



ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNAs (small RNAs ) ΣΤΗ  
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Πτυχιακή εργασία  
του σπουδαστή Αθανάσιου Καραφλού

Καλαμάτα, Μάιος 2008

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ( ΤΕΙ )  
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNAs (small RNAs ) ΣΤΗ  
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Πτυχιακή εργασία  
του σπουδαστή Αθανάσιου Καραφλού

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ  
Δρ. Ι. Ν. ΞΥΝΙΑΣ  
Αναπληρωτής Καθηγητής

Καλαμάτα, Μάιος 2008

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας και της συμπλήρωσης τεσσάρων χρόνων στο χώρο του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος (Τ.Ε.Ι.) Καλαμάτας και ιδιαίτερα στο τμήμα Φυτικής Παραγωγής αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους αυτούς που συμμετείχαν και βοήθησαν για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Ιωάννη Ξυνιά, για την επιστημονική καθοδήγηση και την ηθική υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στο να αναλάβω αυτό το τόσο ενδιαφέρον και δελεαστικό θέμα, καθώς και για το φιλικό και άριστο περιβάλλον εργασίας. Με μεγάλη μου χαρά χαιρετίζω τη σημαντική βοήθεια που μου παρείχε στην προσπάθειά του να μου δώσει αρκετό υλικό και οδηγίες για τη συμπλήρωση αυτής της διατριβής. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου που με στήριξαν σε αυτήν την προσπάθεια για τη δημιουργία αυτής της διατριβής και για τις δύσκολες στιγμές που γίνονταν πιο εύκολες με την παρέα τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω, αν και αυτό είναι πολύ λίγο, την οικογένειά μου, τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την υπομονή, τη στήριξη, το κουράγιο και την αγάπη που μου έδωσαν όλα αυτά τα χρόνια που ασχολήθηκα με την εκπαίδευσή μου στον τομέα του τεχνολόγου – γεωπόνου. Ό,τι είμαι σήμερα το οφείλω σε αυτούς και στην στήριξη που μου παρέχουν, τόσο την υλική όσο και την ψυχολογική. Δεν υπάρχουν λόγια να τους εκφράσω την ευγνωμοσύνη και την αγάπη μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο τρόπος που αναπτύσσονται μορφολογικά και λειτουργικά οι φυτικοί οργανισμοί κατά τη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου προκάλεσε το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων. Πολλές έρευνες έγιναν (και που ακόμα συνεχίζονται) ώστε να ανακαλυφθεί μια θεωρία που να εξηγεί τον τρόπο αυτό.

Για πολλά χρόνια η ερευνητική κοινότητα πίστευε, ότι ο μοναδικός εκπρόσωπος της μετάδοσης της γενετικής πληροφορίας αποτελούσε το DNA και ότι το RNA δεν ήταν τίποτα άλλο παρά μόνο ένα συμπληρωματικό μόριο. Με τις τελευταίες έρευνες που έγιναν αποδείχθηκε ότι υπάρχουν περισσότερα είδη RNA σε σχέση με τα τρία που ήταν ήδη γνωστά, τα οποία είχαν άμεση δράση σε πολλές δραστηριότητες των κυττάρων των φυτών.

Η παρούσα διατριβή ασχολείται με την ικανότητα που έχουν τα μικρά μόρια RNA να συμμετέχουν ενεργά στη ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών. Η βελτίωση της λειτουργίας τους με την άμεση αντίδραση αυτών των μορίων έρχεται να εξηγήσει πολλά από τα ερωτήματα που είχαν μείνει αναπάντητα αρκετό καιρό.

Πολλοί επιστήμονες προσπάθησαν να εξηγήσουν τον τρόπο, με τον οποίο δραστηριοποιούνται τα μόρια των μικρών RNA στο φυτικό κύτταρο, με τις διάφορες εργαστηριακές αναλύσεις. Μερικά από τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων παρουσιάζονται σε αυτήν την πτυχιακή εργασία.



*Στους γονείς μου  
και στον πολυαγαπημένο μου αδερφό*

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....8**

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ**

**Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNA  
ΣΤΟΥΣ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ**

**1.1 Η ΘΕΩΡΙΑ ΤΟΥ ΚΟΣΜΟΥ ΤΟΥ RNA ΚΑΙ Η ΕΠΑΝΑΔΙΑΤΥΠΩΣΗ  
ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΔΟΓΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.....11**

1.1.1 Θεωρία του κόσμου του RNA.....12

1.1.2 Επαναδιατύπωση του κεντρικού δόγματος της Μοριακής Βιολογίας.....12

**1.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΚΟΣΜΟ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNA..... 13**

**1.3 Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΤΟΥ RNA ΣΤΑ ΦΥΤΑ.....17**

**1.4 Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ RNAi (RNA interference).....19**

1.4.1 Αναγνώριση και ορισμός του miRNA.....21

1.4.2 Ποια είναι η σημασία του siRNA.....23

1.4.3 Σύγκριση μεταξύ των δύο RNAi (miRNA και siRNA).....25

**1.5 ΤΟ ΜΙΚΡΟ ΠΥΡΗΝΙΚΟ RNA (snRNA).....25**

**1.6 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟΥ..... 27**

1.6.1. Το ριβόσωμα ως ριβοένζυμο.....29

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ  
RNA ΣΤΟ ΦΥΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ**

**2.1 Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA ΔΙΑΔΡΑΜΑΤΙΖΕΙ  
ΕΝΑΝ ΕΚΠΛΗΚΤΙΚΑ ΙΣΧΥΡΟ ΡΟΛΟ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ.....32**

**2.2 Ο ΤΡΟΠΟΣ ΜΕ ΤΟΝ ΟΠΟΙΟ ΕΝΕΡΓΕΙ Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΟΥ  
RNAi ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.....33**

**2.3 Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΒΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ microRNA.....35**

**2.4 Η ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ ΤΩΝ microRNAs ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ  
ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.....37**

**2.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ.....39**

**2.6 Ο ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ siRNA ΣΤΟ ΦΥΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ.....42**

**2.7 ΠΡΩΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ  
ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗ.....44**

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ**

**ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟ  
ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΡΟΛΟ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNAs ΚΑΙ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ  
ΦΥΤΩΝ**

**3.1 ΤΑ microRNAs ΕΛΕΓΧΟΥΝ ΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ.....47**

**3.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ**

RNA ΣΤΑ ΦΥΤΑ.....	48
3.2.1 Γενετικές απαιτήσεις για το σχηματισμό των miRNA.....	48
3.2.2 Γενετικές απαιτήσεις για τον ενδογενή σχηματισμό των siRNA.....	50
3.2.3 Γενετικές απαιτήσεις για τον σχηματισμό των siRNA που παράγονται από τους ιούς.....	50
3.3 Η ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ miRNAs ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ cDNA.....	52
3.4 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ microRNA ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ.....	54
3.5 Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥΝ ΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΤΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΗ ΠΡΟΟΔΟ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ.....	55
3.6 Η ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ ΣΤΟ microRNA ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΠΟΛΛΕΣ . ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....	56
3.7 Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΕΙΝΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	58
3.8 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA ΣΤΑ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΕΙΝΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ ΣΤΗΝ ΟΛΟΚΛΗΡΩΤΙΚΗ ΤΟΥΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....	59
3.9 ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNA ΣΤΑ ΦΥΤΑ.....	61
3.10 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA ΣΕ ΦΥΤΑ.....	66
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	68
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>69</b>

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γεγονός ότι η επιστημονική γνώση στον τομέα της βιολογίας μεταβάλλεται με πιο αργούς ρυθμούς απ' ό,τι οι άλλοι τομείς της ευρύτερης επιστήμης. Όλοι οι στόχοι και οι επιθυμίες στην ανακάλυψη του «γιατί» που κρύβεται πίσω από κάθε σκέψη, απαιτούν μήνες ή και χρόνια σκληρής σωματικής και πνευματικής εργασίας, μόνο και μόνο για να «ανακαλυφθεί» τελικά μία σταγόνα από τον απέραντο ωκεανό της γνώσης. Και αυτό ισχύει γιατί η κλασική αντιμετώπιση στην εξέλιξη της επιστημονικής γνώσης είναι να προχωρεί βήμα-βήμα ανακαλύπτοντας κάτι καινούργιο κάθε φορά και να στηρίζεται πάντα στην προϋπάρχουσα γνώση. Έχει έρθει όμως η χρονική στιγμή που η ίδια η επιστημονική εξέλιξη προσφέρει τα εργαλεία εκείνα με τα οποία θα μετατρέψει την «γραμμικά μεταβαλλόμενη» πρόοδο σε «γεωμετρικά μεταβαλλόμενη», μέσα από την χρήση εξελιγμένων μεθόδων και πρακτικών, αλλά και με τη χρήση αυτοματοποιημένων νανο-ρομποτικών μηχανών.

Η ανακάλυψη των μικρών RNAs και ο ρυθμιστικός τους ρόλος είναι η πιο συναρπαστική εξέλιξη στη βιολογία τα τελευταία χρόνια. Την προηγούμενη δεκαετία έγινε μια αληθινή αποκάλυψη για το πώς τα μικρά μόρια του RNA έχουν τη δυνατότητα να ενεργήσουν ως ρυθμιστικοί παράγοντες στη λειτουργία του κυττάρου. Πρόκειται για μικρά, μονόκλιωνα μόρια RNA, τα οποία εκφράζονται από τα κύτταρα φυτών και ζώων. Ο ρόλος τους είναι να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων, προκαλώντας συνήθως την «απενεργοποίηση» μιας αναπτυξιακής διαδικασίας την κατάλληλη χρονική στιγμή, είτε επάγοντας την καταστροφή των αγγελιοφόρων RNA (mRNAs) είτε αναστέλλοντας τη μετάφραση τους σε πρωτεΐνες. Η κεντρική ιδέα της λειτουργίας των παραπάνω μορίων είναι κυρίως η συμμετοχή τους στην καταστολή των ευκαρυωτικών γονιδίων του κυττάρου.

Η αποτελεσματική αντιμετώπιση των μικρών RNAs ( si και mi RNA κ.ά.) απέναντι σε κάθε είδους προβλήματος της έκφρασης των γονιδίων του κυττάρου, όπως π.χ. μπορεί να είναι ένας πολλαπλασιαζόμενος ιός μέσα στο φυτικό κύτταρο και επίσης η μελέτη για τη γονιδιακή θεραπεία που τόσο πολύ κερδίζει σημαντικό έδαφος στη βιολογία, επιτρέπει στους επιστήμονες να ασχοληθούν ακόμα περισσότερο με τη δραστηριότητά τους στην έκφραση της πληροφορίας. Η ανάγκη για μια αποδεκτή θεωρία στην ευρύτερη επιστημονική κοινωνία σχετικά με τον τρόπο που ενεργούν τα μικρά, μονόκλιωνα μόρια του RNA στην σύνθεση των πρωτεϊνών μέσα σε ένα φυτικό οργανισμό, καθώς επίσης και

η παρεμβατική τους ιδιότητα κατά τη διάρκεια της μετάφρασης, αποτελεί ένα βασικό στοιχείο που απασχόλησε την παρούσα διατριβή.

Σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, γίνεται σαφές ότι η ανακάλυψη των μικρών μορίων RNA σε φυτικά κύτταρα από τους βιολόγους, καθώς και η δραστηριότητα που εμφανίζουν κατά τη διάρκεια της μεταγραφής αποτελούν σπουδαία ευρήματα στην ευρύτερη επιστημονική κοινότητα. Αυτό το γεγονός προσφέρει τη δυνατότητα σε πολλούς επιστήμονες να ερευνήσουν τον τρόπο με τον οποίο γίνεται η σύνθεση των πρωτεϊνών και στα φυτικά κύτταρα (εκτός από τα ζωικά) και να εφαρμόσουν ολοένα και καλύτερα τα δεδομένα που έχουν συλλέξει σχετικά με το πως αυτά τα μόρια εμπλέκονται στην έκφραση της γενετικής πληροφορίας.

Βασικός στόχος αυτής της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι να χρησιμοποιήσει με τον καλύτερο τρόπο όλες εκείνες τις αναφορές που έχουν γίνει από τους βιολόγους σχετικά με την ανάπτυξη των μικρών μορίων RNA σε φυτικούς οργανισμούς και να αποκαλύψει τη δράση και το ρόλο που έχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση και γενικά στη μεταφορά της γενετικής πληροφορίας στα φυτά.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται οι μελέτες για το πως μικρά μόρια RNA (κυρίως το si και το mi RNA) έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό τη γονιδιακή έκφραση των φυτικών οργανισμών και γενικά την ομαλή διεξαγωγή της διαδικασίας της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η παρουσία των μικρών μορίων του RNA στα κύτταρα των φυτών αποκαλύπτει μια σημαντική πτυχή της έκφρασης των γονιδίων, αφού τα μόρια αυτά θεωρούνται ως «ρυθμιστές» της δραστηριότητας του κυττάρου.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ**  
**Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNA<sub>s</sub> ΣΤΟΥΣ ΦΥΤΙΚΟΥΣ**  
**ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ**



## 1.1 Η ΘΕΩΡΙΑ ΤΟΥ ΚΟΣΜΟΥ ΤΟΥ RNA ΚΑΙ Η ΕΠΑΝΑΔΙΑΤΥΠΩΣΗ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΔΟΓΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Αμέσως μετά την ανακάλυψη των δομικών μονάδων και την περιγραφή της διπλής έλικας του DNA, διατυπώθηκε από τον Crick το 1968 το κεντρικό δόγμα της βιολογίας. Σύμφωνα με αυτό, η ροή της γενετικής πληροφορίας ξεκινά από το αποθηκευτικό μόριο DNA και με μεσολαβητή το RNA καταλήγει στις πρωτεΐνες. Το DNA δύναται να αντιγράφεται, ενώ η μεταγραφή του σε RNA αποτελεί μια μονόδρομη διαδικασία (Εικόνα 1). Οι πρωτεΐνες αποτελούν τα μοναδικά λειτουργικά μόρια στα κύτταρα των οργανισμών.



**Εικόνα 1.** Το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας, όπως εκφράστηκε από τον Crick.

Πηγή: [www.el.wikipedia.org](http://www.el.wikipedia.org)

Η γενική ιδέα ότι η εξέλιξη της ζωής πάνω στη γη βασίστηκε στην αντιγραφή του RNA αναφέρθηκε για πρώτη φορά πριν από περίπου 40 χρόνια (Woese κ. ά 1967, Crick κ. ά 1968, Orgel κ. ά 1968). Είχε προταθεί η άποψη πως υπήρξαν πολύ σημαντικά μόρια σε αυτό το πρώιμο στάδιο της εξέλιξης της ζωής, συμπεριλαμβανομένου και του RNA, αλλά η πιθανότητα τα μόρια αυτά να είναι παρόντα και στους σύγχρονους οργανισμούς αγνοήθηκε. Με τις σύγχρονες ανακαλύψεις από τους βιολόγους αποδείχθηκε πως το κεντρικό δόγμα της βιολογίας, όπως ήταν αποδεκτό έως τότε, αδυνατούσε να εξηγήσει τα νέα επιστημονικά δεδομένα. Με αφορμή την απρόσμενη ανακάλυψη των καταλυτικών μορίων RNA ή ριβοενζύμων ξεκίνησε μια εκτεταμένη συζήτηση στην επιστημονική κοινότητα για τον ρόλο του RNA στην προέλευση της ζωής (Pace και Marsh 1985, Sharp κ. ά 1985). Αποτέλεσμα όλης αυτής της προσπάθειας ήταν η διατύπωση της θεωρίας του κόσμου του RNA (Gilbert κ. ά 1986).

### 1.1.1 ΘΕΩΡΙΑ ΤΟΥ ΚΟΣΜΟΥ ΤΟΥ RNA

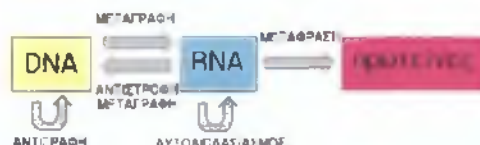
Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, οι διαπιστευμένες ικανότητες του RNA να αποτελεί το πρωτογενές αποθηκευτικό μόριο της γενετικής πληροφορίας και παράλληλα να καταλύει χημικές αντιδράσεις, το καθιστούν ικανό να αποτελεί το πρώτο βιολογικό μόριο που

εμφανίστηκε στο πρώτο οργανωμένο βιολογικό σύστημα, πριν το DNA και τις πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται και με τη μελέτη του ενδιάμεσου μεταβολισμού, όπως αυτός είναι γνωστός σήμερα. Βάσει της βιοχημείας, λοιπόν, σε κάθε κύτταρο η σύνθεση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων ακολουθεί τη σύνθεση των ριβονουκλεοτιδίων, όπως επίσης πρώτα πραγματοποιείται η σύνθεση της ουρακίλης και έπεται η μεθυλίωσή της για την παραγωγή της θυμίνης. Εξάλλου, είναι γνωστό πως η έναρξη της αντιγραφής του DNA προαπαιτεί την σύνθεση RNA εκκλητών, που βέβαια στη συνέχεια αποσυντίθενται και αντικαθίστανται από DNA.

Η θεωρία του κόσμου του RNA περιγράφει το πρώτο βιολογικό σύστημα ως μια αρχέγονη δεξαμενή (primordial pool) μέσα στην οποία συνυπήρχαν μόρια RNA με ικανότητες αντιγραφής και σύνθεσης των μεταβολιτών από τις πρώτες ύλες του περιβάλλοντος, που αποτελούσαν τις δομικές μονάδες για την σύνθεση των μορίων RNA. Σε αυτό το σύστημα τα μόρια RNA, κάτω από τη Δαρβίνεια εξελικτική πίεση, θα επιλέγονταν ανάλογα με την ικανότητα αντιγραφής του εαυτού τους και της καταλυτικής τους δυνατότητας και θα συσσωρευόνταν. Στην συνέχεια δημιουργήθηκαν τα πρώτα ακυτταρικά συστήματα με την διαμερισματοποίηση αυτής της δεξαμενής από μια μεμβράνη λιπιδίων και από τα οποία προέκυψε ο «οικουμενικός προγεννήτορας» (universal ancestor), όπως τον φαντάστηκε ο Woese (Woese κ.ά 1998). Τέτοια συστήματα θα μοιράζονταν τις μοριακές προσαρμογές με οριζόντια μεταφορά των γονιδίων και θα συνεξελίσσονταν σε συνθήκες έντονης μεταλλακτικότητας στους προγόνους των κυττάρων, οι οποίοι στη συνέχεια θα δημιουργούσαν ο καθένας την δικιά του γενεαλογική ιστορία.

### 1.1.2 ΕΠΑΝΑΔΙΑΤΥΠΩΣΗ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΔΟΓΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα νέα επιστημονικά δεδομένα σχετικά με τις ιδιότητες του RNA, το Κεντρικό Δόγμα της Βιολογίας τροποποιήθηκε έτσι ώστε να περιλαμβάνει και τη θεωρία του κόσμου του RNA. Στην αναθεώρηση αυτή εμφανίζεται το RNA ως ένα μόριο ικανό να αντιγράφει τον εαυτό του, να κωδικοποιεί και ταυτόχρονα να μεταφέρει τη γενετική πληροφορία, ενώ πλέον η σχέση μετατροπής του DNA σε RNA είναι αμφίδρομη, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.



**Εικόνα 2.** Το τροποποιημένο δόγμα της μοριακής βιολογίας.

Πηγή: [www.el.wikipedia.org](http://www.el.wikipedia.org)

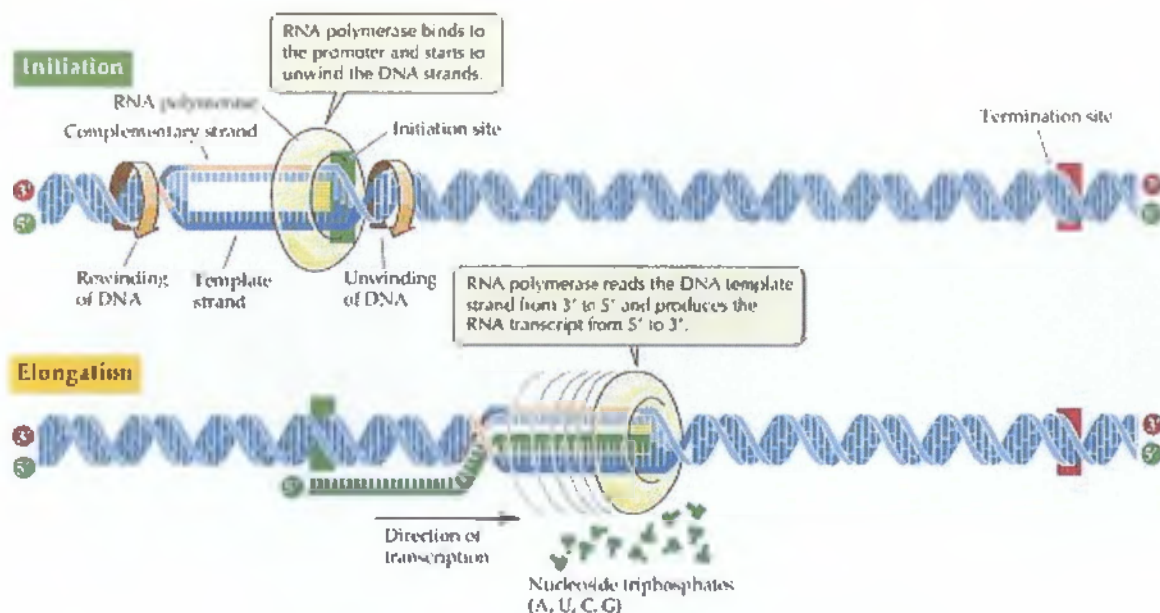
## 1.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΚΟΣΜΟ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNA

Αρκετοί επιστήμονες που ασχολούνται με τη βιολογία των φυτών πίστευαν αρχικά ότι το μεγαλύτερο ρόλο, αν όχι τον πρωταρχικό, στην έκφραση της γενετικής πληροφορίας του φυτικού κυττάρου τον είχε το DNA. Όμως, με τα σημερινά δεδομένα και με τις πρόσφατες ανακαλύψεις των ερευνητών σχετικά με την εμφάνιση, τη δράση των μικρών μορίων του RNA στο φυτικό κύτταρο και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν ως ρυθμιστές στην πρωτεϊνοσύνθεση, η αρχική σκέψη αυτή φαίνεται να καταρρίπτεται. Ο βοηθητικός ρόλος που κατείχε το RNA και συνάμα τα διάφορα είδη του, όπως είναι και τα μικρά RNA, παύει πλέον να ισχύει. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περισσότεροι γνωρίζουν τις τρεις βασικές μορφές του RNA, όπως παρουσιάζονται παρακάτω:

- **m-RNA**, αγγελιοφόρο RNA, που περιέχει ένα κωδικοποιημένο μήνυμα για τη σύνθεση πεπτιδίων. Το αγγελιοφόρο RNA συμβάλει στη σύνθεση των πρωτεϊνών μεσολαβώντας στην πρόσκαιρη αποθήκευση της γενετικής πληροφορίας και τη μεταφορά της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου βρίσκονται τα ριβοσώματα.

Στην Εικόνα 3 απεικονίζεται ο σχηματισμός ενός mRNA που θα μεταφέρει τις γενετικές πληροφορίες από το DNA του πυρήνα στα ριβοσώματα που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και όπου γίνεται η πρωτεϊνική σύνθεση. Κάθε γονίδιο, δηλαδή ένα τμήμα του DNA, παράγει ένα χωριστό μόριο mRNA όταν απαιτείται η παραγωγή ενός ορισμένου πολυπεπτιδίου στο κύτταρο. Το mRNA αναλύεται γρήγορα κατά τη διάρκεια της μετάφρασης. Το μέγεθος mRNA εξαρτάται από τον αριθμό των νουκλεοτιδίων στο γονίδιο. Στο στάδιο έναρξης, η RNA-πολυμεράση δεσμεύει τα γονίδια-υποκινητές και αρχίζει να ξετυλίγει τις αλυσίδες του DNA. Στο στάδιο της επιμήκυνσης, η RNA-πολυμεράση διαβάζει τις ακολουθίες των προτύπων DNA από το 3'-5' άκρο και παράγει το αντίγραφο RNA από το 5'-3'. Τα νουκλεοτίδια προστίθενται πάντα στο τέλος του 3' ακρού

του RNA. Στη τελική φάση, η RNA-πολυμεράση φθάνει στην περιοχή λήξης, η μεταγραφή DNA ολοκληρώνεται, οπότε το αγγελιοφόρο RNA που έχει σχηματισθεί απελευθερώνεται από το πρότυπο (Εικόνα 3). Τα γονίδια αποτελούνται από περιοχές που ονομάζονται εξόνια και περιέχουν τις πληροφορίες για την παραγωγή του συγκεκριμένου πολυπεπτιδίου και από περιοχές που ονομάζονται ιντρόνια που δεν κωδικοποιούν αμινοξέα. Το mRNA που παράγεται με τη μεταγραφή καλείται προ-mRNA επειδή είναι ένα αντίγραφο ολόκληρου του προτύπου DNA, συμπεριλαμβανομένων και των ιντρονίων. Στη συνέχεια, το προ-mRNA υποβάλλεται σε μια ειδική επεξεργασία στον πυρήνα για να αφαιρεθούν τα ιντρόνια, με τη βοήθεια ενός άλλου RNA, του μικρού πυρηνικού (snRNA). Έτσι, παράγεται ένα ώριμο, λειτουργικό mRNA που μεταφέρει τις γενετικές πληροφορίες από τον πυρήνα στα ριβοσώματα. (Εικόνα 3).



