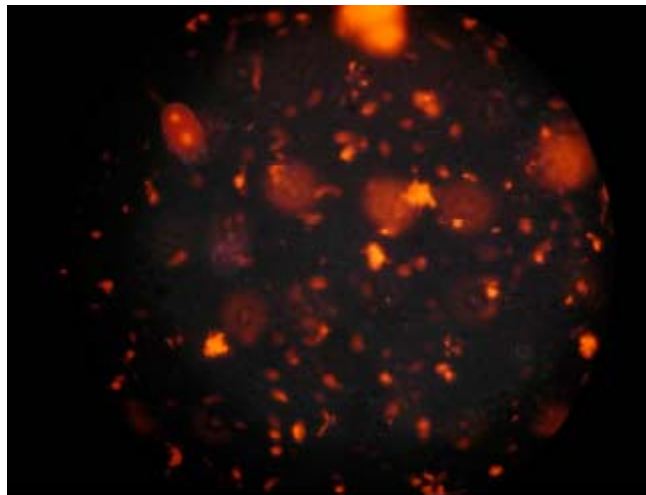


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

Διατριβή μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης
Δαλακούρας Αθανάσιος



RNA-εξαρτώμενη μεθυλίωση και παραγωγή ομόλογων siRNAs
σε διαγονιδιακά φυτά καπνού *Nicotiana tabacum*
που εκφράζουν δίκλωνο RNA του ιού CMV.

Επιβλέπων καθηγητής: Κοτζαμπάσης Κυριάκος
Συνεπιβλέπων ερευνητής: Καλαντίδης Κρίτων

Ηράκλειο
2006

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τους παρακάτω:

Τον ερευνητή Κρίτωνα Καλαντίδη για την εμπιστοσύνη, την συνεχή συμπαράσταση και καθοδήγηση, την επιλογή του θέματος και την έμπνευση.

Τον καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση για την καθοριστική του συμβολή στην διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Την καθηγήτρια Μίνα Τσαγρή και τον καθηγητή Νίκο Πανόπουλο για τις πολύτιμες υποδείξεις τους.

Την τεχνικό Σεργία Τζωρτζακάκη και τους διδακτορικούς φοιτητές Νίκο Βρεττό, Τάσο Αλεξιάδη, Κώστα Καραντεμίρη και Παναγιώτη Σαρρή για την καθημερινή βοήθεια.

Τους γονείς μου για τον χρηματικό παρασιτισμό.

Επιτροπή αξιολόγησης:

Καθηγητής Κοτζαμπάσης Κυριάκος

Καθηγήτρια Μίνα Τσαγρή

Ερευνητής Καλαντίδης Κρίτων

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Η μεγάλη σημασία των μικρών RNA μορίων. Η γονιδιακή σίγηση.....	2
1.2. Βασικοί πρωταγωνιστές. Οι πρωτείνες της σίγησης.....	3
1.3. Το σύστημα των miRNAs. Ετεροσίγηση.....	4
1.4. Το σύστημα των siRNAs.....	6
1.5. Η μεθυλίωση. Βιοχημικά/βιολογικά χαρακτηριστικά.....	8
1.6. Incipit tragoedia. Η μεθυλίωση ως κάλεσμα για σίγηση.....	9
1.7. Μοντέλο της RdDM. Οι διαγονιδιακές σειρές CMV.....	16
2. Υλικά και μέθοδοι.....	19
2.1. Υλικά.....	20
2.2. Μέθοδοι μοριακής κλωνοποίησης.....	20
2.3. Απομόνωση RNA από φύλλα.....	20
2.4. Απομόνωση DNA από φύλλα.....	21
2.5. Αποτύπωμα κατά Northern.....	22
2.6. Αποτύπωμα κατά Southern.....	23
2.7. Δημιουργία DNA ραδιενεργού ανιχνευτή.....	24
2.8. Αγροεμποτισμός.....	24
2.9. Ισοτακοφόρηση.....	24
2.10. Απομόνωση πυρήνων.....	25
2.11. Μεταγραφή RUN-ON.....	26
2.12. Αλκαλική υδρόλυση του μεταγράφου.....	27
2.13. TAIL-PCR.....	27
3. Αποτελέσματα.....	31
3.1. Ανάλυση μεθυλίωσης των πολλαπλών αντιγράφων των διαγονιδίων.....	32
3.2. Αγροεμποτισμός με την Reo-sigma3.....	35
3.3. Απομόνωση πυρήνων και RUN-ON μεταγραφή.....	37
3.4. Εξέταση του 3' άκρου του μεταγράφου με Southern και TAIL-PCR.....	40
4. Συζήτηση.....	42
Βιβλιογραφία.....	48

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1. Η μεγάλη σημασία των μικρών RNA μορίων. Η γονιδιακή σίγηση.

Ο όρος *γονιδιακή σίγηση* αναφέρεται σε μία σειρά συντονισμένων διαδικασιών που έχουν ως αποτέλεσμα την ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου σε μεταγραφικό (Transcriptional Gene Silencing, TGS) ή μετά-μεταγραφικό επίπεδο (Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS). Μικρά RNA μόρια αποτελούν τον κεντρικό ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης στα τέσσερα ευκαρυωτικά βασίλεια (πρώτιστα, μύκητες, φυτά, ζώα) με την αξιοσημείωτη εξαίρεση της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*. Ο κεντρικός μηχανισμός είναι σχετικά συντηρημένος, χωρίς να λείπουν βασικές διαφορές, με αποτέλεσμα να έχει καθιερωθεί η γονιδιακή σίγηση μέσω των μικροριβορυθμιστών να αναφέρεται στους μύκητες ως *quelling*, στα ζώα *RNA interference* (RNAi) και στα φυτά γενικά ως *RNA silencing*. Η συμμετοχή της σίγησης σε μια πληθώρα φαινομένων που εκτείνονται από την διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας και την σωστή αναπτυξιακή διαδικασία μέχρι την απόκριση σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις την καθιστούν επιστημονικό φαινόμενο κεφαλαιώδους σημασίας.

Η γονιδιακή σίγηση στα φυτά είναι η πιο πλουραλιστική, διαθέτοντας όλους τους τρόπους που έχουν γίνει μέχρι τώρα γνωστοί. Η πολυπλοκότητα του κάθε συστήματος και η αλληλεπίδραση των συστημάτων μεταξύ τους, καθιστούν εξαιρετικά επικίνδυνη την προσπάθεια αναγωγής της όλης διαδικασίας σε έναν ορισμό ή αξίωμα. Για παράδειγμα, υπάρχουν διακριτοί ρόλοι για την μορφή της σίγησης (μεταγραφική ή μετα-μεταγραφική), για την ταυτότητα των μικροριβορυθμιστών (micro RNAs/miRNAs, small interfering RNAs/siRNAs, trans-acting small interfering RNAs/tasiRNAs, natural small interfering RNAs/natsiRNAs) ή ακόμα και για την πολυδύναμη λειτουργία του κάθε ρυθμιστή (αναστολή μετάφρασης ή εγκοπή του στόχου mRNA ή μεθυλίωση του ομόλογου DNA κτλ). Η ανάλυση, λοιπόν, του κάθε συστήματος στα επιμέρους συστατικά του και η παρουσία των πρωταγωνιστών της θαυμαστής αυτής εξελικτικής διαδικασίας παρουσιάζονται παρακάτω.

1.2. Βασικοί πρωταγωνιστές. Οι πρωτεΐνες της σίγησης.

Ο βασικός μηχανισμός και οι πρωτεΐνες που σχετίζονται στη σίγηση μέσω RNA είναι συντηρημένα ανάμεσα στα βασίλεια, χωρίς να εκλείπουν όμως σημαντικές διαφορές στο ακριβές εμπλεκόμενο μονοπάτι που θα ακολουθηθεί, ένεκα διαφορετικού οργανισμού, φύσης του γονιδίου-στόχου και τρόπου εισαγωγής του εναρκτήριου μορίου σίγησης (Susi et al., 2004).

Η οικογένεια Dicer.

Πρόκειται για ATP-εξαρτώμενες ενδονουκλεάσες, με αμινοτελικό DExH κουτί, PAZ περιοχή (ακρωνύμιο των Piw*i*-Argonaute-Zwille), 2 μοτίβα RNaseIII και μια καρβοξυτελική dsRNA-δεσμεύουσα περιοχή (Schauer et al., 2002). Τα φυτά διαθέτουν πολλές πρωτεΐνες ομοιάζουσες της Dicer (Dicer-Like, DCLs). Η DCL1 συμμετέχει στην παραγωγή των miRNAs και των natsi-RNAs (natural siRNAs) 21 νουκλεοτιδίων (Borsani et al., 2005), ενώ είναι εξαιρετικού ενδιαφέροντος το γεγονός ότι αποτελεί στόχο προς αποδόμηση του miRNA162 (Xie et al., 2003). Η DCL2 εμπλέκεται στη σίγηση μέσω ιών (Virus Induced Gene Silencing, VIGS) και στην παραγωγή natsi-RNAs 24 νουκλεοτιδίων (Vaucheret, 2006). Η διαδικασία της μεθυλίωσης του DNA απαιτεί τη δράση της DCL3 (Xie et al., 2004) ενώ η DCL4 συναντάται στην παραγωγή των tasi-RNAs (trans-acting siRNAs) (Allen et al., 2005) και πιθανότατα στην παραγωγή του συστηματικού σήματος. Χαρακτηριστικό της εγκοπής με μέλος της οικογενείας αυτής των ενδονουκλεασών είναι το 5'-φωσφορικό και 3'-υδροξυλικό άκρο καθώς και μια ουρά 2 νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των παραγόμενων dsRNAs.

Η οικογένεια των Αργοναυτών.

Με μια αμινοτελική PAZ περιοχή που αλληλεπιδρά με τα προεκτεινόμενα 3' ακρα των μικρών RNAs και μια καρβοξυτελική PIWI περιοχή με δράση ομοιάζουσα της RNaseH, οι Αργοναύτες έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην διαδικασία της σίγησης. Στο *Arabidopsis thaliana* έχουν ταυτοποιηθεί 10 μέλη της οικογενείας με διακριτούς ρόλους: η AGO1 (*Slicer*) ευθύνεται για την εγκοπή του στόχου σε μορφές σίγησης προερχόμενες από διαγονίδιο σε νοηματικό προσανατολισμό (Sense silencing, *S-silencing*) αλλά όχι

από διαγονίδιο αμφίδρομου προσανατολισμού (Inverted Repeat silencing, *IR-silencing*), μαρτυρώντας συνεργιστική δράση των AGOs (Ronemus et al., 2006). Επιπρόσθετα, η AGO1 συμμετέχει στο μονοπάτι των miRNAs αλλά και των tasi-RNAs (TAS1/TAS2), ενώ ο ρόλος της εξάλλου σε αναπτυξιακές διαδικασίες είναι καταλυτικός (Meins et al., 2005). Αξίζει να αναφερθεί στο σημείο αυτό ότι η AGO1 αποτελεί στόχο του miR168 (Vaucheret et al., 2004). Οι διαδικασίες μεθυλίωσης του DNA/ιστονών απαιτούν τη δράση της AGO4 (Zilberman et al., 2003), ενώ η AGO7 φαίνεται ότι είναι υπεύθυνη για την παραγωγή κάποιων tasi-RNAs (TAS3) (Qi et al., 2005).

Το σύμπλοκο RISC.

Αποτελεί ακρωνύμιο του RNA-Induced-Silencing-Complex. Κεντρικό του συστατικό είναι η AGO1, αναγνωρίζοντας το μονόκλωνο μικροριβορυθμιστή (miRNA/siRNA), ενσωματώνοντάς τον στο σύμπλοκο και οδηγώντας στην εγκοπή του στόχου, την αναστολή της μετάφρασης ή την μεθυλίωση ομόλογων αλληλουχιών DNA.

RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες.

Οι πολυμεράσες αυτές παράγουν συμπληρωματικό RNA από μήτρα μονόκλωνο RNA, με τη βοήθεια ή όχι κάποιου ιχνηλάτη. Στους ιούς ονομάζονται RdRPs ενώ πρόσφατα καθιερώθηκε στους ευκαρυώτες να ονομάζονται RDRs (Wassenegger, 2006). Η RDR1 επάγεται μετά από μόλυνση ιού (Dorssers et al., 1984), ιοειδούς (Khan et al., 1986) ή από σαλικυλικό οξύ (Xie et al., 2001). Η RDR2 σχετίζεται με την μεθυλίωση του DNA (Vaucheret, 2005), και η RDR6 με το *S-silencing* (όχι όμως και με το *IR-silencing*) και την παραγωγή/επεξεργασία των εκτρόπων RNAs (aberrant RNAs, *abRNAs*), των tasi-RNAs και των natsi-RNAs (Vaucheret, 2006). Όπως παρατηρεί κανείς, οι RDRs δεν εμπλέκονται στο miRNA μονοπάτι.

1.3. Το σύστημα των miRNAs. Ετεροσίγηση.

Τα miRNAs είναι ενδογενή μικρά RNAs που παράγονται από γονίδια διακριτά από αυτά που ρυθμίζουν, δικαιολογώντας έτσι τον όρο ετεροσίγηση/trans δράση (Bartel, 2004).

Η διαδικασία παραγωγής τους αλλά και ο τρόπος δράσης τους διαφέρει στα φυτά και στα ζώα. Και στα δύο, μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II ως πρόδρομα pri-miRNAs των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται από εκατοντάδες ως χιλιάδες νουκλεοτίδια (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004; Parizotto et al., 2004), ενώ αξιωματικά ότι μπορούν να αποτελούν αυτόνομες μεταγραφικές μονάδες ή να μεταγράφονται πολυκιστρονικά (Reinhardt et al., 2002)

Στα ζώα, η πυρηνική τύπου RNaseIII ενδονουκλεάση Drosha, σε συνεργασία με μια dsRNA-δεσμεύουσα πρωτεΐνη, την Pasha, κόβει το ένα άκρο του pri-miRNA για να διαμορφώσει το ~70 νουκλεοτιδίων pre-miRNA (Lee et al., 2002, Han et al., 2004). Το pre-miRNA αναγνωρίζεται και εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα από την πρωτεΐνη Exportin 5/RanGTP. Εκεί, μια δεύτερη ενδονουκλεάση τύπου RNaseIII, η Dicer, μαζί με μια dsRNA-binding πρωτεΐνη, την Loquacious, δημιουργούν το δεύτερο κόψιμο που θα καθορίσει το άλλο άκρο του miRNA, απελευθερώνοντας το ώριμο ~21 νουκλεοτιδίων δίκλωνο miRNA/miRNA* (Hutvagner et al., 2001), η μια αλυσίδα του οποίου, αυτή με το λιγότερο θερμοδυναμικά σταθερό 5' άκρο (Schwarz et al., 2003), θα ενσωματωθεί στο σύμπλοκο RISC και η άλλη θα αποδομηθεί. Το σύμπλοκο miRNA/RISC θα αναγνωρίσει το στόχο του mRNA μέσω μιας μικρής περιοχής συμπληρωματικότητας (*seed region*) συνήθως στο 3'-UTR του και θα οδηγήσει κατά κανόνα σε αναστολή της μετάφρασης, χωρίς να λείπουν οι περιπτώσεις αποδόμησης του στόχου (Yekta et al., 2004) αλλά και αποαδενιλίωσής του (Wu et al., 2006).

Στα φυτά, η Dicer-Like 1 (DCL1) ενδονουκλεάση, εντοπίζεται στον πυρήνα και ευθύνεται και για τις δυο επεξεργασίες δημιουργίας pre-miRNA από pri-miRNA και miRNA από pre-miRNA (Park et al., 2002), χρησιμοποιώντας ως dsRNA-binding πρωτεΐνη την HYL1 (Papp et al., 2003). Το προκύπτον δίκλωνο miRNA/miRNA* αναγνωρίζεται και εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα από την πρωτεΐνη HASTY (ορθόλογη της Exportin-5) και η μια θερμοδυναμικά πάλι προτιμώμενη αλυσίδα ενσωματώνεται στο σύμπλοκο RISC στο κυτταρόπλασμα (Park et al., 2005), αναγνωρίζοντας συνήθως με τέλεια συμπληρωματικότητα τον στόχο του (από το 5' ως το 3' άκρο του) και αποδομώντας τον (Εικόνα 1.1), αν και αναφορές για μεταφραστική παρεμπόδιση έχουν γίνει για το AP2/miR172 (Aukerman & Sakai, 2003), χωρίς να λείψουν οι ενστάσεις (Schwab et al., 2005). Γενικά, η τύχη ενός φυτικού miRNA στόχου

είναι η αποδόμησή του από τη συνισταμένη δράση μιας 5'→3' εξωριβονουκλεάσης και του εξοσώματος (3'→5' εξωριβονουκλεάση, δράση ενισχυόμενη από υπογραφή 3'-ολιγοουριδίνης).

