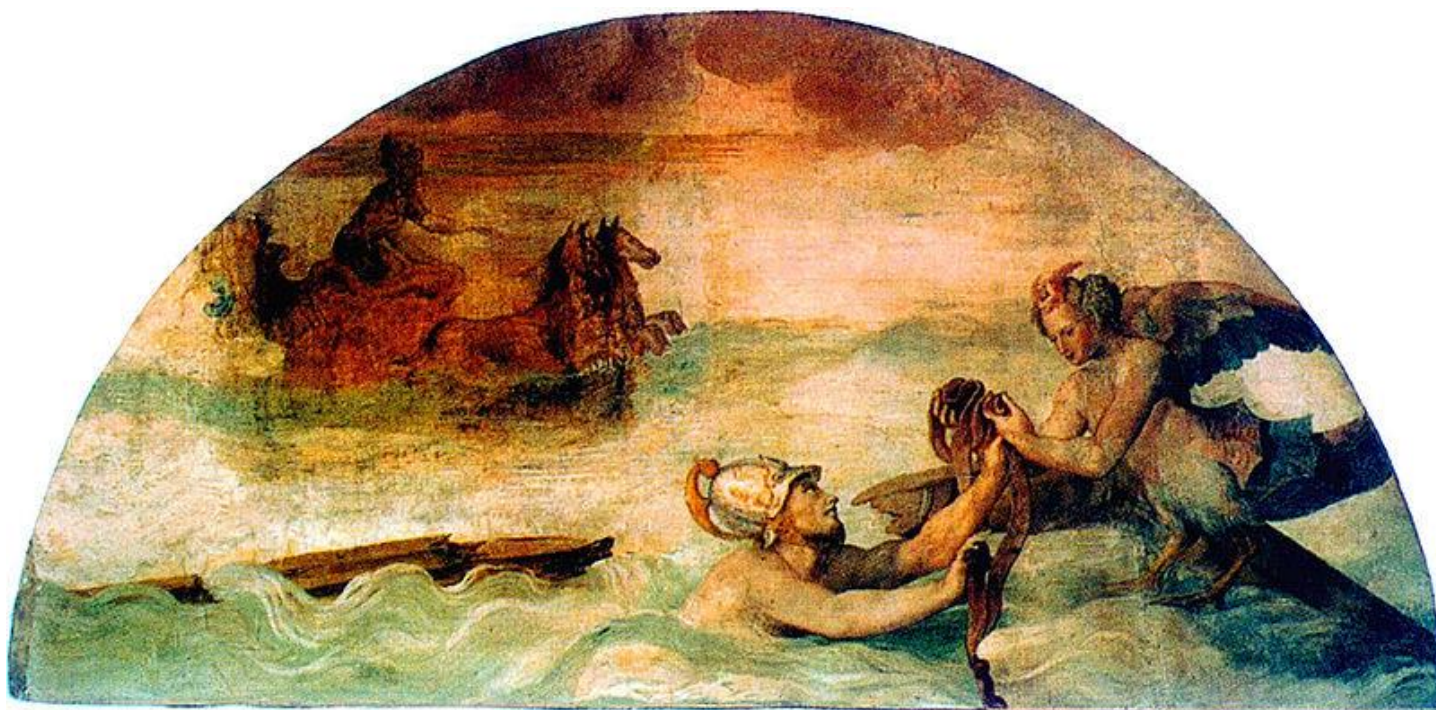


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

“Καθορισμός της μοίρας της πρωτεΐνης LEFKOTHEA
από το 26S-πρωτεάσωμα στο *Arabidopsis*”



Μεταπτυχιακή μελέτη
ΜΥΡΣΙΝΗ Μ. ΜΙΧΟΥ
ΑΘΗΝΑ 2016
Επιβλέπων: Σταμάτης Ρήγας

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

“Καθορισμός της μοίρας της πρωτεΐνης LEFKOTHEA
από το 26S-πρωτεάσωμα στο *Arabidopsis*”

Μεταπτυχιακή μελέτη
ΜΥΡΣΙΝΗ Μ. ΜΙΧΟΥ
ΑΘΗΝΑ 2016
Επιβλέπων: Σταμάτης Ρήγας
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

“Καθορισμός της μοίρας της πρωτεΐνης LEFKOTHEA από το 26S-πρωτεάσωμα στο *Arabidopsis*”

ΜΥΡΣΙΝΗ Μ. ΜΙΧΟΥ

Επιβλέπων: Σταμάτης Ρήγας

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ρήγας Σταμάτης, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Μηλιώνη Δήμητρα, Επίκουρη Καθηγήτρια (Μέλος)

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής (Μέλος)

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με Γενική Συνέλευση του Τμήματος Βιοτεχνολογίας στις 21/10/2015, κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή της διατριβής.