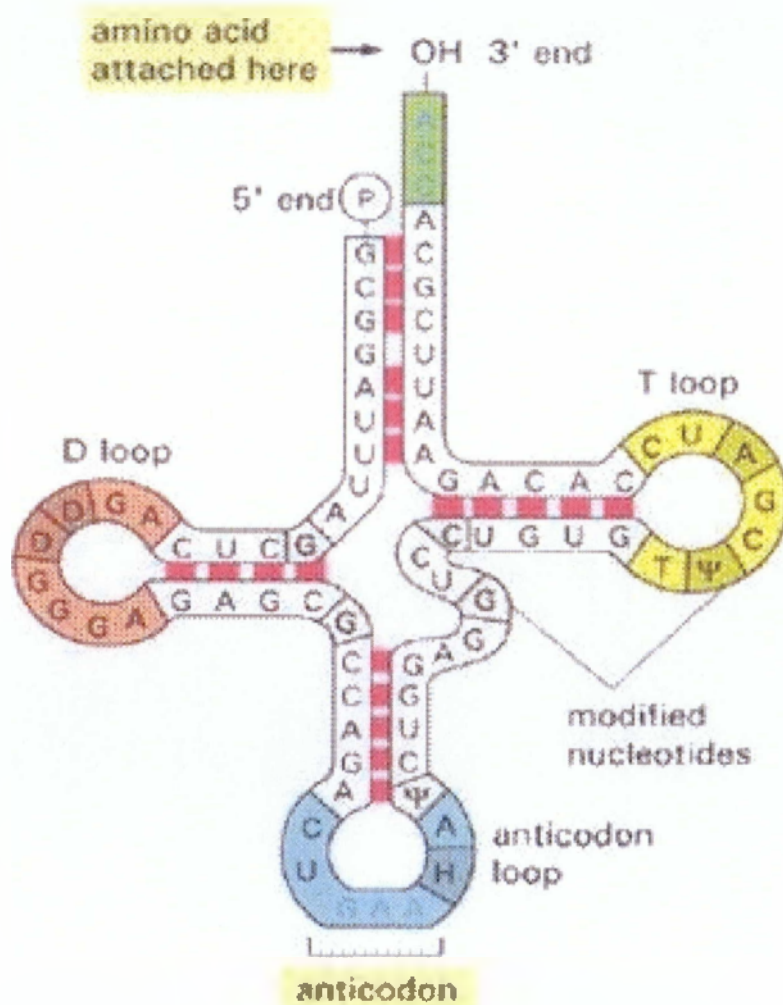
**Εικόνα 3.** Η μεταγραφή του DNA και το πέρασμα της πληροφορίας στο mRNA.

Πηγή: [www.Universe-review.ca](http://www.Universe-review.ca)

- **t-RNA**, μεταφορικό RNA, που μεταφέρει αμινοξέα στο ριβοσώματα για τη σύνθεση των πεπτιδίων. Το μεταφορικό RNA είναι υπεύθυνο για τη σωστή μετάφραση του γενετικού κώδικα, αφού είναι αυτό που φέρει το ενεργοποιημένο αμινοξύ που κάθε φορά πρέπει να ενσωματωθεί στην σωστή θέση της νεοσυντιθέμενης πεπτιδικής αλυσίδας. Υπάρχουν ένα ή περισσότερα διαφορετικά tRNAs για κάθε ένα από τα είκοσι αμινοξέα. Οι αλληλουχίες των tRNAs είναι παρόμοιες και αποτελούνται από 70-90 νουκλεοτίδια. Η πραγματική δομή ενός



tRNA είναι μια τρισδιάστατη μορφή Λ. Κάθε tRNA περιέχει ένα αντικωδικόνιο (Εικόνα 4), το οποίο είναι μια σειρά τριών βάσεων που συμπληρώνει τις τρεις βάσεις mRNA. Το tRNA για κάθε τριπλέτα βάσεων του αντικωδικονίου, φέρει και το αντίστοιχο αμινοξύ στο 3' άκρο του και το μεταφέρει στο ριβοσωμάτιο, όπου γίνεται η σύνθεση των πρωτεϊνών.

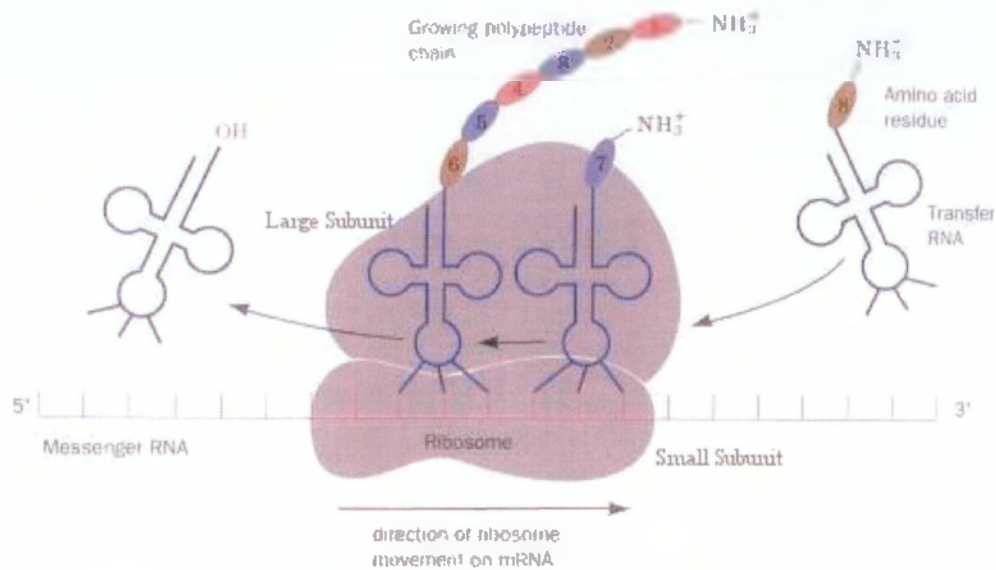


**Εικόνα 4.** Η τρισδιάστατη δομή του tRNA

Πηγή: [www.Universe-review.ca](http://www.Universe-review.ca)

- **r-RNA**, ριβοσωματικό RNA, με σημαντικό ρόλο τόσο στη δομή των ριβοσωματίων, όσο και στην πρωτεϊνοσυνθετική διαδικασία. Παράγεται στον πυρηνίσκο και μαζί με πολλές πρωτεΐνες οργανώνεται για να δημιουργηθεί η πρωτεϊνοσυνθετική δομική μονάδα, το ριβοσωμάτιο. Το rRNA αποτελεί το 65% του δομικού υλικού των ριβοσωμάτων και το άλλο 35% είναι πρωτεϊνικό. Τα ριβοσώματα, που είναι οι περιοχές για την πρωτεϊνική σύνθεση, αποτελούνται από δύο υπομονάδες, μια μεγάλη υπομονάδα και μια μικρή υπομονάδα. Η πρωτεϊνική

σύνθεση απαιτεί mRNA, tRNA, τα αμινοξέα, τα ριβοσώματα, το ATP, και τους διάφορους πρωτεϊνικούς παράγοντες. Αυτά τα κομμάτια ενώνονται στην αρχή της μετάφρασης, σε ένα στάδιο αποκαλούμενο 'έναρξη μετάφρασης' (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5.** Η μετάφραση του rRNA

Πηγή: [www.Universe-review.ca](http://www.Universe-review.ca)

Αυτό που έως πρόσφατα θεωρείτο ως το σημαντικότερο ήταν το αγγελιοφόρο RNA (mRNA), καθώς αυτό είναι που περιέχει τις πληροφορίες για την κωδικοποίηση των πεπτιδίων. Όμως, η έρευνα έρχεται για να ανατρέψει την παρούσα σκέψη και να θεωρήσει εξίσου σημαντικά (σε ορισμένες βιοχημικές διαδικασίες ίσως και σπουδαιότερα) εκείνα τα είδη του RNA, που δεν κωδικοποιούν για κάποιες πρωτεΐνες (noncoding RNA - ncRNA). Τα μικρά RNAs έχουν την ικανότητα να ελέγχουν τη μεταγραφή και τη μετάφραση και συνεπώς να ελέγχουν τη συνολική λειτουργία του γονιδιώματος. Τα πιο σημαντικά από τα μικρά RNAs είναι:

- **Μικρά παρεμβατικά RNA** (small interfering RNA - siRNA), που συμμετέχουν στον κυτταρικό μηχανισμό του παρεμβαλλόμενου RNA (RNA interference - RNAi).
- **Μικρά παρεμβατικά RNA** (micro interfering RNA - miRNA), που είναι τα τελικά προϊόντα των μη κωδικοποιημένων πρωτεϊνών.
- **Μικρά πυρηνικά RNA** (snRNA), που είναι υπεύθυνα στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης.



- **Ριβοένζυμο (Ribozyme).** Αναφέρεται και ως καταλυτικό RNA καθώς έχει την ικανότητα να καταλύει κάποια βιοχημική αντίδραση.

Πάντως, πρέπει να γίνουν αρκετές μελέτες από τους βιολόγους πάνω στη δράση που έχουν αυτά τα μόρια του RNA στη μεταφορά της γενετικής πληροφορίας στα κύτταρα των φυτών για να βγουν τα τελικά συμπεράσματα όσον αφορά την ουσιαστική συμμετοχή τους στη λειτουργία του κυττάρου. Τα αποτελέσματα των μακρόχρονων ερευνών πάνω στη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας στα κύτταρα ενός ζωντανού οργανισμού, όπως είναι τα φυτά, απέδειξαν ότι είναι απαραίτητη η δραστηριότητα των μικρών μορίων του RNA κατά τη διαδικασία της πρωτεϊνσύνθεσης.

### 1.2.1 Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΤΟΥ RNA ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Η αποτελεσματική ανακάλυψη των μικρών RNAs στα φυτικά κύτταρα από τους βιολόγους είναι ακόμα σε εξέλιξη. Αν και έχει γίνει αρκετή προσπάθεια στην κατεύθυνση της αναγνώρισης των μορίων αυτών σε διάφορα είδη φυτών, όπως είναι το ρύζι, το φυτό *Arabidopsis thaliana*, την πετούνια κ.ά., εντούτοις πολλά οικονομικά και εξελίξιμα φυτά θέλουν ακόμα χρόνο για να εξεταστούν. Αρκετά από τα φυτά που έχουν ανακαλύψει οι επιστήμονες με τη δράση των μικρών μορίων RNAs θα παρουσιαστούν στο τελευταίο κεφάλαιο.

Τα περισσότερα στοιχεία που μπορούν να ληφθούν υπόψη σχετικά με τη δραστηριότητα που έχουν τα μικρά μόρια RNA στην ομαλή λειτουργία των κυττάρων προέρχονται από τη μελέτη και την έρευνα του Cech (βραβείο Nobel 1989) και των άλλων επιστημόνων στο εργαστήριο. Σύμφωνα με αυτήν, τα περισσότερα μόρια RNA ασκούν ένα παθητικό γενετικό σχέδιο ενώ μερικά άλλα από αυτά, όπως π.χ. είναι τα ριβοένζυμα, έχουν μια σαφή ενζυματική δραστηριότητα, λειτουργώντας καταλυτικά στις χημικές αντιδράσεις του κυττάρου. Εκτός από τη γνωστή λειτουργία του μικρού ριβοένζυμου, ότι διασπά τους φωσφοδιεστέρες, σήμερα έχει βρεθεί και μια άλλη δραστηριότητα. Το καταλυτικό αυτό μικρό RNA είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς βασικών κυψελοειδών αντιδράσεων. Η έρευνα του Cech και των άλλων επιστημόνων έχει κατοχυρώσει την ιδέα ότι τα μόρια RNA μπορεί να έχουν καιρική σημασία για τα πρώτα στάδια της ζωής στη Γη (Nature 2002).

Κατά τη διάρκεια της μελέτης των μικρών RNAs στους φυτικούς οργανισμούς από τους βιολόγους, παρουσιάστηκαν πολλοί παράγοντες που δρούσαν περιοριστικά σ' αυτή

την προσπάθεια. Ένας από αυτούς είναι η ελάχιστη πιθανότητα που υπάρχει για την ανάλυση των μικρών RNAs, αφού μόνο ένα κλωνοποιημένο τμήμα μικρού RNA είναι διαθέσιμο. Επίσης, η διαθεσιμότητά τους σ' ένα τοποθετημένο διαδοχικά φυτικό γονιδίωμα, χωρίς την περιεκτική ανάλυση στις δομές του, έχει ως αποτέλεσμα η μέθοδος της κλωνοποίησης των μικρών αυτών μορίων να μην είναι επιτυχής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας πάνω στο ρύζι και στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, έγινε ξεκάθαρο ότι αυτοί οι φυτικοί οργανισμοί είναι υπερβολικά πλούσιοι σε ενδογενή μικρά RNAs και ότι μόνο μια μικρή μερίδα από αυτά αντιστοιχεί σε miRNAs. Η πλειοψηφία των μικρών ενδογενών RNAs, που βρέθηκαν στα παραπάνω φυτά συμπεριλαμβάνει και μικρά παρεμβατικά RNAs, τα siRNAs.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχουν χρησιμοποιηθεί τρεις κύριοι τρόποι για την ανακάλυψη των μικρών RNAs. Περιληπτικά αυτοί οι τρόποι είναι οι εξής:

### 1. Προχωρημένη Γενετική.

Αν και οι μελέτες της προχωρημένης γενετικής έχουν οδηγήσει μόνο στην αναγνώριση λίγων miRNAs, παρέχουν όμως σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο λειτουργίας αυτών των μορίων, αλλά και τη μέθοδο της απομόνωσής τους.

### 2. Βιοπληροφορική.

Μια δεύτερη προσέγγιση στην ανακάλυψη των μικρών RNAs, είναι η Βιοπληροφορική. Ένας αριθμός δημοσιοποιημένων μελετών χρησιμοποιήθηκε με διαφορετικούς αλγορίθμους για να προβλέψει τα συγκεκριμένα μικρά μόρια. Τα χαρακτηριστικά και η έρευνα των αλγορίθμων για τις γονιδιακές ακολουθίες βασίζονται στην υπάρχουσα γνώση για τα φυτά, αλλά και στην πρόσφατη μελέτη των miRNAs. Αυτά τα χαρακτηριστικά περιλαμβάνονται στα γονίδια των κυττάρων και ο υψηλός βαθμός της ακολουθίας των πεδίων που βρίσκονται στα mRNA εμφανίζεται στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και στο ρύζι. Πολλοί αλγόριθμοι αρχίζουν ανάμεσα στις ακολουθίες της εξαγωγής των γονιδίων ή κατά τη διάρκεια της συμπλήρωσης των mRNA. Ένα προφανές μειονέκτημα της Βιοπληροφορικής είναι ότι, είτε η αρχική φάση της πρόβλεψης είτε η επόμενη του καθορισμού βασίζεται στην ακολουθία διατήρησης η οποία είναι αδύνατον να προβλέψει συγκεκριμένα είδη mRNA.

### 3. Απευθείας κλωνοποίηση και ακολουθία.

Ίσως αυτή η μέθοδος είναι πιο αποτελεσματική για την ανάλυση των miRNAs. Σύμφωνα με αυτήν, επιτυγχάνεται εύκολα η αναγνώρισή τους και παρέχεται μια εικόνα του

γονιδιώματος των miRNAs στο φυτικό κύτταρο. Με τον τρόπο αυτόν επιτυγχάνεται ο σχηματισμός της πλήρους εικόνας για την ανάλυση των miRNAs.

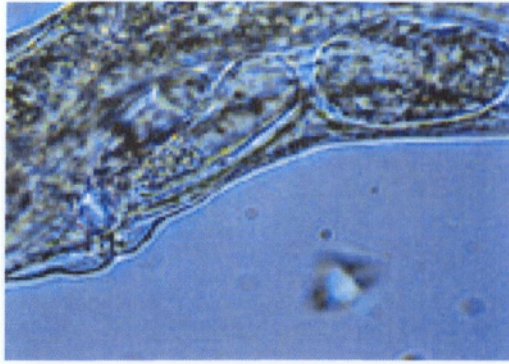
#### 1.4 Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ RNAi (RNA interference)

Αν δινόταν ένας ορισμός για το Παρεμβατικό RNA (RNA interfering ή RNAi), θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί ότι είναι ένας μηχανισμός ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, σύμφωνα με την οποία το RNAi καταστέλλει την έκφραση των συμπληρωματικών προς αυτό γονιδίων. Φυλογενετικά ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να έχει προέλθει από πρώιμους αντιϊκούς μηχανισμούς ανοσίας και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην γονιδιακή ρύθμιση, στην εξελικτική βιολογία και στη διατήρηση του γονιδιώματος του φυτικού κυττάρου.

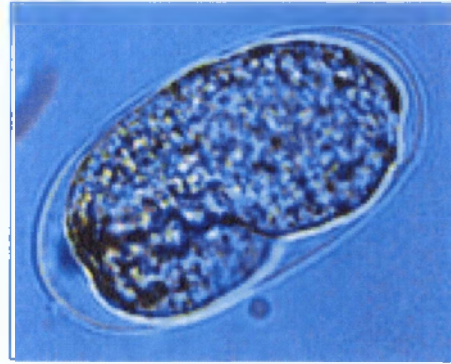
Πριν την ανακάλυψη του «παρεμβατικού RNA» (RNAi), είχαν προηγηθεί παρατηρήσεις από ερευνητές που δούλευαν πάνω σε διαγονιδιακά φυτά, σύμφωνα με τις οποίες ένα αντιπληροφοριακό RNA (antisense RNA) παρεμπόδιζε τη γονιδιακή έκφραση των φυτών (Ecker και Davis 1986, Napoli κ.ά. 1990). Μετά από τις πρώτες αυτές παρατηρήσεις, πλήθος εργαστηρίων έστρεψε την προσοχή του στο να ερμηνεύσει τα φαινόμενα αυτά όχι μόνο στα φυτά αλλά και σε άλλους οργανισμούς (Pal-Bhadra κ.ά. 1997). Σήμερα η γνώση για την επίδραση του RNAi είναι ραγδαία και αυτό αποδεικνύεται από μια σειρά εργαστηριακών τεχνικών που στοχεύουν στην κατανόηση της λειτουργίας των συγκεκριμένων γονιδίων πάνω σε εξελιξίμους οργανισμούς, στους οποίους περιλαμβάνονται τα φυτά, η *Drosophila* και τα κύτταρα των θηλαστικών. Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται αναλυτική παρουσίαση του τρόπου με τον οποίο λειτουργεί το RNAi στα φυτικά κύτταρα.

Οι ερευνητές Mello και Fire, μελετώντας μια πρωτεΐνη στον σκώληκα *C. elegans*, ανακάλυψαν ότι εισάγοντας ενέσιμα το κατάλληλο RNA διπλής αλυσίδας (dsRNA) μπορούσαν να επιτύχουν αποσιώπηση ενός γονιδίου στόχου (Fire κ.ά. 1998). Τότε δόθηκε και ο πρώτος ορισμός του RNAi, που ορίστηκε ως ένας εγγενής γονιδοκατασταλτικός και αμυντικός μηχανισμός των κυττάρων. Για την εργασία τους αυτή οι παραπάνω ερευνητές, βραβεύτηκαν με το βραβείο Nobel Ιατρικής το 2006. Έπειτα από πολυετείς μελέτες, έχει αποσαφηνισθεί αρκετά αναλυτικά η λειτουργία του μηχανισμού αυτού. Στις Εικόνες 6, 7, 8 και 9 παρουσιάζεται ένας σύντομος βιολογικός κύκλος του σκώληκα *C. elegans*, που αποτέλεσε την αρχή για την έρευνα του ρόλου των μικρών RNA στο φυτικό κύτταρο.

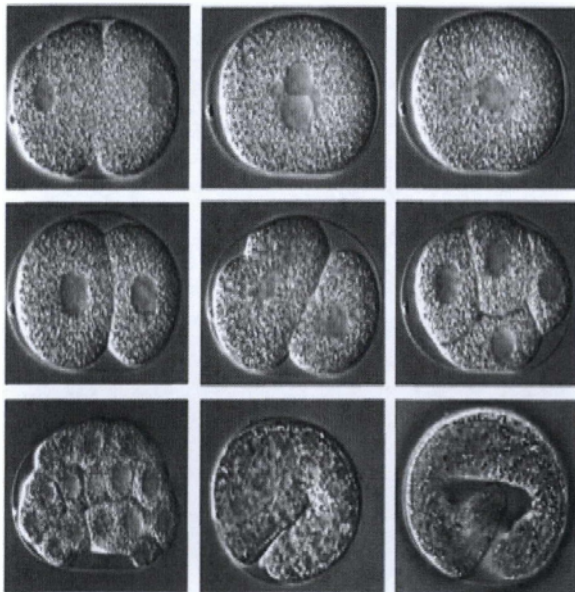




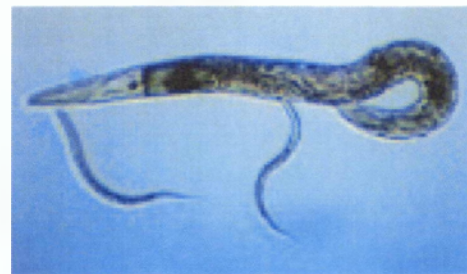
**Εικόνα 6.** Ανάπτυξη εμβρύων στη μήτρα του νηματώδους *C. elegans*



**Εικόνα 7.** Έμβρυο του νηματώδους *C. elegans* 1,5 φορές μεγαλύτερο



**Εικόνα 8.** Εμβρυϊκή ανάπτυξη του νηματώδους *C. elegans*



**Εικόνα 9.** Ενήλικο και δύο μικρά νηματώδους *C. elegans*

Πηγές των εικόνων: [www.aspnet.org](http://www.aspnet.org)

#### 1.4.1 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΥ RNA (miRNA)

Το μικρό RNA (microRNA - miRNA) αντιπροσωπεύει μια νέα οικογένεια "μη-πληροφοριακού" RNA και το μέγεθος του κυμαίνεται από 20 έως 25 νουκλεοτίδια. Οι μελέτες δείχνουν ότι μπορεί να λειτουργήσει ως ρυθμιστής της έκφρασης των γονιδίων μέσα στο φυτικό κύτταρο. Κωδικοποιείται από γονίδια που υπάρχουν στο DNA αλλά δεν έχει τη δυνατότητα να μεταφραστεί σε πρωτεΐνη. Τα miRNA για να σχηματιστούν έχουν κάποιο δικό τους γονίδιο (DNA). Το γονίδιο αυτό δημιουργεί ένα μεγάλο RNA που στη συνέχεια κόβεται και μένει ένα κομμάτι που αποτελεί το miRNA. Τα miRNA είναι

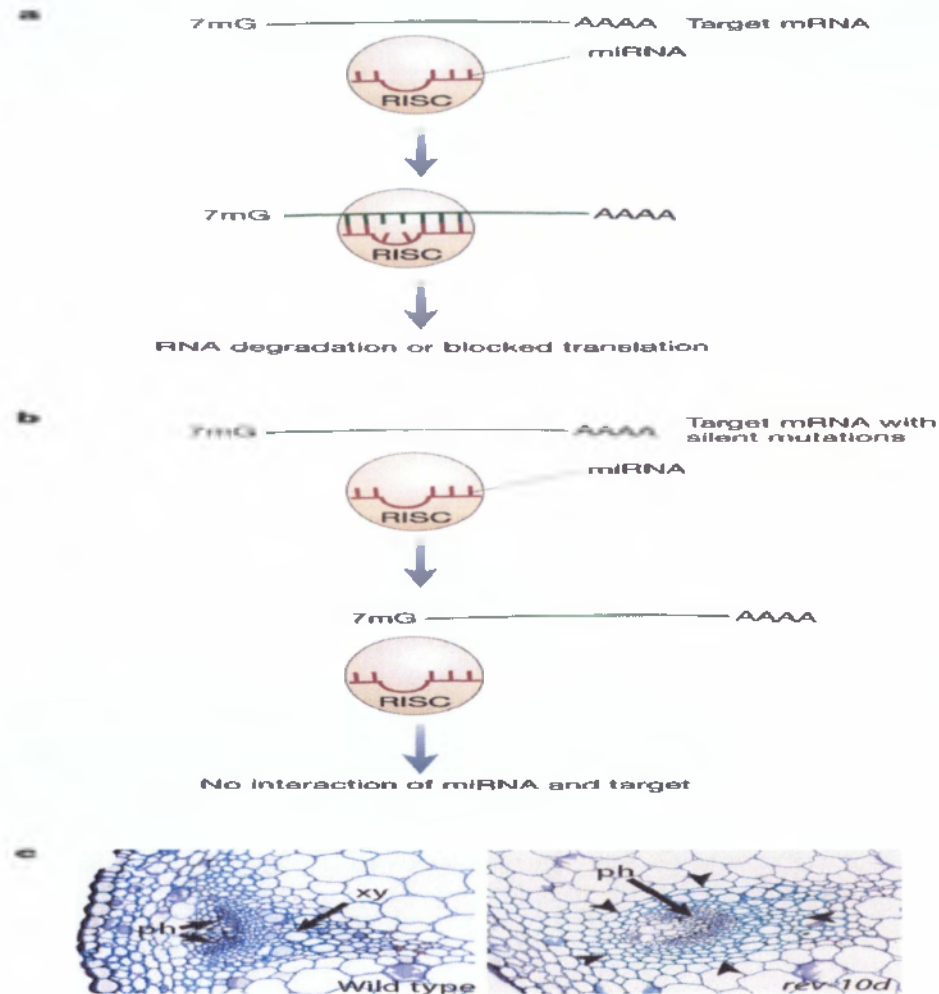
δύσκολο να απομονωθούν με βιοχημικές μεθόδους και για το λόγο αυτό η έκφρασή τους δεν μπορούσε να ανιχνευτεί (Ξυνιάς 2006).