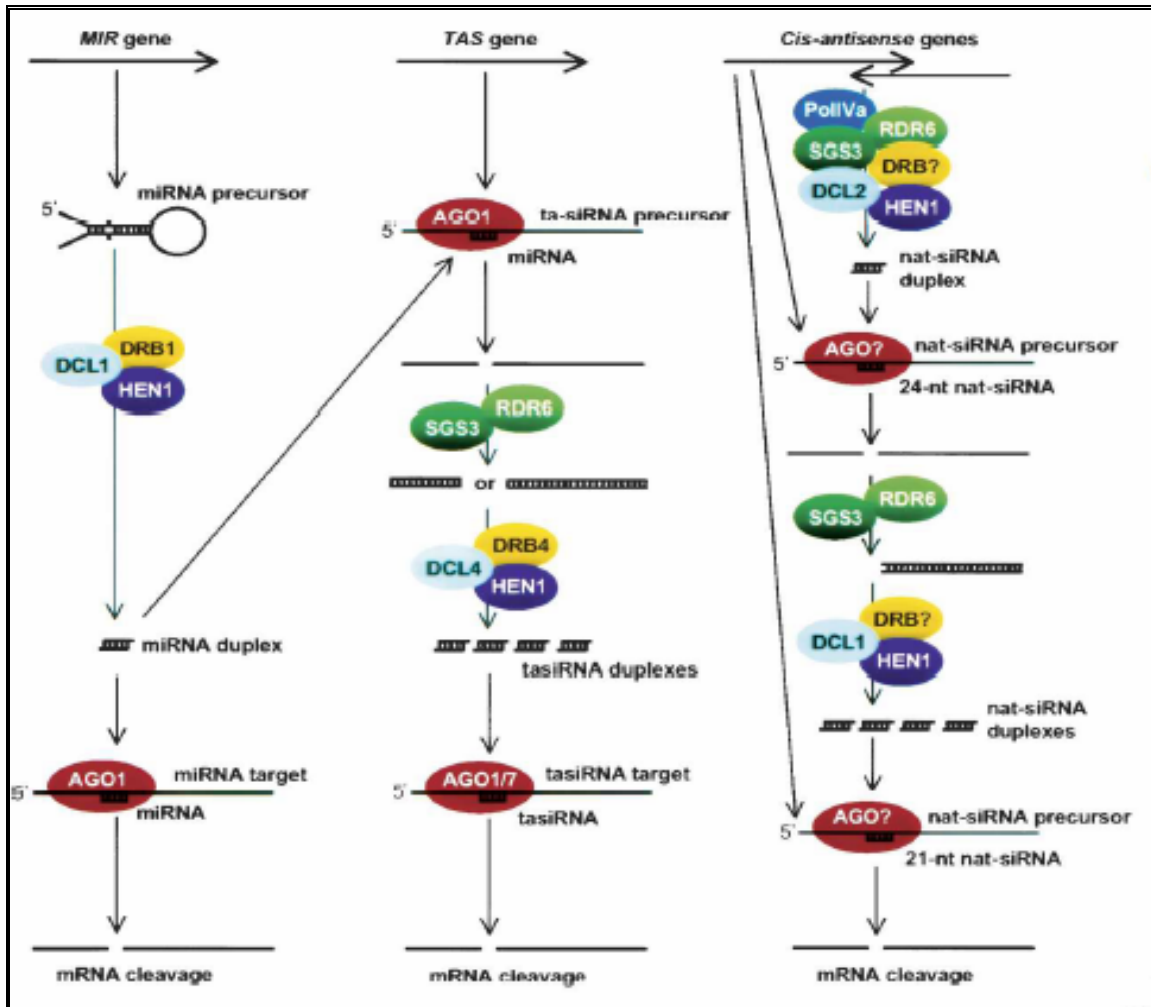
Θα πρέπει στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι τα φυτικά miRNAs, σε αντίθεση με τα ζωικά που έχουν 5' φωσφορικό και 3' υδροξυλικό άκρο, έχουν μεθυλομάδα στο 2'-Ο της ριβόζης τους, δραση που καταλύεται από την μεθυλτρανσφεράση HEN1 και θεωρείται ότι προστατεύει τα miRNAs από ουριδινυλίωση ή τα αποτρέπει από το να δράσουν ως εκκινήτες για RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμερασες (RDRs) (Yu et al., 2005). Εξάλλου αυτή είναι μία μονο διαφορά των φυτικών από τα ζωικά miRNAs, με τις υπόλοιπες να έχουν να κάνουν, τόσο με την βιοσύνθεση όσο και το τρόπο δράσης τους.

1.4. Το σύστημα των siRNAs.

Τα siRNAs σε αντίθεση με τα miRNAs παρουσιάζουν cis δράση και δικαιολογημένα έχουν χαρακτηριστεί ως βασικά συστατικά της αυτοσίγησης (Bartel, 2004). Κατά την δημιουργία dsRNA στο εσωτερικό ευκαρυωτικού κυττάρου (λόγω μόλυνσης από ιό, δραστηριότητας μεταθετών στοιχείων, ύπαρξη διαγονιδίου σε sense/antisense/IR προσανατολισμό) η Dicer (DCL στα φυτά) το αναγνωρίζει και το κόβει, με αποτέλεσμα τη δημιουργία δίκλωνων siRNAs μήκους 21-26 νουκλεοτιδίων, με φωσφορυλιωμένο το 5' άκρο, μεθυλιωμένο το 3' άκρο (δράση της HEN1) και ουρά 2 νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο (Yu et al., 2005). Στα φυτά, η μια αλυσίδα του siRNA θα ενσωματωθεί στο RISC και θα οδηγήσει σε αποδόμηση του συμπληρωματικού mRNA-στόχου στο κυτταρόπλασμα, ενώ η δράση του στον πυρήνα σχετίζεται με την μεθυλίωση του DNA (βλέπε παρακάτω).

Γενικά, η διαδικασία της σίγησης μέσω siRNAs προϋποθέτει μια *αρχική φάση*, κατά την οποία παράγεται ο στόχος RNA πάνω από ένα κρίσιμο σημείο (*threshold*), και μία *φάση ενίσχυσης* (Baulcombe, 2004), κατά των οποία η RDR6 θα παράξει dsRNA και κατά συνέπεια siRNAs κατά την εμφάνιση κάποιου έκτροπου abRNA, αποτέλεσμα ανορθόδοξης επεξεργασίας μεταγράφου. Η παραγωγή abRNAs από διαγονίδια είναι άλλωστε πολύ πιο συχνή από την αντίστοιχη από ενδογονίδια, αν αναλογιστεί κανείς την

παρουσία στοιχείων μη-ευκαρυωτικής φύσης (π.χ. CaMV 35S υποκινητής) και την απουσία των απαραίτητων για σωστή επεξεργασία και συρραφή ιντρονίων. Η παρουσία δευτερευόντων siRNAs εμπλέκεται στην "μετατόπιση" της σίγησης (*transitive silencing*) (Tang et al., 2003), αλλά και σε άλλες σημαντικές για την σίγηση διαδικασίες, όπως η



Εικόνα 1.1. Το μονοπάτι των miRNAs, tasiRNAs και nat-siRNAs. Το ίδιο χρώμα αντικατοπτρίζει μέλη της ίδιας οικογένειας (DCLs, AGOs κτλ). Επεξηγήσεις για τον τρόπο βιοσύνθεσης και χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών παρουσιάζονται στο κείμενο.

εξάπλωση της σε όλο το φυτό (Voinnet et al., 1998) μέσω πλασμοδεσμάτων σε μικρή απόσταση (δράση siRNAs μήκους 21 nt) ή του ηθμού σε μεγάλη (*systemic silencing*, δράση siRNAs μήκους 25 nt) (Himber et al., 2003) αλλά και στην μεθυλίωση του DNA (Wassenegger, 2006, βλέπε παρακάτω).

Περαιτέρω πολυπλοκότητα προσέδωσε στο όλο σύστημα η εμφάνιση δύο νεών παικτών, των tasiRNAs και natsiRNAs (Εικόνα 1.1). Τα πρώτα, αποτελούν μια ομάδα ενδογενών μικροριβορυθμιστών, με βιογένεση ομοιάζουσα αυτή των siRNAs και δράση αυτή των miRNAs (*trans* δράση) (Allen et al., 2005). Συνοπτικά, το μετάγραφο του ενδογενούς TAS γονιδίου εγκόπτεται από συγκεκριμένο miRNA και ακολούθως επεξεργάζεται από την RDR6/SGS3 για να προκύψουν dsRNAs, και έπειτα της δράσης της DCL4, tasiRNAs. Τα natsiRNAs αποτελούν μια επιπρόσθετη ομάδα ενδογενών siRNAs που προέρχονται από ζευγάρια cis-antisense μεταγράφων, εμφανιζόμενων μεχρι στιγμής σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης (αλατότητα) στην *A.thaliana* (Borsani et al., 2005).

1.5. Η μεθυλίωση. Βιοχημικά/βιολογικά χαρακτηριστικά.

Στην οργανική χημεία, ο όρος μεθυλίωση αναφέρεται στην μεταφορά μιας μεθυλομάδας CH₃ σε ένα υπόστρωμα, ηλεκτρονιόφιλα ή πυρηνόφιλα. Όταν δε το υπόστρωμα αυτό είναι DNA, τότε η υπόθεση αποκτά εξαιρετικό ενδιαφέρον. Η μεθυλίωση του DNA λαμβάνει χώρα κατά την μεταφορά μιας μεθυλομάδας από την S-αδενοσυλμεθειονίνη (SAM) στην κυτοσίνη ή την αδερίνη, με αποτέλεσμα την ^{m5}C και ^{m4}C μεθυλίωση της κυτοσίνης, την ^{m4}C υδροξυμεθυλίωση της κυτοσίνης και την ^{m6}N μεθυλίωση της αδερίνης. Στα βακτήρια, το DNA μεθυλιώνεται από συστήματα περιορισμού/τροποποίησης με σκοπό την μείωση της έκτασης μόλυνσης από βακτηριοφάγο (dam, dcm, EcoK, EcoB, McrA, McrBC, Mrr μεθυλίωση). Στους ευκαρυώτες, η μεθυλίωση εξαρτάται όχι μόνο από το είδος, αλλά επίσης από τον τύπο κυττάρου και το αναπτυξιακό του στάδιο. Στα θηλαστικά, η DNA μεθυλίωση περιορίζεται στην ^{m5}C της κυτοσίνης του δινουκελοτιδίου CG, σε ποσοστό 5% του ολικού ολικού αριθμού κυτοσινών. Ας σημειωθεί ότι υπάρχουν νησίδες μη

μεθυλιωμένων CGs, συνήθως στο 5' μεταγραφόμενου DNA (ή καλύτερα κοντά στους υποκινητές των συστατικών γονιδίων *housekeeping genes*), αναφερόμενες ως *CG islands*. Αντίθετα, στα φυτά, η μεθυλίωση περιλαμβάνει τις αλληλουχίες CG, CNG αλλά και την ασύμμετρη CNN. Η μεθυλίωση του DNA αλλά και των ιστονών είναι υπεύθυνη για την μεταγραφική αλλά και μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων, μια λειτουργία που αναπτύσσεται αμέσως παρακάτω.

1.6. *Incipit tragoedia*. Η μεθυλίωση ως κάλεσμα για σίγηση.

Γενικά, η κυτοσίνη του DNA μπορεί να απαμινωθεί και να μετατραπεί σε ουρακίλη, κάτι που μπορεί να διορθωθεί (μέσω δράσης γλυκοσυλάσης) καθώς δεν αναγνωρίζεται σαν δεοξυριβονουκλεοτίδιο. Αντιθέτως, η απαμινωμένη μεθυλ-κυτοσίνη μετατρέπεται σε θυμίνη, κάτι που ο διορθωτικός μηχανισμός του κυττάρου δεν αντιλαμβάνεται (Lewin, 2004). Η σημασία όμως της μεθυλίωσης δεν περιορίζεται σε δημιουργία μεταλλάξεων αλλά επεκτείνεται και σε επιγενετικές τροποποιήσεις. Η χρωματίνη, το σύμπλοκο DNA και ιστονών, διακρίνεται στην μεταγραφική ενεργή ευχρωματίνη και την μεταγραφική ανενεργή ετεροχρωματίνη (Elgin, 2003). Η ετεροχρωματίνη περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες κεντρομερούς και ριβοσωμικού DNA (rDNA), καθώς και μεταθετά στοιχεία (Lippmann et al., 2003). Στην περίπτωση των επαναλήψεων, η ετεροχρωματίνη σταθεροποιεί το DNA έναντι ανακατατάξεων (Xu et al., 1999) ενώ στην περίπτωση των μεταθετών στοιχείων λαμβάνει χώρα καταστολή της μεταγραφής και δραστηριότητάς τους (Miura et al., 2001). Η δημιουργία ετεροχρωματίνης και συνεπακόλουθης σίγησης σχετίζεται με δυο κορυφαίες διαδικασίες: την μεθυλίωση των ιστονών και του DNA.

Η μεθυλίωση των ιστονών.

Το νουκλεόσωμα αποτελείται από ~147 bp DNA περιελισσόμενο σε ένα οκταμερές ιστονών (H2A, H2B, H3, H4). Οι ουρές των ιστονών μπορούν να υποστούν πολλές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση της σερίνης/θρεονίνης, ακετυλίωση της λυσίνης και μεθυλίωση της λυσίνης και της αργινίνης. Γενικά, η ευχρωματίνη χαρακτηρίζεται

από υπερακετυλίωση της λυσίνης και μεθυλίωση της λυσίνης στις θέσεις H3K4 και H3K36. Αντίθετα, η δημιουργία ετεροχρωματίνης συνοδεύεται από απεκετυλίωση της λυσίνης και μεθυλίωσή της στις θέσεις H3K9, H3K27 και H4K20 (Bernstein, 2005). Το γονίδιο DDM1 (Decreased in DNA Methylation), που ανήκει στην οικογένεια παραγόντων αναμόρφωσης της χρωματίνης SWI2/SNF2, συμμετέχει στη μεθυλίωση του DNA (Dennis et al., 2001), στην αδρανοποίηση μεταθετών στοιχείων και στην διατήρηση της ετεροχρωματίνης (Lipmann et al., 2004).. Εξάλλου, στην ίδια οικογένεια ανήκει και το γονίδιο DRD1 (Defective in RNA-Directed methylation), το οποίο συνδέεται με την μεθυλίωση στις αλληλουχίες CNN (Kanno et al., 2004) ενώ στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* έχουν βρεθεί 8 SUVH H3K9 μεθυλτρανσφεράσες (Bambush et al., 2001) με τις SUVH4/SUVH5/SUVH6 να μονο- και δι-μεθυλιώνουν την H3K9 (Bambush et al., 2001). Αντίστροφα, απομεθυλίωση των ιστονών έχει παρατηρηθεί και οφείλεται στην πρωτείνη LSD1.

Η μεθυλίωση του DNA.

Αποτελεί την κορυφαία επιγενετική τροποποίηση του γονιδιώματος. Είναι υπεύθυνη για την μεταγραφική σίγηση (Transcriptional Gene Silencing, TGS) και την μετα-μεταγραφική σίγηση (Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS). Στην πρώτη περίπτωση μιλάμε για παρεμπόδιση της μεταγραφής λόγω μεθυλίωσης του υποκινητή από αίτια που εκτείνονται από ομόλογα του υποκινητή siRNAs και στοιχεία βακτηριακής προέλευσης του T-DNA, ως ενσωμάτωση του διαγονιδίου σε ετεροχρωματίνη και σε περιοχές γειτονικές κρυπτικών υποκινητών (Eike et al., 2005). Στην δεύτερη περίπτωση μεθυλιώνεται η κωδική περιοχή αλλά αυτό δεν σταματάει την μεταγραφή της, με αποτέλεσμα να παράγονται συνεχώς τα αντίστοιχα siRNAs πιθανότατα και γιατί το ίδιο το μεθυλιωμένο μετάγραφο αναγνωρίζεται ως abRNA.

Όπως προαναφέρθηκε, στα φυτά στόχοι μεθυλίωσης αποτελούν οι συμμετρικές κυτοσίνες των αλληλουχιών CpG/CpNpG αλλά και οι μη-συμμετρικές της αλληλουχίας CpNpN. Η πρώτη περίπτωση μεθυλίωσης μπορεί να διατηρηθεί και να μεταδοθεί μέσω μείωσης στους απογόνους ενώ η δεύτερη όχι (Yada, 2005). Το γονιδίωμα του

Arabidopsis περιέχει τουλάχιστον 10 γονίδια DNA μεθυλτρανσφερασών που χωρίζονται σε 3 οικογένειες (Finnegan and Kovac, 2000).

Η μεθυλτρανσφεράση 1 (MET1), μεγέθους 175 kD είναι ορθόλογη της θηλαστικής Dnmt1, έχει μια μεγάλη αμινοτελική ρυθμιστική περιοχή και μια καρβοξυτελική καταλυτική περιοχή (Finnegan and Dennis, 1993). Στο *Arabidopsis* υπάρχουν 4 γονίδια για την οικογένεια *MET1* με προϊόντα υπεύθυνα για την διατήρηση της μεθυλίωσης στις αλληλουχίες CpG (Finnegan et al., 1996) και την επακόλουθη σίγηση διαγονιδίων (Jones et al., 2001).

Η DRM (Domain Rearranged Methyltransferase) αποτελεί τον δεύτερο τύπο μεθυλτρανσφεράσης, όμοια της θηλαστικής Dnmt3 (Cao et al., 2000), αλλά και σημαντικές αναμορφώσεις στα καταλυτικά μοτίβα I-V και VI-X. Στο *Arabidopsis* υπάρχουν 3 γονίδια αυτού του τύπου (*DRM1*, *DRM2*, *DRM3*), με χαρακτηριστικές περιοχές συσχέτισης με ουμπικουιτίνη και κύριο ρόλο των DRM1 και DRM2 την *de novo* μεθυλίωση των κυτοσινών όλων των πιθανών αλληλουχιών (CC/CNG/CNN) (Cao and Jacobsen, 2002).

Ο τρίτος τύπος μεθυλτρανσφεράσης αναφέρεται στην χρωμομεθυλάση CMT, αποκλειστικά εμφανιζόμενη στο φυτικό βασίλειο, περιέχουσα μια χαρακτηριστική χρωμοπεριοχή (*chromodomain*), χαρακτηριστική των πρωτεϊνών σχετιζόμενων με χρωματίνη (Cavalli, 1998). Στο *Arabidopsis* έχουν βρεθεί 3 γονίδια αυτού του τύπου (*CMT1*, *CMT2*, *CMT3*) με κυριότερο το *CMT3* με λειτουργία σχετιζόμενη με την διατήρηση της μεθυλίωσης στις αλληλουχίες CpNpN (Lindroth et al., 2001), πιθανότατα μέσω αρχικής αναγνώρισης του ετεροχρωματικού σινιάλου H3K9 (Lindroth et al., 2004) που δημιουργείται από την SUVH5. Ας υπενθυμηθεί ότι στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* έχουν βρεθεί 8 SUVH H3K9 μεθυλτρανσφεράσες (Bambush et al., 2001) με τις SUVH4/SUVH5/SUVH6 να μονο- και δι-μεθυλιώνουν την H3K9 και να ελέγχουν την δράση της CMT3 με έναν τρόπο εξαρτώμενο από τον εκάστοτε γονιδιακό τόπο (Ebbs and Bender, 2006).

Από την στιγμή λοιπόν που λάβει χώρα ^{m5}C μεθυλίωση μιας κυτοσίνης (μέσω της *de novo* δράσης της DRM1/2), αυτή μπορεί να διατηρηθεί στις αλληλουχίες CpG (δράση MET1) και CpNpG (δράση CMT3) αλλά όχι στην αλληλουχία CpNpN. Κατά την αντίστροφη διαδικασία, τα γονίδια *DME* και *ROS1* κωδικοποιούν για DNA

γλυκοσυλάση (Kinoshita et al., 2004) και DNA γλυκοσυλάση/λύαση αντίστοιχα (Gong et al., 2002) απομεθυλιώνοντας τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες. Άλλοι παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν σε απομεθυλίωση του DNA είναι οι χαμηλές θερμοκρασίες (Steward et al., 2002), η επίθεση από παθογόνο (Wada et al., 2004), η εξωγενής εφαρμογή 5-αζακυτιδίνης (Richards 1997) και διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις (Wada, 2005).

