol.* 2008 Jul;50(7):886-96. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00692.x. PMID: 18713399.
- Mandava, N. B. (1988). Plant Growth-Promoting brassinosteroids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39(1), 23–52. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.39.060188.000323>
- Manghwar H, Hussain A, Ali Q, Liu F. Brassinosteroids (BRs) Role in Plant Development and Coping with Different Stresses. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 18;23(3):1012. doi: 10.3390/ijms23031012. PMID: 35162936; PMCID: PMC8835148.
- Mankovich AG, Freeman BC. Regulation of Protein Transport Pathways by the Cytosolic Hsp90s. *Biomolecules.* 2022 Aug 5;12(8):1077. doi: 10.3390/biom12081077. PMID: 36008972; PMCID: PMC9406046.
- Martins S, Dohmann EM, Cayrel A, Johnson A, Fischer W, Pojer F, Satiat-Jeunemaitre B, Jaillais Y, Chory J, Geldner N, Vert G. Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination. *Nat Commun.* 2015 Jan 21;6:6151. doi: 10.1038/ncomms7151. Erratum in: *Nat Commun.* 2021 May 17;12(1):2982. PMID: 25608221; PMCID: PMC4713032.

- Mayer MP, Le Breton L. Hsp90: breaking the symmetry. *Mol Cell*. 2015 Apr 2;58(1):8-20. doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.022. PMID: 25839432
- McKenzie SL, Henikoff S, Meselson M. Localization of RNA from heat-induced polysomes at puff sites in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Mar;72(3):1117-21. doi: 10.1073/pnas.72.3.1117. PMID: 805422; PMCID: PMC432477.
- The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones* 6, 238–246., Milioni D, Hatzopoulos P. 1997. Genomic organization of hsp90 gene family in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 35, 955–961
- Mora-García S, Vert G, Yin Y, Caño-Delgado A, Cheong H, Chory J. Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Genes Dev*. 2004 Feb 15;18(4):448-60. doi: 10.1101/gad.1174204. Epub 2004 Feb 20. PMID: 14977918; PMCID: PMC359398.
- Moran L, Mirault ME, Arrigo AP, Goldschmidt-Clermont M, Tissières A. Heat shock of *Drosophila melanogaster* induces the synthesis of new messenger RNAs and proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1978 May 11;283(997):391-406. doi: 10.1098/rstb.1978.0044. PMID: 26088.
- Morcillo G, Diez JL, Carbajal ME, Tanguay RM. HSP90 associates with specific heat shock puffs (hsr omega) in polytene chromosomes of *Drosophila* and *Chironomus*. *Chromosoma*. 1993 Nov;102(9):648-59. doi: 10.1007/BF00352313. PMID: 8306827.
- Nadeau K, Das A, Walsh CT. Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J Biol Chem*. 1993 Jan 15;268(2):1479-87. PMID: 8419347
- Naramoto S, Otegui MS, Kutsuna N, de Rycke R, Dainobu T, Karampelias M, Fujimoto M, Feraru E, Miki D, Fukuda H, Nakano A, Friml J. Insights into the localization and function of the membrane trafficking regulator GNOM ARF-GEF at the Golgi apparatus in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2014 Jul;26(7):3062-76. doi: 10.1105/tpc.114.125880. Epub 2014 Jul 10. PMID: 25012191; PMCID: PMC4145132.
- Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Yoshida S, Yuan H, Feldmann KA, Tax FE. Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant Physiol*. 1999 Nov;121(3):743-52. doi: 10.1104/pp.121.3.743. PMID: 10557222; PMCID: PMC59436.
- Noh B, Lee SH, Kim HJ, Yi G, Shin EA, Lee M, Jung KJ, Doyle MR, Amasino RM, Noh YS. Divergent roles of a pair of homologous jumonji/zinc-finger-class transcription factor proteins in the regulation of *Arabidopsis* flowering time. *Plant Cell*. 2004 Oct;16(10):2601-13. doi: 10.1105/tpc.104.025353. Epub 2004 Sep 17. PMID: 15377760; PMCID: PMC520958.