Το miRNA ανακαλύφθηκε αρχικά στο νηματοσκώληκα *C. elegans* και ήταν το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ρυθμιστικού γονιδίου *lin4* και του γονιδίου στόχου *lin14*. Η έκφραση του *lin14*, ελέγχεται από το *lin4* το οποίο κωδικοποιεί ένα μικρό μετάγραφο μήκους 22 νουκλεοτιδίων, το οποίο είναι συμπληρωματικό με μία αλληλουχία δέκα ζευγών βάσεων που επαναλαμβάνεται επτά φορές στην 3<sup>η</sup> αμετάφραστη περιοχή του *lin14*. Η έκφραση του *lin4* καταστέλλει αυτή του *lin14* στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο, ίσως επειδή η σύζευξη ανάμεσα στα δύο RNA οδηγεί στην αποικοδόμηση του mRNA. Είναι ενδιαφέρον να τονιστεί ότι στη ρύθμιση εμπλέκονται αλληλουχίες που βρίσκονται στο 3<sup>ο</sup> άκρο του mRNA. Το RNA του γονιδίου *lin4* είναι ένα παράδειγμα ενός microRNA (miRNA). Υπάρχουν περίπου 55 γονίδια στο γονιδίωμα του *C. elegans* που κωδικοποιούν miRNA μήκους 21-24 νουκλεοτιδίων, με ρόλους κυρίως ρυθμιστικούς της γονιδιακής έκφρασης και πολλά απ' αυτά περιέχονται σ' ένα μεγάλο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σωματίδιο. Πολλά από τα miRNA του *C. elegans* έχουν ομόλογα στα φυτά και σε πολλά θηλαστικά. Ο μηχανισμός φαίνεται να είναι ευρέως διαδεδομένος, καθόσον από τα 16 miRNA στο φυτό *Arabidopsis thaliana* τα 8 είναι πλήρως διατηρημένα στο ρύζι, κάτι που δείχνει ευρεία εξελικτική συντήρηση αυτού του ρυθμιστικού μηχανισμού (Lewin 2004).

Ο μηχανισμός της παραγωγής των miRNA είναι και αυτός συντηρητικός. Το γονίδιο *lin4* μεταγράφεται σε ένα μετάγραφο που σχηματίζει μια δίκλωνη περιοχή, η οποία γίνεται στόχος μιας νουκλεάσης, της Dicer. Η Dicer έχει στο N-τελικό της άκρο μια περιοχή με δράση ελικάσης, που έχει την ικανότητα να αναδιατάσσει δίκλωνες περιοχές. Επιπλέον, η Dicer έχει και δύο περιοχές που είναι ομόλογες με τη βακτηριακή ριβονουκλεάση III, οι οποίες έχουν δράση νουκλεάσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόμοια ένζυμα, εκτός από τα φυτά, υπάρχουν στις μύγες αλλά και στους σκώληκες. Το ενεργό μόριο miRNA δημιουργείται με αποκοπή από το αρχικό μετάγραφο, παρεμποδίζοντας την ενζυμική ενεργότητα και καταστέλλοντας την παραγωγή του, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αναπτυξιακών ανωμαλιών (Lewin 2004).

Οι εικόνες 10a, b, c παρουσιάζουν ένα είδος άγριου φυτού, του *Arabidopsis thaliana* και ενός άλλου, όπου ένα miRNA που συνδέεται με το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (RISC, RNA Induced Silencing Complex) έχει στόχο την καταστολή της μετάφρασης (Εικόνα 10a). Στην Εικόνα 10b φαίνεται να είναι αδύνατον το miRNA να δεσμεύσει την ακολουθία του στόχου και επιπλέον η πρωτεΐνη που είναι κωδικοποιημένη στο mRNA βρίσκεται σε υπερέκφραση. Τέλος, στα τμήματα των βλαστών και των δύο άγριων φυτών,

εμφανίζονται ορισμένα αλληλόμορφα γονίδια που είναι χρήσιμα κατά τη διαδικασία της μεταγραφής. Χαρακτηριστικά, το γονίδιο *rev10d* κωδικοποιεί το γονίδιο *revolute* του μεταγραφικού παράγοντα, με αποτέλεσμα το RNA να είναι ανθεκτικό στη στοχοθέτηση από τα miR165, miR166 και mG στους γύρω φλοιώδεις και ξυλώδεις ιστούς των άγριων φυτών (Εικόνα 10c).



**Εικόνα 10.** Παρουσία του miRNA σε ένα είδος άγριου φυτού (αριστερά) και του *Arabidopsis thaliana* (δεξιά)

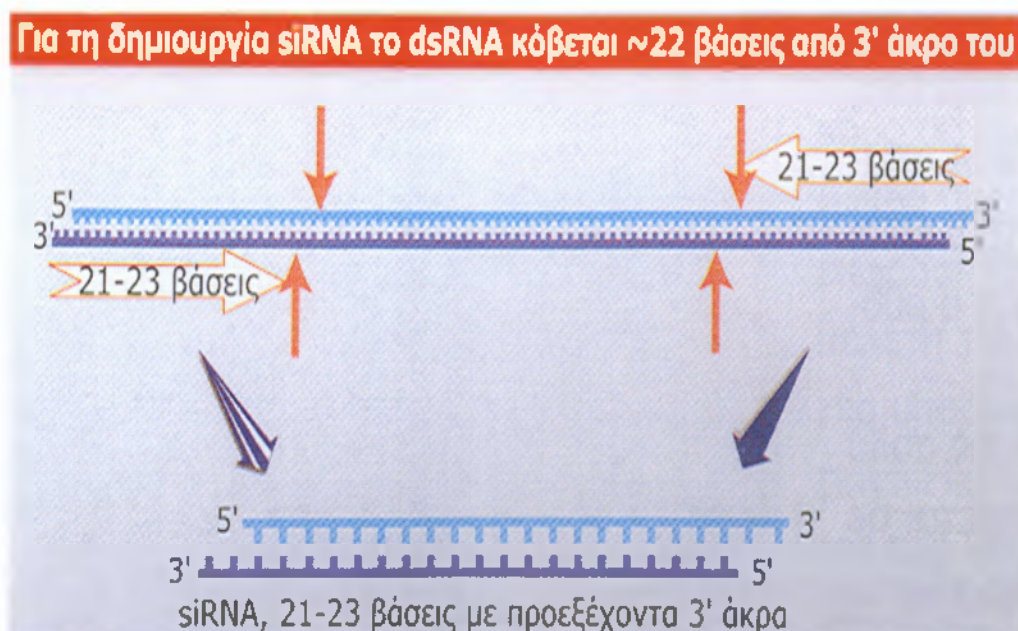
Πηγή: [www.nature.com](http://www.nature.com)

#### 1.4.2 ΠΟΙΑ ΕΙΝΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΥ ΠΑΡΕΜΒΑΤΙΚΟΥ RNA (siRNA)

Η εμφάνιση των μικρών παρεμβατικών RNA (siRNA) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το φαινόμενο της παρέμβασης του RNA (RNAi). Για να αποδειχθεί αυτή η θεωρία πραγματοποιήθηκαν αρκετά πειράματα *in vitro* στο εργαστήριο από τους ερευνητές. Με τη βοήθεια ενός δείγματος, μολυσμένου με μικρές ποσότητες δίκλωνου RNA που ήταν ικανό



να καταστείλει τη γονιδιακή έκφραση για την παρασκευή οποιουδήποτε τύπου μονόκλωνου RNA, παρατηρήθηκε μια ενεργειακή αποικοδόμηση του δίκλωνου RNA που είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ολιγονουκλεοτιδίων, μήκους 21-23 βάσεων. Αυτά τα μικρά RNA ονομάζονται siRNA (μικρά παρεμβατικά RNA). Τα siRNA δεν έχουν δικά τους γονίδια που να τα κωδικοποιούν και βρίσκονται διάσπαρτα. Παράγονται από μεταθετά στοιχεία ή από ενδιάμεσες περιοχές του DNA. Μόλις σχηματιστούν επιστρέφουν πίσω και αδρανοποιούν με μεθυλίωση την περιοχή παραγωγή τους (Ξυνιάς 2006). Ο μηχανισμός με τον οποίο δημιουργούνται τα siRNA φαίνεται αρκετά παραστατικά στην εικόνα που ακολουθεί.



**Εικόνα 11.** Το siRNA, που προκαλεί την παρεμβολή RNA, δημιουργείται μετά από την αποκοπή του δικλωνου RNA σε μικρότερα τμήματα. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα 21-23 νουκλεοτίδια από το 3' άκρο. Το προϊόν siRNA έχει προεξέχοντα 3' άκρα.

Πηγή: [www.ergito.com](http://www.ergito.com)

Η παρέμβαση του RNA συμβαίνει μετα-μεταγραφικά, όταν ένα μόριο siRNA επάγει την αποικοδόμηση ενός mRNA που είναι συμπληρωματικό με αυτό. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 12, το siRNA ενδεχομένως καθοδηγεί κάποια νουκλεάση να αποικοδομήσει τα μόρια του mRNA που είναι συμπληρωματικά με τη μια ή και με τις δύο αλυσίδες του. Αυτό γίνεται ίσως με μια διαδικασία που περιλαμβάνει ζευγάρωμα του mRNA με το siRNA. Είναι πολύ πιθανό το ζευγάρωμα αυτό να υποβοηθείται από τη δραστηριότητα μιας ελικάσης. Το siRNA καθοδηγεί την πέψη στη μέση του ζευγαρωμένου τμήματος. Οι

αντιδράσεις αυτές γίνονται σε ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (RISC, RNA Induced Silencing Complex), δηλαδή σε ένα σύμπλοκο αποσιώπησης εξαρτώμενο από το RNA.



**Εικόνα 12.** Η παρεμβολή RNA λαμβάνει χώρα όταν το δίκλωνο RNA κόβεται σε τμήματα που καθοδηγούν το κόψιμο του αντίστοιχου mRNA

Πηγή: [www.ergito.com](http://www.ergito.com)

### 1.4.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΥΟ RNAi (miRNA και siRNA)

Είναι αρκετά δύσκολο να γίνει μια σύγκριση μεταξύ των δύο RNAi (miRNA και siRNA), αφού έχουν σχεδόν παρόμοιο τρόπο λειτουργίας και έκφρασης κατά τη διάρκεια της μεταγραφής. Ίσως η μοναδική διαφορά που υπάρχει ανάμεσά τους οφείλεται στο σημείο προέλευσής τους. Το miRNA κωδικοποιείται από γονίδια, τα οποία είναι ευδιάκριτα από τα γνωστά γονίδια της κωδικοποίησης των πρωτεϊνών. Αντίθετα το siRNA προέρχεται από την επεξεργασία μακρών διπλών προδρόμων του RNA (dsRNA).

### 1.5 ΤΟ ΜΙΚΡΟ ΠΥΡΗΝΙΚΟ RNA (snRNA)

Οι 5' και 3' θέσεις του τεμαχισμού και επανασυγκόλλησης του RNA (RNA splicing, δηλαδή της διαδικασίας κατά την οποία απομακρύνονται οι αλληλουχίες των ιντρονίων από τα πρόδρομα μόρια RNA, ενώ ταυτόχρονα συρράπτονται σε ένα συνεχές μόριο

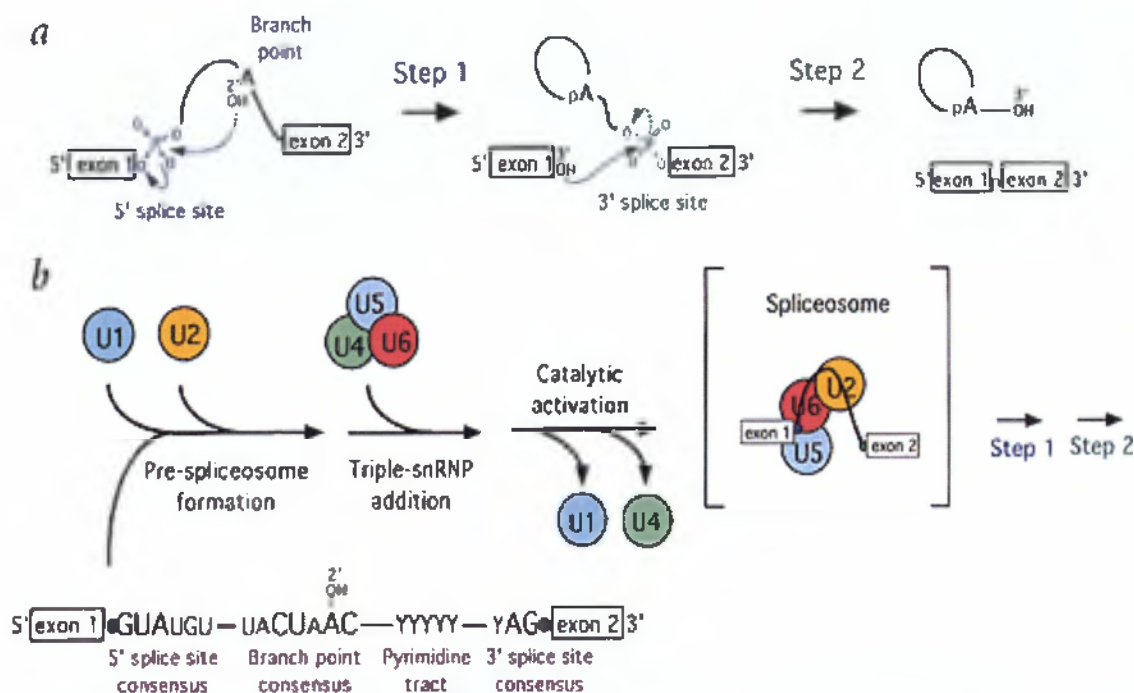
mRNA οι αλληλουχίες των εξονίων) και η αλληλουχία της διακλάδωσης αναγνωρίζονται από τα αντίστοιχο υπεύθυνο σύστημα τεμαχισμού και επανασυγκόλλησης και συναρμολογούνται σε ένα μεγάλο σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό φέρνει κοντά τις 5' και 3' θέσεις του τεμαχισμού και επανασυγκόλλησης πριν συμβεί οποιαδήποτε άλλη αντίδραση, γεγονός που εξηγεί γιατί το έλλειμμα οποιασδήποτε από αυτές τις θέσεις μπορεί να εμποδίσει την έναρξη της αντίδρασης. Το σύμπλοκο συναρμολογείται διαδοχικά πάνω στο πρόδρομο mRNA και αναγνωρίζεται εύκολα από τα ενδιάμεσα στάδια της δημιουργίας του. Η διαδικασία τεμαχισμού και επανασυγκόλλησης συμβαίνει μόνο μετά τη συναρμολόγηση όλων των συστατικών του συμπλόκου (Lewin 2004).

Το σύστημα τεμαχισμού και επανασυγκόλλησης περιλαμβάνει τόσο τις πρωτεΐνες όσο και μόρια RNA. Τα μόρια RNA που συμμετέχουν στη διεργασία αυτή είναι μικρά πυρηνικά RNA και γνωρίζονται ως ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα. Το μικρό πυρηνικό RNA (snRNA) αποτελείται από μικρά μόρια που συνδέονται με πρωτεΐνες και σχηματίζουν μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια. Τα σωματίδια αυτά λειτουργούν σαν ένζυμα και καταλύουν την λεγόμενη «ωρίμανση» του ευκαρυωτικού mRNA, που είναι η διαδικασία της αποκοπής των εσωνίων (introns) και συρραφής των εξονίων (exons) στο mRNA (Lewin 2004).

Στη φυσιολογική του κατάσταση το snRNA υπάρχει ως ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο snRNP (Lewin 2004). Τα snRNP που εμπλέκονται στη διεργασία τεμαχισμού και επανασυγκόλλησης σχηματίζουν μαζί με αρκετές επιπρόσθετες πρωτεΐνες ένα μεγάλο σύμπλοκο, που αποκαλείται σωματίδιο τεμαχισμού και επανασυγκόλλησης (spliceosome). Οι πρωτεΐνες ενώνονται σταδιακά με τα snRNP, δημιουργώντας διαδοχικά διάφορα πρόδρομα σύμπλοκα. Το σωματίδιο τεμαχισμού και επανασυγκόλλησης είναι ένα αρκετά μεγάλο σύμπλοκο και έχει μέγεθος που ξεπερνάει και αυτό του ριβοσώματος. Στην Εικόνα 13 παρουσιάζεται το σωματίδιο τεμαχισμού και επανασυγκόλλησης που εκτός από πρωτεΐνες, περιλαμβάνει και πέντε snRNA που αντιστοιχούν στο ένα τέταρτο και πλέον της μάζας του. Στην Εικόνα 13a παρουσιάζονται τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης του προ-mRNA που είναι τα συνδεδεμένα εξόνια και τα διακλαδισμένα ιντρόνια, που παίρνουν τη μορφή θηλιών, μέσω των δύο βημάτων της μεταφοράς της φωσφορυλίωσης. Τα μικρά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά μόρια των snRNPs (U1, U2, U4, U5, U6) συγκεντρώνουν επάνω στην επιφάνεια των ιντρονίων μια σταδιακή διάταξη, που κατευθύνεται από τις αλληλεπιδράσεις με τα ιντρόνια και τις ακολουθίες συναίνεσης (ο βαθμός συντήρησης στη σειρά δείχνεται από το μέγεθος, το Υ δείχνει την πυριμιδίνη). Τα U1 και U4 των snRNPs αποσταθεροποιούνται κατά τη διάρκεια της καταλυτικής



ενεργοποίησης και το αποτέλεσμα της δράσης του ενεργού σωματιδίου τεμαχισμού και επανασυγκόλλησης αποτελείται από τα U2, U5, και U6 snRNPs (Εικόνα 13b).



**Εικόνα 13** (a) Τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης του προ-mRNA που είναι τα συνδεδεμένα εξόνια και τα διακλαδισμένα ιντρόνια, παίρνοντας τη μορφή «λάσων» και (b) το αποτέλεσμα της δράσης του ενεργού σωματιδίου τεμαχισμού και επανασυγκόλλησης αποτελείται από τα U2, U5, και U6 snRNPs.

Πηγή: [www.el.wikipedia.org](http://www.el.wikipedia.org)

## 1.6 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟΥ

Η άποψη ότι μόνο οι πρωτεΐνες διαθέτουν ενζυμική δράση αποτελούσε κάποτε κοινή πεποίθηση, καθώς θεωρούνταν ότι μόνο οι πρωτεΐνες, με τις πολύμορφες τρισδιάστατες δομές τους και την ποικιλία στις πλευρικές ομάδες των αμινοξικών τους καταλοίπων, μπορούν να σχηματίσουν εξειδικευμένες δομές, όπως τα ενεργά κέντρα. Ωστόσο, ο χαρακτηρισμός των συστημάτων που ενέχονται στην ωρίμανση του RNA απέδειξε ότι η παραπάνω άποψη αποτελούσε μια υπεραπλούστευση (Lewin 2004).

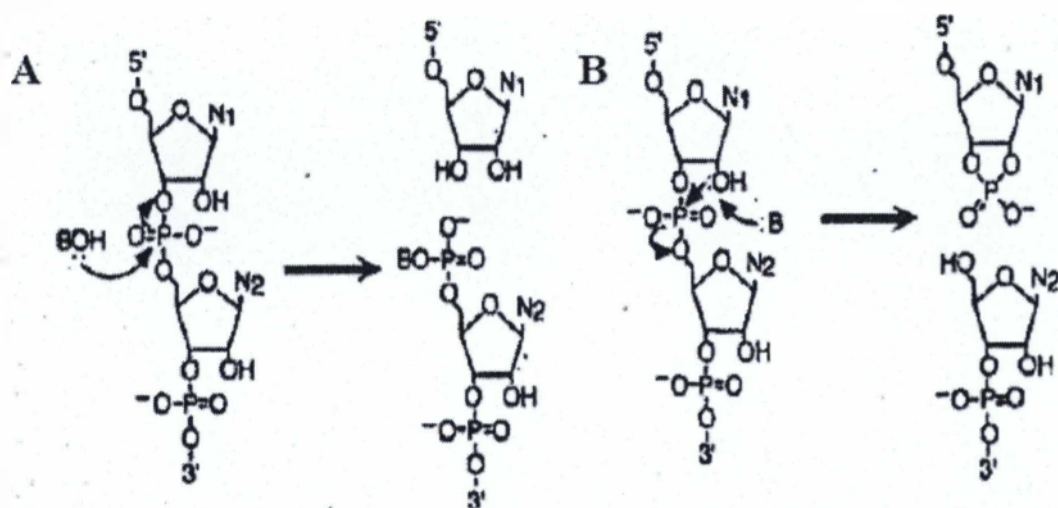
Σήμερα, με τις τελευταίες έρευνες που έγιναν από τους βιολόγους, κυρίως από τον Cech, είναι πλέον γνωστό ότι αρκετοί τύποι αντιδράσεων καταλύονται από μόρια RNA. Η λέξη ριβοένζυμο (ribozyme) χρησιμοποιείται ως ένας γενικός όρος που περιγράφει ένα μόριο RNA που έχει καταλυτική δράση. Η ενζυμική δράση των ριβοενζύμων είναι δυνατόν να χαρακτηριστεί με τον ίδιο τρόπο με αυτό της δράσης των «συμβατικών» πρωτεϊνικών

ενζύμων. Το υπόστρωμα μιας αντίδρασης που καταλύεται από ένα ριβοένζυμο, μπορεί να είναι το ίδιο το ριβοένζυμο ή άλλα μόρια RNA (Cech 1989).

Παρακάτω παρουσιάζονται δύο κατηγορίες ριβοενζύμων που έχουν ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα. Αυτές οι κατηγορίες είναι οι ακόλουθες:

- **Μικρά ριβοένζυμα**

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει το ριβοένζυμο φουρκέτα (hairpin ribozyme), το οποίο εντοπίστηκε στον δακτυλοειδή ιό του καπνού, το σφυροκέφαλο ριβοένζυμο (hammerhead ribozyme) το οποίο βρίσκεται στα φυτά κ.λ.π. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από ~35 έως ~164 νουκλεοτίδια. Χρησιμοποιούν την 2<sup>η</sup> υδροξυλομάδα της ριβόζης σαν το νουκλεόφιλο για την προσβολή και θραύση του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Τα προϊόντα που παράγονται βρίσκονται στο 2'-3' κυκλικό φωσφορικό άκρο και στο 5' υδροξύλιο (Εικόνα 14B). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όλα αυτά τα ριβοένζυμα δεν μπορούν να θεωρηθούν κανονικά ένζυμα, εξαιτίας του γεγονότος ότι καταλύουν την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών *in cis*, δηλαδή ενδομοριακά.



**Εικόνα 14.** Προτεινόμενοι μηχανισμοί χημικής κατάλυσης ριβοενζύμων. Οι αντιδράσεις αυτές απαιτούν μεταφορά πρωτονίων η οποία μπορεί να επηρεάζεται γενικά από την παρουσία βάσεων παρουσιάζονται ως B:) ή άλλους παράγοντες όπως η παρουσία ιόντων  $Mg^{2+}$ . A: Μεγάλα ριβοένζυμα B: Μικρά ριβοένζυμα

Πηγή: [www.el.wikipedia.org](http://www.el.wikipedia.org)

- **Μεγάλα ριβοένζυμα**

Τα ιντρόνια της ομάδας I, των οποίων το μέγεθος ποικίλει από 200 νουκλεοτίδια έως 1500 νουκλεοτίδια (nt), έχουν ανιχνευθεί σε σχεδόν όλους τους οργανισμούς. Τα ιντρόνια της ομάδας II έχουν βρεθεί σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, αλλά και σε αρκετά

υποκυτταρικά οργανίδια. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 300 nt έως 3000 nt. Ο μηχανισμός κατάλυσης και στις δύο ομάδες ιντρονίων είναι μια τρανσεστεροποίηση (transesterification) με SN2 πυρηνόφιλη αντικατάσταση με την οποία παράγονται προϊόντα με 5'-φωσφορικά και 3'-OH άκρα (Steitz κ.ά 1993) (Εικόνα 14A). Τα ιντρόνια και των δύο ομάδων παρουσιάζουν πολύπλοκη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή, η οποία φαίνεται πως σταθεροποιείται με τη βοήθεια δισθενών κατιόντων, όπως το Mg<sup>2+</sup>. Παρόλο που τα ιντρόνια των δύο ομάδων διαφέρουν σημαντικά στις δομές και στους μηχανισμούς τεμαχισμού και επανασυγκόλλησης, παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ομοιότητα στον τρόπο με τον οποίο εξελίχθηκαν οι αντιδράσεις που καταλύουν.