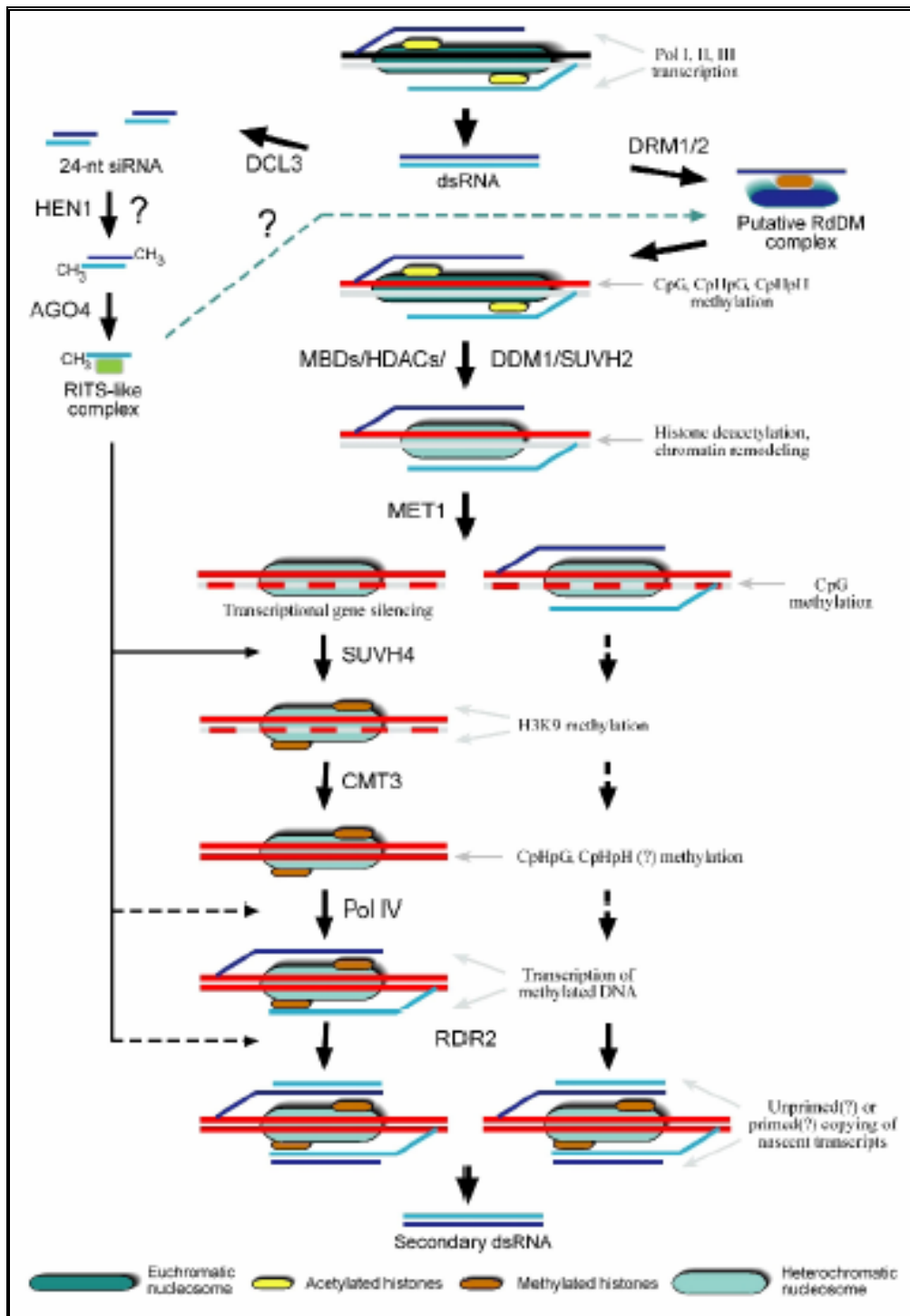
Το πως το σήμα της μεθυλίωσης ερμηνεύεται σε μια λειτουργική σειρά διαδικασιών είναι κάτι ασαφές. Πάντως, στο *Arabidopsis* έχουν αναγνωριστεί 12 υποθετικές πρωτεΐνες που δεσμεύουν μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια CpG (Methyl-CpG-Binding Domain proteins, *MBD*) αλλά όχι μεθυλιωμένες αλληλουχίες CpNpG (Zemach, 2003), ενεργοποιούν μια ποικιλία απακετυλασών και παραγόντων αναμόρφωσης της χρωματίνης και οδηγούν σε μεταγραφική σίγηση (Ballestar, 2001). Επιπρόσθετα, το αν προηγείται η μεθυλίωση των ιστονών και έπεται αυτή του DNA ή το αντίστροφο είναι κάτι αμφιλεγόμενο. Τουλάχιστον όμως κάποιες μορφές μεθυλίωσης του DNA έχει δείχτει ότι έπονται της μεθυλίωσης των ιστονών (Jackson et al., 2002), όπως όμως ότι και η πρώτη αρκεί για σίγηση γονιδίων ενώ η δεύτερη όχι (Johnson et al., 2002).

RNA-εξαρτώμενη DNA μεθυλίωση (RdDM).

Μια επαναστατική δουλειά του Wassensegger το 1994, χρησιμοποιώντας το σύστημα του ιοειδούς στον καπνό, έδειξε ότι το RNA μπορεί να οδηγήσει σε μεθυλίωση ομόλογων αλληλουχιών DNA (Wassenegger et al., 1994). Έκτοτε, πολλοί ερευνητές έχουν πιστοποιήσει τα αποτελέσματά του χρησιμοποιώντας συστήματα ιών που ως γνωστόν απαιτούν για τον πολλαπλασιασμό τους την δημιουργία ενδιάμεσης μορφής dsRNA (Jones et al., 1999; Wang et al., 2001). Επιπρόσθετα, έγινε εμφανές ότι η συσχέτιση της σίγησης (RNAi/PTGS) και της RdDM είναι κάτι παραπάνω από εμφανής (Vaistij et al., 2002). Κατά μια θεωρία, η παρουσία dsRNA οδηγεί στη δημιουργία siRNAs, τα οποία θα δράσουν στο κυτταρόπλασμα αποδομώντας τον στόχο mRNA τους αλλά και στον πυρήνα, μεθυλιώνοντας το ομόλογο DNA και τις ιστόνες του. Η προηγούμενη πρόταση είναι υπεραπλουστευμένη φυσικά, καθώς στα φυτά δεν είναι ξεκαθαρισμένη φύση του RNA που προκαλεί μεθυλίωση (siRNAs, dsRNA) αλλά και ο τρόπος (αλληλεπίδραση του RNA με το DNA ή με το παραγόμενο μετάγραφο). Ωστόσο,

η *de novo* μεθυλίωση στα φυτά προαπαιτεί dsRNA στον πυρήνα (Mette et al., 2000) καθώς και την DRD1, αν και ο τρόπος προσανατολισμού της DRM2 στο ομόλογο DNA παραμένει άγνωστος. Ένα πιθανό μοντέλο είναι το RdDM σύμπλοκο να περιέχει την DRD1 και να αλληλεπιδρά με μία ή και τις δυο αλυσίδες του dsRNA, να αναζητά ομόλογους στόχους και να αλληλεπιδρά τελικά με αυτούς (Wassenegger, 2005), μεθυλιώνοντάς την μια ή και τις δυο αλυσίδες μέσω της DRM2, στο σύνολο των κυτοσινών. Εναλλακτικά, μπορεί siRNAs να προσδένονται στο RdDM σύμπλοκο, και μάλιστα αυτά με μήκος 24 και όχι 21 νουκλεοτίδια (προϊόντα επεξεργασίας της πυρηνικής DCL3) (Hamilton et al., 2002). Ας σημειωθεί ωστόσο ότι στο *Arabidopsis* έχουν βρεθεί 24 nt siRNAs ομόλογα μη μεθυλιωμένων περιοχών, δεικνύοντας ότι οι μικροριβοθυμιστές αυτοί δεν μπορούν *per se* να επάγουν RdDM (Xie et al., 2004), παρόλο που φαίνεται να εμπλέκονται και στην παραγωγή δευτερογενών dsRNAs. Επιπρόσθετα, δεν είναι ξεκάθαρο αν η μη ανάγκη της DCL3 για μεθυλίωση οφείλεται στο ότι siRNAs για αυτή την διαδικασία παράγονται από τις άλλες DCLs ή δεν είναι απαραίτητο να παραχθούν γιατί το πυρηνικό dsRNA μπορεί από μόνο του να αποτελέσει σήμα μεθυλίωσης. Προφανώς απάντηση σε αυτό το ερώτημα θα δώσουν πολλαπλά μεταλλάγματα των DCLs. Πάντως, έχειδειχτεί ότι το ελάχιστο μήκος DNA που μπορεί να αποτελέσει στόχο είναι ~30 bp (Pelissier and Wassenegger, 2000), όπως και ότι η μεθυλίωση παρουσιάζει πολύ μικρή εξάπλωση σε γειτονικές περιοχές (Aufsatz et al., 2002).

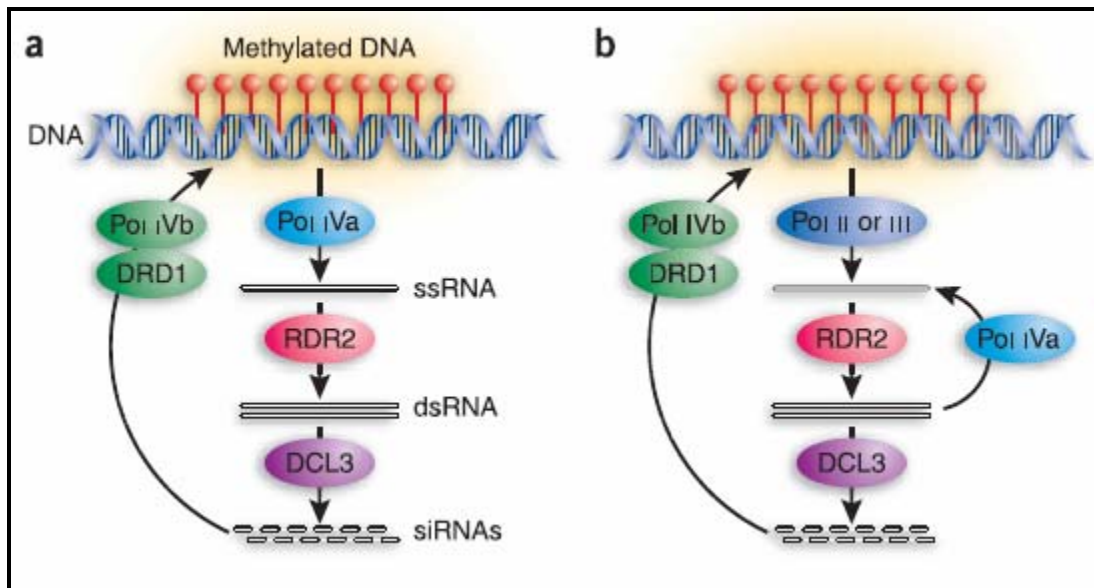
Η μεθυλίωση της απέναντι αλυσίδας αλλά και η εξάπλωσή της φαίνεται να απαιτεί τροποποιήσεις της χρωματίνης (Εικόνα 1.2). Όσον αφορά στη διατήρηση της CpG μεθυλίωσης, είναι γνωστό ότι οι MBDs δημιουργούν σύμπλοκο με απακετυλάσες (HDACs). Έτσι, η MET1 μπορεί να δράσει σε απακετυλιωμένο, ημιμεθυλιωμένο στόχο, συνεπικουρούμενη από την DDM1 (Zemach et al., 2005), η οποία έχειδειχτεί ότι αλληλεπιδρά με την SUVH2 (Naumann et al., 2005). Η διατήρηση της CpNpG μεθυλίωσης από την CMT3 έχει την ίδια λογική. Αν τα 24 nt siRNAs είναι ο υπεύθυνος αυτής της διαδικασίας, τότε ενσωματώνονται σε ένα RITS-like σύμπλοκο περιέχον την AGO4 (Zilbermann et al., 2004), το οποίο οδηγεί την H3K9 μεθυλτρανσφεράση SUVH4 στο συμπληρωματικό DNA, κάνοντάς το προσβάσιμο στην CMT3. Εναλλακτικά, το



Εικόνα 1.2. Το μοντέλο της RNA-εξαρτώμενης DNA μεθυλίωσης (κατά Wassenaar, 2005). Η περιγραφή του γίνεται στο κείμενο.

RdDM σύμπλοκο μπορεί να αλληλεπιδρά όχι με το DNA αλλά με το παραγόμενο μετάγραφο.

Η παραγωγή δευτερογενούς dsRNA είναι κεφαλαιώδους σημασίας για την *de novo* μεθυλίωση (Wassenegger, 2005). Καταλυτικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία διαδραματίζει η νεοφανής RNA πολυμεράση IV που ανακαλύφθηκε από ταυτόχρονα από τα εργαστήρια των Baulcombe και Pikaard το 2005. Η πολυμεράση IV στοιχειοθετείται από 2 υπομονάδες, την μεγάλη (NRPD1a και NRPD1b) και την μικρή (NRPD2a), ενώ η λειτουργία της είναι πραγματικά αινιγματική. Αν υποθεθεί ότι μεταγράφει μεθυλιωμένο DNA (Onodera et al., 2005), τότε το σύμπλοκο Pol IVa (NRPD1a και NRPD2a) παράγει ssRNAs που μετατρέπονται σε dsRNAs από την συνδυασμένη δράση RDR2 και DCL3 (Vaucheret, 2005). Τα παραγόμενα siRNAs θα κατευθύνουν την DRD1 και το σύμπλοκο Pol IVb (NRPD1b και NRPD2a) σε ομόλογο DNA για *de novo* μεθυλίωση (Εικόνα 1.3).

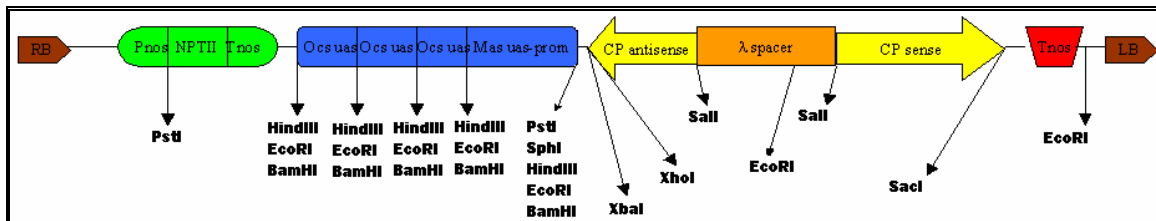


Εικόνα 1.3. Εναλλακτικά μοντέλα για την διατήρηση της μεθυλίωσης μέσω siRNAs και pol IV (κατά Vaucheret, 2005). Στο πρώτο μοντέλο, η pol IVa μεταγράφει ssRNA από μεθυλιωμένο DNA. Στο δεύτερο, η pol IVa μεταγράφει ssRNA από RDR2-παραγόμενο dsRNA.

Αμφιβολίες για την εγκυρότητα του σκεπτικού αυτού είναι αναπόφευκτες, καθώς θα περίμενε κανείς να ανιχνεύσει siRNAs από κάθε πιθανή μεθυλιωμένη περιοχή του γονιδιώματος. Θα ήταν πιο λογικό να κατευθύνονταν η Pol IV σε ημιμεθυλιωμένες περιοχές από τα siRNAs. Εναλλακτικά, θα μπορούσε η Pol IVa να δράσει πάνω σε RDR2-παραγόμενα dsRNAs, αποτρέποντας την συνεχή μεταγραφή ssRNAs από την Pol IV και προυποθέτοντας ότι η Pol II ή η Pol III θα δράσει αν τα επίπεδα siRNAs πέσουνκάτω από ένα συγκεκριμένο επίπεδο διατήρησης της σίγησης.

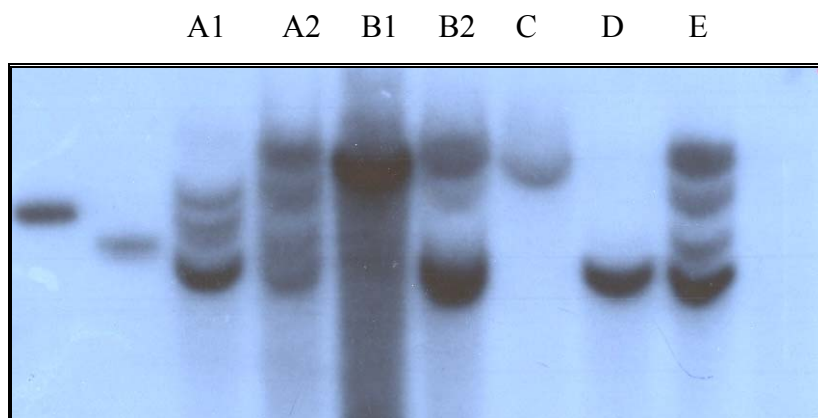
1.7. Μοντέλο μελέτης της RdDM. Οι διαγονιδιακές σειρές CMV.

Σε προηγούμενη εργασία δημιουργήθηκαν διαγονιδιακές σειρές καπνού *Nicotiana tabacum* που εκφράζουν υπό μορφή φουρκέτας (hairpin) ένα τμήμα του 3' τμήματος του RNA 3 του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς (Cucumber Moosaic Virus, CMV) που κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη αυτού (Coat Protein, CP) (Kalantidis et al., 2002) (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4. Η δομή T-DNA στον δυαδικό φορέα pATC940 (παράγωγο του pBi101.2) που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των διαγονιδιακών σειρών CMV28. Ο υποκινητής χαρακτηρίζεται ως "Super promoter" και περιγράφεται από τον Ni et al., 1995. Τα Ocs-uas κομμάτια είναι ~200 bp, το Mas-uas/promoter ~450 bp, το CP antisense 542 bp, το spacer του λ φάγου 1444 bp (με μια περιοριστική θέση EcoRI στα 1000 bp) και το CP sense 748 bp. Ας σημειωθεί ότι θέσεις MspI (για ανάλυση μεθυλίωσης) βρίσκονται στις θέσεις 136 του CP antisense, 407 του CP sense και πολλές στον spacer, με ακραίες αυτές στις θέσεις 159 και 1419 bp.