Περίληψη

Το τμήμα (PORR Plant Organelle RNA Recognition) αποτελεί κομμάτι πολλών συγκεκριμένων φυτικών πρωτεϊνών των οποίων η λειτουργία παραμένει ακαθόριστη μέχρι και σήμερα. Το πλέον πιθανό σενάριο είναι πως αυτές οι πρωτεΐνες παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία του ματίσματος των ιντρονίων της ομάδας II των γονιδίων που κωδικοποιούνται από τον χλωροπλάστη. Η LEFKOTHEA1 (LEFKO1) αποτελεί μία πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον πυρήνα και είναι μέλος της οικογένειας PORR. Βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, προέβλεψε πως η LEFKO1 περιέχει ένα πεπτίδιο-οδηγό το οποίο ευθύνεται για την στόχευση της πρωτεΐνης στον χλωροπλάστη, καθώς και δύο μοτίβα τα οποία συνδέονται με την είσοδο(NLS) και την έξοδο(NES) της πρωτεΐνης από τον πυρήνα. Έχουμε χαρακτηρίσει το *lefko1-1* το οποίο αποτελεί ένα μετάλλαγμα EMS το οποίο χαρακτηρίζεται από μία αμινοξική υποκατάσταση της Γλυκίνης από Ασπαρτικό οξύ στο τμήμα του NES. Η μετάλλαξη αυτή διαταράσσει την πρωτεϊνική ομοιότητα, αυξάνοντας την έξοδο της πρωτεΐνης από τον πυρήνα. Το μετάλλαγμα *lefko1-1* έχει λευκές κοτυληδόνες και κοντή πρωτογενή ρίζα, ενώ το T-DNA αλληλόμορφο του *lefko1-2* το οποίο έχει πλήρη έλλειψη λειτουργικότητας, σε ομοζυγωτία διακρίνεται από την παύση της ανάπτυξης του εμβρύου στο καρδιάσχημο στάδιο. Μικροσκοπική ανάλυση κατασκευών του γονιδίου *LEFKO1* συντηγμένου με τη πρωτεΐνη-μάρτυρα YFP, επιβεβαίωσε την δυαδική τοποθέτηση της πρωτεΐνης και στον χλωροπλάστη και στον πυρήνα. Ο φαινότυπος του *lefkothea* αποτελεί αποτέλεσμα της διαταραγμένης ισορροπίας της πρωτεΐνης στον πυρήνα, εξαιτίας της αυξημένης εξόδου της από τον πυρήνα. Συνεπώς, η εκδοχή της πρωτεΐνης LEFKOTHEA1 που στερείται το πεπτίδιο-οδηγό στο αμινο-τελικό(N-terminus) άκρο συμπληρώνει τον φαινότυπο του *lefkothea* και επισημαίνει τον σημαντικότατο ρόλο της πρωτεΐνης στον πυρήνα. Ενώ η απεικόνιση σε ζωντανά, παροδικώς μετασχηματισμένα κύτταρα καπνού, κατασκευών του γονιδίου *LEFKO1* όπου περιέχεται συντηγμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη μάρτυρα YFP επιβεβαιώνει την δυαδική τοποθέτηση της πρωτεΐνης στα δύο υποκυτταρικά διαμερίσματα, σε σταθερώς μετασχηματισμένα φυτά *Arabidopsis*, η αντίχενση της πρωτεΐνης στον πυρήνα καθίσταται εφικτή μόνο μετά την εφαρμογή του αναστολέα MG-132 του 26S πρωτεασώματος. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα αποτελέσματα, θα μπορούσε να υποστηριχθεί πως η ελλειμματική διανομή της LEFKOTHEA1 μεταξύ του πυρήνα και του χλωροπλάστη, συνδέεται άμεσα με την αποδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα. Σε συνδυασμό με αυτές τις παρατηρήσεις, in silico ανάλυση προέβλεψε πως η LEFKOTHEA1 αποτελείται από 2 Destruction Boxes (D-Boxes) τα οποία και ευθύνονται για την αναγνώριση της πρωτεΐνης από το μονοπάτι της Ουμπικουτίνης/26S πρωτεασώματος. Σκοπό αυτής της μελέτης αποτελεί η αλλαγή της ισορροπίας της LEFKOTHEA1 ανάμεσα τον πυρήνα και τον χλωροπλάστη με το να εμποδιστεί η αποδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτός ο στόχος, προετοιμάστηκαν κατασκευές του γονιδίου *LEFKOTHEA1* με το γονίδιο YFP, οι οποίες έφεραν μεταλλάξεις στις

ακολουθίες των δύο D-Boxes και συγκεκριμένα αμινοξικές αντικαταστάσεις. Αυτές οι κατασκευές έφεραν επίσης τον επίτοπο FLAG στο καρβόξυ-τελικό τους άκρο για πειράματα co-IP. Στόχος είναι να διαλευκανθεί το εάν η μη- διαταραγμένη διανομή της LEFKOTHEA1 απαιτείται για την εμβρυογένεση και να αποκαλύψει τα μονοπάτια επικοινωνίας μεταξύ του πυρήνα και του χλωροπλάστη, τα οποία και έχουν ξεχωριστή προέλευση, που ελέγχουν την βιογένεση του χλωροπλάστη και την λειτουργία του.