Όσον αφορά τα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ριβοενζύμων, μικρών και μεγάλων, ο λόγος kcat/K<sub>m</sub> είναι χαμηλός, όπου το K<sub>m</sub> και το kcat έχουν χαμηλή τιμή. Αυτό υποδηλώνει υψηλή συγγένεια για τα υποστρώματά τους και αργή απελευθέρωση των προϊόντων αντίστοιχα, με αποτέλεσμα τον γρήγορο κορεσμό του καταλυτικού τους κέντρου. Συμπερασματικά, τα ριβοένζυμα είναι, συγκριτικά με τα πρωτεϊνικά ένζυμα, πολύ πιο “αργοί” καταλύτες. Αυτά, όμως, τα κινητικά χαρακτηριστικά ταιριάζουν με τη λειτουργία των ριβοενζύμων, η οποία για τις περισσότερες περιπτώσεις είναι η κατάλυση μιας αντίδρασης ενός κύκλου (single turnover reaction), όπως είναι η αποκοπή τους από ένα μεγαλύτερο μόριο.

### 1.6.1. ΤΟ ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΙΟ ΩΣ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟ

Με πρόσφατες μελέτες και την ανάπτυξη κρυσταλλογραφικών μεθόδων επιβεβαιώθηκε ότι στο ενεργό κέντρο της πεπτιδυλο-τρανσφεράσης του ριβοσώματος (κατά τη δράση της σχηματίζεται ο πεπτιδικός δεσμός στις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες) υπάρχει μόνο RNA που ανήκει στην 23S υπομονάδα (Nissen κ.ά 2000). Με αυτόν τον τρόπο αποδείχθηκε ότι το ριβοσωμάτιο αποτελεί ένα ριβοένζυμο (Steitz και Moore 2003). Από τις αρχές της δεκαετίας του '90 υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις για το γεγονός αυτό, όταν ο Noller και οι συνεργάτες του είχαν υποβάλλει το ριβοσωμάτιο σε εξαντλητική αποπρωτεΐνωση και είχαν διαπιστώσει ότι η δραστηριότητα της πεπτιδυλοτρανσφεράσης παρέμενε (Noller κ.ά 1992).

Το ριβοσωμάτιο θεωρείται μια δομή που σχηματίστηκε την εποχή που επικρατούσαν τα RNA μόρια και αποτελούταν αποκλειστικά από RNA, ενώ στη συνέχεια συνέβαλλε καθοριστικά στην εγκαθίδρυση των πρωτεϊνών στους μοριακούς μηχανισμούς των



πρωτοκυττάρων. Λόγω της εμφάνισής του στον αρχέγονο κόσμο του RNA, της εξελικτικής του πορείας και της λειτουργικής του σημαντικότητας, το ριβοσωμάτιο και πιο συγκεκριμένα το ριβοσωματικό RNA χρησιμοποιείται πολύ συχνά για φυλογενετικές μελέτες, γι' αυτό και η περαιτέρω διαλεύκανση των λειτουργικών χαρακτηριστικών αυτού του σχηματισμού θα δώσει σημαντικές πληροφορίες για την μοριακή φυλογένεση των συστατικών του κυττάρου.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ**  
**Ο ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNA<sub>s</sub> ΣΤΟ**  
**ΦΥΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ**

## 2.1 Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA ΔΙΑΔΡΑΜΑΤΙΖΕΙ ΕΝΑΝ ΕΚΠΛΗΚΤΙΚΑ ΙΣΧΥΡΟ ΡΟΛΟ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Η πρόσφατη ανακάλυψη των *microRNAs* και ο ρόλος τους στους φυτικούς οργανισμούς και κυρίως στα κύτταρα αυτών αποτελεί για την επιστημονική κοινότητα ένα σημαντικό γεγονός στην εξέλιξη της βιολογίας. Σύμφωνα με τα λόγια του Grimson «τα *microRNAs* αποτελούν μια μεγαλοπρεπή αξίωση προς μελέτη και η ανακάλυψη του διαδεδομένου ρόλου αυτών των μορίων άλλαξε το τοπίο της βιολογίας πολύ γρήγορα». Ο Bartel και οι συνάδελφοί του τονίζουν ότι «τα εργαστήρια σε όλον τον κόσμο, που λειτουργούν πάνω σε ποικίλα βιολογικά ζητήματα, ενσωματώνουν τώρα *microRNAs* στην έρευνά τους». Οι παραπάνω μελετητές έχουν τροφοδοτήσει στην επιστημονική κοινότητα με τα κατάλληλα στοιχεία σχετικά με τον προσδιορισμό των εκατοντάδων μικρών μορίων RNA και την παρουσία αυτών των μορίων στη ρύθμιση της παραγωγής χιλιάδων πρωτεϊνών στα φυτά (Kneller 2006).

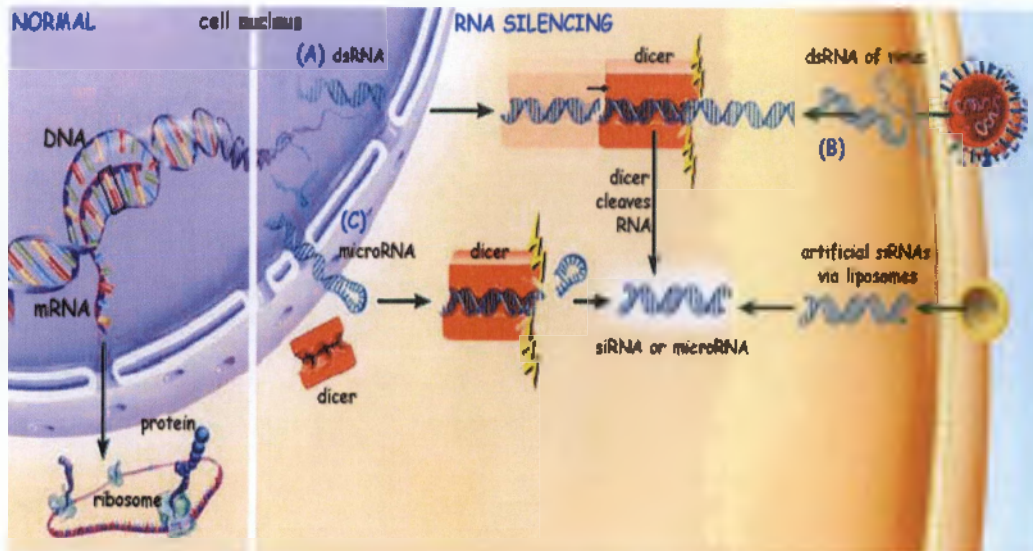
Η έρευνα έχει παρουσιάσει μια πολύ μεγάλη εικόνα των *microRNAs* σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Έως τις αρχές της δεκαετίας του '90, κανένας δεν είχε μια ένδειξη για τα *microRNAs*, λόγω του μικροσκοπικού μεγέθους τους, αφού η παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο ήταν αδύνατη. Η ομάδα του Victor, το 1993 στην Ιατρική Σχολή του Χάρβαρντ, βρήκε το πρώτο *microRNA-lin-4*, μελετώντας μια μεταλλαγή στο σκουλήκι *Caenorhabditis elegans* (βλέπε κεφ. 1<sup>ο</sup>). Στη συνέχεια, ακολούθησαν και άλλες έρευνες για αυτά τα μόρια, έως να αποκτηθούν τα σημερινά δεδομένα. Οι επιστήμονες ήξεραν για δεκαετίες ότι τα μόρια του RNA χρησιμεύουν ως αγγελιοφόροι και μεταφραστές, που χτίζουν τις πρωτεΐνες από τις ακολουθίες DNA. Αλλά τα *microRNAs* είναι αυτά που καθορίζουν ποιες ακολουθίες DNA είναι μεταφράσιμες σε ένα δεδομένο κύτταρο, κάτι που αναφέρεται στους παράγοντες της μεταγραφής. Αν μπορούσαν να χαρακτηριστούν τα *microRNAs*, σίγουρα θα έπαιρναν τη μορφή ενός βιολογικού μπαλέτου μιας αρκετά καλοστημένης χορογραφίας, αφού βοηθούν στον καθορισμό της σύνθεσης των πρωτεϊνών (Kneller 2006).

Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται μια λεπτομερής αναφορά στο ρόλο και στη λειτουργία των *microRNAs* σε διάφορα κύτταρα των φυτικών οργανισμών και επίσης δίνονται πληροφορίες στο μηχανισμό της αποσιώπησης των γονιδίων που γίνεται στα φυτά.

## 2.2 Ο ΤΡΟΠΟΣ ΜΕ ΤΟΝ ΟΠΟΙΟ ΕΝΕΡΓΕΙ Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNAi ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

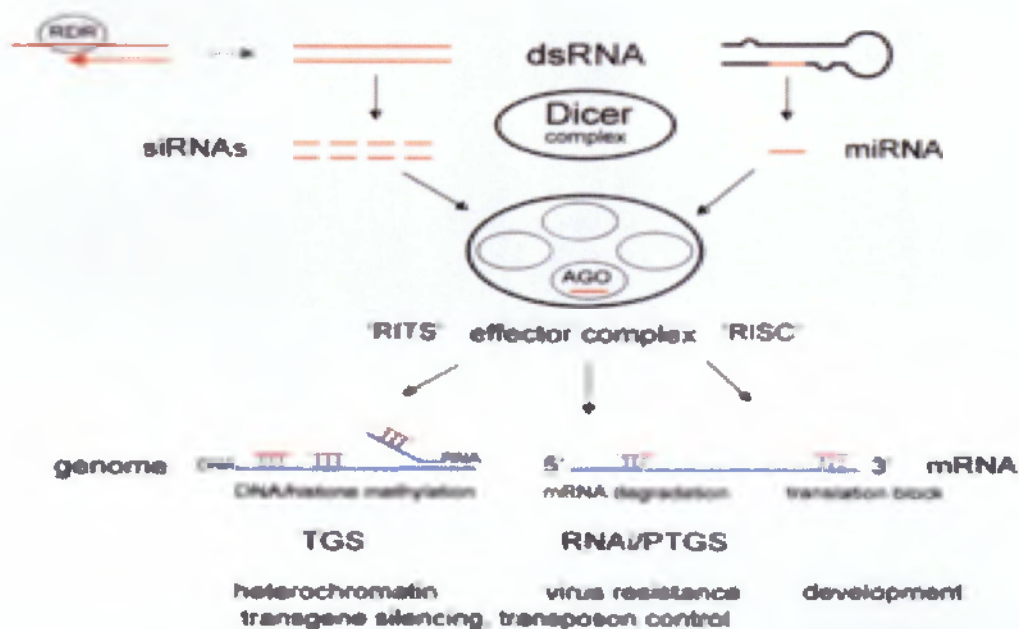
Σύμφωνα με τις εργαστηριακές τεχνικές για την κατανόηση και τον κανονισμό της λειτουργίας συγκεκριμένων γονιδίων στα φυτά, η επίδραση του RNAi είναι ραγδαία. Το RNAi συμμετέχει σε μεγάλο βαθμό στη μετατροπή των διπλών RNA (dsRNA) σε ειδικά τμήματα του RNA που έχουν ως σκοπό την καταστροφή των επιβλαβών μηνυμάτων που μεταφέρονται από το mRNA. Ο μηχανισμός του RNAi αρχίζει τη λειτουργία του με το ένζυμο *dicer* (μια ριβονουκλεάση) το οποίο έχει την ικανότητα να διασπά τη διπλή αλυσίδα RNA (dsRNA), με στόχο τη δημιουργία μικρών-κοντών τμημάτων διπλής αλυσίδας, αποτελούμενης από 20-25 ζευγάρια βάσεων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι από τη διάσπαση της διπλής αλυσίδας RNA εμφανίζονται δύο ειδικά μόρια του RNA που είναι αποτελεσματικά στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων που υπάρχουν στο φυτικό κύτταρο. Οι μελέτες που έγιναν, απέδειξαν ότι όταν γίνεται η αποικοδόμηση του δίκλωνου μορίου RNA, σχηματίζονται τα siRNA και τα miRNA και παρατηρείται μια ενεργειακή δαπάνη στο κύτταρο. Αυτό οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης στο φυτικό γονιδίωμα. Συνεπώς, το ίδιο το ένζυμο *dicer*, καταλύει τη διάσπαση αυτή.

Τα miRNA που παράγονται με τη βοήθεια του μηχανισμού του RNAi, καθώς προέρχονται από τη διάσπαση μεγαλύτερων μεταγραφημάτων, λειτουργούν με σύζευξη των βάσεων πάνω στο mRNA στόχο, σχηματίζοντας δίκλωνες περιοχές που είναι επιδεκτικές στη διάσπαση από ενδονουκλεάσεις. Έτσι λοιπόν γίνεται κατανοητό ότι η αποικοδόμηση του mRNA στόχου παρεμποδίζει και την έκφρασή του. Η ρύθμιση του mRNA με microRNA βρίσκει απομίμηση στο φαινόμενο των 'επεμβατικών' RNA (RNA interference). Στις εικόνες 2.2.1 και 2.2.2 υπάρχει, αρκετά παραστατικά, ένα σχεδιάγραμμα του μηχανισμού του RNAi στα κύτταρα των φυτών.



**Εικόνα 15.** Η λειτουργία του RNAi επηρεάζει την έκφραση των μεμονωμένων γονιδίων στη μεταγραφή του φυτικού κυττάρου. Α) αυτό-αντιγραφή των γονιδιακών αλληλουχιών, β) αναπαραγωγή από ιούς, γ) σχηματισμών ρυθμιστικών αλληλουχιών. Με τη βοήθεια του ενζύμου dicer και κυρίως του siRNA γίνεται η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης.

Πηγή: [www.hyscience.com](http://www.hyscience.com)



**Εικόνα 16.** Τα κύτταρα χρησιμοποιούν το ένζυμο dicer για να κοντύνουν τη διπλή αλυσίδα του RNA για να δημιουργήσουν μικρά τμήματα διπλής αλυσίδας, αποτελούμενη από 20-25 ζευγάρια βάσεων. Η διπλή αλυσίδα RNA (dsRNA) ή ένα ενδογενές προ-miRNA μπορεί να επεξεργαστεί από το ένζυμο dicer και να ενσωματωθεί στο σύμπλοκο αποσιώπησης, εξαρτώμενο από το RNA (RNA-induced silencing complex, RISC), το οποίο στοχεύει στη μονή αλυσίδα του αγγελιοφόρου RNA (μεταφέρει τη γενετική πληροφορία), προκαλώντας την καταστολή της μετάφρασης των αντιστοίχων γονιδίων.

Πηγή: [www.el.wikipedia.org](http://www.el.wikipedia.org)



Η παρεμβολή του RNA (RNAi) είναι ένας μηχανισμός που αναστέλλει την έκφραση των γονιδίων στο στάδιο της μετάφρασης και παρεμποδίζει τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων στα φυτικά κύτταρα. Οι RNAi στόχοι βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό στους ιούς και παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών και στη διατήρηση του γονιδιώματος. Μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια (siRNA) είναι το κλειδί για την RNAi διαδικασία. Τα siRNA αυτά έχουν συμπληρωματικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες με τις αντίστοιχες του dsRNA που στοχεύουν. Ειδικές πρωτεΐνες, που καθοδηγούνται από τα siRNAs, στοχεύουν το mRNA, το οποίο κόβουν σε συγκεκριμένες περιοχές, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μικρότερα τμήματα που δεν έχουν τη δυνατότητα να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες.

Η επιλεκτική και ισχυρή επίδραση του RNAi στη γονιδιακή έκφραση το καθιστά ένα πολύτιμο εργαλείο έρευνας: (α) στην κυτταρική καλλιέργεια σε φυτικούς οργανισμούς, με την εισαγωγή των συνθετικών dsRNA σε κύτταρα που προκαλούν την καταστολή των συγκεκριμένων γονιδίων, και (β) στη χρησιμοποίησή τους σε ευρεία κλίμακα στο κύτταρο, απομακρύνοντας κάθε επιβλαβές γονίδιο, με αποτέλεσμα τον προσδιορισμό των στοιχείων που είναι απαραίτητα για μια σταθερή διαδικασία, όπως είναι η κυτταρική διαίρεση.

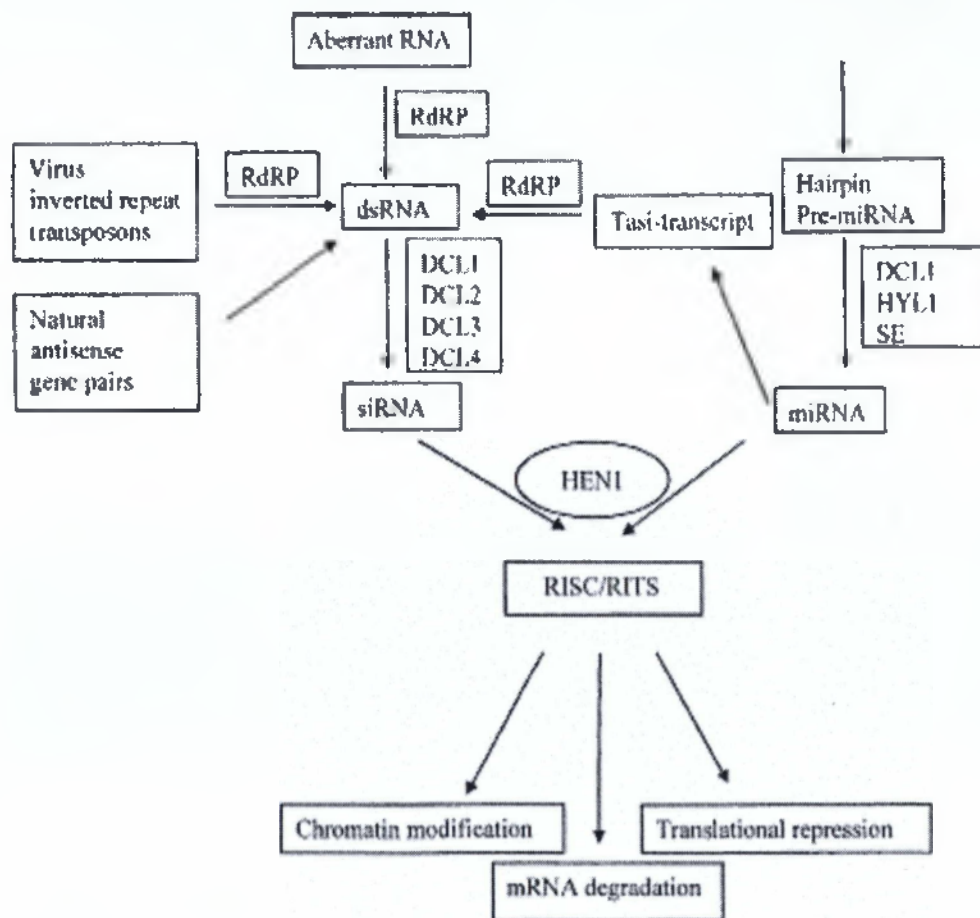
Επίσης, το RNAi μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια αντι-αγγελιοφόρα καταστολή της έκφρασης των γονιδίων, η οποία ενεργεί καταλυτικά στην υποβάθμιση του mRNA.

## 2.3 Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΒΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ microRNA

Η διαδικασία του μηχανισμού της βιογένεσης του microRNA στα φυτά είναι σχεδόν ίδια με αυτήν των ζωικών οργανισμών. Τα ώριμα microRNAs (miRNAs) προέρχονται από μια συντονισμένη δράση του ενζύμου *dicer*, όπου το επεξεργασμένο dsRNA με τα 21 νουκλεοτίδια μεθυλιώνεται στο 3<sup>ο</sup> άκρο της αλυσίδας από το γονίδιο *hen1*. Τα μεθυλιωμένα microRNAs τοποθετούνται με ακρίβεια στο RISC, δηλαδή στο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο και χρησιμεύουν ως ένα μόριο – οδηγός για την αναγνώριση του στόχου των mRNAs. Το RISC επηρεάζει το μετα-μεταγραφικό γονίδιο, το οποίο αποσιωπείται, είτε με την υποβάθμιση του mRNA είτε με την παρεμπόδιση της μετάφρασης του στόχου των mRNAs.

Η βιογένεση των ενδογενών siRNAs απαιτεί τη δραστηριότητα μιας από τις RNA-πολυμεράσεις (RdRPs), για τη μετατροπή των κοντών αλυσίδων του RNA. Το dsRNA

αναγνωρίζεται και χωρίζεται σε τετράγωνα από ένα από τα γονίδια DCLs (DCL2, DCL3, DCL4 ή ακόμα και DCL1). Τα επεξεργασμένα siRNAs στοιβάζονται στο RISC ή ένα RITS (RNA Induced Transferable Silencing). Αυτό μπορεί να προκαλέσει την υποβάθμιση του mRNA ή την τροποποίηση της ιστόνης του DNA, προκαλώντας μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων στόχων. Στο σχήμα 17 παρουσιάζεται με τη μορφή διαγράμματος η βιογένεση και ο τρόπος δράσης του μικρού RNA στα φυτά.

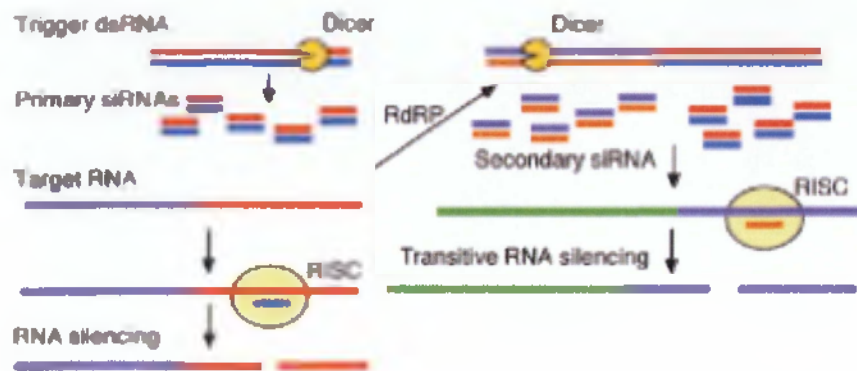


**Σχήμα 17.** Η βιογένεση και τρόπος δράσης του μικρού RNA στα φυτά

Πηγή: Sunkar και Zhu 2007

Το σχήμα 18 δείχνει την επεξεργασία των dsRNAs με κοπή του στόχου RNA, με στόχο την αποσιώπησή του. Το μόριο του RNA που δεν έχει καμία ομολογία στη λειτουργία των dsRNA, υποβάλλεται σε μια διαδικασία που καλείται μεταβατική αποσιώπηση. Η ενεργοποίηση των dsRNA (κόκκινα / μπλε σκέλη) γίνεται με την επεξεργασία των siRNA και το RNA στόχος μετατρέπεται σε έναν εγχυτήρα στο dsRNA με τη βοήθεια της RNA-πολυμεράσης (RdRP) με έναν εξαρτώμενο ή ανεξάρτητο τρόπο. Το dsRNA που προκύπτει, υποβάλλεται σε επεξεργασία στα δευτεροβάθμια siRNAs

(πορτοκαλιά / πορφυρά σκέλη). Όταν ένα δευτεροβάθμιο siRNA ενσωματώνεται στο RISC, οποιοδήποτε RNA που έχει συμπληρωματική ακολουθία με το δευτεροβάθμιο siRNA, διασπάται. Κανένα συστατικό εκτός από το siRNA δεν έχει κλωνοποιηθεί ή έχει καθαριστεί στα συστήματα των φυτών.



**Σχήμα 18.** Επεξεργασία των dsRNAs στο σχίσμο του στόχου RNA με στόχο την αποσιώπησή του.

Πηγή: [www.el.wikipedia.org](http://www.el.wikipedia.org)

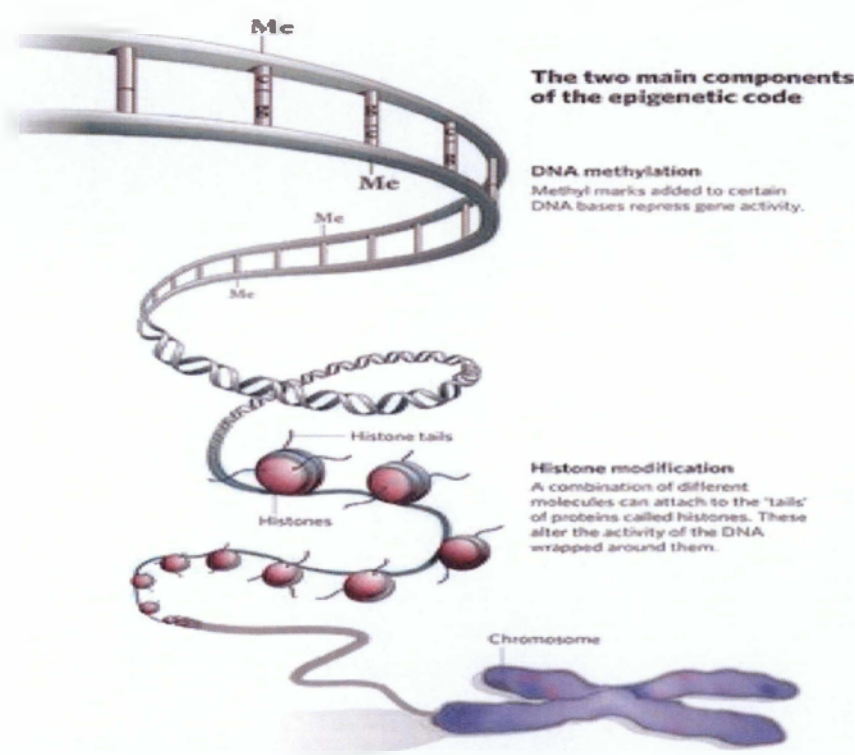
## 2.4 Η ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ ΤΩΝ microRNAs ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.