Οι παραγόμενες σειρές υποβλήθηκαν σε μόλυνση με τον ιό CMV. Κάποιες παρουσίασαν ανθεκτικότητα (κανένα σύμπτωμα), κάποιες φαινότυπο ανάρρωσης (εξαφάνιση συμπτωμάτων σε μεταγενέστερα στάδια) και κάποιες ευαισθησία (συμπτώματα μόλυνσης). Η ανθεκτικότητα συσχετίστηκε άμεσα με την ανίχνευση CMV siRNAs, καθιστώντας την παρουσία τους μοριακό δείκτη. Επιλέχθηκε να μελετηθεί η σειρά CMV28, η οποία παρουσίασε ανθεκτικότητα στην μόλυνση και επιπρόσθετα είχε περισσότερα των 2 αντιγράφων του διαγονιδίου (μέχρι τέσσερα). Η παρουσία πολλαπλών αντιγράφων γέννησε το εύλογο ερώτημα αν η ανθεκτικότητα οφείλεται σε συνδυασμένη δράση όλων των αντιγράφων ή μόνο σε μερικά λόγω αποτελέσματος θέσης. Έτσι, έλαβε χώρα διάσχιση της σειράς αυτής με σκοπό την μελέτη των παραπάνω, με αποτέλεσμα τις σειρές (T4 απόγονοι): CMV28A1, CMV28A2, CMV28B1, CMV28AB2, CMV28C, CMV28D και CMV28E. Οι σειρές A2, B2, D και E είναι ανθεκτικές, οι B1 και C ευαίσθητες και η A2 μέτριας ανθεκτικότητας (Εικόνα 1.5). Προηγούμενες εργασίες έδειξαν ότι αφενός μεν η ανθεκτικότητα σχετίζεται με την παρουσία CMV siRNAs, αφετέρου δε και με μικρότερο ποσοστό μεθυλίωσης (MspI/HpaII ανάλυση) σε σχέση με τις ευαίσθητες σειρές, δεικνύοντας ότι *δεν υπάρχει άμεση σχέση μεθυλίωσης και παραγωγής siRNAs*.



Εικόνα 1.5. Ανάλυση κατά Southern των T4 απογόνων της CMV28 προς διερεύνηση των αντιγράφων του διαγονιδίου. Το αντίγραφο της θέσης 4 kb (τελευταίο) φαίνεται να ευθύνεται για την ανθεκτικότητα. (Πηγή: Τζανοπούλου Μ., MSc thesis 2004).

Στην παρούσα μελέτη γίνεται μια προσπάθεια μεταγραφικής ανάλυσης των σειρών αυτών: από την στιγμή που ανάλυση μεθυλίωσης του εκκινήτη δεν έδειξε μεθυλίωση (άρα όχι TGS), τότε τι γίνεται με το μετάγραφο; Όλες οι σειρές το παράγουν; Προφανώς δεν μπορεί να ανιχνευθεί σε αποτύπωμα κατά Northern γιατί πιθανότατα θα έχει αποδομηθεί. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν αγροεμποτισμοί με την Reo-sigma3, μια dsRNA-δεσμεύουσα πρωτεΐνη που προστατεύει το μετάγραφο (Lichner et al., 2003), και μετέπειτα προσπάθεια ανίχνευσής του σε αποτύπωμα κατά Northern. Επιπλέον, για τον ίδιο λόγο, απομονώθηκαν πυρήνες και έλαβε χώρα RUN-ON μεταγραφή, πάλι προς ανίχνευση του μεταγράφου. Σε ένα παράλληλο σκέλος της εργασίας, θελήσαμε να δούμε αν η μεθυλίωση επηρεάζεται από τα πολλαπλά αντίγραφα του διαγονιδίου ή όχι καθώς και το επίπεδο μεθυλίωσης του κάθε αντιγράφου (πιθανότατα ένα αντίγραφο ξεκίνησε την μεθυλίωση, την μετέδωσε στα άλλα και έπειτα από την διάσχιση τα υπόλοιπα αντίγραφα παρουσίασαν επιγενετική μνήμη του φαινομένου). Τέλος, θεωρήθηκε σκόπιμο να αναλυθεί το 3' άκρο του μεταγράφου στις παραπάνω σειρές (ανθεκτικές και ευαίσθητες) προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή διαφορά τους (κυρίως στον τερματιστή της μεταγραφής) μέσω της TAIL-PCR, ενώ περαιτέρω ανάλυση μεθυλίωσης (κυρίως ασύμμετρης) μέσω bisulfite μεταχείρισης είναι στα άμεσα σχέδια.

Κεφάλαιο 2
Υλικά & Μέθοδοι

2.1. Υλικά.

Χρησιμοποιήθηκαν χημικά αντιδραστήρια από τις εταιρείες Minotech, Aldrich, Merck, Biolabs. Τα ένζυμα και τα ραδιοϊσότοπα προμηθεύτηκαν από την Minotech.

Το *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 με την πρωτεΐνη Reo-σ3 ήταν μια ευγενική προσφορά του Jozsef Burgyan.

2.2. Μέθοδοι μοριακής κλωνοποίησης.

Οι κλασικές μέθοδοι κλωνοποίησης (απομόνωση πλασμιδιακού DNA, πέψεις, αντιδράσεις σύνδεσης, μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων κτλ) πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις γενικές αρχές που παρουσιάζονται στο Molecular Cloning του Μανιάτη (Sambrook et al., 1989).

2.3. Απομόνωση RNA από φύλλα.

Συλλέγονται φύλλα τις πρώτες πρωινές ώρες και λειοτριβούνται σε υγρό άζωτο. Στη σκόνη, αφού ζυγιστεί και προστεθεί σε σωληνίσκο των 50 ml, προστίθεται ομοιογενές μίγμα RNA Extraction Buffer/Acid Phenol (1/1, 10 ml μίγματος ανά gr ιζήματος) και μίγμα chloroform/isoamyl alcohol (24/1, 2 ml μίγματος ανά gr ιζήματος). Το μίγμα ανακινείται και φυγοκεντρείται (3.500 rpm / 30 min / 4° C), ενώ στο μετέπειτα συλλεχθέν υπερκείμενο προστίθεται διάλυμα LiCl (ίσος όγκος, 8 M). Το μίγμα ανακινείται και διατηρείται στους -20° C για 24 hrs. Την επόμενη μέρα, το δείγμα φυγοκεντρείται (3.500 rpm / 30 min / 4° C) και συλλέγεται τόσο το υπερκείμενο (πλούσιο σε μικρά RNAs & DNA) όσο και το ίζημα (πλούσιο σε ολικά RNAs). Στο ίζημα προστίθεται ddH₂O (300 λ) και μεταφέρεται σε σωληνίσκο του 1,5 ml. Τόσο στο υπερκείμενο όσο και στο διάλυμα του ιζήματος προστίθεται κρύα απόλυτη αιθανόλη (2,5 όγκοι) ενώ επιπλέον στο υπερκείμενο προστίθεται οξικό νάτριο (0,1 όγκος, pH=5,4). Τα μίγματα ανακινούνται καλά και φυλάσσονται στους -20° C για 30 min. Ακολούθως φυγοκεντρούνται (13.500 rpm για eppendorfs ή 3.500 rpm για falcons / 20 min / 4° C), το

προκύπτων υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα πλένεται με αιθανόλη 70% (1 ml). Έπεται νέα φυγοκέντρηση (13.500 rpm / 7 min / 4° C), μετά το πέρας της οποίας το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα αφού στεγνώσει (30 min) επαναδιαλύεται σε ddH₂O (50 λ).

2.4. Απομόνωση DNA από φύλλα.

Τα φυτά πριν τον οποιοδήποτε χειρισμό μένουν 2 μέρες στο σκοτάδι για την αποφυγή συγκέντρωσης πολυσακχαριτών. Μια ποσότητα φυλλικού ιστού (2 γρ) λειοτριβείται με υγρό άζωτο, προστίθεται μαζί με 15 ml DNA Extraction Buffer (100 mM Tris-Cl, pH=8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol) και 2 ml SDS (10% w/v) σε φυαλίδιο των 50 ml (falcon) και επωάζεται στους 65° C για 10 min. Μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 5 ml οξικού καλίου 5 M και το δείγμα αφού αναδευτεί ελαφρά επωάζεται στον πάγο για 30 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (3.500 rpm / 45 min / 4° C) και το υπερκείμενο αφού φιλτραριστεί σε Miracloth προστίθεται σε νέο falcon μαζί με 0,7 όγκους ισοπροπανόλης και επωάζεται 20 min στους -20° C. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση (3.500 rpm / 45 min / 4° C) και το ίζημα αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται με 1 ml ddH₂O στους 50° C για 1 hr και μεταφέρεται σε φυαλίδιο erppendorf των 2 ml για να φυγοκεντρωθεί (13.500 rpm / 10 min / 4° C) και να ιζηματοποιηθούν οι ακαθαρσίες. Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος μίγματος ουδέτερης φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25/24/1) και έπειτα από την φυγοκέντρηση (13.500 rpm / 10 min / 4° C) και την επιλογή του υπερκειμένου, το DNA κατακρημνίζεται με 0,1 όγκο οξικού νατρίου 3 M, 0,7 όγκους ισοπροπανόλης, επώαση 20 min στους -20° C και φυγοκέντρηση (13.500 rpm / 15 min / 4° C). Ακολουθεί ξέπλυμα των αλάτων με αιθανόλη (70% v/v) και το DNA αφού φυγοκεντρωθεί (13.500 rpm / 7 min / 4° C) και στεγνώσει επαναδιαλύεται για πολλές ώρες (overnight) στους 4° C σε 200 λ ddH₂O. Την επόμενη μέρα προστίθενται 2 λ RNaseA (10 mgr/ml) και το δείγμα επωάζεται στους 37° C για 15 min. Η πιθανή παρουσία πολυσακχαριτών απομακρύνεται με εφαρμογή ίσου όγκου CTAB buffer (4% w/v) (0,2M Tris/Cl pH 7,5-8, 0,05 NaEDTA, 2M NaCl, 4% CTAB) και επώση στους 65° C για 60 min. Ακολουθεί

απομάκρυνση των πολυσακχαριτών με χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24/1), φυγοκέντρηση (13.500 rpm / 10 min / 4° C), κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη, πλύσιμο με αιθανόλη 70%, στέγνωμα του ιζήματος και επαναδιάλυση overnight στους 4° C σε 200 λ ddH₂O.

2.5. Αποτύπωμα κατά Northern.

Τα RNA δείγματα αναμειγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος φόρτωσης και βράζονται για 5 min, ενώ μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος τοποθετούνται απότομα σε πάγο για 5 min για να μην λάβει χώρα επανυβριδισμός των RNA μορίων. Τα δείγματα (~50 λ το καθένα, με 10 γ RNA) ηλεκτροφορούνται σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης/φορμαλδεύδης: η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης διαλύεται με θέρμανση σε ddH₂O (74 ml) και αφού το μίγμα κρυώσει ελαφρά προστίθεται φορμαλδεύδη 37% (16 ml) και MOPS 10x (10 ml). Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης αποτελείται κατ'αντιστοιχία από ddH₂O (740 ml), φορμαλδεύδη 37% (160 ml) και MOPS 10x (100 ml). Λαμβάνει χώρα ηλεκτροφόρηση (100 V, 4 hrs), μετά το πέρας της οποίας το πήκτωμα βάφεται με διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (300 ml, 10 min, ανακίνηση), πλένεται με ddH₂O (300 ml, 20 min, ανακίνηση, x2) και φωτογραφίζεται με χάρακα στο UV, ενώ τέλος εξισορροπείται με διάλυμα SSC 10x (300 ml, 10 min, ανακίνηση). Το πήκτωμα τοποθετείται ανάποδα στην γέφυρα μεταφοράς (capillary transfer), και διαδοχικά τοποθετούνται πάνω του διαβρεχόμενα με SSC 2x και προσέχοντας να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες η μεμβράνη μεταφοράς (Nytran-N) και 3 χαρτιά τύπου Watman. Προστίθενται χαρτοπετσέτες για δημιουργία τριχοειδούς μεταφοράς και τέλος κάποιο βάρος. Η μεταφορά λαμβάνει χώρα 24 hrs.

Μετά την μεταφορά των RNA μορίων, το πήκτωμα βάφεται για τον προσδιορισμό του ποσοστού μεταφοράς, ενώ η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα SSC 2x, στεγνώνεται 30 min και σταθεροποιείται (UV crosslinking, 1200 μJ). Κατόπιν τοποθετείται σε διάλυμα προυβιδοποίησης (5 SSC 10x, 12 ml ddH₂O, 2 ml SDS 10%, 400 λ Denhards 50x, 500 λ tRNA) και επωάζεται στην κατάλληλη θερμοκρασία για 1 ώρα περίπου. Μετά το πέρας της προυβιδοποίησης, μειώνεται ο όγκος της αντίδρασης

στο μισό και προστίθεται ο ραδιενεργός ανιχνευτής (αποδιαταγμένος, 10^6 cpm/ml αντίδρασης) και λαμβάνει χώρα υβριδοποίηση για 24 hrs.

Την επόμενη μέρα η μεμβράνη πλένεται διαδοχικά με 3 διαλύματα: α) SSC 2x, 30 ml, 5 min, β) SSC 2x, SDS 0,1%, 30 ml, 30 min, γ) SSC 0,2x, SDS 0,1%, 30 ml, 15min. Κατόπιν η μεμβράνη σακουλοποιείται και τοποθετείται σε κασέτα με φιλμ για έκθεση στους -80° C για μια μέρα περίπου.

2.6. Αποτύπωμα κατά Southern.

Τα DNA δείγματα διαχωρίζονται σε πηκτή αгарόζης (12 hrs, 23 Volts). Η πηκτή υπόκειται στους ακόλουθους χειρισμούς για να είναι δυνατή η τριχοειδής μεταφορά των μορίων DNA στη μεμβράνη: τοποθετείται σε διάλυμα 0,2 N HCl και αναδεύεται για 10 λεπτά. Στη συνέχεια η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα 1,5 M NaCl και 0,5 N NaOH για 45 λεπτά υπό ανάδευση. Κατόπιν γίνεται ρύθμιση του pH με τοποθέτηση της πηκτής σε διάλυμα 1 M Tris pH 7,4 και 1,5 M NaCl για 30 λεπτά υπό ανάδευση. Το διάλυμα αλλάζεται και η πηκτή αναδεύεται για άλλα 15 λεπτά στο παραπάνω διάλυμα. Κατόπιν τοποθετείται σε διάλυμα 10x SSC για 10 λεπτά και ακολουθεί τοποθέτηση της σε κατάλληλη συσκευή για τριχοειδή μεταφορά των μορίων DNA σε νάϋλον μεμβράνη (Nytran-N). Το διάλυμα μεταφοράς είναι 10x SSC και η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε 2x SSC προτού τοποθετηθεί επάνω στο πήκτωμα. Η διαδικασία μεταφοράς αφήνεται για 12 ώρες. Όταν ολοκληρωθεί, η μεμβράνη πλένεται σε διάλυμα 2x SSC για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αгарόζης και στεγνώνεται. Μετά υπόκειται στην επίδραση UV ακτινοβολίας ενέργειας 800 μ Joules για να μονιμοποιηθούν τα μεταφερόμενα μόρια DNA επάνω στη μεμβράνη. Επίσης μετά το τέλος της διαδικασίας μεταφοράς το πήκτωμα βάφεται με βρωμιούχο εθίδιο και φωτογραφίζεται υπό UV ακτινοβολία για να εκτιμηθεί η απόδοση της μεταφοράς. Στη συνέχεια η μεμβράνη φυλάσσεται σε ασφαλές μέρος ως ότου υβριδοποιηθεί με το κατάλληλο ραδιοσημασμένο ανιχνευτή.

2.7. Δημιουργία DNA ραδιενεργού ανιχνευτή.

Διάλυμα μήτρας DNA (0,1 γ σε 15 λ υδατικό διάλυμα) αποδιατάσσεται με βρασμό και παγώνεται απότομα, για να προστεθούν TTP 0,5 M (1 λ), GTP 0,5 M (1 λ), διάλυμα πολυμεράσης Klenow 2,5x (20 λ), τυχαίοι εκκινητές (1 λ), πολυμεράση Klenow (4 λ), ραδιενεργό ATP (3 λ) και ραδιενεργό CTP (3 λ). Ο τελικός όγκος των 50 λ επωάζεται στους 37 ° C για 1 hr. Κατόπιν, συλλέγεται η πρώτη κορυφή του εκλούσματος μέσω στήλης αγαρόζης, μετράται η ενεργότητα του ανιχνευτή και προστίθεται στο διάλυμα υβριδοποίησης σε τελική συγκέντρωση 10⁶ cpm/ml αντίδρασης.

2.8. Αγροεμποτισμός.

Αγροβακτήρια επωάζονται (>24 hrs, 28 ° C) σε υγρό θρεπτικό υλικό LB (20 ml) με τα αντίστοιχα αντιβιοτικά. Μετά το πέρας της επώασης τα βακτήρια φυγοκεντρούνται (2.700 rpm / 10 min / 4 ° C). Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε MMA (MS 1x, MES 10 mM, AcS 200 μM, 20 ml) και επωάζεται (1 hr, 28 ° C, ανακίνηση). Τα βακτήρια ακολούθως φυγοκεντρούνται (2.700 rpm / 10 min / 4 ° C) και το ίζημα πλένεται με MgCl₂ 10 mM (10 ml) και φυγοκεντρείται (2.700 rpm / 10 min / 4 ° C). Η πλύση επαναλαμβάνεται. Το ίζημα τέλος επαναδιαλύεται σε με MgCl₂ 10 mM (10 ml), ρυθμίζεται η απορρόφησή του σε 0,2 (600 nm) και ενύεται σε φυτά με σύριγγα ινσουλίνης.

2.9. Ισοτακοφόρηση.

Χρησιμοποιήθηκε για να απομονωθούν από πήκτωμα αγαρόζης τμήματα DNA πολύ μεγάλα για τις προδιαγραφές των υπαρχόντων kits (>20 kb). Εναλλακτικά χρησιμοποιείται και για απομόνωση πολύ μικρών κομματιών DNA/RNA από πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η αρχή της βασίζεται στον διαχωρισμό του επιθυμητού νουκλεϊκού οξέος κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (Hamman C. and Tabler M., 1999).