Abstract

The PORR (Plant Organelle RNA Recognition) domain is a component of plant specific proteins whose function remains elusive as yet. These proteins most likely play a key role in the splicing process of group II introns of chloroplast encoded genes. LEFKOTHEA1 (LEFKO1) is a nuclear encoded protein that is a member of the PORR class. Bioinformatics analysis predicted that LEFKO1 contains a putative transit peptide responsible for protein targeting to the chloroplast and two motifs associated with nuclear localization (NLS) and export (NES). We have characterized *lefko1-1* an EMS mutant allele that carries an amino acid substitution of Glycine to Aspartic acid at NES proximity. This mutation disturbs protein homeostasis by enhancing LEFKO nuclear export. The *lefko1-1* mutant has white (Greek: *lefko*) cotyledons and short primary roots, while the total loss of function *lefko 1-2* T-DNA allele causes embryogenesis arrest upon transition from the globular to the heart-stage. Microscopic analysis of *LEFKO1* gene constructs fused to YFP confirmed the dual targeting properties of LEFKO1 to both chloroplasts nucleoids and nucleus foci. The *lefkothea* phenotype results from disturbed equilibrium of the protein in the nucleus due to enhanced protein export. Consequently, the truncated version of LEFKOTHEA1 protein missing the transit peptide at the N-terminus complements the *lefkothea* phenotype and highlights the crucial role of LEFKOTHEA1 in the nucleus. While live cell imaging of *LEFKO1* gene fusion constructs with YFP confirmed protein targeting upon transient expression in tobacco leaves to two subcellular compartments, the protein is detected in the nucleus of stable transformed *Arabidopsis* plants only when the 26S proteasome inhibitor MG-132 is applied. Taken together these results support that the eclipsed protein distribution of LEFKOTHEA1 between the nucleus and chloroplast is associated with selective protein turnover by the 26S proteasome. In line with these observations, *in silico* analysis predicted that LEFKOTHEA1 bears two Destruction Boxes (D-Boxes) responsible for protein recognition by the ubiquitin/26S proteolytic system. The aim of this work is to change the equilibrium of LEFKOTHEA1 between the nucleus and the chloroplast by inhibiting protein turnover through the 26S proteasome. To accomplish this task *LEFKOTHEA1* gene fusion constructs with the *YFP* reporter gene were prepared that carry mutations through amino acid substitutions of the two D-Boxes. These transgenes also carry the FLAG epitope at the C-terminus for co-IP experiments. The scope is to clarify whether the non-eclipsed distribution of LEFKOTHEA1 is crucial for embryogenesis and unravel the communication pathways between the nucleus and chloroplast, which have distinct origin, that control chloroplast biogenesis and function.

Περίληψη.....	4
Abstract	6
Εισαγωγή	9
Η διαδικασία του μάτισματος χλωροπλαστικών γονιδίων	10
Το μάτισμα στα πρόδρομα μόρια του RNA πυρηνικών γονιδίων.....	11
Η πρωτεΐνη LEFKOTHEA επηρεάζει το μάτισμα των χλωροπλαστικών γονιδίων	12
Η δομή της πρωτεΐνης LEFKOTHEA.....	13
Η μετάλλαξη lefkothea	14
Η σημασία της EMS μετάλλαξης του αλληλομόρφου lefko1-1.....	16
Τα σινιάλα στόχευσης της LEFKOTHEA.....	17
Η στόχευση της πρωτεΐνης στον πυρήνα.....	18
Σκοπός της μελέτης.....	20
Υλικά και μέθοδοι.....	22
Φυτικό υλικό	23
Σύσταση και προετοιμασία θρεπτικού υλικού ανάπτυξης φυτών	23
Προετοιμασία και συνθήκες ανάπτυξης φυτικού υλικού	24
Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	25
Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	25
PCR αποικιών.....	27
Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	27
Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	28
Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού	29
Ενοποίηση τμημάτων με κολλώδη άκρα.....	29
Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός	30
Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων E.coli με πλασμιδιακό DNA	30
Προετοιμασία ηλεκτροδεκτικών βακτηριακών κυττάρων Agrobacterium tumefaciens. 30	
Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων Agrobacterium tumefaciens με ηλεκτροπόρωση.....	31
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα Escherichia coli	32
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης	32
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη βοήθεια κολώνας QIAGEN.....	33
Μετασχηματισμός <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
Μέθοδος διείδυσης με εφαρμογή κενού σε ολόκληρα φυτά A. thaliana	33