Οι πρόσφατες εργαστηριακές έρευνες στα φυτά έχουν αποκαλύψει τη σπουδαιότητα της λειτουργίας των microRNAs στο σχηματισμό της χρωματίνης. Η κληρονομικότητα αυτού του χαρακτηριστικού των μικρών μορίων RNA, μέσω των πολλαπλάσιων κύκλων κυτταρικών διαιρέσεων και σε μερικές περιπτώσεις, μέσω του μηχανισμού της μείωσης, βεβαιώνεται από τα επιγενετικά σημάδια. Στα φυτά, τα μετατρέψιμα στοιχεία και τα επιγενετικά γονίδια αποτελούν εντυπωσιακά παραδείγματα της σταθερής κληρονομιάς των γονιδίων που είναι κατασταλμένα, λόγω της μεθυλίωσης του DNA τους και της τροποποίησης των ιστονών της χρωματίνης (εικόνα 19). Το φυτό *Arabidopsis thaliana* αποτελεί ένα χρήσιμο πρότυπο που έχει δώσει αρκετές πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο που παρεμβαίνει το microRNA στην ανάπτυξη και στον έλεγχο των στοιχείων του γονιδιώματος των φυτών.

Για να γίνει κατανοητός ο τρόπος που ενεργεί το microRNA στο σχηματισμό της χρωματίνης στα φυτά, είναι απαραίτητο πρώτα να αναφερθούν λίγα στοιχεία σχετικά με την επιστήμη της επιγενετικής. Η επιγενετική ορίζεται ως η μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στη δημιουργία της φαινοτυπικής πολυπλοκότητας κατά τη μορφογένεση των

φυτών. Οι μηχανισμοί αυτοί επιτρέπουν στα κύτταρά τους να χρησιμοποιούν από τη γενετική πληροφορία μόνο ένα τμήμα της, αυτό που πρέπει. Αν και κάθε κύτταρο διαθέτει ολόκληρη τη γενετική πληροφορία για τη δημιουργία του φυτικού οργανισμού, δεν χρησιμοποιεί παρά ένα μέρος της. Οι επιγενετικές αλλαγές λειτουργούν σαν ένα είδος 'διακόπτη' ο οποίος ενεργοποιεί μόνο όσα γονίδια πρέπει να εκφραστούν σε κάθε κυτταρικό τύπο. Επιπροσθέτως, αποτελούν ένα είδος μνήμης, η οποία περνά από ένα κύτταρο στο θυγατρικό του. Έτσι τα νέα κύτταρα ενός φυτικού ιστού (τα οποία προέρχονται από διαίρεση των παλιών) διατηρούν την ταυτότητα του ιστού στον οποίο ανήκουν.

Η περισσότερο μελετημένη από τις επιγενετικές αλλαγές είναι η μεθυλίωση της κυτοσίνης, η προσθήκη δηλ. μιας ομάδας μεθυλίου σε μια από τις τέσσερις βάσεις του DNA. Κατά κανόνα, η μεθυλίωση αποτελεί έναν τρόπο άρσης της έκφρασης ενός γονιδίου. Με άλλα λόγια, τα προϊόντα για τα οποία κωδικοποιεί ένα γονίδιο παύουν να παράγονται όταν αυτό μεθυλιωθεί. Αντιθέτως, τα γονίδια τα οποία δεν είναι μεθυλιωμένα παραμένουν ενεργά.



**Εικόνα 19.** Τα δύο κύρια συστατικά του επιγενετικού κώδικα, η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών της χρωματίνης

Πηγή: [www.e-bioidea.blogspot.com/2007/09/blog-post\\_3165.html](http://www.e-bioidea.blogspot.com/2007/09/blog-post_3165.html)



Παράλληλα με τη μεθυλίωση του DNA, που θεωρείται ως ένα κλασικό επιγενετικό παράδειγμα, οι τροποποιήσεις και οι παραλλαγές των ιστονών έχουν γίνει όλο και περισσότερο αποδεκτές ως πιθανοί μεταφορείς των επιγενετικών πληροφοριών. Ο πιο πρόσφατος, και ο ευπροσάρμοστος, 'συνεργάτης' της χρωματίνης που έχει προκύψει και στα φυτικά είδη είναι τα τελευταία χρόνια το RNA. Το RNA εμπλέκεται σε πολλές διαδικασίες μέσα στο φυτικό κύτταρο, με κύριο εκφραστή του το microRNA. Το microRNA λαμβάνει μέρος στην αδρανοποίηση των χρωμοσωμάτων και τη γενετική αποτύπωση των κυττάρων των φυτών με τη σύντομη παρέμβαση του RNA (siRNA).

Στα φυτά, η πρώτη άμση έδειξε ότι το RNA διαδραματίζει ένα ιδιαίτερο ρόλο στην τροποποίηση της χρωματίνης προήλθε από την παρατήρηση της μεθυλίωσης του DNA στον καπνό.

## 2.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ microRNA ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Η δραστηριότητα που εμφανίζουν τα microRNAs με τη συμμετοχή τους στις διάφορες πτυχές της ανάπτυξης των φυτικών οργανισμών είναι αξιοσημείωτη. Ο ευνοϊκός σχηματισμός της ορμόνης της αυξίνης στα φυτά, ο μηχανισμός της δημιουργίας των μεριστωμάτων, ο διαχωρισμός των οργάνων τους, η ανάπτυξη των φύλων με την απαιτούμενη πολικότητα τους, ο σχηματισμός των πλευρικών ριζών και των εμβρύων, η μεταβίβαση του νεαρού σποροφύτου από την ενήλικη φυτική φάση, στη φάση άνθησης και τον πλήρη σχηματισμό των οργάνων του, είναι μερικές από τις πτυχές ανάπτυξης όπου τα microRNAs διαδραματίζουν ένα σπουδαίο ρόλο (Mallory και Vaucheret 2006, Rhoades κ. ά 2006). Επίσης τα microRNAs είναι οι βασικοί ρυθμιστές των βιοτικών και αβιοτικών επιδράσεων και παρουσιάζουν ένα εξίσου σημαντικό ρόλο στην ομοίωση των φυτών (Rhoades και Bartel 2004, Fujii 2005, Navarro 2006 κ. ά).

Διάφορες μελέτες στο φυτό *Arabidopsis thaliana* κατέδειξαν το ρόλο των microRNAs στις αναπτυξιακές διαδικασίες. Μια από τις πρώτες αναφορές παρείχε τη γενετική βάση της συμμετοχής των microRNA στην ανάπτυξη των φύλλων (Palatnik κ. ά 2003). Η λειτουργία του microRNA αυτού, οδήγησε στην υπερέκφραση του γονιδίου miR319 (που είναι γνωστού επίσης ως miRJA, Palatnik κ. ά 2003). Το miRJA που απαρτίζεται από μια συγκεκριμένη ακολουθία νουκλεοτιδίων, η οποία βρίσκεται και σε διάφορα γονίδια TCP. Αυτά κωδικοποιούν μια μεγάλη οικογένεια των πρωτεϊνών που

μοιράζεται μια κοινή περιοχή, Teosinte διακλάδωση 1, Cycloidea και PCF). Η ρύθμιση των γονιδίων TCP έχουν ως αποτέλεσμα τη λειτουργία του γονιδίου miR172. Αυτό επιβεβαιώθηκε μελετώντας τις μεταλλάξεις των μικρών RNA και οι περιοχές τεμαχισμού χαρτογραφήθηκαν στη κοινή συμπληρωματική περιοχή των πολλαπλών γονιδίων TCP (Palatnik κ. ά 2003).

Δύο ανεξάρτητες μελέτες έδειξαν τη σημασία των καθοδιγούμενων miR172 του *Arabidopsis thaliana* στη ρύθμιση του γονιδίου APETALA2, που είναι υπεύθυνο για τη διαμόρφωση των οργάνων του (Aukerman και Sakai 2003, Chen 2004). Υπάρχουν τρεις κατηγορίες παραγόντων μεταγραφής οι οποίες εκφράζονται ως συνδυασμένες δραστηριότητες και καθορίζουν τη λειτουργία του μεριστώματος. Ένας από αυτούς, το γονίδιο APETALA2 (AP2), ρυθμίζει την ταυτότητα των οργάνων των φυτών. Υψηλά πρωτεϊνικά επίπεδα παρατηρούνται σε μεταλλάξεις και έχουν επιπτώσεις στη συσσώρευση του miR172 και AP2. Η υπερέκφραση του miR172 στα διαγενετικά φυτά, είχε ως συνέπεια την επιτάχυνση της ανάπτυξής τους και προκάλεσε σε σημαντικό βαθμό την ομοιόστασή τους.

Έχει σημασία να αναφερθεί ότι η έκφραση του AP2 με μια περιοχή που αποτελεί στόχο του γονιδίου miR172, στα περισσότερα φυτά, προκάλεσε ισχυρές ατέλειες στην τελική διαμόρφωσή τους. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι ο βαθμός συμπληρωματικότητας μεταξύ ενός miRNA και του στόχου του mRNA, καθορίζει τον τύπο της επίδρασης του ενός στο άλλο ως εξής: ο υψηλός βαθμός της συμπληρωματικότητας οδηγεί στο τεμαχισμό του mRNA, ενώ ο χαμηλός βαθμός συμπληρωματικότητας μπορεί να οδηγήσει στη μεταφραστική καταστολή (Doench κ. ά 2003). Εντούτοις, ο ρυθμιστικός ρόλος του miR172 στο φυτό *Arabidopsis thaliana* προτείνει ότι στα miRNA και στα mRNA που είναι οι στόχοι τους, οι αλληλεπιδράσεις τους είναι πιο περίπλοκες. Το miR172 στο φυτό *Arabidopsis thaliana* ρυθμίζει τόσο τον τεμαχισμό (Kassachau κ. ά 2003, Schwab κ. ά 2005) όσο και την καταστολή της μετάφρασης (Aukerman και Sakai 2003, Chen 2004).

Είναι άγνωστο αν μια παρόμοια πολυπλοκότητα είναι διαδεδομένη ή αν αυτό περιορίζεται στο ζευγάρι miR172-AP2. Η διακοπή του ρυθμιστικού ρόλου των miRNA στα φυτά, έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με αναπτυξιακές ανωμαλίες σε διάφορες περιπτώσεις. Τα εξασθενημένα φυτά παρουσιάζουν διαταραχές στην ανάπτυξη των εμβρυικών κυττάρων και στην τελική διαμόρφωση του σχήματος των οργάνων τους, με αποτέλεσμα αυτό να δημιουργεί μεγάλο πρόβλημα στη φυσιολογία τους (Mallory κ. ά 2004, Laufs κ. ά 2004). Η υπερέκφραση του miR164, οδηγεί σε ένα φαινότυπο όπου

σχεδόν όλα τα όργανα των φυτών παρουσιάζουν ένα διάφορο βαθμό τήξης (Mallory κ. ά 2004). Η ανάλυση της μετάλλαξης κατά την οποία σταματά η έκφραση του miR164, καθόρισε έναν συγκεκριμένο ρόλο του τελευταίου στο σχηματισμό του περιθωρίου των φύλλων (κομμένα οδοντωτά περιθώρια). Αντίθετα, η σωστή λειτουργία του miR164 οδηγεί στο σχηματισμό ομαλών περιθωρίων στα φύλλα (Níkovics κ. ά 2006). Η επίδραση του miR164 ρυθμίζει τα γονίδια CUC1 και CUC2 κατά τρόπο που είναι ορατός στα πρόωρα αναπτυσσόμενα άνθη, καθορίζοντας και τον αριθμό πετάλων (Baker κ. ά 2005).

Το γονίδιο miR164 ρυθμίζει με αρνητικό τρόπο τη συσσώρευση της αυξίνης στην πλευρική ανάπτυξη της ρίζας. Ένας αντίστροφος συσχετισμός βρέθηκε μεταξύ των γονιδίων miR164 και NAC1. Ο συσχετισμός αυτός έχει ως συνέπεια την αλλαγή του αριθμού των πλευρικών ριζών (Guo κ. ά 2005). Το επίπεδο των miR164 διαμορφώνεται από την αυξίνη. Το miRNA μεσολαβεί με κάποιο μηχανισμό, με τον οποίο το mRNA καθαρίζεται από το γονίδιο NAC1 και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη παραγωγής της αυξίνης (Guo κ. ά 2005). Η αυξίνη είναι μια φυτορμόνη που εμπλέκεται σε πολλές πτυχές της αύξησης και ανάπτυξης των φυτών. Στα περισσότερα περιπτώσεις που συμμετέχει η ορμόνη αυτή στα φυτά, μεσολαβούν οι παράγοντες που είναι στόχοι του miR160. Αυτοί είναι τα γονίδια ARF10, ARF16 και ARF17. Τα διαγενετικά φυτά, στα οποία το miR160 δεν επηρεάζει τη λειτουργία του ARF17, έδειξαν αναπτυξιακές ατέλειες, όπως διαστρεβλωμένη συμμετρία των εμβρυακών κυττάρων, αλλαγή των φυλλοταξιανθιών και της λειτουργίας των στημόνων. Αυτά τα τελευταία έχουν ως συνέπεια τη στειρότητα των φυτών (Mallory κ. ά 2005). Ένα άλλο miRNA, το miR167, ρυθμίζει αρνητικά και άλλα μέλη της οικογένειας των γονιδίων ARF (ARF6 και ARF8) που συμμετέχουν στην ανάπτυξη των φυτών (Rhoades και Bartel 2004).

Η υπερέκφραση του miR159, με την ταυτόχρονη παρουσία του γονιδίου MYB33 και την εμφάνιση πολλών αντιγράφων των γονιδίων αυτών στα φύλλα, οδηγούν τους ελαττωματικούς ανθήρες σε μειωμένη γονιμότητα και στην καθυστέρηση της άνθησης των φυτών σε συνθήκες με μικρή διάρκειας ημέρας (Achard κ. ά 2004). Η κατάργηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των γονιδίων miR159 και MYB33, οδήγησε σε αναπτυξιακές ατέλειες των φυτών, όπως είναι η ανικανότητα να επεκταθούν οι κοτυληδόνες, η μείωση της ανάπτυξης των σποροφύτων, το μειωμένο μέγεθος των φυτών (Millar και Gubler 2005). Επίσης, η υπερέκφραση του miR156 προκαλεί μια μέτρια καθυστέρηση στην άνθιση (Schwab κ. ά. 2005, Gandikota κ.ά 2007), ενώ η υπερέκφραση του γονιδίου SPL3 (που είναι ένας από τους στόχους του miR156) οδηγεί στο επιταχυνόμενο άνθισμα (Cardon κ. ά 1997, Wu και Poethig 2006, Gandikota κ. ά 2007).

Διάφορες λειτουργικές μελέτες έδειξαν ότι τα miRNAs, εκτός από το ρόλο τους στην ανάπτυξη των φυτών, ρυθμίζουν και τις αντιδράσεις των φυτικών οργανισμών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Rhoades και Bartel 2004, Fujii κ. ά 2005, Navarro κ. ά 2006). Για παράδειγμα, το γονίδιο miR395 δεν είναι ανιχνεύσιμο όταν τα φυτά αναπτύσσονται σε κανονικά θρεπτικά διαλύματα. Το γονίδιο αυτό ενεργοποιείται από τη χαμηλή συγκέντρωση θεικών αλάτων (Rhoades και Bartel 2004). Το miR399 έχει ως στόχο το γονίδιο UBC που κωδικοποιεί ένα αριθμό αντιγράφων ενός ενζύμου. Η συσσώρευση του UBC στο mRNA μειώνεται από την επίδραση χαμηλής συγκέντρωσης φωσφορικού άλατος. Η ρύθμιση του UBC έχει σημασία, γιατί μπορεί να επηρεάσει θετικά τη δραστηριότητα του γονιδίου AtPT1 (το γονίδιο AtPT1 είναι αυτό που μεταφέρει το φωσφορικό άλας) και να μειώσει την επιμήκυνση της αρχικής ρίζας (Fujii κ. ά 2005, Chiu κ. ά 2006). Στην περίπτωση του φυτού *Arabidopsis thaliana*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα γονίδια CSD1, CSD2 καθώς επίσης και αντίγραφα τους, δεν επηρεάζονται σημαντικά στο μεταγραφικό επίπεδο κατά τη διάρκεια της επίδρασης (Sunkar κ. ά 2006), ενώ εξαρτώνται από τις αλλαγές στα επίπεδα του miR398. Στην οξειδωτική πίεση, το miR398 είναι ρυθμισμένο να αναστέλλει την καταστολή των γονιδίων CSD1 και CSD2 (Sunkar κ. ά 2006).

## 2.6 Ο ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ siRNA ΣΤΟ ΦΥΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Η δράση των μικρών παρεμβατικών RNAs (siRNAs), είναι μια ρυθμιστική διαδικασία που έχει διατηρηθεί από γενιά σε γενιά και έχει εξελιχθεί ως ένας αμυντικός μηχανισμός απέναντι σε κάθε είδους δραστηριότητα των ιών στα φυτά και τα ζώα. Δεν είναι γνωστό εάν τα κύτταρα αυτών των οργανισμών χρησιμοποιούν siRNAs ως έναν αντιβακτηριδιακό αμυντικό μηχανισμό.

Η ανακάλυψη ενός ενδογενούς siRNA (siRNAATGB2), το οποίο επιδρά σε συγκεκριμένα βακτηριακά παθογόνα, όπως π.χ. το *Pseudomonas syringae*, αποτελεί ένα αξιοσημείωτο γεγονός. Αξίζει να αναφερθεί ότι η βιογένεση αυτού του siRNA απαιτεί τα γονίδια DCL1, HYL1, HEN1, RDR6, NRPD1A, και SGS3. Η επαγωγή της βιογένεσης εξαρτάται επίσης από το γονίδιο RPS2, που δίνει ανθεκτικότητα σε ασθένειες των φυτών και από το γονίδιο NDR1, που απαιτείται για την αντίστασή των φυτών σε βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Αυτό το siRNA συμβάλλει στη ανθεκτικότητα των φυτών



καταστέλλοντας το γονίδιο PPRL, που είναι ένας υποθετικός αρνητικός ρυθμιστής του γονιδίου RPS2.

Η ενδογενής δραστηριότητα του siRNA, καθώς και μερικών άλλων microRNAs, αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα της έκφρασης γονιδίων, υπεύθυνων για την καθοδήγηση του τεμαχισμού του mRNA, την παρεμπόδιση της μετάφρασης, ή την τροποποίηση της χρωματίνης (βλέπε και ενότητα 2.4) (Baulcombe κ. ά 2005). Στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, λιγότερα από εκατό miRNAs έχουν αναφερθεί ότι παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού (Rhoades 2006 και Bartel 2006). Τα μικρά αυτά RNA επηρεάζουν και την ανθεκτικότητα του φυτού στους διάφορους αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης, όπως είναι η υγρασία, η επάρκειά του σε θρεπτικά στοιχεία κ.λ.π. (Rhoades και Bartel 2004, Fujii και Chίου κ. ά 2005). Όπως βρέθηκε προσφάτως, ένα miRNA μπορεί να συμβάλει στη υπεράσπιση του *Arabidopsis thaliana* από βακτηρίδια με τη ρύθμιση της παραγωγής της αυξίνης (Navarro και Jones 2006). Σε αντίθεση με τον περιορισμένο αριθμό των miRNAs, χιλιάδες ενδογενή siRNAs έχουν βρεθεί να συμμετέχουν στη λειτουργία αυτή (Sunkar και Zhu 2004, Haudenschild 2005). Εντούτοις, οι βιολογικοί ρόλοι τους είναι κατά ένα μεγάλο μέρος άγνωστοι, εκτός από μερικές δραστηριότητες που 'χουν να κάνουν με την ανάπτυξη των φυτών, τον έλεγχο των επιπέδων της αυξίνης και τη συμμετοχή τους στη μεθυλίωση του DNA και την αποσιώπηση του δομικού γονιδίου (Mallory και Vaucheret 2006)

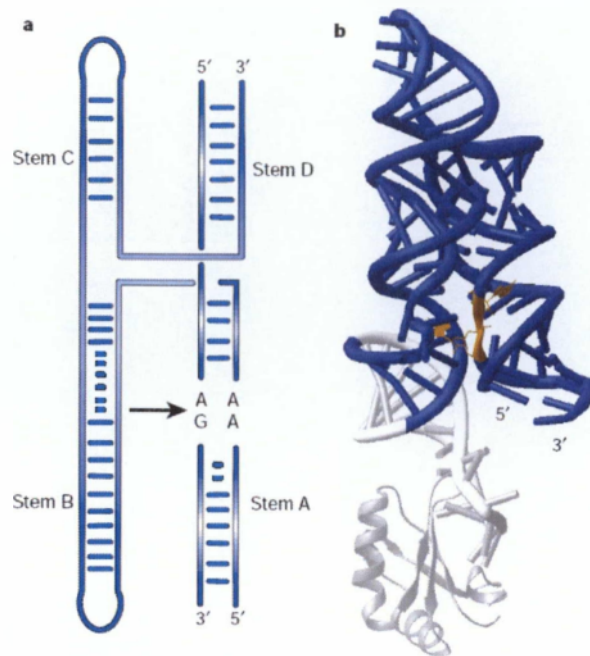
Πρόσφατα ανακαλύφθηκε μια νέα κατηγορία ενδογενών siRNAs που προήλθαν από μια επικαλυπτόμενη περιοχή ενός ζευγαριού φυσικών αντιαγγελιαφόρων αντιγράφων (NATs), που ρυθμίζουν την επίδραση των αλάτων στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Sunkar και Zhu 2005). Παρά τα μεγάλα διαστήματα που υπάρχουν ανάμεσα στα γονίδια, ένα σημαντικό ποσοστό των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων εμφανίζεται ως NATs (Werner και Berdal 2005). Περισσότερα από χίλια ζευγάρια NATs υπάρχουν στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Gaasterland και Chua κ. ά 2005). Η ανάλυση των αντιγράφων σε σχέση με μια βάση δεδομένων των microRNA σ' αυτό το φυτό, έχει αποκαλύψει ότι, σε πολλές περιπτώσεις, ένα αντίγραφο ενός ζευγαριού NATs επηρεάζεται από συγκεκριμένους αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες. Το αντίγραφο αυτό μπορεί να ζευγαρώσει με το υπάρχον αντιαγγελιαφόρο αντίγραφο και να προκαλέσει τον σχηματισμό των siRNA, με συνέπεια τη αποσιώπηση του NAT (Zimmermann κ.ά 2004). Και άλλοι ομόλογοι γεωμετρικοί τόποι των NATs μπορούν να χρησιμεύσουν ως μια από τις σημαντικότερες πηγές ενδογενών siRNAs στη ρύθμιση των γονιδίων σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες.

## 2.7 ΠΡΩΤΑΓΟΝΙΣΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗ

Ο κόσμος του RNA επιδρά σημαντικά στην εκκίνηση παραγωγής των καταλυτικών πρωτεϊνών, κατά τη διαδικασία της πρωτεϊνوسύνθεσης, αφού τα RNAs καταλύουν δευτερεύουσες φορείς στα φυτικά κύτταρα. Στην πραγματικότητα, αυτή η ιδέα είναι πολύ πιο κεντρική στην κυτταρική βιολογία, απ' ό,τι πιστευόταν πριν.

Το ριβοένζυμο είναι υπεύθυνο για τις άμεσες πληροφορίες σε όλη τη διάρκεια του σχηματισμού της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο. Αποτελείται από τρία μόρια RNA (σε μερικές περιπτώσεις τέσσερα), μαζί με μια δωδεκάδα πρωτεϊνών. Καμία υπομονάδα πρωτεΐνης δεν έχει αναγνωριστεί σήμερα από τους επιστήμονες, εκτός από αυτή του ενζύμου της πεπτιδικής τρανσφεράσης. Η πιο άμεση απόδειξη της παραπάνω ιδέας, προέρχεται από τη συμπεριφορά της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου, στο κέντρο του οποίου εντοπίστηκε ένα μικρό μόριο RNA με ανασταλτική δράση. Το μόριο αυτό είναι ανάλογο με την ενδιάμεση τετραεδρική μορφή του ανιόντος που σχηματίζεται κατά τη δημιουργία του δεσμού του αμιδίου (Doudna και Cech 2002).