- Nolan T, Chen J, Yin Y. Cross-talk of Brassinosteroid signaling in controlling growth and stress responses. *Biochem J*. 2017 Jul 27;474(16):2641-2661. doi: 10.1042/BCJ20160633. PMID: 28751549; PMCID: PMC6296487.
- Nolan TM, Vukašinović N, Liu D, Russinova E, Yin Y. Brassinosteroids: Multidimensional Regulators of Plant Growth, Development, and Stress Responses. *Plant Cell*. 2020 Feb;32(2):295-318. doi: 10.1105/tpc.19.00335. Epub 2019 Nov 27. PMID: 31776234; PMCID: PMC700848
- Obermann WMJ, Sondermann H et al (1998) In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol* 143(4):901–910, Prodromou C, Roe SM et al (1997)
- Ohnishi T. Recent advances in brassinosteroid biosynthetic pathway: Insight into novel brassinosteroid shortcut pathway. *J. Pestic. Sci.* 2018;43:159–167. doi: 10.1584/jpestics.D18-040
- Ott T. Membrane nanodomains and microdomains in plant-microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol*. 2017 Dec;40:82-88. doi: 10.1016/j.pbi.2017.08.008. Epub 2017 Sep 1. PMID: 28865975.
- Paez Valencia J, Goodman K, Otegui MS. Endocytosis and Endosomal Trafficking in Plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2016 Apr 29;67:309-35. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-112242. PMID: 27128466.

- Páli T, Dixon N, Kee TP, Marsh D. Incorporation of the V-ATPase inhibitors concanamycin and indole pentadiene in lipid membranes. Spin-label EPR studies. *Biochim Biophys Acta*. 2004 May 27;1663(1-2):14-8. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.03.003. PMID: 15157605.
- Planas-Riverola A, Gupta A, Betegón-Putze I, Bosch N, Ibañes M, Caño-Delgado AI. Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development*. 2019 Mar 14;146(5):dev151894. doi: 10.1242/dev.151894. PMID: 30872266; PMCID: PMC6432667.
- Plitsi PK, Samakovli D, Roka L, Rampou A, Panagiotopoulos K, Koudounas K, Isaioglou I, Haralampidis K, Rigas S, Hatzopoulos P, Milioni D. GA-Mediated Disruption of RGA/BZR1 Complex Requires HSP90 to Promote Hypocotyl Elongation. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 21;24(1):88. doi: 10.3390/ijms24010088. PMID: 36613530; PMCID: PMC9820706.
- Pu L, Sung ZR. PcG and trxG in plants - friends or foes. *Trends Genet*. 2015 May;31(5):252-62. doi: 10.1016/j.tig.2015.03.004. Epub 2015 Apr 6. PMID: 25858128.
- Prasinis C, Krampis K, Samakovli D, Hatzopoulos P. 2005. Tight regulation of expression of two Arabidopsis cytosolic Hsp90 genes during embryo development. *Journal of Experimental Botany* 56, 633–644.
- Prodromou C, Siligardi G, O'Brien R, Woolfson DN, Regan L, Panaretou B, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J*. 1999 Feb 1;18(3):754-62. doi: 10.1093/emboj/18.3.754. PMID: 9927435; PMCID: PMC1171168.
- Prodromou C, Panaretou B, Chohan S, Siligardi G, O'Brien R, Ladbury JE, Roe SM, Piper PW, Pearl LH. The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J*. 2000 Aug 15;19(16):4383-92. doi: 10.1093/emboj/19.16.4383. PMID: 10944121; PMCID: PMC302038.