Χρωματογραφική στήλη πλένεται με NaOH 0,1 N και HCl 0,1 N. Ακολουθεί νέα πλύση-εξισορρόπηση με Tris-Cl 40 mM (επανάληψη 3 φορές) και πακετάρισμα της στήλης με Sephadex G-50 (4,5 ml, διαλελυμένη σε TE 4x). Έπονται 4 πλύσεις με Tris-Cl 40 mM. Παράλληλα, ετοιμάζονται οι βαλβίδες με εφαρμογή στο άκρο τους μεμβράνης διαπίδυσης και πλήρωσής τους με Tris-Cl 40 mM, προσέχοντας να μην υπάρχουν φυσαλίδες. Στη συνέχεια προστίθεται 4-αμινο-καπρικό οξύ (100 mM, με προσθήκη σταγόνων phenol red) και τα τμήματα της αγαρόζης, ενώ δημιουργείται κύκλωμα με επαφή των βαλβίδων σε διάλυμα Tris-Cl 40 mM και εφαρμογή του καπακιού της στήλης. Οι συνθήκες ισοτακοφόρησης είναι 15 Watt, 250 Volts και 4 mA για κάθε στήλη. Όταν ο κόκκινος δακτύλιος φθάσει στα 0,5 cm, συλλέγεται το DNA και ακολουθεί πλύση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.

2.10. Απομόνωση πυρήνων.

Μια ποσότητα φυλλικού ιστού (50 γρ) πλένεται δυο φορές με αποστειρωμένο νερό, με αιθανόλη 70% για 15 sec, και πάλι με αποστειρωμένο νερό. Τα φύλλα τοποθετούνται σε φλάσκα απαέρωσης περιέχουσα 800 ml Buffer A και εφαρμόζεται κενό 4-5 φορές. ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 min. Όλοι οι χειρισμοί από το σημείο αυτό και μετά πραγματοποιούνται στους 4° C. Τα φύλλα απομακρύνονται από το Buffer A και τοποθετούνται σε Waring Blendor με 150 ml Buffer B που διατηρεί την ακεραιότητα των πυρήνων. Ακολουθεί ομογενοποίηση με θρυμματισμό των φύλλων για 5 sec και 4 φορές. Το προκύπτον μίγμα προστίθεται φιλτραρισμένο από Miracloth σε δοχεία των 500 ml, αφού έχει προστεθεί και 1/9 του όγκου NP40 10% (v/v) για την απομάκρυνση των χλωροπλαστών. Μετά την φυγοκέντρηση (5.000 rpm / 10 min / 4° C) το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1,6 ml Buffer D και 126 ml Buffer C. Ακολουθεί πάλι φυγοκέντρηση (4.000 rpm / 10 min / 4° C) μετά το πέρας της οποίας το προκύπτον πράσινο στρώμα (χλωροπλάστες) απομακρύνεται και το ίζημα (πυρήνες) επαναδιαλύεται σε 1 ml Buffer D και 50 ml Buffer C. Το μίγμα μοιράζεται σε φυαλίδια Corex των 30 ml και φυγοκεντρείται (4.000 rpm / 10 min / 4° C). Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 7,5 ml Buffer D για κάθε Corex και φυγοκεντρείται (4.000 rpm / 10

min / 4° C, χωρίς φρένο). Ο προκύπτων δακτύλιος συλλέγεται και μεταφέρεται σε καθαρό Corex, οπότε και προστίθεται Buffer E σε τελικό όγκο 9,3 ml. Στη συνέχεια προστίθενται 5,7 ml Buffer D (ώστε η συγκέντρωση της περκόλης να είναι τελικά 36%) και το μίγμα φυγοκεντρείται (5.000 rpm / 5 min / 4° C) με τους προκύπτοντες πυρήνες (ίζημα) να πλένονται 2 φορές με 1 ml Buffer E και να αποθηκεύονται στους -80° C σε 1 ml Buffer E/glycerol (1/1).

Stamm 30x (750 mM MES/NaOH, pH=6,5, 300 mM KCl, 150 mM MgCl ₂ , 30 mM DTT, 3 % (w/v) BSA).
Buffer A (600 mM mannitol, stamm 1x).
Buffer B (600 mM sucrose, 40% glycerol, stamm 1x).
Buffer C (600 mM sucrose, 1% (v/v) NP40, 40% glycerol, stamm 1x).
Buffer D (250 mM mannitol, 95% Percoll, 1% NP40, stamm 1x).
Buffer E (250 mM mannitol, stamm 1x).

2.11. Μεταγραφή RUN-ON.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι μετά την απομόνωση πυρήνων, τα μεταγραφικά σύμπλοκα έχουν παγώσει στο DNA λόγω της ξαφνικής απώλειας των ριβονουκλεοτιδίων. Με την εφαρμογή όμως νέων ριβονουκλεοτιδίων η μεταγραφή ξαναξεκινά.

Από ήδη απομονωμένους πυρήνες (1 ml) από 50 γρ φύλλα, λαμβάνεται μια ποσότητα (100 λ) και φυγοκεντρείται (5.000 rpm / 5 min / 4° C), με το ίζημα να επαναδιαλύεται σε 97,5 ml Transcription Buffer (10 mM Tris-Cl, pH=5,6, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM MgCl₂, 0,1% thiodiglycol). Ακολούθως προστίθενται 0,5 ml rATP (100 mM), 0,5 ml rCTP (100 mM), 0,5 ml rGTP (100 mM) και 1 λ [α-³²P] UTP (20 mCi/ml). Το δείγμα επωάζεται στους 28° C για 40 min και η μεταγραφή σταματά με την προσθήκη 100 λ Stop Solution (2% SDS, 7 M ουρία, 0,35 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl, pH=8). Ακολουθεί προσθήκη DNase I-*RNase free* (20 U) και επώαση στους 37° C για 15 min. Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος όξινης φαινόλης/χλωροφορμίου (1/1)

και μετά την φυγοκέντρηση (10.000 rpm / 5 min) συλλέγεται το υπερκείμενο και το μετάγραφο κατακρημνίζεται με 2,5 όγκους αιθανόλης 100% και πλένεται με αιθανόλη 70%. Το ίζημα στεγνώνει και αφού επαναδιαλυθεί, βράζεται για 5 λεπτα, παγώνει απότομα στον παγο και προστίθεται στο διάλυμα υβριδοποίησης (έχει προηγηθεί μέτρηση κρούσεων). Η μεμβράνη περιέχει το πλασμίδιο (2 γ) κομμένο με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (ώστε το DNA της μεμβράνης να υβριδίζει με το πιθανό RNA μετάγραφο).

2.12. Αλκαλική υδρόλυση του μεταγράφου του RUN-ON.

Στην περίπτωση μας το μετάγραφο είναι δίκλωνο οπότε θα πρέπει να διευκολυνθεί η υβριδοποίηση με την ελεγχόμενη αλκαλική του υδρόλυση. Στο επαναδιαλυμένο μετάγραφο (50 λ) προστίθεται 50 λ Carbonate Buffer 2x (80 mM NaHCO₃, 120 mM Na₂CO₃, pH=10,2) και ακολουθεί επώαση στους 60° C για χρόνο που καθορίζεται από την σχέση: $t=(L_0-L)/(0,11xL_0xL)$, όπου L₀: αρχικό μήκος μεταγράφου, L: τελικό μήκος μεταγράφου. Στην δική μας περίπτωση (με αρχικό μέγεθος 2,8 kb και επιθυμητό τελικό 0,5 kb): $t = (2,8-0,5)/(0,11x2,8x0,5)=15$ min. Η αντίδραση σταματά και ακολουθεί κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη 10 λ οξικού οξέος 10% (v/v), 12 λ οξικού νατρίου (3 M, pH=5,6). 300 λ απόλυτης αιθανόλης και παραμονή για 30 min στους -80° C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (13.000 g / 10 min), πλύσιμο με αιθανόλη 70%, στέγνωμα της πελέτας και επαναδιάλυσή της, ενώ πριν την προσθήκη της στο διάλυμα υβριδοποίησης βράζεται και παγώνεται απότομα.

2.13. Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR).

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για να ενισχυθούν τα 3' άκρα του T-DNA που ενσωματώθηκε στα φυτά (Liu et al., 1995). Από την στιγμή που δεν γνωρίζουμε τον τόπο ενσωμάτωσης αλλά ούτε και αν η ενσωμάτωση είναι πλήρης (το αριστερό συνοριακό δεν διατηρείται ακέραιο), αυτή η μέθοδος φάνηκε η πιο κατάλληλη για τον σκοπό μας (η

inverse PCR δεν ενδείκνυται γαι την περίπτωση μας). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται σε ένα σετ συγκεκριμένων εκκινητών (Specific Primers, SP1, SP2, SP3) και σε ένα σετ αυθαίρετων (Arbitrary Degenerate, AD1, AD2, AD3), οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε διαδοχικούς κύκλους PCR διαβαθμιζόμενης αυστηρότητας θερμοκρασίας υβριδισμού. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα 2.1.

Όπως περιγράφεται και στην Εικόνα 2.1, ο AD θα υβριδίσει με το γενωμικό DNA σε κύκλους χαμηλής αυστηρότητας. Οι επόμενοι όμως κύκλοι υψηλής αυστηρότητας θα ευνοήσουν τον SP, οδηγώντας σε μια γραμμική ενίσχυση του στόχου. Προς εξασφάλιση επαρκούς θερμικής ασυμμετρίας, οι SPs και οι ADs σχεδιάστηκαν να έχουν T_m 57-62° C 44-46° C αντίστοιχα. Με τους παρεμβαλλόμενους κύκλους χαμηλής αυστηρότητας (υβριδισμός των ADs) δίκλωμα μόρια δημιουργούνται και τα επιθυμητά γραμμικά προϊόντα αυξάνονται λογαριθμικά. Στην δεύτερη και τρίτη αντίδραση, τα μη συγκεκριμένα προϊόντα δεν ενισχύονται.

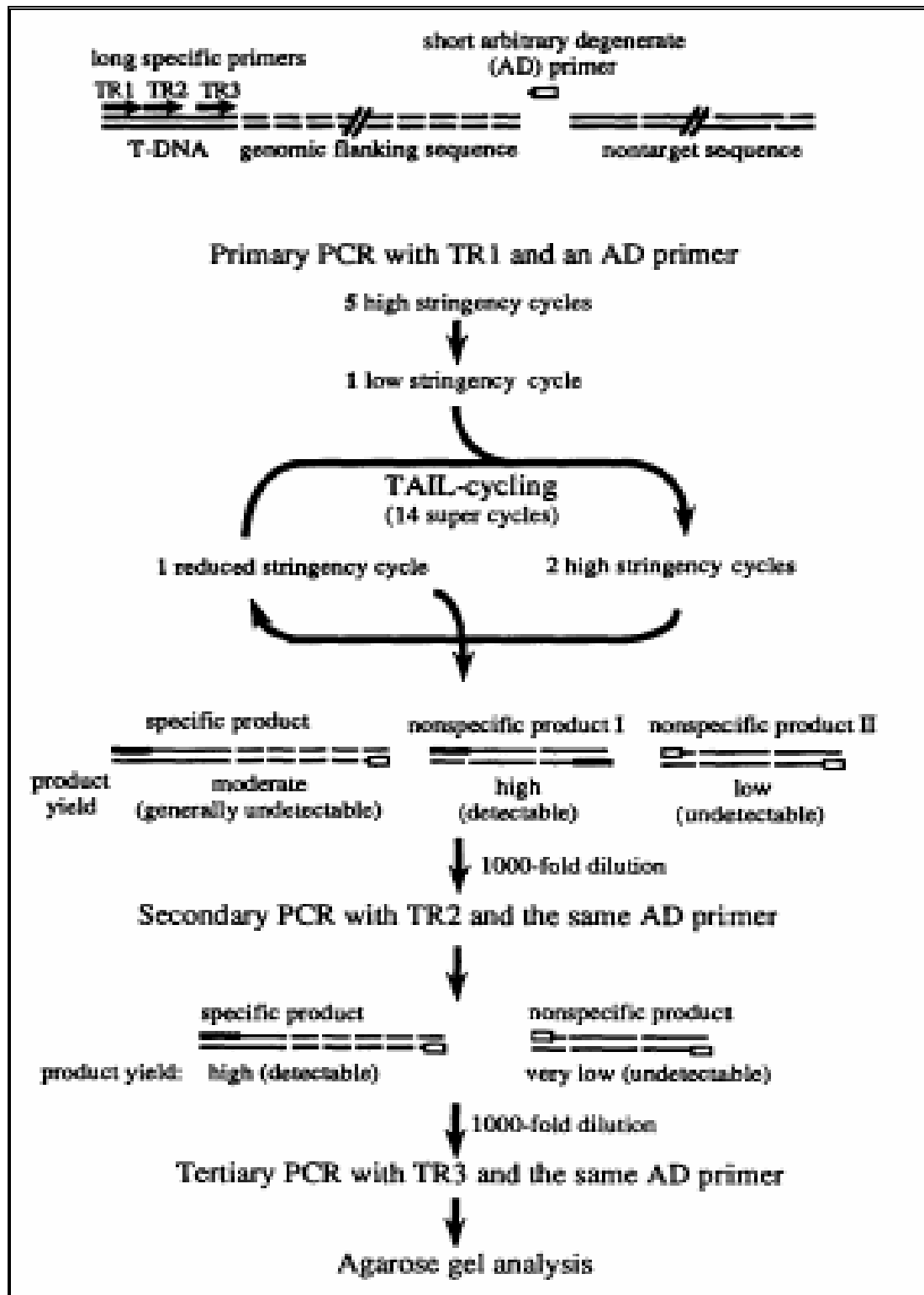
Εμείς θελήσαμε να ενισχύσουμε τα 3' άκρα του T-DNA που ενσωματώθηκε στα φυτά CMV28C (ευαίσθητο) και CMV28D (ανθεκτικό) προς ανάλυση πιθανών διαφορών (και κυρίως του τερματιστή της μεταγραφής Tnos). Χρησιμοποιήθηκε Minotech Ταq πολυμεράση, γενωμικό DNA (100 ngr) απομονωμένο όπως περιγράφεται παραπάνω, οι παρακάτω εκκινητές (οι SPs για το τέλος του CP sense κομματιού, Πίνακας 2.2) και το παρακάτω πρόγραμμα (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.2. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην TAIL-PCR

AD1	→	5' -	NTCGA(G/C)T(A/T)T(G/C)G(A/T)GTT	-3'
AD2	→	5' -	NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GAA	-3'
AD3	→	5' -	(A/T)GTGNAG(A/T)ANCANAGA	-3'
SP1	53	5' -	ACTTTAGAGTCTTGTTCGCAGCA	-3'
SP2	128	5' -	CAACCTTTGTAGGGAGTGAACGC	-3'
SP3	171	5' -	CACATCTATTACCCTAAAGCCACC	-3'

Πίνακας 2.1 Το πρόγραμμα της TAIL-PCR

REACTION	CYCLE NUMBER	THERMAL SETTINGS				
Primary	1	93° C / 1 min, 95° C / 1min				
	5	94° C / 1 min 62° C / 1 min 72 / 2,5 min				
		1	94 / 1 min 25 / 3 min ramping to 72 / over 3 min			
			15	72 / 2,5 min 94 / 30 sec 68 / 1min 72 / 2,5 min 94 / 30 sec 68 / 1 min 72 / 2,5 min 94 / 30 sec 44 / 1 min 72 / 2,5 min		
				Secondary	1	72 / 5 min
	12	94 / 30 sec 64 / 1 min 72 / 2,5 min 94 / 30 sec 64 / 1 min 72 / 2,5 min 94 / 30 sec 44 / 1 min 72 / 2,5 min				
		Tertiary			1	72 / 5 min
					20	94 / 1min 44 / 1 min 72 / 2,5 min
			1			72 / 5 min 4 for ever



Εικόνα 2.1. Η αρχή της TAIL-PCR.

Κεφάλαιο 3
Αποτελέσματα

3.1. Ανάλυση μεθυλίωσης των πολλαπλών αντιγράφων του διαγονιδίου: όλα τα αντίγραφα παρουσιάζουν το ίδιο επίπεδο μεθυλίωσης.

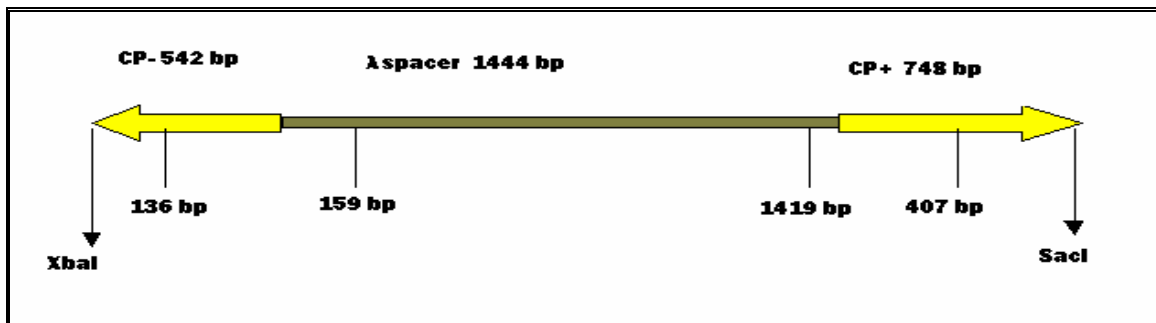
Η ανάλυση μεθυλίωσης της εργασίας αυτής βασίζεται στο σύστημα των ισοσχιζομερών περιοριστικών ενζύμων MspI/HpaII, όπου αναλύεται η μεθυλίωση της αλληλουχίας CCGG: η μεθυλίωση στην εσωτερική κυτοσίνη παρεμποδίζει μόνο το HpaII ενώ η μεθυλίωση στην εξωτερική κυτοσίνη και τα δυο ένζυμα. Πιο συγκεκριμένα, το MspI κόβει τις αλληλουχίες CCGG, C^mCGG, GGCCGG αλλά όχι τις ^mCCGG και GGC^mCGG, ενώ το HpaII κόβει την αλληλουχία CCGG αλλά όχι τις ^mCCGG, C^mCGG και GGC^mCGG.

Προηγούμενες εργασίες (Τζανοπούλου Μ., MSc thesis 2004) έδειξαν ότι ο υποκινητής των T4 απογόνων των διαγονιδιακών σειρών CMV28 δεν είναι μεθυλιωμένος. Επιπλέον, ανάλυση μεθυλίωσης στην κωδική περιοχή του διαγονιδίου, φανέρωσε υψηλότερο ποσοστό μεθυλίωσης των ευαίσθητων σειρών από των ανθεκτικών, ενώ επιχειρήθηκε η συσχέτιση περιβαλλοντικών παραγόντων και μεθυλίωσης, καθώς αυτή παρουσιάζεται αυξημένη το καλοκαίρι.