Ανάπτυξη φυτών και διείσδυση με κατάλληλο στέλεχος <i>A.tumefaciens</i>	34
Επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών της T1 γενιάς	35
Παροδική έκφραση σε φύλλα καπνού.....	35
Αποτελέσματα	37
Ενίσχυση επιθυμητού τμήματος από γενωματικό DNA	38
Κλωνοποιήσεις και κατασκευές.....	40
Μελέτη παροδικού μετασχηματισμού φυτών <i>Nicotiana benthamiana</i>	45
Μελέτη μόνιμα μετασχηματισμένων φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
Συζήτηση	51
Η ομοιότητα της LEFKOTHEA στο κύτταρο και η συσχέτισή της με τα D-Boxes	52
Η δομή του D-box	53
Το D-box στον φυτικό οργανισμό.....	54
Το προφίλ των μόνιμα μετασχηματισμένων φυτών	56
Βιβλιογραφία.....	59
Παράρτημα.....	63

1. Εισαγωγή

Η διαδικασία του ματίσματος χλωροπλαστικών γονιδίων

Στα Αγγειόσπερμα, τα γενώματα τόσο των μιτοχονδρίων όσο και των χλωροπλαστών, κωδικοποιούν περίπου 20 ιντρόνια, τα περισσότερα εκ των οποίων χαρακτηρίζονται σε ιντρόνια της κατηγορίας II (group II introns), βάσει της ομοιότητάς τους στα κατηγορίας II ιντρόνια ριβοενζύμων τα οποία επιτελούν μόνο τους μάτισμα (self-splicing group II intron ribozymes)(Colas des Francs-Smal et al., 2011). Η διαδικασία του αυτό-ματίσματος (self-splicing) φαίνεται να έχει εκλείψει στα Αγγειόσπερμα, υπόθεση η οποία επιβεβαιώνεται από την διεθνή βιβλιογραφία, καθώς πειραματικά δεδομένα απέδειξαν την συμμετοχή πολλών πρωτεϊνών οι οποίες κωδικοποιούνται από τον πυρήνα στη διαδικασία του ματίσματος στα ιντρόνια του χλωροπλάστη (Falcon de Longevialle et al., 2010) .

Καθώς τα ιντρόνια που συναντώνται στα οργανίδια διακόπτουν γονίδια τα οποία είναι αναγκαία για την ολοκλήρωση διαδικασιών όπως είναι η φωτοσύνθεση, η αναπνοή κ.α, είναι σημαντικό να ταυτοποιηθούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στο μάτισμά τους, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο μετέχουν στην γονιδιακή ρύθμιση. Στα Αγγειόσπερμα έχουν ταυτοποιηθεί 14 πρωτεΐνες οι οποίες κωδικοποιούνται από τον πυρήνα και εμπλέκονται στο μάτισμα των χλωροπλαστικών ιντρονίων (Chateigner-Boutin et al., 2011; Watkinset al., 2011). Έχει βρεθεί πως κάθε ιντρόνιο απαιτεί αλληλεπίδραση με ποικίλες πρωτεΐνες προκειμένου να αφαιρεθεί επιτυχώς, καθώς και πως οι περισσότερες πρωτεΐνες δρουν σε διακριτά υποσύνολα ιντρονίων. Παρά το γεγονός πως υπάρχει προφανής εξελικτική σχέση μεταξύ του ματίσματος των ιντρονίων κατηγορίας II και της δράσης του Σπλισοσώματος (spliceosome) στον πυρήνα, οι παράγοντες που μετέχουν στη διαδικασία των γονιδίων του χλωροπλάστη, δεν έχουν καμία σχέση με τους αντίστοιχους παράγοντες που συναντώνται στο μάτισμα των γονιδίων του πυρήνα. Πιο συγκεκριμένα, η πλειοψηφία τους ανήκει στις οικογένειες των RNA δεσμευτικών πρωτεϊνών(RNA binding protein families), των οποίων τα μέλη εδράζονται στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια: οι οικογένειες των πρωτεϊνών με τα τμήματα CRM,PPR,APO και PORR .