- Prodromou C, Roe SM et al (1997) Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *CeN* 90(1):65–75
- Pu L, Sung ZR. PcG and trxG in plants - friends or foes. *Trends Genet*. 2015 May;31(5):252-62. doi: 10.1016/j.tig.2015.03.004. Epub 2015 Apr 6. PMID: 25858128.
- Reguera M, Bassil E, Tajima H, Wimmer M, Chanoca A, Otegui MS, Paris N, Blumwald E. pH Regulation by NHX-Type Antiporters Is Required for Receptor-Mediated Protein Trafficking to the Vacuole in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2015 Apr;27(4):1200-17. doi: 10.1105/tpc.114.135699. Epub 2015 Mar 31. PMID: 25829439; PMCID: PMC4558692.
- Richter R, Kinoshita A, Vincent C, Martinez-Gallegos R, Gao H, van Driel AD, Hyun Y, Mateos JL, Coupland G. Floral regulators FLC and SOC1 directly regulate expression of the B3-type transcription factor TARGET OF FLC AND SVP 1 at the Arabidopsis shoot apex via antagonistic chromatin modifications. *PLoS Genet*. 2019 Apr 4;15(4):e1008065. doi: 10.1371/journal.pgen.1008065. PMID: 30946745; PMCID: PMC6467423.
- Roe SM, Ali MM, Meyer P, Vaughan CK, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH. The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). *Cell*. 2004 Jan 9;116(1):87-98. doi: 10.1016/s0092-8674(03)01027-4. PMID: 14718169.
- Ruden DM, Lu X. Hsp90 affecting chromatin remodeling might explain transgenerational epigenetic inheritance in Drosophila. *Curr Genomics*. 2008 Nov;9(7):500-8. doi: 10.2174/138920208786241207. PMID: 19506739; PMCID: PMC2691676.
- Russinova E, Borst JW, Kwakitaal M, Caño-Delgado A, Yin Y, Chory J, de Vries SC. Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell*. 2004 Dec;16(12):3216-29. doi: 10.1105/tpc.104.025387. Epub 2004 Nov 17. PMID: 15548744; PMCID: PMC535869.
- Saito C, Ueda T. Chapter 4: functions of RAB and SNARE proteins in plant life. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2009;274:183-233. doi: 10.1016/S1937-6448(08)02004-2. PMID: 19349038.
- Samakovli, D., Margaritopoulou, T., Prasinis, C., Milioni, D., & Hatzopoulos, P. (2014). Brassinosteroid nuclear signaling recruits HSP90 activity. *New Phytologist*, 203(3), 743–757. <https://doi.org/10.1111/nph.12843>

- Samakovli D, Roka L, Dimopoulou A, Plitsi PK, Žukauskait A, Georgopoulou P, Novák O, Milioni D, Hatzopoulos P. HSP90 affects root growth in Arabidopsis by regulating the polar distribution of PIN1. *New Phytol.* 2021 Sep;231(5):1814-1831. doi: 10.1111/nph.17528. Epub 2021 Jul 6. PMID: 34086995.
- Samakovli D, Roka L, Plitsi PK, Drakakaki G, Haralampidis K, Stravopodis DJ, Hatzopoulos P, Milioni D. BRI1 and BAK1 Canonical Distribution in Plasma Membrane Is HSP90 Dependent. *Cells.* 2022 Oct 22;11(21):3341. doi: 10.3390/cells11213341. PMID: 36359737; PMCID: PMC9656807
- Samakovli, D., Roka, L., Plitsi, P. K., Kaltsa, I., Daras, G., Milioni, D., & Hatzopoulos, P. (2019). Active BR signalling adjusts the subcellular localisation of BES1/HSP90 complex formation. *Plant Biology*, 22(1), 129–133. <https://doi.org/10.1111/plb.13040>
- Samakovli D, Thanou A, Valmas C, Hatzopoulos P. Hsp90 canalizes developmental perturbation. *J Exp Bot.* 2007;58(13):3513-24. doi: 10.1093/jxb/erm191. PMID: 18057034.