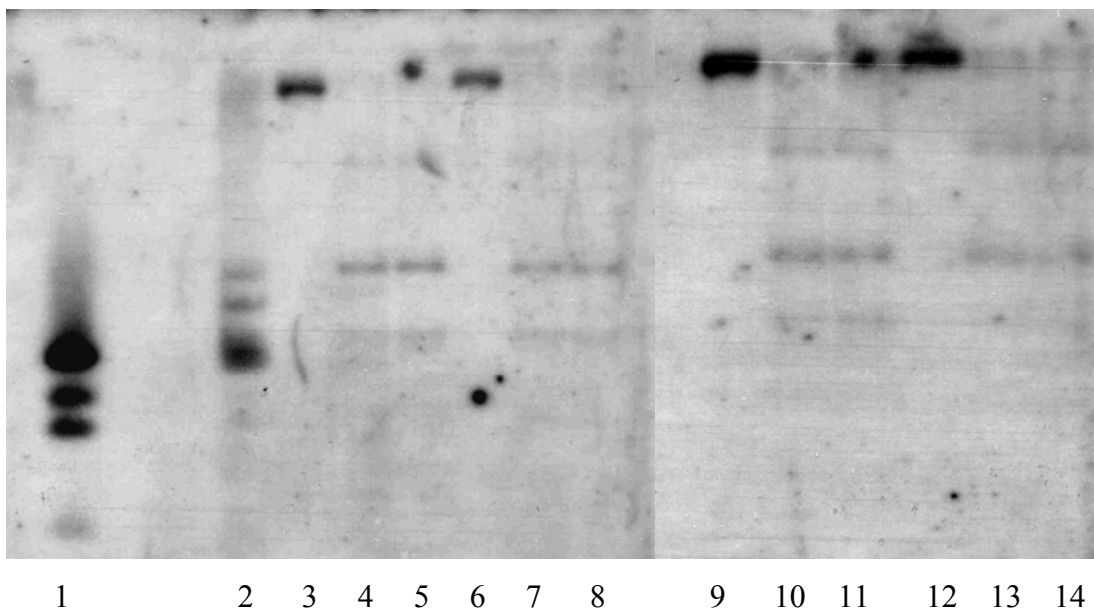


Εικόνα 3.1. Τα 4 αντίγραφα του διαγονιδίου hrCP όπως φαίνονται σε υβριδισμό κατά Southern (0,75 % πήκτωμα αγαρόζης, ιχνηλάτης CP sense). Το γενωμικό υλικό προηγουμένως είχε υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο XbaI (θέση στην αρχή του διαγονιδίου) και τα προκύπτοντα κομμάτια κυμαίνονται από 11,5 kb έως 4,8 kb.

Η σειρά CMV28 είχε μέχρι 4 αντίγραφα του διαγονιδίου, ενσωματωμένα σε διαφορετικούς γονιδιακούς τόπους. Τα αντίγραφα αυτά διασχίστηκαν (T4 απόγονοι) και μελετήθηκε η μεθυλίωσή τους με τα παραπάνω αποτελέσματα. Ωστόσο, δεν μελετήθηκε η μεθυλίωση των διαγονιδίων όταν βρίσκονται μαζί στον ίδιο φυτό. Για αυτόν τον σκοπό, χρησιμοποιήθηκε η σειρά CMV28E που παρουσιάζει 4 αντίγραφα του διαγονιδίου, κάτι που πιστοποιήθηκε μετά από πέψη του γενωμικού υλικού με XbaI (περιοριστικό ένζυμο στο άκρο του διαγονιδίου) (Εικόνα 3.1). Τα κομμάτια (αντίγραφα) που προέκυψαν απομονώθηκαν με των μέθοδο της ισοτακοφόρησης, καθώς το μέγεθος κάποιων αντιγράφων (π.χ. 11,5 kb) κατέστη απαγορευτικό για την χρησιμοποίηση των συνηθισμένων μεθόδων. Τα απομονωμένα αντίγραφα υποβλήθησαν σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο SacI (θέση στο άλλο άκρο του διαγονιδίου) ώστε τα προκύπτοντα κομμάτια μετά την ανάλυση μεθυλίωσης να είναι συγκρίσιμα, ενώ τέλος πραγματοποιήθηκε πέψη με το ζεύγος ισοχιζομερών MspI/HpaII (Εικόνα 3.3). Το αναμενόμενο πρότυπο ζωνών παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.2.



Εικόνα 3.2. Για τον καθορισμό του προτύπου ζωνών ακολουθείται ο παρακάτω συλλογισμός: θέσεις MspI/HpaII βρίσκονται στις θέσεις 136 bp του CP antisense (542 bp), 407 bp του CP sense (748 bp) και πολλές στον spacer (1444 bp), με ακραίες αυτές στις θέσεις 159 και 1419 bp. Οπότε μετά από πέψη του διαγονιδίου με τα ένζυμα XbaI/SacI και MspI/HpaII και υβριδισμός κατά Southern με ιχνηλάτη κομμάτι του CP θα περιμένουμε 4 ζώνες (καμία μεθυλίωση) μεγέθους 136 bp, 565 bp, 432 bp και 341 bp και λιγότερες (συνδυασμός τους) αν κάποια θέση από τις προαναφερθείσες είναι μεθυλιωμένη. Είναι αυτονόητο ότι αν λάβει χώρα μεθυλίωση και στον spacer (κάτι που συμβαίνει) τότε το πρότυπο είναι αρκετά διαφορετικό.

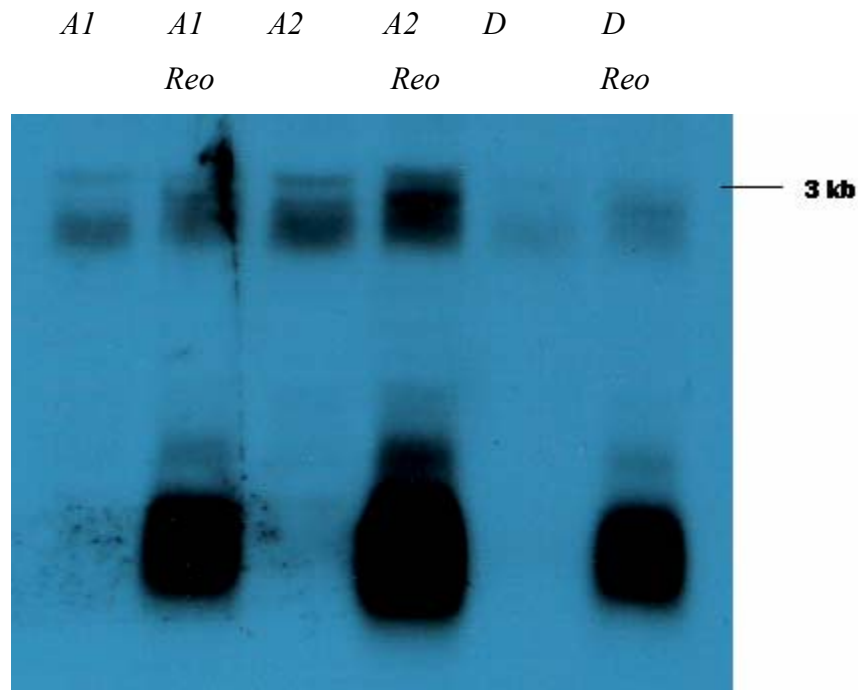


Εικόνα 3.3. Ανάλυση μεθυλίωσης MspI/HpaII των πολλαπλών αντιγράφων της σειράς CMV28E (Εικόνα 3.1) (τα οποία χάριν ευκολίας θα ονομαστούν από το μεγαλύτερο στο μικρότερο I-II-III-IV). Πραγματοποιήθηκε πέψη γενωμικού υλικού (συνολικά 40 γ) με το ένζυμο XbaI για την ανίχνευση αριθμού αντιγράφων, κατόπιν απομόνωση των αντιγράφων με ισοτακοφόρηση (όπου από 40 γ ανακτήθηκαν ~ 4 γ από το κάθε αντίγραφο) και πέψη με SacI. Τέλος, πραγματοποιήθηκε πέψη με MspI/HpaII και υβριδισμός κατά Southern (1,5% πήκτωμα αγαρόζης, ιχνηλάτης CP sense).

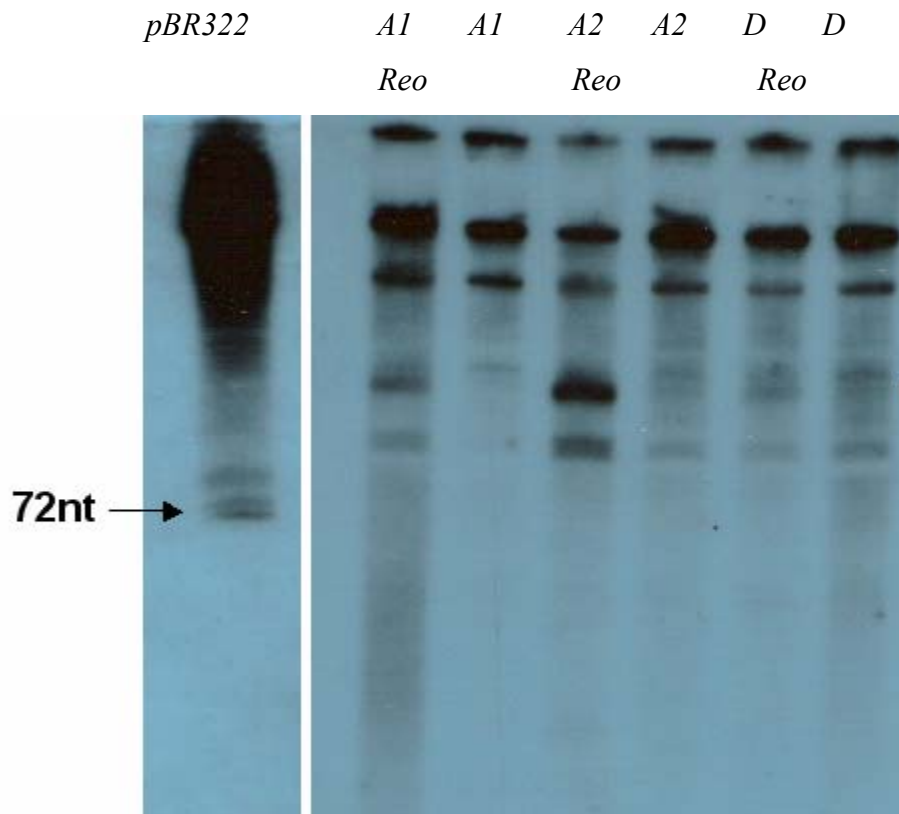
- 1: pATC940/hpCP/ XbaI + SacI + MspI
- 2: CMV28D/ XbaI + SacI + HpaII
- 3: αντίγραφο IV
- 4: αντίγραφο IV/ SacI + MspI
- 5: αντίγραφο IV/ SacI + HpaII
- 6: αντίγραφο III
- 7: αντίγραφο III/ SacI + MspI
- 8: αντίγραφο III/ SacI + HpaII
- 9: αντίγραφο II
- 10: αντίγραφο II/ SacI + MspI
- 11: αντίγραφο II/ SacI + HpaII
- 12: αντίγραφο I
- 13: αντίγραφο I/ SacI + MspI
- 14: αντίγραφο I/ SacI + HpaII

3.2. Αγροεμποτισμός με την πρωτεΐνη Reo-sigma3: το μεταγράφο προστατεύεται.

Η πρωτεΐνη Reo-sigma3 έχει την ιδιότητα να προσδένεται σε dsRNA και να το προστατεύει από αποδόμηση. Στην περίπτωση μας χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί αν και κατά πόσο οι ευαίσθητες σειρές B1 και C (οι οποίες δεν παράγουν ανιχνεύσιμη ποσότητα CMV siRNAs) παράγουν το dsRNA μεταγράφο. Έτσι, ευαίσθητες (B1 και C), και ανθεκτικές σειρές (A2 και D) καθώς και φαινότυποι ανάρρωσης (A1) αγροεμποτίστηκαν με την Reo-sigma3 και έπειτα από 4 μέρες ακολούθησε απομόνωση RNA και ανάλυση κατά Northern. Τα αποτελέσματα (Εικόνες 3.4, 3.5 και 3.6) φανερώνουν ότι το μεταγράφο παράγεται σε όλες τις σειρές και προστατεύεται από την Reo-sigma3.

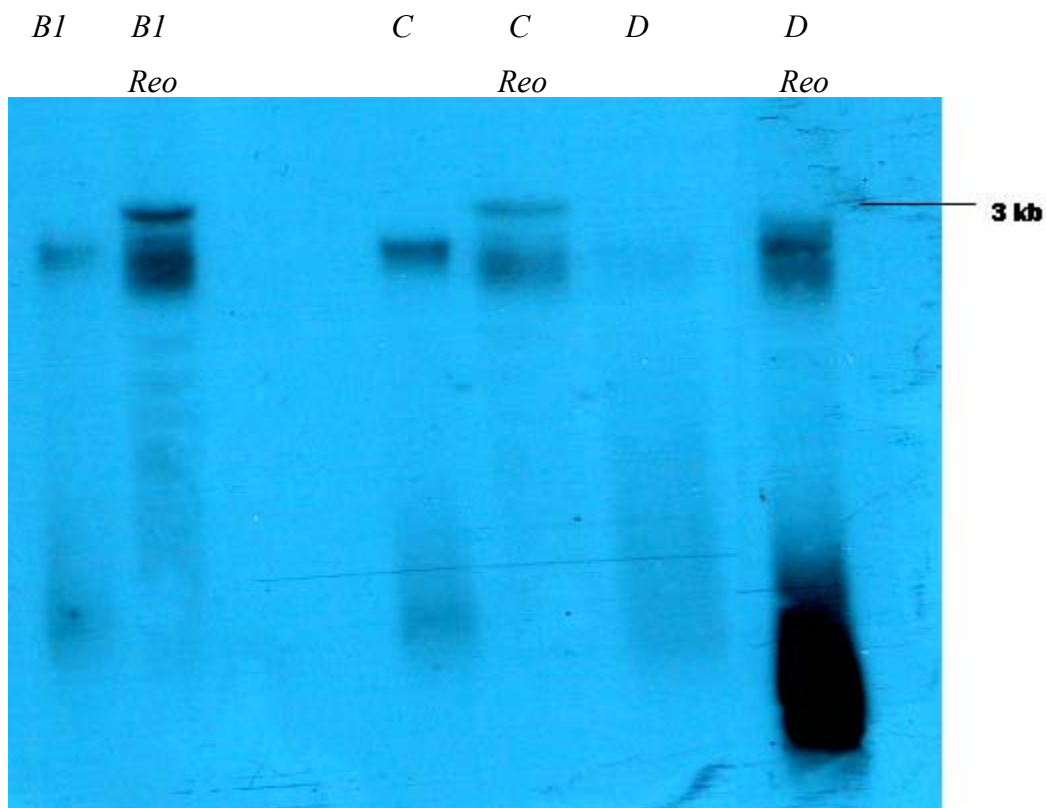


Εικόνα 3.4. Ανάλυση κατά Northern (1,2% αγαρόζη, ιχνηλάτης CMV CP sense DNA) προς διερεύνηση προστασίας του dsRNA μεταγράφου hpCP από την πρωτεΐνη Reo-sigma3. Η προστασία του μεταγράφου είναι ξεκάθαρη: εκτός από την διαφορά στα 2,8 kb (μέγεθος του μεταγράφου) ανιχνεύονται και διάφορες ενδιάμεσες μορφές που δεν αποδομήθηκαν.



Εικόνα 3.5. Ανάλυση κατά Northern (5% ακρυλαμίδη, , ιχνηλάτης CMV CP sense DNA) προς διερεύνηση προστασίας του dsRNA μεταγράφου hrCP από την πρωτεΐνη Reo-sigma3. Πάλι η προστασία είναι εμφανής στα αγροεμποτισμένα φυτά.

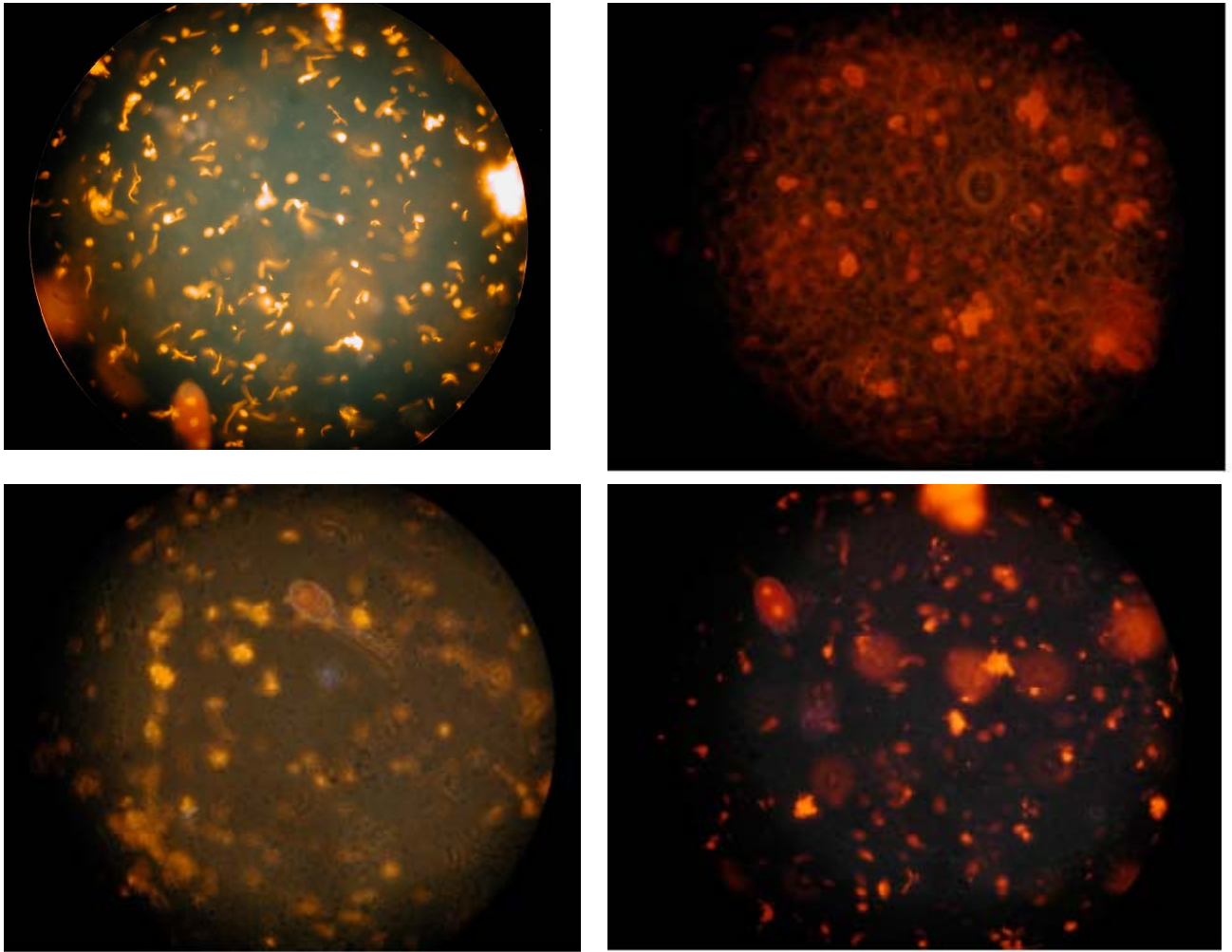
Εκτός τις ανθεκτικές A2 και D και φαινοτύπου ανάρρωσης A1 σειρές, και οι ευαίσθητες B1 και C υποβλήθησαν στην ίδια διαδικασία. Στην Εικόνα 3.6 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα του αγροεμποτισμού με την Reo-sigma3 και είναι σαφής η προστασία που παρέχει η πρωτεΐνη αλλά και η διαφορά των ευαίσθητων σειρών B1 και C από την ανθεκτική D.