Το μάτισμα στα πρόδρομα μόρια του RNA πυρηνικών γονιδίων

Το μάτισμα του πρόδρομου mRNA ακολουθεί κατά προτίμηση, αλλά όχι απαραίτητα, συγκεκριμένα μονοπάτια για την αφαίρεση πολλαπλών ιντρονίων. Απαραίτητες για το μάτισμα είναι μόνο κάποιες ιδιαίτερα σύντομες συντηρημένες αλληλουχίες. Το υπόλοιπο ιντρόνιο φαίνεται να μην είναι σημαντικό. Όλες οι 5' θέσεις ματίσματος εμφανίζονται μεταξύ τους ισοδύναμες, όπως και όλες οι 3' θέσεις ματίσματος. Οι απαραίτητες για το μάτισμα αλληλουχίες περιγράφονται από τον κανόνα GU-AG ο οποίος αναφέρεται στα νουκλεοτίδια που απαντώνται στα άκρα του ιντρονίου. Η αντίδραση στην 5' θέση ματίσματος οδηγεί στον σχηματισμό θηλιάς, όπου το άκρο GU ενώνεται με το ιντρόνιο σχηματίζοντας ένα 5' → 2' φωσφοδιεστερικό δεσμό στο κατάλοιπο αδενίνης στη 6' θέση της θέσης διακλάδωσης. Στην συνέχεια, το 3'-OH άκρο του 5' εξονίου προσβάλλει την 3' θέση ματίσματος, έτσι ώστε να συνδεθούν τα εξόνια και να αποδεσμευτεί το ιντρόνιο με τη μορφή θηλιάς. Και οι δύο αντιδράσεις είναι μετεστεροποιήσεις στις οποίες διατηρείται σταθερός ο αριθμός των δεσμών. Αρκετά στάδια της αντίδρασης 19 απαιτούν υδρόλυση του ATP, πιθανώς για την προώθηση αλλαγών της διαμόρφωσης του RNA και/ή των πρωτεϊνικών συστατικών. Ο σχηματισμός της θηλιάς ευθύνεται για την επιλογή της 3' θέσης ματίσματος. Το μάτισμα του πρόδρομου mRNA απαιτεί τη δημιουργία του σωματίου ματίσματος (spliceosome), δηλαδή ενός μεγάλου συμπλόκου που συναρμολογεί τις συντηρημένες πρότυπες αλληλουχίες σε μία δομή η οποία διευκολύνει την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Το σωματίο ματίσματος σχηματίζεται συνήθως με την διαδικασία καθορισμού ιντρονίου, η οποία περιλαμβάνει την αναγνώριση της 5' θέσης ματίσματος. Το σωματίο ματίσματος αποτελείται από μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια με πρωτεϊνικά στοιχεία (snRNP) και μικρού μεγέθους RNA (snRNA), εκ των οποίων τα βασικά είναι τα U1, U2, U4/U6 και U5. Το σωματίο ματίσματος περιέχει τα U1, U2, U4/U6 και U5 snRNP και κάποιους πρόσθετους παράγοντες ματίσματος. Τα U1, U2 και U5 snRNP περιέχουν το καθένα ένα μόριο snRNA και αρκετές πρωτεΐνες. Το U4/U6 περιέχει 2 snRNP και αρκετές πρωτεΐνες. Κάποιες πρωτεΐνες είναι κοινές σε όλα τα σωματίδια snRNP. Τα snRNP αναγνωρίζουν συντηρημένες αλληλουχίες. Το U1 σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την 5' θέση ματίσματος, το U2 σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την αλληλουχία διακλάδωσης, ενώ το U5 snRNP δρα στην 5' θέση ματίσματος. Η πρόσδεση του U1 snRNP στην 5' θέση ματίσματος αποτελεί το πρώτο βήμα για το μάτισμα. Όταν το U4 αποδεσμεύει το U6, το U6 σχηματίζει ζεύγη βάσεων με το U2, δημιουργώντας ενδεχομένως το καταλυτικό κέντρο του ματίσματος. Η σταθερότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του U1 snRNA και της θέσης ματίσματος διασφαλίζεται από εξωγενείς παράγοντες που περιλαμβάνουν:

- Μέλη της οικογένειας των SR πρωτεϊνών και πιο συγκεκριμένα με την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης ASF/SF2 (γενικός παράγοντας ματίσματος της

οικογένειας των πρωτεϊνών SR) με το U1 snRNP. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής συνδέουν επίσης τον παράγοντα U2AF με τον U1 snRNP.

- Μια ομάδα από συντηρημένες πρωτεΐνες δέσμευσης του RNA που χαρακτηρίζονται από ένα τουλάχιστον μοτίβο αναγνώρισης RNA μορίων 21 (RNA recognition motif, RRM) και μια RS περιοχή πλούσια σε σερίνη και αργινίνη που συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Τα μόρια snRNA μπορούν να δρουν καταλυτικά στο μάτισμα και σε άλλες αντιδράσεις κατά την επεξεργασία του RNA.