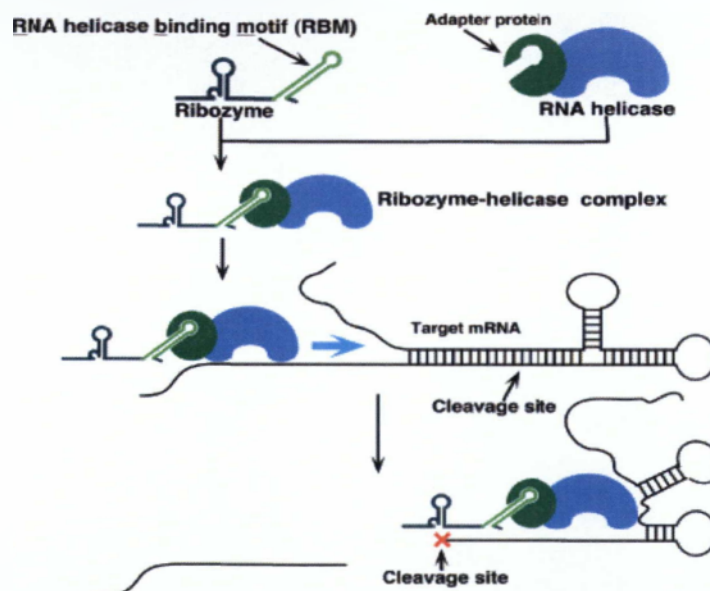
Έχει ιδιαίτερη αξία να αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια της κατάλυσης της αντίδρασης συμμετέχουν μόνο τα μόρια του RNA και καμία πρωτεΐνη δεν είναι παρούσα, με αποτέλεσμα η κατάλυση να είναι μόνο ριβοενζυμική (Doudna και Cech 2002). Πολλές από τις πρωτεΐνες του RNA έχουν τη δυνατότητα να ενεργήσουν σε συγκεκριμένους φωσφοροδιαστερικούς δεσμούς χρησιμοποιώντας το καλούπι 'βάση – ένωση' και σε άλλες αλληλεπιδράσεις να ευθυγραμμίσουν την περιοχή του τεμαχισμού μέσα στην ενεργή περιοχή του ριβοενζύμου. Στην εικόνα 20 φαίνεται η δομή της φουρκέτας του ριβοενζύμου. Στο σχήμα a παρατηρείται μια δευτερεύουσα τομή της φουρκέτας του ριβοενζύμου, που βοηθά την αποτελεσματικότητα των νουκλεοτιδίων (οι κουκίδες δείχνουν τις μη κανονικές βάσεις στην ένωση). Το σχήμα b δείχνει την κρυσταλλική του δομή, όπου τα νουκλεοτίδια πλαισιώνουν το δεσμό της αποκοπής του τεμαχισμού του RNA (χρυσό χρώμα). Η γκρίζα περιοχή στην εικόνα 20 παριστά τα σημεία στα οποία η πρωτεΐνη είναι ενωμένη με το RNA και συμμετέχει ενεργά στην κρυσταλλοποίηση.



Εικόνα 20. Η δομή της φουρκέτας του ριβοενζύμου

Πηγή: Doudna και Cech 2002

Στην εικόνα 21 παρουσιάζεται μια σχηματική αναπαράσταση του σχισίματος μιας κανονικά απρόσιτης περιοχής στόχου από ένα υβριδικό ριβοένζυμο. Το ριβοένζυμο συνδέεται με μια ελικάση του RNA, με την οποία ξετυλίγεται η δομή του mRNA που είναι ο στόχος, στην περιοχή της τομής. Η σύζευξη της ελικάσης με το ριβοένζυμο, επιτρέπει την καταστολή της έκφρασης των γονιδίων.



Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση του σχισίματος μιας κανονικά απρόσιτης περιοχής στόχου από ένα υβριδικό ριβοένζυμο.

Πηγή: [www.el.wikipedia.org](http://www.el.wikipedia.org)

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ**  
**ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟ**  
**ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΡΟΛΟ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNAS ΚΑΙ**  
**ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΦΥΤΩΝ**



### 3.1 ΤΑ microRNA ΕΛΕΓΧΟΥΝ ΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Στην προσπάθεια να ερμηνευτεί ο μηχανισμός της ρύθμισης των γονιδίων στο φυτικό κύτταρο από τους βιολόγους έμεινε ανοικτό το ερώτημα κατά πόσο το μικρό RNA μπορεί να είναι ο κύριος ρυθμιστής αυτού του μηχανισμού. Ένα μικρό RNA αποτελεί ένα ανεξάρτητα συντιθέμενο μόριο που διαχέεται προς το στόχο του, ο οποίος είναι μια ειδική νουκλεοτιδική αλυσίδα. Το μόριο αυτό είναι συμπληρωματικό με το στόχο του και δρα σχηματίζοντας πάνω σ' αυτόν μια δίκλωνη περιοχή (Lewin 2004).

Υπάρχουν δύο γενικοί μηχανισμοί για τη δράση ενός ρυθμιστικού RNA:

1. Ο σχηματισμός της δίκλωνης περιοχής εμποδίζει άμεσα τη λειτουργία του νουκλεϊκού οξέος-στόχου, είτε δημιουργώντας είτε καθιστώντας μια ειδική θέση. Αναφέρεται μια περίπτωση κατά την οποία η δράση μιας πρωτεΐνης που προσδέεται σε ένα μονόκλωνο RNA παρεμποδίζεται όταν η θέση της σύνδεσής της μετέχει στο σχηματισμό της δίκλωνης περιοχής. Στην αντίθετη περίπτωση, ο σχηματισμός της δίκλωνης περιοχής δημιουργεί μια θέση -στόχο για μια ενδονουκλεάση που αποικοδομεί το RNA - στόχο.

2. Η αλληλεπίδραση με την αλληλουχία - στόχο και ο σχηματισμός της δίκλωνης περιοχής σε ένα τμήμα του μορίου - στόχου επιφέρουν αλλαγές στη στερεοδιάταξη μιας άλλης περιοχής. Η επίδραση σ' αυτήν την περίπτωση είναι έμμεση. Το ζευγάρισμα του RNA - στόχου με το ρυθμιστή RNA μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη δημιουργία της δευτεροταγούς δομής του, που κάτω από άλλες συνθήκες, σχηματίζεται ανάμεσα σε δύο περιοχές του.

Το κοινό χαρακτηριστικό και στις δύο περιπτώσεις των παραπάνω τύπων ρύθμισης των γονιδίων με τη βοήθεια των microRNAs, είναι ότι οι αλλαγές στη δευτεροταγή δομή του στόχου καθορίζουν την ενεργότητά του. Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι τα μόρια του RNA δεν ανταποκρίνονται σε άλλα μικρότερα μόρια, τροποποιώντας τη δυνατότητα τους να αναγνωρίσουν την ακολουθία - στόχο. Η δράση τους όμως μπορεί να ελεγχθεί τόσο θετικά, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή του γονιδίου τους, όσο και αρνητικά, μέσω της αποικοδόμησής τους από κάποιο ένζυμο (Lewin 2004).

## 3.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNA ΣΤΑ ΦΥΤΑ

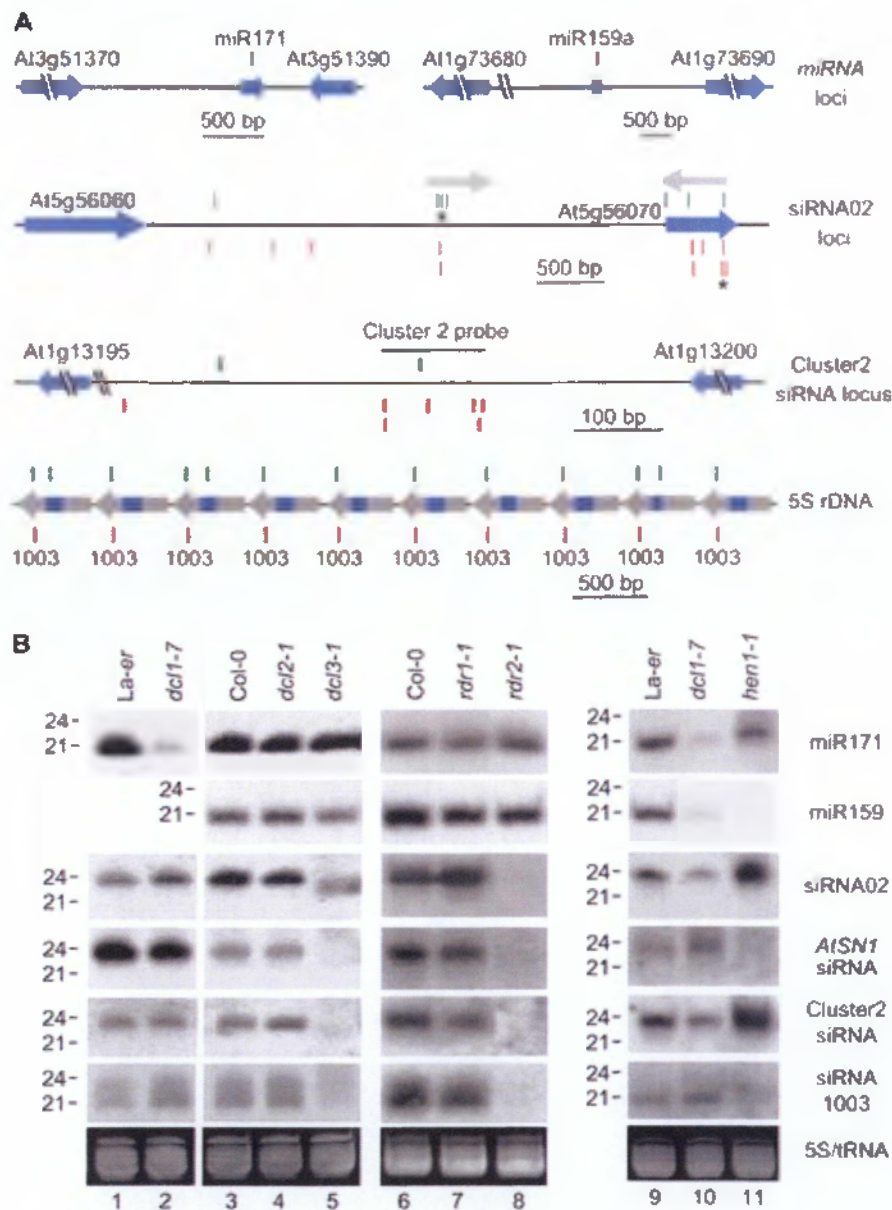
Σύμφωνα με το Κέντρο Έρευνας και Βιοτεχνολογίας των Γονιδίων και του Τμήματος Βοτανικής και Παθολογίας των Φυτών, (Πανεπιστήμιο της Πολιτείας του Όρεγκον, Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής) διαπιστώθηκε ότι η παρουσία των miRNA και siRNA στα κύτταρα των φυτών επιτρέπει σ' αυτά να λειτουργούν συλλογικά ως συγκεκριμένοι οδηγοί στην αποσιώπηση ή στη ρύθμιση των γονιδίων, με αποτέλεσμα να τροποποιούν τη χρωματίνη και τη δομή του γονιδιώματός τους. Ο σχηματισμός ή η δραστηριότητα του μικρού RNA απαιτεί τους παράγοντες που ανήκουν στις οικογένειες γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες *dcl* και *rdr*. Χρησιμοποιώντας μια σειρά μεταλλάξεων στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, προσδιορίστηκαν με μεγάλη επιτυχία οι μοναδικές λειτουργίες των τριών πρωτεϊνών *dcl*, στο miRNA (*dcl1*), στο ενδογενές siRNA (*dcl3*) και στο προερχόμενο από ιό κατά τη βιογένεση στο siRNA (*dcl2*). Η πρωτεΐνη *rdr* (*rdr2*), αναλύθηκε και αυτή με επιτυχία σ' όλα τα ενδογενή siRNA.

Η απώλεια των ενδογενών siRNA, *dcl3* και *rdr2* κατά τη διάρκεια των μεταλλάξεων, συνδέθηκε με την απώλεια των ετεροχρωματικών περιοχών και αύξησε τη συσσώρευση των αντιγράφων σε μερικούς γεωμετρικούς τόπους. Οι ατέλειες στη δραστηριότητα της siRNA – παραγωγής σε σχέση με την παρουσία του ιού (*dcl2* πρωτεΐνη) στις μεταλλάξεις των φυτών, είχαν σαν αποτέλεσμα την αυξανόμενη ευαισθησία των ιών. Εύκολα λοιπόν γίνεται κατανοητό, ότι ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των γονιδίων *dcl* και *rdr* κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των φυτών συνέβαλαν στην ειδίκευση των μικρών κατευθυνόμενων διαβάσεων του RNA στην ανάπτυξη, τη δομή της χρωματίνης και την υπεράσπισή τους από τις 'επιθέσεις' των επιβλαβών οργανισμών, π.χ. των ιών κ.λ.π.

### 3.2.1 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΩΝ miRNA

Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, οι βιολόγοι ανακάλυψαν τουλάχιστον δύο παράγοντες, τις πρωτεΐνες *dcl1* και *hen1* (HUA ENHANCER1), που περιλαμβάνονται στα miRNA κατά το σχηματισμό του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Όπως παρουσιάζεται και στις παρακάτω εικόνες (εικόνα 22A) στα miR-171, miR-159 και στα διάφορα άλλα

microRNAs (Park κ.ά 2002 και Reinhart κ.ά 2002), οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν με την παρουσία των *dcl1* αλληλόμορφων γονιδίων οδηγεί σε απώλεια των περισσότερων από τους πληθυσμούς miRNA (εικόνα 22B). Τα φυτά που φέρουν τα αλληλόμορφα γονίδια *hen1* όταν υποστούν μεταλλάξεις, είτε χάνουν τα περισσότερα από τα miRNAs είτε παρουσιάζουν μια σχετική αύξηση του μεγέθους των miRNAs, αφού αυτά αυξάνονται κατά ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια (Park κ.ά 2002 και Boutet κ.ά 2003), (εικόνα 22B). Με τον τρόπο αυτόν φαίνεται ότι η λειτουργία των miRNA που είναι η καταστολή του στόχου- mRNA ότι είναι περιορισμένη (Boutet κ. ά. 2003).



**Εικόνα 22.** Στο Α παρουσιάζονται τα miR-171, miR-159 και διάφορα άλλα microRNAs (Park κ.ά 2002, Reinhart κ.ά 2002). Στο Β φαίνεται ότι οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν με την παρουσία των *dcl1* αλληλόμορφων γονιδίων και άλλων που οδηγεί σε απώλεια των περισσότερων από τους πληθυσμούς miRNA.

Πηγή: [www.majournal.org](http://www.majournal.org)

### 3.2.2 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΩΝ siRNA

Η αφθονία κάθε πληθυσμού siRNA βρέθηκε να μειώνεται σημαντικά όταν μεταλλάσσονταν το γονίδιο *dcl3-1*, όχι όμως και όταν μεταλλάσσονταν τα γονίδια *dcl1-7* ή *dcl2-1* (εικόνα 22B). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα *miR-171*, *miR-159* (εικόνα 22B) και τα διάφορα άλλα *microRNAs*, τα οποία βρέθηκαν να εξαρτώνται από το γονίδιο *dcl1*. Η μετάλλαξη των γονιδίων *rdr2-1* βρέθηκε να μειώνει τον πληθυσμό των siRNA, σε αντίθεση με αυτό που συμβαίνει με τη μετάλλαξη του *rdr1-1* (εικόνα 22B). Σε προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν, κάθε πληθυσμός siRNA δεν βρέθηκε να επηρεάζεται από τη μεταλλαγή του *rdr6-1*, αν και αυτά τα στοιχεία πρέπει να ερμηνευθούν πολύ προσεκτικά, λόγω του μικρού αριθμού των σχετικών πειραμάτων. Η ενδογενής επίδραση του siRNA όσον αφορά την παραγωγή των *rdr2* αλληλόμορφων γονιδίων αποκαλύφθηκε με αντιπαραβολή με τα *miRNA*, τα οποία έδειξαν πλήρη ‘αναισθησία’ σε κάθε μια από τις μεταλλαγές του *rdr* γονιδίου (εικόνα 22B). Αυτά τα στοιχεία προσδιορίζουν τα γενετικά *dcl3* και *rdr2* ως συστατικά ενός ενδογενούς siRNA που παράγει το σύστημα που διαφέρει λειτουργικά από αυτά που παράγονται από τα *miRNA*.

Η πρωτεΐνη *hen1* εμπλέκεται στη μετα-μεταγραφική λειτουργία της αποσιώπησης των ‘επιβλαβών’ γονιδίων, με αποτέλεσμα τη μη διαμόρφωσή τους (Boutet κ. ά 2003). Η επίδραση της πρωτεΐνης *hen1* στον ενδογενή σχηματισμό του siRNA, χρησιμοποιώντας τη μετάλλαξη, προκάλεσε ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη γνώση των επιστημόνων για τις γενετικές απαιτήσεις του ενδογενούς σχηματισμού του siRNA. Δύο από τους πληθυσμούς του siRNA, το *siRNA1003* και το *AtSN1-siRNA*, έδειξαν σημαντική μείωση κατά την ανίχνευση της πρωτεΐνης *hen1-1* στα φυτά (εικόνα 22B). Το *siRNA02* και το *cluster2* siRNA, αφ’ ενός, υπήρχαν στα πιο υψηλά επίπεδα στα φυτά, με την παρουσία της πρωτεΐνης *hen1-1*, σε σχέση με κάποιους άλλους άγριους τύπους φυτών.

### 3.2.3 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΩΝ siRNAs ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΙΟΥΣ

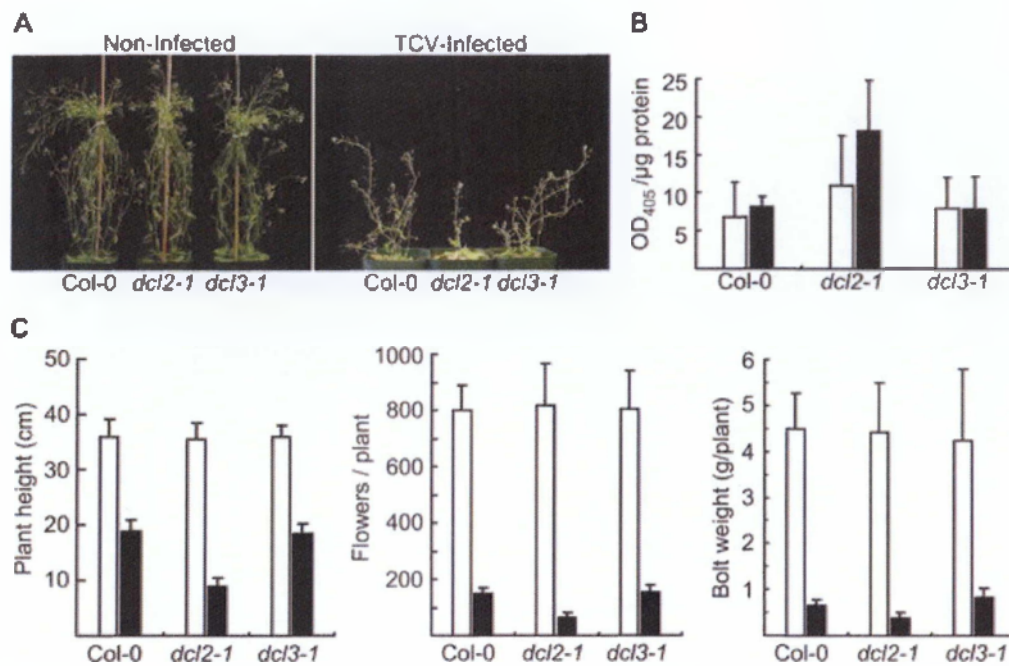
Η συμμετοχή των πρωτεϊνών *dcl1*, *dcl2* και *dcl3* στο σχηματισμό των siRNA είναι καθοριστική και η σπουδαιότητά της εξετάστηκε στο εργαστήριο με τη βοήθεια της



μόλυνσης από τρεις ανόμοιους ιούς RNA, χρησιμοποιώντας τη σειρά μεταλλάξεων dcl. Ο ιός του μωσαϊκού στο φυτό της ελαιοκάμβης (tuMV-GFP) και ο ιός (tCV) μολύνουν και το φυτό *Arabidopsis thaliana* συστηματικά και προκαλώντας μέτρια συμπτώματα. Ο ιός της μωσαϊκής των αγγουριών Y (cMV-Y), μολύνει αρκετά τα φυτά αυτά, αλλά προκαλεί μόνο ήπια συμπτώματα. Τα φυτά που έχουν υποστεί μετάλλαξη και ο άγριος τύπος, σύμφωνα με το πείραμα εμβολιάστηκαν στα φύλλα με τη μορφή ροζετών στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, και ο ανώτερος ιστός (στα φύλλα και στις επανθίσεις) αναλύθηκε για την παρουσία των συγκεκριμένων siRNAs.

Στην εικόνα 23 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανίχνευση στους ιστούς του φυτού *Arabidopsis thaliana* των siRNAs που προέρχονται από τη μόλυνσή τους με ιό. Σύμφωνα με το πείραμα, τα επίπεδα των siRNA στα μολυσμένα φυτά φαίνονται αρκετά υψηλά. Οι ιοί tuMV-GFP και cMV-Y έχουν μολύνει τις πρωτεΐνες dcl1-7, dcl2-1 και dcl3-1 στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και έχουν συσσωρεύσει τα επίπεδα των siRNA που ήταν σχεδόν παρόμοια με εκείνα στα μολυσμένα φυτά στον άγριο-τύπο. Οι φαινότυποι αυτών των ιών και τα συμπτώματα και στις τρεις μεταλλάξεις ήταν όμοια με τους αντίστοιχους γονείς του. Ομοίως και στον ιό tCV, οι πρωτεΐνες dcl1-7 και dcl3-1 εμφάνισαν τα ίδια αποτελέσματα.

Στην εικόνα 23A φαίνεται ο μάρτυρας (αριστερά στην εικόνα) που δεν έχει υποστεί καμία μετάλλαξη με ανεπηρέαστες τις πρωτεΐνες στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Δεξιά, παρουσιάζεται ο άγριος-τύπος του, με σημαντικές επιδράσεις στις πρωτεΐνες. Στο σχήμα 23B εμφανίζεται το αποτέλεσμα επηρεασμού της ποσοτικής αύξησης των πρωτεϊνών και του άγριου-τύπου (col-0) που έχουν μολυνθεί από τους παραπάνω ιούς. Στα σχήματα 26C, παρουσιάζονται το ύψος του άγριου-τύπου (cm) με τις πρωτεΐνες dcl2-1 και dcl3-1 σε σχέση με την επίδρασή τους από τους ιούς tuMV-GFP, cMV-Y και tCV (το πρώτο σχήμα από αριστερά), η ποσότητα των λουλουδιών τους (το δεύτερο) και το βάρος τους (gr), (το τρίτο).



**Εικόνα 23.** Παρουσίαση των αποτελεσμάτων του πειράματος στο φυτό *Arabidopsis thaliana* σχετικά με το σχηματισμό των siRNAs που παράγονται από ιούς.

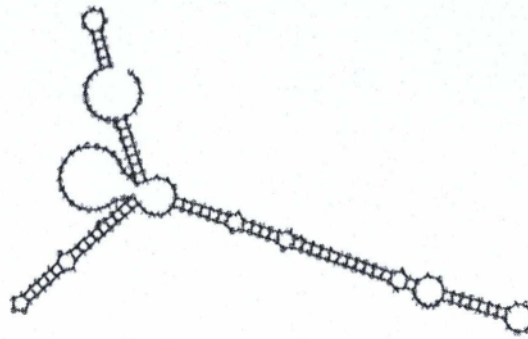
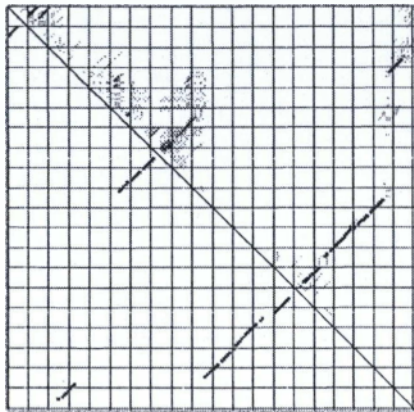
Πηγή: <http://biology.plosjournals.org>

### 3.3 Η ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ miRNAs ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ cDNA.

Η εύρεση των τελικών προϊόντων της μη κωδικοποίησης των γονιδίων, δηλαδή των miRNA, που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του αγγελιοφόρου RNA που μεταφέρει τις γενετικές πληροφορίες στα ριβοσωμάτια για τη σύνθεση των πρωτεϊνών στο φυτικό κύτταρο, αποτελούν ένα καταπληκτικό επιπλέον στρώμα του κανονισμού της έκφρασης των γονιδίων. Τα περισσότερα από τα γονίδια miRNA που ανακαλύφθηκαν έως τώρα, περιλαμβάνονται στον κανονισμό των αναπτυξιακών διαδικασιών του κυττάρου και πολλά από αυτά στοχεύουν στους παράγοντες της μεταγραφής του. Η ανίχνευση των miRNA με τη μέθοδο της συγκριτικής φυλογενετικής ανάλυσης στα γονιδιώματα των φυτών με τη βοήθεια των βιβλιοθηκών cDNA, έχει χρησιμοποιηθεί πολύ στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, στη λεύκα, στο ρύζι και σε αρκετά άλλα.