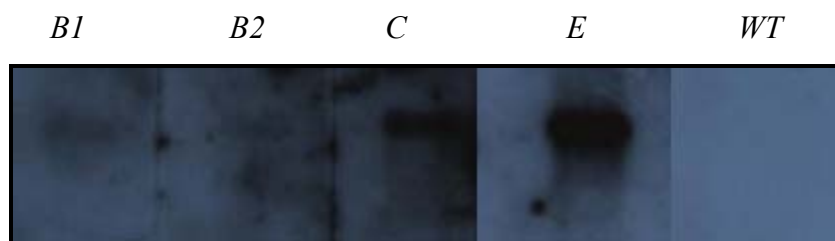
Εικόνα 3.6. Ανάλυση κατά Northern (1,2% αγαρόζη, ιχνηλάτης CMV CP sense DNA) προς διερεύνηση προστασίας του dsRNA μεταγράφου hrCP από την πρωτεΐνη Reo-sigma3. Το μετάγραφο παράγεται και στις ευαίσθητες (B1 και C) και στις ανθεκτικές (D) σειρές.

3.3. Απομόνωση πυρήνων και RUN-ON μεταγραφή: επιβεβαίωση ότι το μετάγραφο παράγεται.

Για επιβεβαίωση της μεταγραφής του διαγονιδίου hrCP (μέχρι τώρα έχουν ήδη γίνει ανάλυση μεθυλίωσης του υποκινητή και αγροεμποτισμός με την πρωτεΐνη Reo-sigma3), απομονώθηκαν πυρήνες από φύλλα ευαίσθητων και ανθεκτικών σειρών (Εικόνα 3.7) και έλαβε χώρα RUN-ON μεταγραφή. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας αυτής παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.8.



Εικόνα 3.7. Απομονωμένοι πυρήνες από φύλλα ευαίσθητων και ανθεκτικών σειρών για μετέπειτα RUN-ON μεταγραφή και ανίχνευση μεταγράφου. Η χρώση τους πραγματοποιήθηκε με μια μικρή ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου και η παρατήρησή τους σε μικροσκόπιο κάτω από UV συνθήκες. Μπορεί κάποιος να παρατηρήσει ακέραιους αλλά και τεθριμμένους πυρήνες, καθώς και υπολείμματα κυτταροπλασματικού κλάσματος (μιτοχονδριακό και χλωροπλαστικό DNA).



Εικόνα 3.8. Απομόνωση πυρήνων και RUN-ON μεταγραφή προς ανίχνευση μεταγράφου στις σειρές *B1* και *C* (ευαίσθητες) και *E* (ανθεκτική). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε καπνός αγρίου τύπου. Η παρουσία του μεταγράφου στις διαγονιδιακές σειρές είναι εμφανής. Η όλη διαδικασία είναι ποιοτική και όχι ποσοτική.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: απομονώθηκαν πυρήνες από 50 γρ φυλλικού ιστού με τον τρόπο που αναλύεται στο Κεφάλαιο 2, Υλικά και Μέθοδοι. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην διατήρηση της ακεραιότητας των πυρήνων, οι οποίοι παρατηρήθηκαν και μικροσκοπικά μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Η RUN-ON μεταγραφή έγινε πάλι με τον τρόπο που περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο, ενώ ακολούθησε και αλκαλική λύση του μεταγράφου πριν την υβριδοποίηση. Η υβριδοποίηση έγινε παρουσία φορμαμίδης και η μεμβράνη περιείχε το προϊόν της πέψης 1 γ του pBluescript/CP sense με τα ένζυμα SstI/BamHI που απελευθερώνουν το CP sense. Ο ιχνηλάτης (RUN-ON αλκαλικά υδρολυμένο μετάγραφο) προστέθηκε στο διάλυμα υβριδοποίησης και έπειτα από ολονύκτια επώαση και 2 πλυσίματα πραγματοποιήθηκε έκθεση σε διαφορετικούς χρόνους προκειμένου να υπάρχει πιο καθαρό σήμα. Έτσι, στην Εικόνα 3.8 παρουσιάζεται η ποιοτική και όχι η ποσοτική ταυτοποίηση του μεταγράφου στις σειρές, καθώς ούτε ο αριθμός των πυρήνων μετρήθηκε ούτε ταυτοποιήθηκε πόσοι ήταν ζωτικοί αλλά ούτε και οι κρούσεις του μεταγράφου σημειώθηκαν πριν την υβριδοποίηση. Παρόλα αυτά, είναι εμφανές ότι σε κάποιο βαθμό, διαφορετικό προφανώς για κάθε σειρά, το μετάγραφο παράγεται.

3.4. Εξέταση του 3' άκρου του μεταγράφου με Southern και TAIL-PCR.

Κατά την ενσωμάτωση του T-DNA στο γονιδίωμα του φυτού, το δεξί συνοριακό συντηρείται μέχρι το τελευταίο του νουκλεοτίδιο, ενώ το αριστερό όχι, με αποτέλεσμα κάποιες ελλείψεις στην περιοχή αυτή. Κατά την διερεύνηση ανίχνευσης του τερματιστή της μεταγραφής Tnos στους T4 απογόνους της CMV28 σειράς, παρατηρήθηκε πως μόνο οι ευαίσθητες σειρές B1 και C τον περιείχαν (Εικόνα 3.9). Όπως είναι φυσικό, το γεγονός αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία αν αναλογιστεί κανείς την σημασία του τερματιστή στην διαδικασία της πολυαδενυλίωσης του μεταγράφου και της συνεπακόλουθης εξόδου του από τον πυρήνα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι πιθανή έλλειψή του όχι μόνο θα ακινητοποιούσε το μετάγραφο στον πυρήνα αλλά και θα το καθιστούσε έκτροπο. Για την σημασία αυτού του ευρήματος δεν είναι δυνατόν να βγάλουμε σαφή συμπεράσματα από το Southern και μόνο (αν και επαναλήφθηκε με τα ίδια αποτελέσματα), καθώς λόγοι όπως ατελής πέψη του γενωμικού υλικού, μειωμένη έκθεση κτλ μπορεί να ευθύνονται για την μη ύπαρξή του στις ανθεκτικές σειρές.

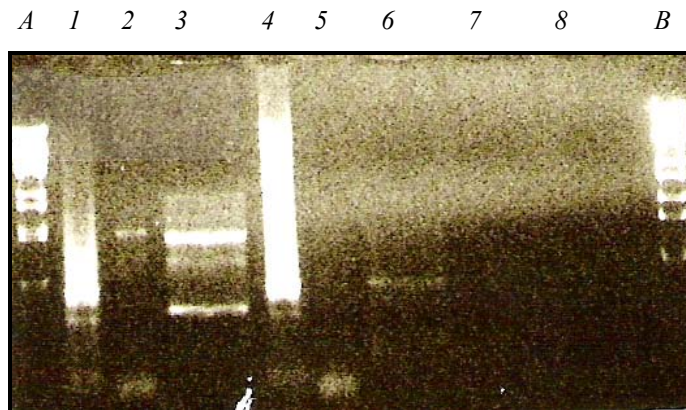
A1 A2 B1 B2 C D E WT



Εικόνα 3.9. Αποτύπωμα κατά Southern (1,6% αγαρόζη, ιχνηλάτης Tnos) προς διερεύνηση ύπαρξης του τερματιστή της μεταγραφής Tnos στους T4 απογόνους της σειράς CMV28. Όπως φαίνεται μόνο οι ευαίσθητες σειρές B1 και C φαίνεται να τον διαθέτουν. Ίση ποσότητα γενωμικού υλικού (10 γ) από κάθε σειρά φορτώθηκε αφού προηγουμένως είχε υποστεί διαδοχική πέψη με τα ένζυμα EcoRI/SacI προς απελευθέρωση του Tnos (~290 bp).

Περισσότερα δεδομένα την όχι μόνο ύπαρξη ή όχι του Tnos αλλά επίσης και για τυχόν διαφορές του στις διάφορες σειρές, αλλά και γενικά για το 3' άκρο του T-DNA μετά την ενσωμάτωση θα μπορούσε να μας δώσει μια αλληλούχιση της εν λόγω περιοχής. Καθώς

όμως η περιοχή ενσωμάτωσης είναι άγνωστη (ώστε να σχεδιαστούν εκκινητές για PCR) στραφήκαμε στην λύση της TAIL-PCR (και όχι της Inverse-PCR που δεν συνίσταται για γενωμικό καπνού, αλλά ούτε και της ορθόδοξης PCR με εκκινητή από το αριστερό συνοριακό, το οποίο δεν ξέρουμε αν συντηρείται. Προσπάθειες με τον δεύτερο τρόπο άλλωστε δεν κατέληξαν σε επιτυχία). Η αρχή της μεθόδου περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2, Υλικά και Μέθοδοι, αλλά ας υπενθυμηθεί ότι βασίζεται στην εφαρμογή εξειδικευμένων και αυθαίρετων εκφυλισμένων εκκινητών, ο συνδυασμός των οποίων σε διακυμαινόμενης αυστηρότητας κύκλους θερμικής ασυμμετρίας δίνει το επιθυμητό προϊόν. Επιλέχθηκαν να μελετηθούν οι σειρές C (ευαίσθητη) και D (ανθεκτική) καθώς εμφανίζουν μόνο ένα αντίγραφο του διαγονιδίου. Τα αποτελέσματα της μεθόδου φαίνονται στην Εικόνα 3.10, ενώ οι ζώνες που εμφανίζονται στις τρίτες αντιδράσεις (διάδρομοι 3 και 6) πρόκειται να απομονωθούν και να αλληλουχηθούν.



Εικόνα 3.10. Ηλεκτροφορητικό πρότυπο (αγαρόζη 1%) του αποτελέσματος της TAIL-PCR για τις σειρές C και D, καθώς και για WT και νερό (αρνητικοί μάρτυρες). Τα παραπάνω αποτελέσματα αναφέρονται στην χρησιμοποίηση του 2ου από τους 3 εκφυλισμένους ανιχνευτές. Οι διάδρομοι A και B αναφέρονται σε λDNA/BstEII και λDNA/StyI αντίστοιχα. Οι 1-3 στην 1η, 2η και 3η αντίστοιχα αντίδραση για την σειρά C, οι 4-6 στην 1η, 2η και 3η αντίστοιχα αντίδραση για την σειρά D, ενώ οι 7 και 8 για την 3η αντίδραση για WT και νερό αντίστοιχα. Όπως είναι εμφανές, για την C (διάδρομος 3) παίρνουμε 3 προϊόντα, για την D (διάδρομος 6) 1, και για τους αρνητικούς μάρτυρες κανένα.

Κεφάλαιο 4

Συζήτηση

4. Συζήτηση.

Η παρούσα εργασία βασίστηκε σε διαγονιδιακές σειρές καπνού *Nicotiana tabacum* που είχαν δημιουργηθεί στο παρελθόν (Kalantidis et al., 2002) και οι οποίες εκφράζουν υπό μορφή φουρκέτας ένα τμήμα του RNA 3 του CMV που κωδικοποιεί την καψιδιακή του πρωτεΐνη CP (Εικόνα 1.4). Οι προκύπτουσες σειρές υποβλήθηκαν σε δοκιμασία μόλυνσης με τον ιο CMV, με αποτέλεσμα κάποιες σειρές να δείξουν ανθεκτικότητα, κάποιες ευασθησία και κάποιες φαινότυπο ανάρρωσης. Μια εκ των ανθεκτικών σειρών ήταν η CMV28, η ανθεκτικότητα της οποίας δεν παρατηρήθηκε μόνο φαινοτυπικά αλλά πιστοποιήθηκε και πειραματικά με την ανίχνευση CMV siRNAs (καθιστώντας την παρουσία τους μοριακό δείκτη). Χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης σειράς αποτελεί και το γεγονός ότι φέρει πολλαπλά αντίγραφα του διαγονιδίου. Το αν η εμφανιζόμενη ανθεκτικότητα σχετίζεται με την συνδυασμένη δράση των πολλαπλών αντιγράφων ή οφείλεται μόνο σε συγκεκριμένα (αποτέλεσμα θέσης) οδήγησε στην διάσχιση της σειράς αυτής με αποτέλεσμα τους T4 απογόνους CMV28A1, CMV28A2, CMV28B1, CMV28B2, CMV28C, CMV28D και CMV28E. Οι σειρές A2, B2, D και E είναι ανθεκτικές, οι B1 και C ευαίσθητες και η A2 μέτριας ανθεκτικότητας (Εικόνα 1.5). Σε προηγούμενη μεταπτυχιακή διατριβή (Τζανοπούλου Μ., 2004) πραγματοποιήθηκε ανάλυση μεθυλίωσης του εκκινητή των ευαίσθητων σειρών B1 και C, χωρίς να παρατηρηθεί μεθυλίωση, ενώ ανάλυση μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής όλων των σειρών έδειξε ότι οι ευαίσθητες σειρές παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό μεθυλίωσης από τις ανθεκτικές. Τα αποτελέσματα φυσικά αυτά παρουσίαζαν εξαιρετικό ενδιαφέρον και θεωρήθηκε σκόπιμο να διερευνηθούν περαιτέρω.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε αρχικά μια καινούρια προσπάθεια μεταγραφικής ανάλυσης των σειρών αυτών (T4 απόγονοι της CMV28). Στο παρελθόν (Kalantidis et al., 2002) αποδείχτηκε ότι οι ανθεκτικές σειρές παράγουν CMV CP siRNAs ενώ οι ευαίσθητες όχι (τουλάχιστον όχι ανιχνεύσιμες). Η ανάλυση μεθυλίωσης του εκκινητή (χρησιμοποιώντας το σύστημα ισοσχιζομερών MspI/HpaII) των ευαίσθητων σειρών δεν έδειξε μεθυλίωση, άρα κατά πάσα πιθανότητα δεν πρόκειται για μεταγραφική σίγηση. Για την πιστοποίηση του παραπάνω, πραγματοποιήθηκαν δυο πειραματικοί χειρισμοί. Κατά τον πρώτο, έλαβε χώρα αγροεμποτισμός των εν λόγω

σειρών με την Reo-sigma3, μια dsRNA δεσμεύουσα πρωτεΐνη των ιών της οικογένειας Reoviridae (το γενετικό υλικό των οποίων είναι dsRNA) που προστατεύει δίκλινα μόρια RNA από την δράση της ενδονουκλεάσης Dicer (Lichner et al., 2003). Ακολούθησε απομόνωση RNA από τα αγροεμποτισμένα φύλλα και ανάλυση κατά Northern, με αποτέλεσμα την πιστοποίηση αφενός μεν της προστατευτικής δράσης της Reo-sigma3, αφετέρου δε της ύπαρξης του διαγονιδιακού μεταγράφου στις ευαίσθητες σειρές (Εικόνα 3.6). Κατά τον δεύτερο πειραματικό χειρισμό απομονώθηκαν πυρήνες από ανθεκτικές και ευαίσθητες σειρές και υποβλήθηκαν σε RUN-ON μεταγραφή, για να επιβεβαιωθεί ότι οι ευαίσθητες σειρές παράγουν το μετάγραφο (Εικόνα 3.7), με μειονέκτημα της μεθόδου αυτής το ποιοτικό και όχι το ποσοτικό του χαρακτήρα της (στην περίπτωση μας δεν μετρήθηκαν ούτε ο αριθμός των πυρήνων και η ζωτικότητα τους ούτε οι κρούσεις του RUN-ON μεταγράφου). Το γεγονός ότι ανιχνεύουμε μετάγραφο αλλά όχι siRNAs είναι κάτι που δεν μπορούμε να εξηγήσουμε, τουλάχιστον όχι ακόμα. Αν αναλογιστεί όμως κανείς την επαναληψιμότητα γεγονότων που συνηγορούν υπέρ της παρουσίας μεταγράφου (ανάλυση μεθυλίωσης εκκινητή, αγροεμποτισμός με Reo-sigma3, RUN-ON μεταγραφή) και υπέρ της απουσίας CMV CP siRNAs (ευαισθησία, απουσία σε Northern) τότε η περίπτωση πειραματικών σφαλμάτων είναι πολύ ακραία υπόθεση. Λιγότερο ακραία υπόθεση θα ήταν να ισχυριστεί κάποιος ότι το μετάγραφο παράγεται αλλά δεν εξάγεται για κάποιο λόγο από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Μια πιθανή αιτία θα ήταν η απουσία του τερματιστή της μεταγραφής T_{nos} (φαινόμενο συχνό κατά την ενσωμάτωση του LB του T-DNA στο γονιδίωμα του φυτού) με συνεπακόλουθη ανυπαρξία του σήματος polyA που ευθύνεται για την εξαγωγή του μεταγράφου στο κυτταρόπλασμα. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε ανάλυση του 3' άκρου του μεταγράφου με την τεχνική της TAIL-PCR αλλά δυστυχώς τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά, καθώς δεν κατέστη δυνατή η απομόνωση του T_{nos} και η μετέπειτα σύγκρισή του στις σειρές C και D. Εν ολίγοις, η TAIL-PCR ως τεχνική δούλεψε, παρατηρήθηκαν προϊόντα στην τρίτη αντίδραση (και μάλιστα εξειδικευμένα προϊόντα όπως φαίνεται και από την μετατόπιση τους σε σχέση με αυτά της δεύτερης αντίδρασης - βλέπε Εικόνες 2.1 και 3.10), έλαβε χώρα σύνδεσή τους σε φορέα TOPO pCR2.1 και αλληλόυχισή τους με εκκινητή M13, αλλά τα αποτελέσματα δεν περιελάμβαναν τον τερματιστή της μεταγραφής. Οι προσπάθειες όμως προς αυτήν την κατεύθυνση θα συνεχιστούν στο μέλλον. Είναι

ωστόσο αξιοπερίεργο το γεγονός ότι ακόμα όμως και αν η τεχνική είχε πετύχει και αποδεικνυόταν ότι όντως στις ευαίσθητες σειρές το μετάγραφο παράγεται αλλά δεν εξάγεται από τον πυρήνα, ή μόνο ένα ελάχιστο ποσοστό του βγαίνει και επεξεργάζεται από την κυτταροπλασματική Dicer, με τα παραγόμενα μη ανιχνεύσιμα siRNAs να μην προσδίδουν ανθεκτικότητα (υψηλό threshold) αλλά να οδηγούν σε μεθυλίωση (χαμηλό threshold), θα παρέμενε μυστήριο η τύχη του ακινητοποιημένου στον πυρήνα μεταγράφου: δεν θα αποτελούσε άραγε στόχο για τις πυρηνικές Dicers; Και τα παραγόμενα τότε CP siRNAs δεν θα ήταν ανιχνεύσιμα από την στιγμή που η αρχική ποσότητα του μεταγράφου είναι ανιχνεύσιμη; Το περίεργο είναι ότι ένα αποτύπωμα κατά Southern προς πιστοποίηση της παρουσίας του Tnos στις σειρές A1, A2, B1, B2, C, D και E παραδόξως έδειξε *επανελημμένα* την παρουσία του Tnos στις ευαίσθητες και όχι στις ανθεκτικές σειρές (Εικόνα 3.8), κάτι αντίθετο με την αρχική μας υπόθεση. Αν αυτό ίσχυε, τότε θα μπορούσε κάποιος να ισχυριστεί ότι πιθανότατα το μετάγραφο στις ανθεκτικές σειρές δεν εξάγεται από τον πυρήνα λόγω απουσίας polyA αλλά θεωρείται έκτροπο abRNA και παράγει μεγάλες ποσότητες siRNAs που ευθύνονται για την παρατηρούμενη ανθεκτικότητα. Το γεγονός ότι η σειρά E που περιέχει όλα τα αντίγραφα δεν έδωσε σήμα για τον Tnos μας κάνει να αντιμετωπίζουμε με δυσπιστία το παραπάνω αποτέλεσμα και υπογραμμίζει την ανάγκη νέων πειραμάτων προς διελεύκανση αυτών των ασαφειών.