Ομοιότητες μεταξύ των ιντρονίων της κατηγορίας II (χλωροπλαστικά γονίδια) και του σπλισσοσώματος που απαντάται στα πυρηνικά γονίδια συνθέτουν μια εξαιρετικά ενδιαφέρουσα υπόθεση πως ο μηχανισμός ματίσματος των ιντρονίων της κατηγορίας II είναι εξελικτικά ο πρόγονος του μηχανισμού ματίσματος που συμβαίνει στον πυρήνα (Cech., 1986).

Η πρωτεΐνη LEFKOTHEA επηρεάζει το μάτισμα των χλωροπλαστικών γονιδίων

Το γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana* αποτελείται από 15 PORR πρωτεΐνες (Kroager et al., 2009), μία εκ των οποίων είναι και η πρωτεΐνη LEFKOTHEA.

Το τμήμα PORR, με τη παλαιότερη ονομασία Domain of Unknown Function 860 (DUF860) (Plant Organellar RNA Recognition) ταυτοποιήθηκε το τμήμα εκείνο της πρωτεΐνης που δεσμεύει το RNA.

Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας PORR φαίνεται να έχουν στόχευση στον χλωροπλάστη ή στο μιτοχόνδριο. Επιπλέον, μετά από βιοπληροφορικές αναλύσεις, υπάρχουν ενδείξεις ότι παράλληλα τοποθετούνται και στον πυρήνα των κυττάρων, κι έτσι δημιουργούνται ερωτήματα σχετικά με την λειτουργία τους, και την εξέλιξη των μηχανισμών επικοινωνίας πυρήνα-οργανιδίων συναρτήσει της ανάπτυξης του φυτικού οργανισμού.

Πρόσφατα αναγνωρίστηκε τοWTF1 από το καλαμπόκι *Zea mays* που ανήκει στην οικογένεια PORR (Kroager et al., 2009). Απαιτείται για το μάτισμα περίπου των μισών ιντρονίων των χλωροπλαστικών γονιδίων και σταθεροποιεί τα ριβο-πρωτεϊνικά σύμπλοκα με τα ιντρόνια (ribonucleo-protein complexes) in vivo. Συγκεκριμένα, σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με την πρωτεΐνη RNC1 (Watkins et al., 2007; Kroeger et al., 2009), και αυτό το ετεροδιμερές συνεργαζόμενο με επιπρόσθετες πρωτεΐνες, πρωταγωνιστεί στη διαδικασία του ματίσματος, χωρίς να είναι πλήρως αποσαφηνισμένος ο τρόπος. Το WTF1 φαίνεται να έχει στόχευση στον χλωροπλάστη, πρόβλεψη η οποία επιβεβαιώθηκε και με κατάλληλο πειραματικό χειρισμό (ανάλυση μέσω φασματομετρίας μάζας εκχυλίσματος χλωροπλαστών), εντοπίζοντάς να ανοσοκαθίζει με χλωροπλαστικά ιντρόνια κατηγορίας II (Kroager et al., 2009).

Καθώς λοιπόν η πρωτεΐνη LEFKOTHEA περιλαμβάνει το τμήμα PORR, όπως και το WTF1, είναι εξαιρετικά πιθανό να εμπλέκεται στον μηχανισμό επεξεργασίας των οργανιδιακών μεταγραφημάτων, όπως είναι το μάτισμα των

ιντρονίων, καθώς επίσης έχει αποδειχθεί πως μετακινείται εντός και εκτός του πυρήνα, όπου η λειτουργία της συσχετίζεται με την επεξεργασία mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται άμεσα με τον γλωροπλάστη(Daras, 2008).

Η δομή της πρωτεΐνης LEFKOTHEA

Μετά από ανάλυση σε αμινοξικό επίπεδο χρησιμοποιώντας κατάλληλα βιοπληροφορικά μέσα και υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές, το γονίδιο *lefko1* αποτελείται από τρία κύρια μέρη.