- Sawarkar R, Paro R. Hsp90@chromatin.nucleus: an emerging hub of a networker. *Trends Cell Biol.* 2013 Apr;23(4):193-201. doi: 10.1016/j.tcb.2012.11.007. Epub 2013 Jan 1. PMID: 23286900.
- Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Kröber S, Amasino RA, Coupland G. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in Arabidopsis. *Genes Dev.* 2006 Apr 1;20(7):898-912. doi: 10.1101/gad.373506. PMID: 16600915; PMCID: PMC1472290.
- Semenza JC, Hardwick KG, Dean N, Pelham HR. 1990. ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* 61, 1349–1357.
- Shao J, Irwin A, Hartson SD, Matts RL. Functional dissection of cdc37: characterization of domain structure and amino acid residues critical for protein kinase binding. *Biochemistry.* 2003 Nov 4;42(43):12577-88. doi: 10.1021/bi035138j. PMID: 14580204.
- Shigeta, T., Zaizen, Y., Asami, T. et al. Molecular evidence of the involvement of heat shock protein 90 in brassinosteroid signaling in Arabidopsis T87 cultured cells. *Plant Cell Rep* 33, 499–510 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1550-y>
- Shigeta, T., Zaizen, Y., Sugimoto, Y., Nakamura, Y., Matsuo, T., & Okamoto, S. (2015). Heat shock protein 90 acts in brassinosteroid signaling through interaction with BES1/BZR1 transcription factor. *Journal of Plant Physiology*, 178, 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.02.003>
- Simpson GG. The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. *Curr Opin Plant Biol.* 2004 Oct;7(5):570-4. doi: 10.1016/j.pbi.2004.07.002. PMID: 15337100.
- Schneider T, Oikarinen J, Ishiwatari-Hayasaka H, Yahara I, Csermely P. Interactions of Hsp90 with histones and related peptides. *Life Sci.* 1999;65(22):2417-26. doi: 10.1016/s0024-3205(99)00508-1. PMID: 10597896.
- Smaczniak C, Immink RG, Muiño JM, Blanvillain R, Busscher M, Busscher-Lange J, Dinh QD, Liu S, Westphal AH, Boeren S, Parcy F, Xu L, Carles CC, Angenent GC, Kaufmann K. Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jan 31;109(5):1560-5. doi: 10.1073/pnas.1112871109. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22238427; PMCID: PMC3277181.
- Somers DE. HSP90 in morphogenesis: taking the heat and keeping the dark. *New Phytol.* 2023 Aug;239(4):1157-1159. doi: 10.1111/nph.19062. Epub 2023 Jun 9. PMID: 37292049.
- Sorger PK, Pelham HR. Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *EMBO J.* 1987 Oct;6(10):3035-41. doi: 10.1002/j.1460-2075.1987.tb02609.x. PMID: 3319580; PMCID: PMC553740.
- Tang W, Kim TW, Osés-Prieto JA, Sun Y, Deng Z, Zhu S, Wang R, Burlingame AL, Wang ZY. BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in Arabidopsis. *Science.* 2008 Jul 25;321(5888):557-60. doi: 10.1126/science.1156973. PMID: 18653891; PMCID: PMC2730546.

- Tang W, Yuan M, Wang R, Yang Y, Wang C, Osés-Prieto JA, Kim TW, Zhou HW, Deng Z, Gampala SS, Gendron JM, Jonassen EM, Lillo C, DeLong A, Burlingame AL, Sun Y, Wang ZY. PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol.* 2011 Feb;13(2):124-31. doi: 10.1038/ncb2151. Epub 2011 Jan 23. PMID: 21258370; PMCID: PMC3077550.
- Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Jul;11(7):515-28. doi: 10.1038/nrm2918. Epub 2010 Jun 9. PMID: 20531426.
- Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M, Kayatekin C, Westover KD, Karras GI, Lindquist S. Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell.* 2012 Aug 31;150(5):987-1001. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.047. PMID: 22939624; PMCID: PMC3894786.
- Tamura K, Shimada T, Ono E, Tanaka Y, Nagatani A, Higashi SI, Watanabe M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *Plant J.* 2003 Aug;35(4):545-55. doi: 10.1046/j.1365-313x.2003.01822.x. PMID: 12904216.
- Tereza Tichá and others, Multifaceted roles of HEAT SHOCK PROTEIN 90 molecular chaperones in plant development, *Journal of Experimental Botany*, Volume 71, Issue 14, 6 July 2020, Pages 3966–3985, <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa177>
- Tiroli-Cepeda AO, Ramos CH. An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis. *Protein Pept Lett.* 2011 Feb;18(2):101-9. doi: 10.2174/092986611794475093. PMID: 21121892.
- Toft D., Meng X., Devin J., Sullivan W., Baulieu E., Catelli M. Mutational analysis of Hsp90 alpha dimerization and subcellular localization: Dimer disruption does not impede “in vivo” interaction with estrogen receptor. *J. Cell Sci.* 1996;109:1677–1687.
- Tsutsumi S, Mollapour M, Prodromou C, Lee CT, Panaretou B, Yoshida S, Mayer MP, Neckers LM. Charged linker sequence modulates eukaryotic heat shock protein 90 (Hsp90) chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 21;109(8):2937-42. doi: 10.1073/pnas.1114414109. Epub 2012 Feb 6. PMID: 22315411; PMCID: PMC3287002.
- Uemura T, Ueda T. Plant vacuolar trafficking driven by RAB and SNARE proteins. *Curr Opin Plant Biol.* 2014 Dec;22:116-121. doi: 10.1016/j.pbi.2014.10.002. PMID: 25460076.
- Ueda T, Uemura T, Sato MH, Nakano A. Functional differentiation of endosomes in Arabidopsis cells. *Plant J.* 2004 Dec;40(5):783-9. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02249.x. PMID: 15546360.
- Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F, Chory J. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:177-201. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.090704.151241. PMID: 16212492.
- van Oosten-Hawle P. Organismal Roles of Hsp90. *Biomolecules.* 2023 Jan 29;13(2):251. doi: 10.3390/biom13020251. PMID: 36830620; PMCID: PMC9952938.
- Viotti C. ER and vacuoles: never been closer. *Front Plant Sci.* 2014 Feb 4;5:20. doi: 10.3389/fpls.2014.00020. PMID: 24550928; PMCID: PMC3913007.
- Wang X, Chen J, Xie Z, Liu S, Nolan T, Ye H, Zhang M, Guo H, Schnable PS, Li Z, Yin Y. Histone lysine methyltransferase SDG8 is involved in brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant.* 2014 Aug;7(8):1303-1315. doi: 10.1093/mp/ssu056. Epub 2014 May 16. PMID: 24838002.
- Wang X, Chory J. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science.* 2006 Aug 25;313(5790):1118-22. doi: 10.1126/science.1127593. Epub 2006 Jul 20. PMID: 16857903.
- Wang X, Gao J, Gao S, Li Z, Kuai B, Ren G. REF6 promotes lateral root formation through de-repression of PIN1/3/7 genes. *J Integr Plant Biol.* 2019 Apr;61(4):383-387. doi: 10.1111/jipb.12726. Epub 2018 Dec 2. PMID: 30267471.
- Wang X, Gao J, Gao S, Song Y, Yang Z, Kuai B. The H3K27me3 demethylase REF6 promotes leaf senescence through directly activating major senescence regulatory and functional genes in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 2019 Apr 10;15(4):e1008068. doi: 10.1371/journal.pgen.1008068. PMID: 30969965; PMCID: PMC6457497.