Ένα ευδιάκριτο χαρακτηριστικό ενός γονιδίου miRNA των παραπάνω φυτών που έχουν αναφερθεί, είναι ότι το αντίγραφο του είναι σε θέση να διπλώσει σε μια δομή μίσχου-βρόγχων όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 27 και καλύτερα στη διπλανή μεγέθυνση αυτής της δομής του. Γι' αυτήν την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα

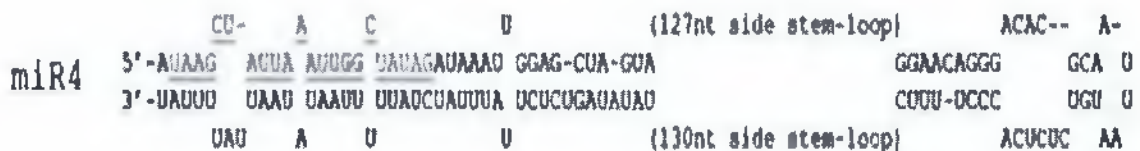
ολόκληρων χρωμοσωμάτων στο επίπεδο RNA και ο υπολογισμός των αντίστοιχων πιθανών ενώσεων των βάσεων (που παρουσιάζονται στο διάγραμμα 24). Η διαγώνιος που εμφανίζεται με αυτή την κλίση, δείχνει τη γωνία που προκύπτει από τη δομή μίσχου-βρόγχων, όπου διπλώνει το αντίγραφο του γονιδίου miRNA.



**Διάγραμμα 24.** Η διαγώνιος εμφανίζεται με αυτή την κλίση και δείχνει τη γωνία που προκύπτει από τη δομή μίσχου-βρόγχων, όπου διπλώνει το αντίγραφο του γονιδίου miRNA. Δίπλα είναι μεγέθυνση αυτής της δομής του.

Πηγή: [www.majournal.org](http://www.majournal.org)

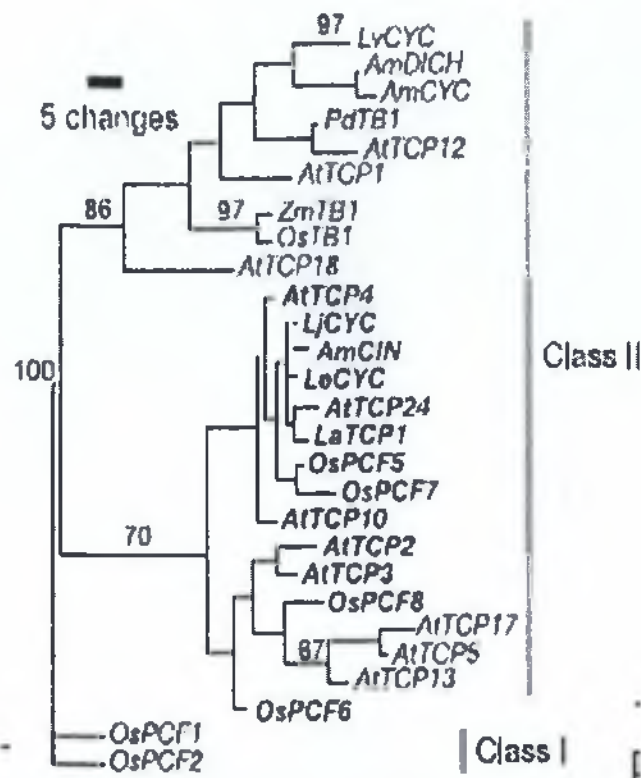
Στην πιο κάτω Εικόνα παρουσιάζεται μια ακολουθία αποτελούμενη από τριπλέτες νουκλεοτιδίων του miRNA, όπου διακρίνεται το πραγματικό από το πρόδρομο miRNA (το πραγματικό τονίζεται με κόκκινο χρώμα). Το πραγματικό miRNA αποκόπτεται από αυτό του προδρόμου, με την ενέργεια ενός βασικού ενζύμου που ονομάζεται *dicer*.



**Εικόνα 25.** Ακολουθία αποτελούμενη από τριπλέτες νουκλεοτιδίων του miRNA, όπου διακρίνεται η αποκοπή του πραγματικού από αυτό του προδρόμου miRNA (το πραγματικό τονίζεται με κόκκινο χρώμα) με το ένζυμο *dicer*.

Πηγή: [www-ab.informatik.uni-tuebingen.de](http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de)

Τέλος, διακρίνονται στο σχήμα 26 τα περαιτέρω χαρακτηριστικά των miRNA, δηλαδή οι στόχοι των miRNA που είναι οι στενοί φυλογενετικοί συγγενείς. Τα γονίδια με κόκκινο χρώμα που παρουσιάζονται εδώ απευθύνονται στην οικογένεια των miRNA.



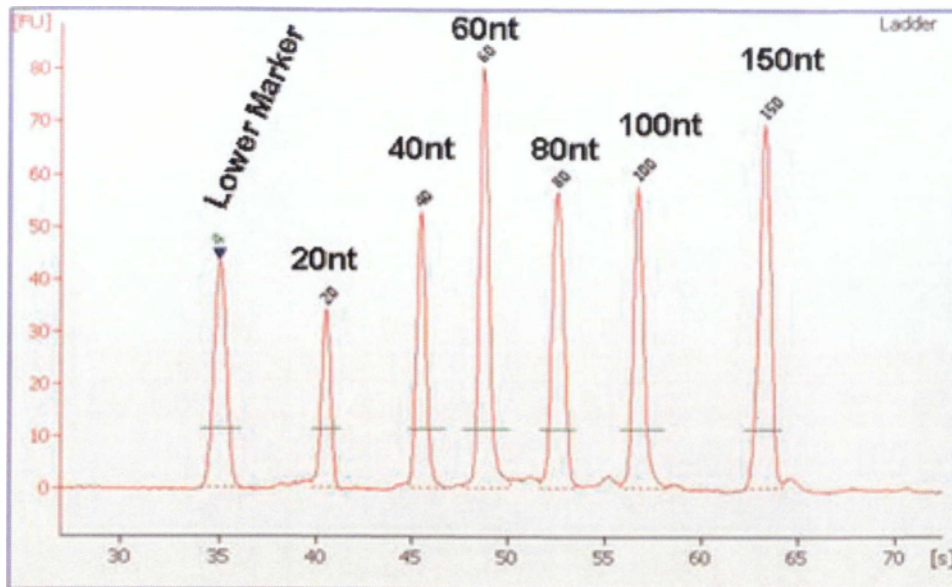
Σχήμα 26. Χαρακτηριστικά των miRNA, οι στόχοι του (με κανονική γραφή) και η οικογένειά των γονιδίων του (με κόκκινο χρώμα).

Πηγή: [www-ab.informatik.uni-tuebingen.de](http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de)

### 3.4 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ microRNA ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Τα μικρά μόρια RNA παίζουν καθοριστικό ρυθμιστικό ρόλο στις κυτταρικές διαδικασίες στα φυτά, όπως είναι η διάδοση των γενετικών πληροφοριών, καθώς και η διαφοροποίηση των κυττάρων. Ωστόσο, η έλλειψη των κατάλληλων μεθόδων έχει εμποδίσει την ακριβή τους ανάλυση. Στην εικόνα 27 παρουσιάζεται μια μικρή 'κλίμακα' από microRNA, που αποτελούν ένα μείγμα συνθετικών μη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, με ένα δείγμα από ελάχιστα μικρά RNA. Φαίνεται η ακριβής απόσταση της καθεμίας ακολουθίας των νουκλεοτιδίων από την κορυφή της σκάλας, αποδεικνύοντας την κλίμακα του μεγέθους των μικρών RNAs.





**Εικόνα 27.** Υψηλής ευκρίνειας ανάλυση που αποδεικνύεται από το διαχωρισμό των μικρών RNA.  
 Πηγή: [www.el.wikipedia.org](http://www.el.wikipedia.org)

### 3.5 Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥΝ ΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΤΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΗ ΠΡΟΟΔΟ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Αναμφισβήτητα, η σημαντικότερη πρόοδος στη βιολογία εδώ και δεκαετίες ήταν η ανακάλυψη ότι τα microRNA μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων στο φυτικό κύτταρο. Για χρόνια, το RNA θεωρήθηκε ότι έχει ακριβώς δύο ευρείες λειτουργίες στα κύτταρα (κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>, ενότητα 1.1). Οι ερευνητές Mello και Fire, διαφοροποίησαν αυτήν την εικόνα με την εύρεση του μηχανισμού της παρέμβασης του RNA (RNAi), (κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>, ενότητα 1.4), με αποτέλεσμα να αποτελεί αυτή ένα πολύτιμο εργαλείο στα χέρια των επιστημόνων, αφού μπορούν πλέον να εξηγήσουν τη διαδικασία της πρωτεϊνικής σύνθεσης.

Η συμμετοχή του Double-stranded RNA (dsRNA) στον παραπάνω μηχανισμό είναι απαραίτητη, αφού όχι μόνο μπορεί να επιτρέψει την καταστροφή των γονιδίων που μεταφέρουν λανθασμένες πληροφορίες κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσα στο φυτικό κύτταρο, αλλά έχει τη δυνατότητα να δημιουργήσει διάφορα εμπόδια στο μηχανισμό της μεταγραφής (δηλαδή της σύνθεσης των mRNAs από το DNA) και να εμποδίσει αποτελεσματικά τη μετάφραση (δηλαδή τη σύνθεση των πρωτεϊνών από τα mRNAs). Και αυτό, δεν είναι σίγουρα το τέλος αυτής της ιστορίας (Novina και Sharp 2004)

Προς το τέλος της δεκαετίας του '80 και κατά τις αρχές της δεκαετίας του '90, αρκετοί βιολόγοι φυτικών οργανισμών, παρατήρησαν τη λειτουργία και την ανάπτυξη της πετούνιας. Το φυτό αυτό, χρησιμοποιήθηκε σε μια σειρά από έρευνες που έδειξαν τον τρόπο με τον οποίο αλλάζει το χρώμα των λουλουδιών του με την εισαγωγή μιας ομάδας πολυάριθμων αντιγράφων dsRNAs, τα οποία εμποδίζουν την κωδικοποίηση του γονιδίου της χρωστικής του λουλουδιού. Στην εικόνα 28 παρουσιάζεται το λουλούδι της πετούνιας, στο οποίο, τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τις χρωστικές του ουσίες έχουν κατασταλεί με το RNAi. Το αριστερό φυτό είναι ο θετικός μάρτυρας ενώ προς τα δεξιά, όπως φαίνεται, κοιτάζοντας την εικόνα, τα λουλούδια περιέχουν μεταφερόμενα γονίδια που καταστέλλουν τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για το χρώμα του.



**Εικόνα 28.** Η καταστολή του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για τις χρωστικές ουσίες του λουλουδιού της πετούνιας με τη χρήση του RNAi.

Πηγή: [www.el.wikipedia.org](http://www.el.wikipedia.org)

### 3.6 Η ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ ΣΤΟ microRNA ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΠΟΛΛΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Οι περισσότερες από τις ασθένειες που έχουν ανακαλυφθεί προκαλούν σε μεγάλο βαθμό αρκετά προβλήματα τόσο στους φυτικούς, όσο και στους ζωικούς οργανισμούς. Παίρνοντας στοιχεία από την έρευνα Δανών επιστημόνων στον τρόπο με τον οποίο δημιουργούνται νέες τεχνικές στη θεραπεία διάφορων νόσων, όπως είναι ο καρκίνος και η ηπατίτιδα, με δημοσίευσή τους στο Nature, αποτελεί ένα σημαντικό βήμα προς την ανάπτυξη μιας νέας γενιάς φαρμάκων, τα οποία θα έχουν τη δυνατότητα να θεραπεύσουν πληθώρα ασθενειών .

Αυτοί οι επιστήμονες πέτυχαν την «αποσιώπηση» του γενετικού υλικού των κυττάρων του RNA, που κατέχει ένα ρόλο - κλειδί στην αντιμετώπιση διαφορετικών νόσων. Πειράματα που έγιναν σε ζωικούς οργανισμούς, έδειξαν ότι η αποσιώπηση τμημάτων microRNA σε ηπατικά κύτταρα που ρυθμίζουν τη χοληστερόλη, οδήγησε σε διακριτή μείωση των επιπέδων της σ' αυτούς τους οργανισμούς .

Η ερευνητική ομάδα από τη φαρμακευτική εταιρεία Santaris Pharma που έχει έδρα την Κοπεγχάγη, εκτιμά ότι η μελέτη αυτή δίνει αρκετές ελπίδες για τη θεραπεία νόσων του ήπατος. Άμεσος στόχος της είναι η ηπατίτιδα C για την οποία δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία .

Η θεραπεία που ανέπτυξαν οι Δανοί επιστήμονες, βασίζεται στην ιδέα της αποσιώπησης ορισμένων τύπων του RNA, το οποίο όπως έχουν αντιληφθεί πλέον οι επιστήμονες, αποτελεί τον κύριο εκφραστή της ρύθμισης των διεργασιών που συντελούνται εντός του κυττάρου (φυτικού και ζωικού). Διαφορετικοί τύποι RNA έχουν ήδη συνδεθεί με αρκετούς νόσους . Υπάρχουν, για παράδειγμα, στοιχεία που μαρτυρούν ότι ένας τύπος RNA παρουσιάζεται σε άκρως υψηλά επίπεδα στην περίπτωση των λεμφωμάτων, γεγονός που δεν αποτελεί σύμπτωμα της νόσου, αλλά γενεσιουργό αιτία της. Με το αποτέλεσμα αυτό, πιστεύεται ότι υπάρχει μια σπουδαία προσφορά στη θεραπεία της συγκεκριμένη ασθένεια, αν όχι στην πλήρη ίασή της.

Το πείραμα που παρουσιάζεται στο Nature, δείχνει για πρώτη φορά ότι η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία σε πρωτεύοντα είδη. Η εφαρμογή που έγινε σε πράσινους πιθήκους που έλαβαν δι' εγχύσεως φάρμακο που στόχευε στην αντιμετώπιση ενός συγκεκριμένου τμήματος RNA, του microRNA-122, το οποίο είναι γνωστό ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή χοληστερόλης. Μετά τη λήψη τριών δόσεων του φαρμάκου τα ζώα εμφάνισαν μείωση των επιπέδων χοληστερόλης της τάξεως του 30%. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι μακροπρόθεσμες παρενέργειες παραμένουν άγνωστες. Αν και οι ερευνητές ελπίζουν ότι θα χρησιμοποιήσουν τα ευρήματά τους για την ανάπτυξη μιας θεραπείας για την ηπατίτιδα C, δεν γνωρίζουν ποιες θα ήταν οι συνέπειες από τη συνεπακόλουθη ταυτόχρονη μείωση τόσο της «καλής» όσο και της «κακής» χοληστερόλης στον οργανισμό.

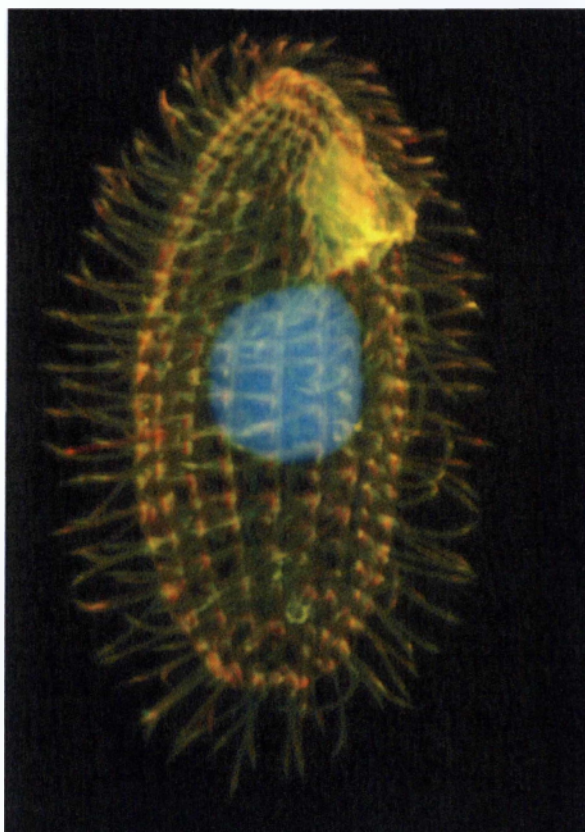
Σε κάθε περίπτωση μια τέτοια παρενέργεια είναι αναμενόμενη. Είναι πιθανό όμως να εμφανιστούν και πολλές άλλες που δεν είναι φανερές, σύμφωνα με τα λόγια του δρ. Κούλαχ, επικεφαλής της εταιρίας Santaris Pharma .

### 3.7 Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΕΙΝΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Το πως ξεκίνησε η ζωή στη γη είναι ένα από τα μεγαλύτερα επιστημονικά μυστήρια. Οι μοριακοί βιολόγοι πιστεύουν ότι τα μόρια του RNA είναι κλειδιά στη διαδικασία της



πρωτεϊνοσύνθεσης, επειδή το RNA έχει απαραίτητο ρόλο στη σύνθεση των πρωτεϊνών με όλα τα κύτταρα των οργανισμών. Το πρώτο παράδειγμα από ένα μόριο RNA που εμφανίζει μια καταλυτική δραστηριότητα σχετικά με την ακρίβεια των βιοχημικών αντιδράσεων πάνω σε ένα είδος οργανισμού, π.χ. ενός ζωικού, είναι το βλεφαριδωτό πρωτόζωο *Tetrahymena thermophila* (εικόνα 29). Αν και υπάρχει μόνο ένα παράδειγμα, η λέξη ριβοένζυμο πλάσθηκε για μια γενική έννοια από ένα μόριο RNA με ένα ένζυμο (Doudna και Cech 2002).



**Εικόνα 29.** Το βλεφαριδωτό πρωτόζωο *Tetrahymena thermophila*

Πηγή: Doudna και Cech 2002

Τον επόμενο χρόνο η καταλυτική δραστηριότητα ανακαλύφθηκε στα συστατικά του RNA με τη βοήθεια μιας ριβονουκλεάσης (RNase), δίνοντας το πρώτο παράδειγμα από ένα πολλαπλό κύκλο εργασιών του ενζύμου, χρησιμοποιώντας την κατάλυση του βασικού RNA.

Αυτά τα ευρήματα αύξησαν σημαντικά τις απόψεις σχετικά με το ρόλο των μορίων RNA, όπου το RNA εξυπηρετεί τη λειτουργία του γενετικού υλικού και του κύριου ενζύμου που πιθανόν βοήθησε την ανάπτυξη των μεταλλικών ιόντων, αμινοξέων και άλλων μοριακών παραγόντων. Ο μεταβολισμός των διάφορων οργανισμών έγινε πιο



εκλεπτυσμένος, αυξάνοντας τις απαιτήσεις των βιοκαταλυτών, δίνοντας ώθηση για στη μεταβίβαση ενζύμων και πρωτεϊνών (Doudna και Cech 2002).

Τα γνωστά, προερχόμενα από ιό, ριβοένζυμα, που θεωρούνται ως μια μοριακή διορθωτική μηχανή που μετατρέπει το RNA σε πρωτεΐνες, καταλύονται μόνο στη μεταφορά του φωσφοδιεστέρα και κυριαρχούν σε τεχνικές επιλογές *in vitro* που μπορούν να χρησιμεύσουν στο μεταβολισμό. Σε μια τυχαία ακολουθία RNA, τα μόρια που επεξεργάζονται σε μια επιθυμητή δραστηριότητα, απομονώνονται σε επιτυχημένους κύκλους, αντιστρέφουν τη μεταγραφή μέσα στο DNA και ενισχύουν την αντίδραση της αλυσίδας της πολυμεράσης. Αυτή η μεθοδολογία έχει επιτρέψει την αναγνώριση των ριβοενζύμων που σχηματίζουν ένα νουκλεοτίδιο από μια βάση και επιπλέον ένα σάκχαρο, συνθέτοντας τους δεσμούς των αμιδίων και σχηματίζοντας συμπλέγματα μονοφωσφορικής ουριδίνης που δίνουν μονοφωσφορική θυμιδίνη. Επιπλέον τα ριβοένζυμα σχηματίζουν το ακετυλο-ένζυμο A, το οποίο βρίσκεται σε πολλά ένζυμα και πρωτεΐνες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα ριβοένζυμα είναι ανάλογα των μη δημιουργημένων συνδέσεων στη μετάφραση από τον κόσμο του RNA στη σύγχρονη βιολογία. Οι δομές και οι χημικοί μηχανισμοί σε επιλεγμένα ριβοένζυμα που παρατηρήθηκαν *in vitro* είναι πιθανόν άγνωστοι έως σήμερα (Doudna και Cech 2002).

### 3.8 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA ΣΤΑ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΕΙΝΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ ΣΤΗΝ ΟΛΟΚΛΗΡΩΤΙΚΗ ΤΟΥΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Τα νέα όργανα και οι ιστοί παράγονται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής των φυτών από τις μικρές δομές που αποκαλούνται μεριστώματα (meristems). Αυτές οι μικρές δομές βρίσκονται στα ακραία σημεία των φυτών, π.χ. στην άκρη των κλάδων (στους οφθαλμούς για παράδειγμα) και γενικά στο εναέριο ή στο υπόγειο μέρος τους, δηλαδή στην κύρια ρίζα και στις δευτερεύουσες. Ο επάκριος βλαστός των φυτών εμφανίζεται σταθερός στην πολυκυτταρική κλίμακα ενώ τα κύτταρα διαμόρφωσής τους είναι ιδιαίτερα δυναμικά. Αυτό υπονοεί την ύπαρξη των πολύ αποδοτικών ρυθμιστικών διαδικασιών που επιτρέπουν μια τέτοια σύνθετη ολοκλήρωση της κυψελοειδούς συμπεριφοράς τους. Διαφορετικές προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί από τους επιστήμονες για την περιγραφή και την τροποποίηση της κυψελοειδούς οργάνωσης του μεριστώματος.

Η δράση που έχουν τα miRNAs στην έκφραση των γονιδίων κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων στα μεριστώματα των φυτών είναι αξιοσημείωτη. Για παράδειγμα στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η περιοχή ορίου που χωρίζει τα διάφορα όργανά

του καθορίζεται από την περιττή δράση των γονιδίων CUC 1, 2 και 3. Επίσης τα γονίδια αυτά προωθούν το σχηματισμό μεριστωμάτων κατά τη διάρκεια της κανονικής του ανάπτυξης. Όπως είναι γνωστό, ο ρόλος των miR164 στη ρύθμιση των γονιδίων CUC1 και CUC2 σχετίζεται με τον έλεγχο των διαφόρων πτυχών της αρχιτεκτονικής των φυτών. Η υποβάθμιση των γονιδίων CUC1 και CUC2 που μεσολαβεί, περιορίζει τη διεύρυνση του ορίου γύρω από τα διάφορα όργανα (Laufs κ.ά 2004). Οι γραμμές που εκφράζουν μια ανθεκτική έκδοση των miR164 του γονιδίου CUC2, παρουσιάζουν μια δραματική τροποποίηση της φυλλοταξίας. Η φυλλοταξία που μετριέται άμεσα στο μερίστωμα αυτών των γραμμών είναι κανονική και συσχετίζεται με τις αλλαγές, που προέρχονται από τροποποιήσεις του πολλαπλασιασμού των κυττάρων κατά τη διάρκεια της αύξησης και τη διαφοροποίηση του μίσχου. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η φυλλοταξία πρέπει όχι μόνο να είναι κατάλληλα οργανωμένη στο μερίστωμα αλλά πρέπει να διατηρηθεί περαιτέρω κατά τη διάρκεια της αύξησης και της διαφοροποίησης των μίσχων (Peaucelle κ.ά 2007).

Τέλος, κατά τη διάρκεια των προχωρημένων σταδίων της ανάπτυξης των φύλλων στη ρύθμιση των miR164/CUC, η έκφρασή τους οδηγεί στο σχηματισμό των φύλλων με ολόκληρα τα περιθώρια ενώ αντίθετα, η αδρανοποίηση των miR164 οδηγεί σε σχηματισμό των φύλλων που παρουσιάζουν υπερβάλλοντες λοβούς. Ένας παρόμοιος φαινότυπος ενισχυμένων λοβών παρατηρείται στα φυτά, εκφράζοντας ένα miR164/ CUC2 ανθεκτικό γονίδιο. Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ένα πρότυπο στο οποίο το τελικό επίπεδο της δραστηριότητας των CUC2 και όχι των CUC1, που ισορροπείται από την παρουσία των miR164, θα καθορίσει το επίπεδο καταστολής της αύξησης στα φύλλα (Nikonics κ.ά 2006).

### 3.9 ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNA ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Οι μεγάλες διαφορές στην εμφάνιση και στην υγεία των οργανισμών μπορούν να προκύψουν από τις μικρές αλλαγές που συμβαίνουν μικροσκοπικά, σε μη συμβατικά γονίδια στα κύτταρά τους. Το φυτό *Arabidopsis thaliana* φανερώνει χαρακτηριστικά, όπως φαίνεται στην εικόνα 30, τη δράση που έχουν τα microRNA στη φυλλική επιφάνεια αυτού του φυτού.