Η σειρά CMV28 είχε πολλαπλά αντίγραφα του διαγονιδίου που *μετά την διάσχιση* μοιράστηκαν στους απογόνους της. Κάθε απόγονος υποβλήθη σε ανάλυση μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου με αποτέλεσμα την εμφάνιση μεγαλύτερης έκτασης μεθυλίωσης στις ευαίσθητες από τις ανθεκτικές σειρές. Προς διερεύνηση της κατάστασης μεθυλίωσης των αντιγράφων *πριν την διάσχιση*, επιλέχθηκε η σειρά CMV28E (έπειτα από ανάλυση κατά Southern για την παρουσία 4 αντιγράφων του διαγονιδίου, Εικόνα 3.1), της οποίας τα αντίγραφα απομονώθηκαν και υπέστησαν ξεχωριστά ανάλυση μεθυλίωσης με το σύστημα MspI/HpaII, δεικνύοντας ίδια (υψηλή) κατάσταση μεθυλίωσης (Εικόνα 3.3). Είναι πιθανό όλα τα αντίγραφα να πυροδοτούν διαδικασία μεθυλίωσης του εαυτού τους ή και των άλλων αντιγράφων. Δεν αποκλείεται όμως μόνο λίγα ή ακόμα και μόνο ένα αντίγραφο (λόγω της ιδιαιτερότητας της δομής του ή της θέσης του) να ξεκίνησε την διαδικασία της μεθυλίωσης και να μεθύλιωσε

εκτός από τον εαυτό του και τα άλλα (συνδυασμένη δράση των DRM1, DRM2, MBDs/HDACs, DDM1/SUVH2). Η μεθυλίωση ως επιγενετικό χαρακτηριστικό διαβιβάζεται στην επόμενη γενιά (μέσω των MET1/SUVH4, CMT3, pol IV) και έτσι οι απόγονοι της διάσχισης "θυμούνται" το σημάδι (CG και CNG μεθυλίωση). Αν το δεύτερο σενάριο έχει κάποιο ίχνος αληθείας, τότε το γεγονός ότι η σειρά CMV28C (ευαίσθητη, 1 αντίγραφο διαγονιδίου, μη ανιχνεύσιμα CP siRNAs) παρουσιάζει περισσότερη μεθυλίωση από την CMV28D (ανθεκτική, 1 αντίγραφο διαγονιδίου, ανιχνεύσιμα CP siRNAs) μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα το αντίγραφο που ξεκίνησε την διαδικασία μεθυλίωσης να είναι το αντίγραφο των ευαίσθητων σειρών B1 και C. Το γεγονός ότι η ευαίσθητη B1 παρουσιάζει το ίδιο ποσοστό μεθυλίωσης με την ανθεκτική E εξηγείται αμέσως από το γεγονός ότι η E περιέχει και τα 4 αντίγραφα προ της διάσχισης (άρα και το αντίγραφο της B1 ή της C). Επιπρόσθετα, το ότι οι ευαίσθητες σειρές παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό μεθυλίωσης από τις ανθεκτικές, παρόλο που μόνο οι δεύτερες εμφανίζουν CMV CP siRNAs, δεν είναι παράλογο, καθώς η ποσότητα των siRNAs παράγουν οι πρώτες μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμες αλλά να αρκούν για να ξεπεράσουν το όριο (threshold) που απαιτείται για RdDM. Εξάλλου, μπορεί η RdDM να μην απαιτεί καν siRNAs αλλά μεγάλα μόρια RNA, κάτι που και οι ευαίσθητες σειρές αποδείχτηκε ότι διαθέτουν. Όπως και να έχει ο μηχανισμός, το γεγονός είναι ότι τα 4 αντίγραφα του διαγονιδίου πριν την διάσχιση εμφανίζουν την ίδια και μετά την διάσχιση διαφορετική κατάσταση μεθυλίωσης. Μπορεί όλα τα αντίγραφα να μεθυλιώνουν τον εαυτό τους ή ένα να οφείλεται για την διαδικασία αυτή και τα υπόλοιπα να θυμούνται το σημάδι. Πριν την διάσχιση, ένα αντίγραφο (ίσως αυτό της σειράς C) ξεκίνησε de novo την μεθυλίωση του εαυτού του και των άλλων, μεθυλιώνοντας στον μέγιστο δυνατό βαθμό όλα τα αντίγραφα (σειρά E). Μετά την διάσχιση, το αντίγραφο που ξεκίνησε την διαδικασία ευθύνεται πάλι για την μέγιστη μεθυλίωση (σειρά C) αλλά τα άλλα αντίγραφα μην μπορώντας να πυροδοτήσουν από μόνα τους την διαδικασία είναι αναγκασμένα να την θυμούνται, και ίσως όχι και τόσο καλά (σειρά D). Η CG και CNG μεθυλίωση διατηρούνται από την MET1 και CMT3 αντίστοιχα (Ebbs and Bender, 2006), ενώ η CNN είναι μόνο de novo μεθυλίωση, δεν διατηρείται όταν το σήμα χαθεί (Matzke et al., 2004). Το σύστημα ισοσχιζομερών MspI/HpaII που χρησιμοποιούμε αναλύει μόνο CG μεθυλίωση, οπότε για μια ποσοτική και ασφαλέστερη ανάλυση μεθυλίωσης

σχεδιάζεται στο μέλλον να πραγματοποιηθεί μέσω του συστήματος bisulfite, διαδικασία κατά την οποία το DNA μεταχειρίζεται με sodium bisulfite με αποτέλεσμα οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες να παραμείνουν ως έχουν, ενώ οι μη μεθυλιωμένες μετατρέπονται σε ουρακίλη και αργότερα στην PCR σε θυμίνη (Clark et al., 1992). Τα αποτελέσματα όχι μόνο θα μας βοηθήσουν να εξάγουμε ασφαλέστερα συμπεράσματα για την διαφορά της έκτασης μεθυλίωσης των ευαίσθητων και ανθεκτικών σειρών (αφού δεν θα μελετάμε μόνο CG μεθυλίωση), αλλά και πιθανότατα θα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε ποιο αντίγραφο πυροδότησε την διαδικασία της μεθυλίωσης (μέσω CNN μεθυλίωσης στις σειρές C και D) ή αν όλα τα αντίγραφα δουλεύουν, όπως κάθε πράγμα στη φύση, για τον εαυτό τους.

Βιβλιογραφία

- Allen, E.** 2005. microRNA-directed phasing during transacting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **121**:207–221.
- Ballestar, E. and Wolffe, A.** 2001. Methyl-CpG-binding proteins: targeting specific gene repression. *Eur. J. Biochem.* **268**:1-6.
- Bartel, D.** 2004. miRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* **116**:281-297.
- Baumbush, L.O.** et al. 2001. The Arabidopsis thaliana genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to 4 evolutionary conserved classes. *Nucleic Acids Res.* **29**:4319-4333.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P., Sunkar, R. and Zhu, J.K.** 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* **123**:1279-1291.
- Brodersen, P. and Voinnet, O.** 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *TIGS* **22**:268-280.
- Cai, X., Hagedorn, C. and Cullen, B.** 2004. Human miRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**:1957-1966.
- Cao, X. and Jacobsen, S.** 2002. Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.* **12**:1138-1144.
- Cao, X., Springer, N., Muszynski, M., Phillips, R., Kaeppler, S. and Jacobsen, S.** 2000. Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:4979-4984.
- Cavalli, G. and Paro, R.** 1998. Chromo-domain proteins: linking chromatin structure to epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**:354-360.
- Dennis, K., Fan, T., Geinman, T., Yan, Q. and Muegge, K.** 2001. Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev.* **15**:2940-2944.
- Dorssers, L.** et al. 1984. Purification of cowpea mosaic virus RNA replication complex: identification of a virus-encoded 110,000 dalton polypeptide responsible for RNA chain elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 1951–1955.
- Ebbs, M. and Bender, J.** 2006. Locus-specific control of DNA methylation by the Arabidopsis SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell* **18**:1166-1176.
- Elgin, S. and Grewal, S.** 2003. Heterochromatin: silence is golden. *Curr. Biol.* **13**:895-898.

- Finnegan, E. and Dennis, E.** 1993. Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **21**:2383-2388.
- Finnegan, E., Peacock, W. and Dennis, E.** 1996. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:8449-8454.
- Finnegan, E. and Kovac, K.** 2000. Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* **43**:189-201.
- Gazzani, S. et al.** 2004. A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* **306**:1046-1048.
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R., Roldan, T., David, L. and Zhu, J.** 2002. ROS1, a repressor of TGS in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* **111**:803-814.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K., Kim, Y., Jin, H. and Kim, V.** 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary miRNA processing. *Genes Dev.* **18**:3016-3027.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. and Voinnet, O.** 2003. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.* **22**:4523-4533.
- Hutvagner, G., Simard, M., Mello, C. and Zamore, P.** 2004. Sequence-inhibition of small RNA function. *PLoS Biol.* **2**:E98.
- Jones, L., Hamilton, A., Voinnet, O., Thomas, C., Maule, A. and Baulcombe, D.C.** 1999. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* **11**:2291-2301.
- Jones, L., Ratcliff, F. and Baulcombe, D.C.** 2001. RNA-directed TGS in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires MET1 for maintenance. *Curr. Biol.* **11**:747-757.
- Kalantidis, K., Psaradakis, S., Tabler, M., and Tsagris, M.** 2002. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived dsRNA is indicative of resistance to the virus. *MPMI* **15**:826-833.
- Kanno, T., Mette, M., Kreil, K., Aufsatz, W., Matzke, M. and Matzke, A.** 2004. Involvement of a putative SNF2 chromatin remodelling protein DRD1 in RdDM. *Curr. Biol.* **14**:801-805.
- Khan, Z.A. et al.** 1986. RNA-directed RNA polymerases from healthy and from virus-infected cucumber. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 2383-2386.
- Kinoshita, T., Miura, A., Choi, Y., Kinoshita, Y., Cao, X., Jacobsen, S., Fischer, R. and Kakutani, T.** 2004. One-way control of FWA imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation. *Science* **303**:521-523.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J., Kim, S., Kim, V.** 2002. miRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* **21**:4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K., Lee, S., Baek, S. and Kim, V.** 2004. miRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**:4051-4060.
- Lichner, Z., Silhavy, D. and Burgyn, J.** 2003. DsRNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. *J. Gen. Virology* **84**: 975-980.

Lindroth, A., Cao, X., Jackson, J., Zilbermann, D., McCallum, C., Henikoff, S. and Jacobsen, S. 2001. Requirement of CMT3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* **292**:2077-2080.

Lindroth, A. et al. 2004. Dual histone H3 methylation at lysines 9 and 27 required for interaction with CMT3. *EMBO J.* **23**:4286-4296.

Lippman, Z. et al. 2004. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* **430**:471-476.

Lippman, Z., May, B., Yordan, C., Singer, T. and Martienssen, R. 2003. Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via siRNA and histone modification. *PLoS Biol.* **1**:E67.

Liu, Y., Mitsukawa, N., Oosumi, T. and Whittier, R. 1995. Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* **8**:457-463.

Mathieu, O. and Bender, J. 2004. RNA-directed DNA methylation. *J. Cell Sci.* **117**:4881-4888.

Meins, F., Azeddine, S. and Blevins, T. 2005. RNA silencing systems and their relevance in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**:297-318.

Mette, M., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. and Matzke, A. 2000. *EMBO J.* **19**:5194-5201.

Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H. and Kakutani, T. 2001. Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in Arabidopsis. *Nature* **411**:212-214.

Naumann, K., Fischer, A., Hofmann, I., Krauss, V., Phalke, S., Irmeler, K., Hause, G., Aurich, A., Dorn, R., Jenuwein, T. and Reuter, G. 2005. *EMBO J.* **24**:1418-1429.

Onodera, Y., Haag, J., Ream, T., Nunes, P., Pontes, O. and Pikaard, C.S. 2005. Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* **120**:613-622.

Papp, I., Mette, M., Aufsatz, W., Daxinger, L., Schauer, S., Ray, A., van der Winden, J., Matzke, M. and Matzke, A. 2003. Evidence for nuclear processing of plant miRNA and siRNA precursors. *Plant Physiol.* **132**:1382-1390.

Parizotto, E., Dunoyer, P., Rahm, N., Himber, C. and Voinnet, O. 2004. In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes Dev.* **18**:2237-2242.

Park, M., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H. and Poethig, R. 2005. Nuclear processing and export of miRNAs in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:3691-3696.

Park, M., Li, J., Song, R., Messing, J. and Chen, X. 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog and HEN1, a novel protein act in miRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Curr. Biol.* **12**:1484-1495.

Qi, Y. et al. 2005. Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Mol. Cell* **19**, 421–428.

Reinhardt, B., Weinstein, E., Rhoades, M., Bartel, B. and Bartel, D. 2002. miRNAs in plants. *Genes Dev.* **16**:1616-1626.

Richards, E. 1997. DNA methylation and plant development. *Trends Genet.* **13**:319-323.

Sambrook, Fritsch and Maniatis 1989. Molecular Cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*

Scgwarz, D., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**:199-208.

Schauer, S., Jacobsen, S., Meinke, D. and Ray, A. 2002. DICER-LIKE 1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends Plant Sci.* **7**:487-491.

Steward, N. et al. 2002. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *J. Biol. Chem.* **277**:37741-37746.

Susi, P., Hohkuri, M., Wahrloos, T. and Kilby, N. 2004. Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Mol. Biol.* **00**:1-18.

Tang, G., Reinhardt, B., Bartel, D. and Zamore, P.D. 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* **17**:49-63.

Tingting, D. and Zamore, P.D. 2005. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* **132**:4645-4652.

Vaistij, F., Jones, L. and Baulcombe, D. 2002. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA-polymerase. *Plant Cell* **14**:857-867.

Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P. and Bartel, D. 2004. The action of ARGONAUTE 1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev.* **18**:1187-1197.

Vaucheret, H. 2005. RNA polymerase IV and transcriptional silencing.. *Nature Gen.* **37**:659-660.

Vaucheret, H. 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* **20**:759-771.

Wada, Y., Miyamoto, K., Kusano, T. and Sano, H. 2004. Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants. *Mol. Genet. Genom.* **271**:658-666.

Wada, Y. 2005. Physiological functions of plant DNA methyltransferases. *Plant Biotech.* **22**:71-80.

Wang, M., Wesley, S., Finnegan, E., Smith, N. and Waterhouse, P. 2001. Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants. *RNA* **7**:16-28.

Wassenegger, M. 2005. The role of RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* **122**:13-16.

Wassenegger, M. and Krczal, G. 2006. Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *TIPS* **11**:142-151.

Xie, Z. et al. 2001. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**:6516–6521.

Xie, Z., Johansen, L., Gustafson, A., Kasschau, K., Lellis, A. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* **2**:1-11.

Xu, G., Bestor, T., Bourc'his, D., Hsieh, C., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J. and Viegas-Pequignot, E. 1999. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* **402**:187-191.

Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R., Steward, R. and Chen, X. 2005. Methylation as a crucial step in plant miRNA biogenesis. *Science* **307**:932-935.

Zabel, P. et al. 1974. In vitro replication of cowpea mosaic virus RNA.I. Isolation and properties of the membrane-bound replicase. *J. Virol.* **14**, 1049–1055.

Zemach, A. et al. 2005. DDM1 binds Arabidopsis MBD proteins and affects their subnuclear localization. *Plant Cell* **17**:1549-1558.

Zemach, A., Li, Y., Wayburn, B., Ben-Meir, H., Kiss, V., Avivi, Y., Kalchenko, V., Jacobsen, S. and Grafi, G. 2005. *Plant Cell* **17**:1549-1558.

Zemach, A. and Grafi, G. 2003. Characterization of *Arabidopsis thaliana* MBD proteins. *Plant J.* **34**:565-572.

Zilberman, D. et al. 2003. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299**:716–719.