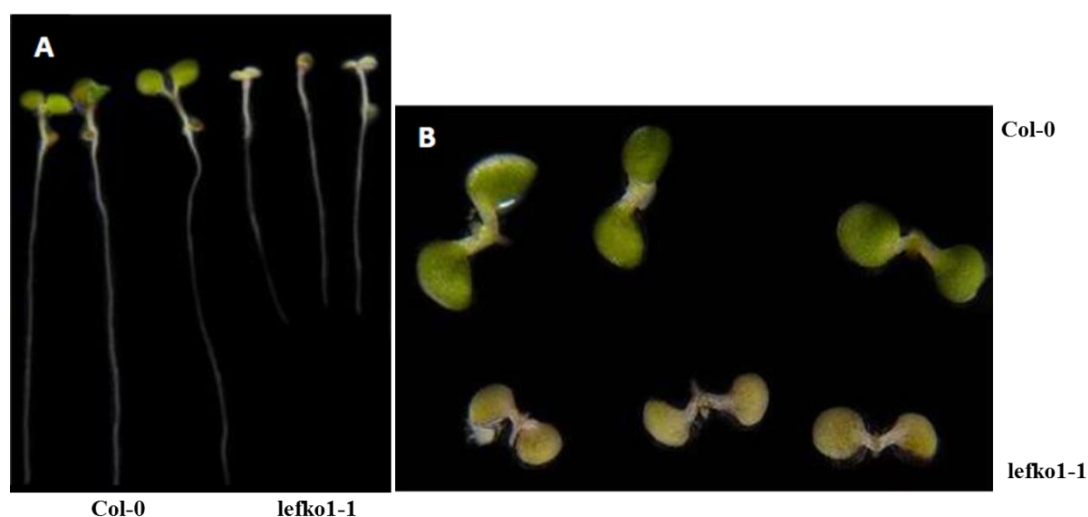
Εικόνα 1.1: Απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης και η θέση των μεταλλάξεων που φέρει

Το αμινο-τελικό της άκρο(N-domain), το οποίο εκτείνεται μέχρι και το εξηκοστό(60) αμινοξύ όπου και εντοπίζεται και η ένθεση T-DNA του αλληλομόρφου *lefko1-2*, 30 βάσεις ανωφορικά του κωδικονίου έναρξης. Κεντρικό τμήμα της LEFKOTHEA1 αποτελεί το τμήμα PORR(61-379aa) στο οποίο και εντοπίζεται η αμινοξική υποκατάσταση της Γλυκίνης 373 σε Ασπαρτικό οξύ (G->D), μετάλλαξη στην οποία οφείλονται και τα ιδιαίτερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των φυτών που τη φέρουν. Το τρίτο και τελευταίο της τμήμα είναι το καρβόξυ άκρο που περιλαμβάνει 114 αμινοξέα.

Η μετάλλαξη *lefkothea*

Το μετάλλαγμα *lefko1-2* προήλθε από T-DNA ένθεση ανοδικά του αμινοτελικού άκρου του γονιδίου At5g62990. Εξαιτίας την μη βιωσιμότητας των μεταλλαγμάτων *lefko1-2*, το μετάλλαγμα *lefko1-1* αποτελεί το πλέον κατάλληλο μετάλλαγμα για την μελέτη της λειτουργίας της πρωτεΐνης, καθώς η αμινοξική υποκατάσταση, ναι μεν επιφέρει σημαντικές φαινοτυπικές ανωμαλίες, αλλά τα φυτά είναι βιώσιμα, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται, να γονιμοποιούνται, να δίνουν απογόνους, κι έτσι να μπορούν να μελετηθούν.

Το μετάλλαγμα *lefkothea1* (*lefko1-1*), το οποίο προήλθε από χημική μεταλλαξογένεση με EMS (Ethane Methane Sulfonate), φέρει μία νουκλεοτιδική αλλαγή που οδήγησε σε αμινοξική υποκατάσταση της Γλυκίνης (373) σε Ασπαρτικό οξύ (D) στο γονίδιο At5g62990 όπου και χαρτογραφήθηκε. Εξαιτίας της αλλαγής αυτής, το μετάλλαγμα παρουσιάζει έναν ιδιαίτερο φαινότυπο ο οποίος χαρακτηρίζεται από λεύκανση των κοτυληδόνων (Εικόνα 1.1).



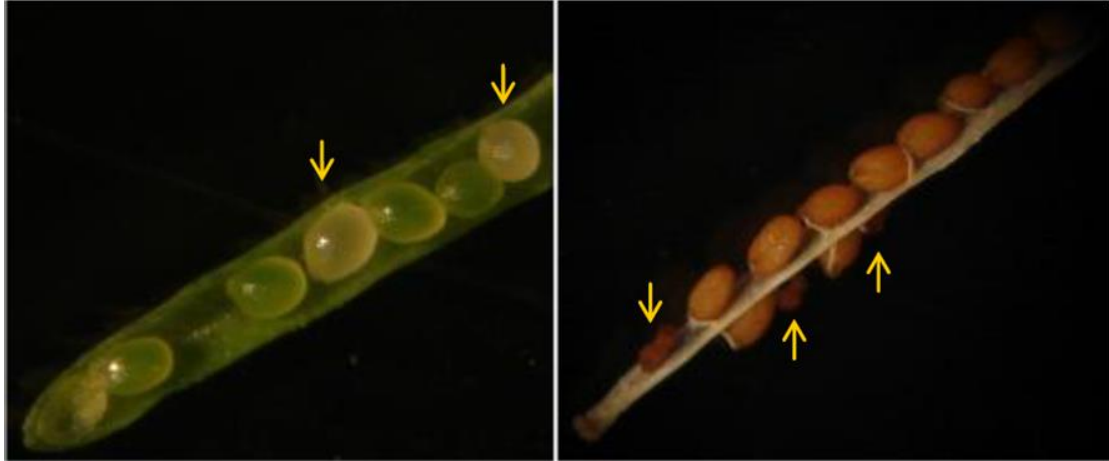
Εικόνα 1.2: Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μεταλλάγματος *lefko1-1*