- Wang L., Li H., Lv X., Chen T., Li R., Xue Y., Jiang J., Jin B., Baluška F., Šamaj J., et al. Spatiotemporal Dynamics of the BRI1 Receptor and its Regulation by Membrane Microdomains in Living Arabidopsis Cells. *Mol. Plant*. 2015;8:8,1334–1349. doi: 10.1016/j.molp.2015.04.005
- Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T, Chory J. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell*. 2002 Apr;2(4):505-13. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00153-3. PMID: 11970900.
- Wang X, Kota U, He K, Blackburn K, Li J, Goshe MB, Huber SC, Clouse SD. Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Dev Cell*. 2008 Aug;15(2):220-35. doi: 10.1016/j.devcel.2008.06.011. PMID: 18694562.
- Whitesell L, Lindquist S. Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert Opin Ther Targets*. 2009 Apr;13(4):469-78. doi: 10.1517/14728220902832697. PMID: 19335068
- Wong, M. M. (2020, September 14). Trafficking of VHA-a isoforms in Arabidopsis thaliana (bioRxiv). *Plantae*. <https://plantae.org/trafficking-of-vha-a-isoforms-in-arabidopsis-thaliana-biorxiv/>
- Wu Y, Ding Y, Zheng X, Liao K. The molecular chaperone Hsp90 maintains Golgi organization and vesicular trafficking by regulating microtubule stability. *J Mol Cell Biol*. 2020 Jul 3;12(6):448-461. doi: 10.1093/jmcb/mjz093. PMID: 31560394; PMCID: PMC7333477.
- Xu ZS, Li ZY, Chen Y, Chen M, Li LC, Ma YZ. 2012. Heat shock protein 90 in plants: molecular mechanisms and roles in stress responses. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 15706–15723., Krishna P, Gloor G. 2001
- Xu W, Mimnaugh EG, Kim JS, Trepel JB, Neckers LM. Hsp90, not Grp94, regulates the intracellular trafficking and stability of nascent ErbB2. *Cell Stress Chaperones*. 2002 Jan;7(1):91-6. doi: 10.1379/1466-1268(2002)007<0091:hngrti>2.0.co;2. PMID: 11892991; PMCID: PMC514806
- Xu W, Zhou B, Zhao X, Zhu L, Xu J, Jiang Z, Chen D, Wei Q, Han M, Feng L, Wang S, Wang X, Zhou J, Jin H. KDM5B demethylates H3K4 to recruit XRCC1 and promote chemoresistance. *Int J Biol Sci*. 2018 Jun 22;14(9):1122-1132. doi: 10.7150/ijbs.25881. PMID: 29989047; PMCID: PMC6036731.
- Yabe N, Takahashi T, Komeda Y. Analysis of tissue-specific expression of Arabidopsis thaliana HSP90-family gene HSP81. *Plant Cell Physiol*. 1994 Dec;35(8):1207-19. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078715. PMID: 7697294
- Yan W, Chen D, Smaczniak C, Engelhorn J, Liu H, Yang W, Graf A, Carles CC, Zhou DX, Kaufmann K. Dynamic and spatial restriction of Polycomb activity by plant histone demethylases. *Nat Plants*. 2018 Sep;4(9):681-689. doi: 10.1038/s41477-018-0219-5. Epub 2018 Aug 13. PMID: 30104650.
- Yang C, Bratzel F, Hohmann N, Koch M, Turck F, Calonje M. VAL- and AtBMI1-mediated H2Aub initiate the switch from embryonic to postgerminative growth in Arabidopsis. *Curr Biol*. 2013 Jul 22;23(14):1324-9. doi: 10.1016/j.cub.2013.05.050. Epub 2013 Jun 27. PMID: 23810531.
- Yan W, Chen D, Smaczniak C, Engelhorn J, Liu H, Yang W, Graf A, Carles CC, Zhou DX, Kaufmann K. Dynamic and spatial restriction of Polycomb activity by plant histone demethylases. *Nat Plants*. 2018 Sep;4(9):681-689. doi: 10.1038/s41477-018-0219-5. Epub 2018 Aug 13. PMID: 30104650.
- Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*. 2002 Apr 19;109(2):181-91. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00721-3. PMID: 12007405.
- Young JC, Barral JM, Ulrich Hartl F. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci*. 2003 Oct;28(10):541-7. doi: 10.1016/j.tibs.2003.08.009. PMID: 14559183.
- Yu X, Li L, Li L, Guo M, Chory J, Yin Y. Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by Jumonji domain-containing proteins ELF6 and REF6 in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 27;105(21):7618-23. doi: 10.1073/pnas.0802254105. Epub 2008 May 8. PMID: 18467490; PMCID: PMC2396691.

- Zander M, Willige BC, He Y, Nguyen TA, Langford AE, Nehring R, Howell E, McGrath R, Bartlett A, Castanon R, Nery JR, Chen H, Zhang Z, Jupe F, Stepanova A, Schmitz RJ, Lewsey MG, Chory J, Ecker JR. Epigenetic silencing of a multifunctional plant stress regulator. *Elife*. 2019 Aug 16;8:e47835. doi: 10.7554/eLife.47835. PMID: 31418686; PMCID: PMC6739875.
- Zeng Y, Wang J, Huang S, Xie Y, Zhu T, Liu L, Li L. HSP90s are required for hypocotyl elongation during skotomorphogenesis and thermomorphogenesis via the COP1-ELF3-PIF4 pathway in Arabidopsis. *New Phytol*. 2023 Aug;239(4):1253-1265. doi: 10.1111/nph.18776. Epub 2023 Feb 21. PMID: 36707919.
- Zhang D, Jing Y, Jiang Z, Lin R. The Chromatin-Remodeling Factor PICKLE Integrates Brassinosteroid and Gibberellin Signaling during Skotomorphogenic Growth in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2014 Jun;26(6):2472-2485. doi: 10.1105/tpc.113.121848. Epub 2014 Jun 10. PMID: 24920333; PMCID: PMC4114946.
- Zhang, K., Duan, M., Zhang, L., Li, J., Shan, L., Zheng, L., & Liu, J. (2022). HOP1 and HOP2 are involved in salt tolerance by facilitating the brassinosteroid-related nucleo-cytoplasmic partitioning of the HSP90-BIN2 complex. *Plant Cell and Environment*, 45(12), 3551–3565. <https://doi.org/10.1111/pce.14441>
- Zhang L, Xing J, Lin J. At the intersection of exocytosis and endocytosis in plants. *New Phytol*. 2019 Dec;224(4):1479-1489. doi: 10.1111/nph.16018. Epub 2019 Aug 4. PMID: 31230354.
- Zhao R, Davey M, Hsu YC, Kaplanek P, Tong A, Parsons AB, Krogan N, Cagney G, Mai D, Greenblatt J, Boone C, Emili A, Houry WA. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):715-27. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.024. PMID: 15766533.
- Zhou J, Liu D, Wang P, Ma X, Lin W, Chen S, Mishev K, Lu D, Kumar R, Vanhoutte I, Meng X, He P, Russinova E, Shan L. Regulation of Arabidopsis brassinosteroid receptor BRI1 endocytosis and degradation by plant U-box PUB12/PUB13-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Feb 20;115(8):E1906-E1915. doi: 10.1073/pnas.1712251115. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29432171; PMCID: PMC5828578.
- Zulkarnain Chowdhury, Devasantosh Mohanty, Mrunmay K Giri, Barney J Venables, Ratnesh Chaturvedi, Aaron Chao, Robby A Petros, Jyoti Shah, Dehydroabietinal promotes flowering time and plant defense in Arabidopsis via the autonomous pathway genes FLOWERING LOCUS D, FVE, and RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6, *Journal of Experimental Botany*, Volume 71, Issue 16, 6 August 2020, Pages 4903–4913, <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa232>