**Εικόνα 30.** Φυτά του *Arabidopsis thaliana* που έχουν παραμορφώσει τα φύλλα τους με τη δράση των μικρών RNA (δεξιά όπως φαίνεται στην εικόνα), ενώ αριστερά είναι ο μάρτυρας. Το microRNA εμφανίζεται να ελέγχει τα επίπεδα δραστηριότητας των πολυάριθμων γονιδίων στο φυτό.

Πηγή: [www.mindfully.org](http://www.mindfully.org)

Όπως είναι γνωστό, τα λουλούδια αποτελούνται από διάφορα μέρη, π.χ. τα σέπαλα που προστατεύουν το νέο οφθαλμό, τα πέταλα που έχουν την ιδιότητα να προσελκύουν κάθε λογής έντομα με τα ζωηρά τους χρώματα, τους στήμονες με τη γύρη που έχουν και την ωοθήκη, όπου με τη διόγκωσή της δημιουργείται ο καρπός με τα σπέρματα κ.λ.π. Αυτή είναι η βασική αρχιτεκτονική στα φυτά, που προτρέπει τους επιστήμονες να ανακαλύψουν τις ιδιότητες που έχουν τα φυτά να μεγαλώνουν και να πολλαπλασιάζονται, στο πλαίσιο ενός γενετικού «γενικού σχεδίου».

Οι ερευνητές στην προσπάθειά τους να εξερευνήσουν την τροποποίηση που είχε το φυτό ενός άγριου είδους (εικόνα 31, κάτω από τις δύο αρχικές και δεξιά), διαπίστωσαν ότι αυτό έγινε με τη βοήθεια μιας μετάλλαξης, στην οποία οι στήμονες αναπτύχθηκαν καλύτερα από τα πέταλα. Με τον ίδιο τρόπο παρουσιάζεται και στην πετούνια (κάτω από τις δύο αρχικές και αριστερά). Και στις δύο περιπτώσεις εμφανίζεται αυτή η ατέλεια της ανάπτυξης των φυτών που φαίνεται να ‘ενοχλεί’ το γενετικό έλεγχο, με συνέπεια να εκφράζονται τα λανθασμένα όργανα (δηλαδή τα σέπαλα) στη λανθασμένη θέση αντί των πετάλων.

Πράγματι, τα πειράματα που εκτελέστηκαν από τους ερευνητές έδειξαν ότι και στα δύο είδη φυτών, η μεταλλαγή στο ίδιο γονίδιο προσέδωσε αλλαγμένη ταυτότητα στα όργανά τους. Το microRNA έχει την ικανότητα να αναγνωρίσει και να δεσμεύσει τις παρούσες συμπληρωματικές ακολουθίες του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) και να αποτρέψει με αυτόν τον τρόπο τη μετάφραση του mRNA σε μια πρωτεΐνη. Από αυτήν την αλληλεπίδραση του microRNA γίνεται ο επηρεασμός ολόκληρων των αλυσίδων των γεγονότων ελέγχου στα κύτταρα των φυτών.





**Εικόνα 31.** Η μεταλλαγή των οργάνων των φυτών της πετούνιας (κάτω αριστερά της εικόνας) και ενός άγριου είδους φυτού (κάτω δεξιά). Επάνω είναι οι μάρτυρες των φυτών. Η μεταλλαγή και των δύο φυτών παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους.

Πηγή: [www.biology-blog.com](http://www.biology-blog.com)

Οι ρυθμιστικές λειτουργίες των μικρών RNA και ιδιαίτερα των miRNA κατά την περίοδο της έναρξης της άνθισης των φυτών αποτελεί ένα σπουδαίο εύρημα από τους επιστήμονες, και εξηγούνται πολύ καλύτερα από την επιστήμη της επιγενετικής (κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>, ενότητα 2.5). Στην αποσιώπηση των επιβλαβών γονιδίων που μεταφέρουν λανθασμένες πληροφορίες στα κύτταρα, όσον αφορά την άνθιση των φυτών, η παρουσία του miRNA είναι καταλυτική, εμποδίζοντας να συμβεί αυτό, με αποτέλεσμα την ομαλή εξέλιξη της παραγωγής λουλουδιών από τα φυτά.

Στις παρακάτω εικόνες 32 και 33 παρατηρείται η αρχή της άνθισης του *Arabidopsis thaliana* με την παρουσία των miRNA.





**Εικόνα 32.** Το ξεκίνημα της άνθισης του *Arabidopsis thaliana* με την παρουσία των miRNA.



**Εικόνα 33.** Αναφέρεται το ίδιο

Πηγή: [www.bio-pro.de](http://www.bio-pro.de)

Οι βιολόγοι, στην προσπάθειά τους να εκφράσουν τον ιό του μωσαϊκού στο φυτό της αγγουριάς, παρατήρησαν τις ατέλειες στην ανάπτυξη του αγγουριού και συγκεκριμένα στα φύλλα του. Τα φύλλα του είναι τα κατσαρωμένα και στραμμένα προς την ανάποδη φορά, όπως εμφανίζεται στην εικόνα 34. Η παρατήρηση αυτή, έδωσε τη δυνατότητα στα miRNA να επέμβουν έγκαιρα και να διορθώσουν την κατάσταση αυτή.



**Εικόνα 34.** Ατέλειες στη ανάπτυξη των φύλλων του φυτού της αγγουριάς  
Πηγή: [www.newswire.rockefeller.edu](http://www.newswire.rockefeller.edu)

Η απομάκρυνση των ανεπιθύμητων γνωρισμάτων από το ρύζι με τη δράση των microRNAs, που αδρανοποιούν τα γονίδια που παρέχουν τις ανεπιθύμητες ιδιότητες, επιτρέπει τη βελτίωση των ποικιλιών και την αναπτυξιακή του αναπαραγωγή. Τα φυτά του ρυζιού αυξάνονται σχεδόν σε όλον τον κόσμο με γρήγορους ρυθμούς (σε 89 χώρες σε όλον τον κόσμο, έξι από τις επτά ηπείρους υπάρχουν τομείς ρυζιού), αφού θεωρείται

μια από τις βασικές τροφές. Οι επιστήμονες από το Ινστιτούτο Max Planck, ειδικευμένοι στην αναπτυξιακή βιολογία και οι συνάδελφοί τους από το διεθνές ερευνητικό κέντρο ρυζιού στις Φιλιππίνες πέτυχαν την επιτάχυνση της αναπαραγωγής εγκαταστάσεων ρυζιού με τη χρησιμοποίηση των τεχνητών μικρών μορίων RNA. (PLoS One 2008).

Η χρησιμοποίηση των αδρανοποιημένων γονιδίων για την αναπαραγωγή ρυζιού μπορεί να είναι μια εξεζητημένη μέθοδος, αλλά δεν είναι ασυνήθιστη. Παραδείγματος χάριν, η κύρια αλλαγή που επέτρεψε την πράσινη επανάσταση στο ρύζι προέκυψε από την απώλεια ενός γονιδίου που κάνει το ρύζι να γίνει ψηλό (και ως εκ τούτου επιρρεπές σε ασθένειες). Κατά συνέπεια, η μεταφορά των αδρανοποιημένων γονιδίων είναι κάτι που ενδιαφέρει πολύ τους ερευνητές.

Ένα από τα γονίδια του ρυζιού που ήταν στόχος ερευνών είναι το *Eui1*. Όταν το *Eui1* είναι ανενεργό, το ανώτατο μέρος των φυτών του ρυζιού και τα μέρη των λουλουδιών του γίνονται πιο ψηλά και έτσι τα φυτά μπορούν να πάρουν τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία πιο εύκολα. Οι ερευνητές χρησιμοποιούν αυτό το γενετικό τέχνασμα για την παραγωγή υβριδική σπόρου. Βασικοί πρωταγωνιστές της έρευνας αυτής, είναι οι ποικιλίες *Oryza sativa var Japonica* και *Oryza sativa var indica*. Αρχικά, η μεταλλαγή του γονιδίου *Eui1* που προέκυψε από τη μετάλλαξη της ποικιλίας *Oryza sativa var Japonica*, τοποθετήθηκε σε ποικιλία της *Oryza sativa var Indica*, η οποία αναπαράχθηκε για αρκετά χρόνια. Με ένα τεχνητό miRNA που στοχεύει στο γονίδιο *Eui1* του mRNA, οι ερευνητές στο διεθνές ερευνητικό κέντρο ρυζιού παρήγαγαν μέσα σε μια εβδομάδα φυτά με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά σε δύο διαφορετικές ποικιλίες ρυζιού, συμπεριλαμβανομένης της αγρονομικά σημαντικού είδους *Oryza sativa var indica* (εικόνα 35).

Εκτός από τη μειωμένη λειτουργία των γονιδίων μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών, τα τεχνητά miRNAs επιταχύνουν και τον αρχικό προσδιορισμό των σημαντικών γονιδίων και επιτρέπουν την ανακάλυψη των λειτουργιών των γονιδίων που δεν είχαν μελετηθεί κατά το παρελθόν. Οι πιθανές εφαρμογές στην αναπαραγωγή του ρυζιού είναι πολλαπλές και δεν σταματούν στα γονίδια αυτά. Τα miRNAs έχουν βρεθεί σε όλα τα είδη φυτών που εξετάστηκαν έως τώρα. Πρέπει επομένως να είναι δυνατό να προσαρμοστεί η τεχνική της αποσιώπησης των γονιδίων από τα τεχνητά miRNAs σε άλλες καλλιέργειες και αυτό μπορεί να ενισχύσει την αγρονομική απόδοση και τη θρεπτική αξία.



**Εικόνα 35.** Μια προφανής επίδραση της απώλειας της λειτουργίας του γονιδίου *Eu1*, είναι η ισχυρή επιμήκυνση του ανώτερου ενδιάμεσου κόμβου, το μέρος του μίσχου που υποστηρίζει το ανθίζοντα σώμα (δεξιά στην εικόνα). Αριστερά, όπως φαίνεται στην εικόνα είναι ο μάρτυρας.

Πηγή: [www.mpg.de](http://www.mpg.de)

### 3.10 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA ΣΕ ΦΥΤΑ

Τα στοιχεία που έχουν συλλέξει οι επιστήμονες, μέσω της μακρόχρονης έρευνάς τους σε εργαστήρια, σχετικά με το πώς ενεργούν τα microRNA στη λειτουργική συμπεριφορά των φυτών κατά το διάστημα της ανάπτυξής τους, αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο στην προσπάθειά τους να εξηγήσουν τον τρόπο της δράσης τους. Η πιθανότητα που υπάρχει στο μέλλον να απαντηθούν ολοένα και περισσότερα ερωτήματα πάνω στη χρήση των microRNA σε φυτικούς οργανισμούς είναι αρκετά αυξημένη.

Η ανακάλυψη των microRNAs από τους βιολόγους συνεισφέρει, με έμμεσο τρόπο, τα καλύτερα αποτελέσματα στις γεωργικές αποδόσεις των καλλιεργήσιμων φυτών, με την ομαλή και πλούσια άνθιση που τους προσφέρει. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του χρονικού πλεονεκτήματος της άνθισης των φυτών, αφού δίνει τη δυνατότητα στα φυτά να μην



προσβληθούν από τα παθογόνα που εμφανίζονται μόνο σε μια ορισμένη εποχή του χρόνου. Έτσι είναι δυνατό να μην προκληθούν ζημιές κυρίως μέσα στα άνθη ή τους καρπούς τους. Επίσης, με τον έλεγχο των λειτουργιών που γίνονται μέσα στο φυτικό κύτταρο από τα microRNAs, επιτυγχάνεται η δημιουργία της σωστής ανάπτυξης των οργάνων των φυτών. Αυτό οφείλεται στην προσεκτική ρύθμιση των μεγάλων σειρών γονιδίων των φυτών που επιτρέπει στα microRNAs να καθορίσουν ποια κύτταρα θα μετατραπούν σε ρίζες, βλαστούς, φύλλα ή σε διάφορους τύπους κυττάρων.

Οι επιστήμονες αναμένουν τα αποτελέσματα των ερευνών που γίνονται πάνω στη μελέτη των επιγενετικών μηχανισμών σχετικά με τη δράση των microRNAs στα φυτά με μεγάλο ενδιαφέρον και ελπίζουν ότι αυτά θα τους οδηγήσουν σε νέες κατευθύνσεις στην αναπαραγωγή υγιέστατων φυτών. Σύμφωνα με τα λόγια του Weigel, ενός επιστήμονα: «Αυτή τη στιγμή, ενδιαφερόμαστε κυρίως για τα υβρίδια και πώς η επιστήμη της επιγενετικής καθιστά μερικά υβρίδια πιο γερά από τους προκατόχους τους, σε σύγκριση με άλλα που είναι πιο αδύνατα από αυτούς». Όπως μερικά από τα πρώτα RNAs που μελετήθηκαν πάνω σε δομικούς και μηχανικούς μηχανισμούς των φυτών, έτσι και τα ριβοένζυμα επιτελούν σημαντικές λειτουργίες του RNA σε ένα θεμελιώδες χημικό επίπεδο. Αν και έχει γίνει μεγάλη πρόοδος, πολλές ενδιαφέρουσες ερωτήσεις σχετικά με τη δράση τους στο κύτταρο παραμένουν αναπάντητες. Η απαραίτητη λεπτομέρεια της αντίδρασης των μηχανισμών των καταλυτών των μορίων RNA, συμπεριλαμβανομένου μιας μεγάλης πρωτεΐνης, περιπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στα ριβοσώματα, που έχει ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη του ρόλου του RNA στην πρόωρη εξέλιξη.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Η λειτουργία των microRNA στο φυτικό κύτταρο επιδρά σημαντικά στις φυσικοχημικές του δραστηριότητες, παρεμποδίζοντας τη μεταφορά των ανεπιθύμητων πληροφοριών και ενεργοποιώντας το μηχανισμό της άμυνάς του. Με αυτήν τους την ιδιότητα προστατεύουν τα φυτά από κάθε είδους απειλή, αφού ελέγχουν τη διαδικασία διάφορων λειτουργιών, όπως είναι π.χ. η πρωτεϊνοσύνθεση.

Με τις έρευνές τους, οι επιστήμονες ανακάλυψαν τη δραστηριότητα που έχουν αυτά τα μόρια στο σχηματισμό των οργάνων των φυτών, όπως είναι τα φύλλα, τα σέπαλα, τα πέταλα κ.λ.π.. Η παρέμβασή τους σε κάθε στάδιο του σχηματισμού τους αποτελεί ένα σπουδαίο γεγονός κατά τη μορφολογική τους ανάπτυξη.

Ο ρόλος τους στην ενεργοποίηση των μηχανισμών του κυττάρου είναι καταλυτικός. Η παρουσία των ενζύμων (ριβοένζυμα) βοηθούν στην κατάλυση αρκετών αντιδράσεων στο φυτικό κύτταρο.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η παρουσία των microRNA στις έρευνες για τη γονιδιακή θεραπεία είναι σε μεγάλο βαθμό αξιοσημείωτη. Πρόσφατα οι βιολόγοι προσπαθούν να συσχετίσουν τη λειτουργία αυτών των μορίων με την αντιμετώπιση ανίατων ασθενειών, που προκαλούν προβλήματα στην ομαλή δραστηριότητα των φυτών, αλλά πολύ περισσότερο στον άνθρωπο.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Achard P., Alan Herr, David C. Baulcombe and Nicholas P. Harberd (2004). *Modulation of floral development by a gibberellin-regulated micro-RNA. Development* **131**, 3357–3365.
- Aukerman, M.J. and Sakai, H. (2003). *Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. Plant Cell* **10**: 10.
- Baker, C.C., Sieber, P., Wellmer, F. and Meyerowitz, E.M. (2005). *The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in Arabidopsis. Curr. Biol.* **15**, 303–315.
- Bartel, D.P. (2004). *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell* **116**, 281-297.
- Baulcombe, D.C. (2005). *Arabidopsis 'ARGONAUTE1' is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* **102**, 11928-33.
- Βήμα. (28/03/2008). 'Παρέμβαση στο microRNA απενεργοποιεί τις ασθένειες'. Νέα τεχνική ανοίγει τον δρόμο σε θεραπείες για νόσους όπως ο καρκίνος και η ηπατίτιδα.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R. & Zhu, J.K. (2005). *Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. Cell* **123**: 1279-91.
- Boutet, S., Vazquez F., Liu J., Beclin C. and Fagard M. (2003). *Arabidopsis HEN1: A genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. Curr. Biol.* **13**: 843–848.
- Carthew, R.W. (2006). *Gene regulation by microRNAs. Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 203-208.
- Cech, T. R. (1989). *Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from Tetrahymena*. Nobel Lecture, December 8, Dep. of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, CO 80309-0215, U.S.A.
- Chen, X. (2004). *A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. Science* **303**: 2022–2025.
- Chiou, T. J., K. Aung, S.I. Lin, C.C. Wu, S.F. Chiang and C. Su (2006). *Regulation of Phosphate Homeostasis by MicroRNA in Arabidopsis. Plant cell* **18**, 412-421
- Crick, F.H. (1968). *The origin of the genetic code. J. Mol. Biol.* **38**: 367 - 379.

- Doench, J.G., Petersen, C.P. and Sharp, P.A. (2003). *SiRNAs can function as miRNAs*. *Genes Dev.* **17**: 438–442.
- Doudna, J. A. and Cech T. R. (2002). *The chemical repertoire of natural ribozymes*. *Nature*, **418**.
- Ecker, J.R. and Davis, R.W. (1986) Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* **83**: 5372–5376.
- Fire, A., Xu., S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998). *Potent and specific genetic interference by double - stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806.
- Fujii, Y.R and Shinya Omoto (2005). *Regulation of human immunodeficiency virus 1 transcription by nef microRNA*. *J. Gen. Virol.* **86**: 751-755
- Gilbert, W. (1986). *Origin of life: The RNA world*. *Nature* **319**: 618 - 618.
- Guo, H.-S., Chua, N.-H. (2005). *MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor NAC1 to Downregulate Auxin Signals for Arabidopsis Lateral Root Development*. *Plant cell* **17**: 1376-1386.
- Jones-Rhoades, M.W., David P. Bartel and Bonnie Bartel (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **57**: 19-53.
- Jones-Rhoades, M.W. and D.P. Bartel. (2004). *Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA*. *Mol. Cell* **14**: 787-799.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Chapman, E.J., Krizan, K.A., and Carrington, J.C. (2003). *PI/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function*. *Dev. Cell* **4**: 205–217
- Kawasaki, H. and Taira, K. (2002a). *Identification of genes by hybrid ribozymes that couple cleavage activity with the unwinding activity of an endogenous RNA helicase*. *EMBO Rep.* **3**: 443–450.
- Kneller, A. (2006). *Running interference*. This article first appeared in the Spring 5 May 2006 issue of Paradigm magazine.
- Laufs, P., Peaucelle, A., Morin, H., and Traas, J. (2004). *MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems*. *Development* **131**: 4311–4322.
- Lewin, B. (2004). *Genes VIII*. Ελληνική έκδοση: Πρόλογος από τον καθηγητή Γ. Σταματογιαννόπουλο. Copywriter 2004 Published by Pearson Education, Inc. ISBN Α' ΤΟΜΟΥ: 960-88412-0-6 ΚΑΙ Β' ΤΟΜΟΥ: 960-88412-2-4.

- Mallory, A.C., Dugas, D.V., Bartel, D.P. and Bartel, B. (2004a). *MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. Curr. Biol. 14: 1035–1046.*
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Jones-Rhoades, M.W., Tang, G., Zamore, P.D., Barton, M.K. and Bartel, D.P. (2004b). *MicroRNA control of 'PHABULOSA' in leaf development: Importance of pairing to the microRNA 5' region. EMBO J. 23: 3356–3364*
- Mallory, A.C., Bartel, D.P., and Bartel, B. (2005). *MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis 'AUXIN RESPONSE FACTOR17' is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. Plant Cell 17: 1360–1375.*
- Mallory, A.C. Bartel, D.P. and Bartel, B (2006). *AGO1 homeostasis entails co expression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. Mol. Cell 22: 129-136.*
- Marsh, T.L. and N.R. Pace. (1985). *RNase P catalysis differs from ribosomal RNA self-splicing. Science 229: 79-81.*
- Millar, A.A. and Gubler, F. (2005). *The Arabidopsis GAMYB-Like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. Plant Cell 17: 705–721.*
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990). *Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell 2: 279–289.*
- Navarro, L., J. D. G. Jones, Patrice Dunoyer, Florence Jay, Benedict Arnold, Nihal Dharmasiri, Mark Estelle and Olivier Voinnet (2006). *A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling.. Science 312: 436-439.*
- Nikovics, K., T. Blein, A. Peaucelle, T. Ishida, H. Morin, M. Aida, and P. Laufs (2006). *The Balance between the MIR164A and CUC2 Genes Controls Leaf Margin Serration in Arabidopsis. Plant cell 18: 2929-2945.*
- Nissen, P, Hansen J, Ban N, Moore PB and Steitz TA. (2000). *The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. Science 289: 920-930.*
- Noller, HF, Hoffarth V. and Zimniak L. (1992). *Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. Science 256: 1416-1419.*
- Novina, C.D. and Sharp P.A. (Jul 8 2004). *The RNAi Revolution. Nature 430: 161-164.*
- Orgel, L.E. (1968). *Evolution of the genetic apparatus. J. Mol. Biol. 38: 381 - 393.*
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R. and Carring C. B. (2003). *Prediction of mammalian microRNA targets. Cell 115: 787–798.*



- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U. and Birchler, J.A. (1997). *Cosuppression in Drosophila: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is Polycomb dependent. Cell* **90**: 479–490.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., and Chen, X. (2002). *CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. Curr. Biol.* **12**: 1484–1495.
- Peaucelle A, Morin H, Traas J and Laufs P. (2007). *Plants expressing a miR164-resistant CUC2 gene reveal the importance of post-meristematic maintenance of phyllotaxy in Arabidopsis. Development* **134**: 1045-1050.
- PLoS, One (Norman Warthmann, Hao Chen, Stephan Ossowski, Detlef Weigel, Philippe Hervé) (2008). *Highly Specific Gene Silencing by Artificial miRNAs in Rice.* Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen, Germany<sup>2</sup> International Rice Research Institute (IRRI), Metro Manila Philippines.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). *Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. Science* **297**: 1831.
- Sharp, P. A. (1985). *Cell.* **42**: 397–400.
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M. and Weigel, D. (2005). *Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. Dev. Cell* **8**: 517–527.
- Steitz T.A and Steitz J.A. (1993). *A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 6498-6502.
- Steitz, T.A and Moore, P.B. (2003). *RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. Trends Biochem. Sci.* **28**: 411-418.
- Sontheimer, E.J. (2005). *Assembly and Function of RNA Silencing Complexes. Nature Reviews. Molecular Cellular Biology.* **6**: 127–138.
- Sunkar, R., and Zhu, J.K. (2004). *Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. Plant Cell* **16**: 2001–2019.
- Sunkar, R., Girke, T., Jain, P.K. and Zhu, J.-K. (2005). *Cloning and characterization of microRNAs from rice. Plant Cell* **17**: 1397–1411.
- Sunkar, R., A. Kapoor, and J.-K. Zhu (2006). *Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in Arabidopsis Is Mediated by Downregulation of miR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance. Plant cell* **18**: 2051-2065.
- Vaucheret, H. (2006). *Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. Genes Dev.* **20**: 759-71.

- Weigel, D. (2003). *Control of leaf morphogenesis by microRNAs*. *Nature* **425**: 257–263.
- Werner, A. & Berdal, A. (2005). *Natural antisense transcripts: sound or silence*. *Physiol. Genomics* **23**: 125-31.
- Woese, C. (1967). *The genetic code*, Harper & Row. New York. 200 pp.
- Woese, C. (1998). *The universal ancestor*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **95**: 6854–6859
- Wu, G. and R. S. Poethig (2006). *Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3*. *Development* **133**: 3539-3547.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. and Carrington, J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* **2**: E104.
- Ξυνιάς, Ι.Ν. (2006). Γεωργική Γενετική. Εκδ. Έμβρυο, Αθήνα, σελ.436.
- Zimmermann P. Hirsch-Hoffmann M, Hennig L and Gruissem W (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox*. *Plant Physiology* **136**: 2621-2632.

## ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΡΟΣΤΙΘΟΝΤΑΙ ΟΙ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΠΗΓΕΣ

### ΑΠΟ ΤΟ internet:

- [www.el.wikipedia.org](http://www.el.wikipedia.org)
- [www.Universe-review.ca](http://www.Universe-review.ca)
- [www.aspnet.org](http://www.aspnet.org)
- [www.nature.com](http://www.nature.com)
- [www.ergito.com](http://www.ergito.com)
- [www.hyscience.com](http://www.hyscience.com)
- [www.e-bioidea.blogspot.com/2007/09/blog-post\\_3165.html](http://www.e-bioidea.blogspot.com/2007/09/blog-post_3165.html)
- [www.rnajournal.org](http://www.rnajournal.org)
- <http://biology.plosjournals.org>
- [www-ab.informatik.uni-tuebingen.de](http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de)
- [www-ab.informatik.uni-tuebingen.de](http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de)
- [www.mindfully.org](http://www.mindfully.org)
- [www.biology-blog.com](http://www.biology-blog.com)
- [www.bio-pro.de](http://www.bio-pro.de)
- [www.newswire.rockefeller.edu](http://www.newswire.rockefeller.edu)
- [www.mpg.de](http://www.mpg.de)