A) Σπορόφυτα B) Κοτυληδόνες φυτών ηλικίας 5 ημερών

Αν και οι κοτυληδόνες του μεταλλάγματος *lefko1-1* έχουν λευκό χρώμα, τα φύλλα του είναι πράσινα, μαρτυρώντας την προβληματική ανάπτυξη στα πρώτα στάδια, αμέσως μετά την βλαστικότητα των σπόρων. Επίσης, παρατηρήθηκαν μορφολογικές αλλοιώσεις των χλωροπλαστών σε κύτταρα κοτυληδόνων φυτών *lefko1-1* οι οποίες ήταν ο μη φακοειδής σχηματισμός και η οργανωμένη δομή θυλακοειδών. Οι παρατηρήσεις αυτές μαρτυρούν πως η μετάλλαξη *lefko1-1* επηρεάζει άμεσα την μορφογένεση των ιστών με εμβρυακές καταβολές (κοτυληδόνες), υποδεικνύοντας έτσι τον κρίσιμο ρόλο της πρωτεΐνης στην ανάπτυξη του εμβρύου.

Ένα επιπλέον στοιχείο το οποίο ισχυροποιεί το σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης *Lefko1-1* στα πρώτα στάδια της εμβρυακής ανάπτυξης, αποτελεί ο αλληλόμορφος

lefko1-2. Ο *lefko1-2* μετά από εκτενή παρατήρηση των καρποταξιών του, επιβεβαιώθηκε η Μενδελιανή διάσχιση του θνησιγόνου φαινοτύπου σε κατάσταση ομοζυγωτίας (Εικόνα 1.2), καθώς η ανάπτυξη του εμβρύου σταματά στο καρδιόσχημο στάδιο, ενώ τα ετερόζυγα έμβρυα ολοκλήρωναν κανονικά την ανάπτυξή τους.



Εικόνα 1.3: Καρποταξίες ετερόζυγων ως προς την ένθεση φυτών *lefko1-2*, όπου με βέλη σημειώνονται τα ομοζυγωτά ως προς την ένθεση, σπέρματα, ενώ στην δεξιά ώριμη καρποταξία σημειώνονται τα ομόζυγα για την ένθεση σπέρματα (συρρικνωμένα).

Η σημασία της EMS μετάλλαξης του αλληλομόρφου *lefko1-1*

Στη μετάλλαξη *lefko1-1* η αμινοξική υποκατάσταση του αμινοξέος της Γλυκίνης στη θέση 373 σε Ασπαρτικό οξύ εντοπίζεται σε πιθανό σινιάλο εξόδου NES(Nuclear Export Signal) της πρωτεΐνης από τον πυρήνα (Εικόνα 1.4)



Εικόνα 1.4: Τα δομικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης Lefkothea

Με βάση την βιοπληροφορική ανάλυση η τροποποίηση αυτή φαίνεται να ενισχύει την εκροή της πρωτεΐνης από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Daras, 2008). Αυτό το έλλειμμα πρωτεΐνης στον πυρήνα φαίνεται να είναι η αιτία του χαρακτηριστικού φαινοτύπου χλώρωσης των κοτυληδόνων στα φυτά της μετάλλαξης *lefko1-1*.

Τα σινιάλα στόχευσης της LEFKOTHEA

Η πρωτεΐνη LEFKOTHEA αποτελείται από 494 αμινοξέα. Το πρόγραμμα ChloroP προβλέπει ότι τα πρώτα 69 αμινοξέα συνιστούν το πεπτίδιο-συνθήματος για τους χλωροπλάστες το οποίο κατά την είσοδο αποκόπτεται. Βιοπληροφορική ανάλυση με νευρωνικά δίκτυα πρόβλεψης και βάσεις δεδομένων προβλέπουν ότι η πρωτεΐνη εκτός του χλωροπλάστη φέρει πληροφορίες υποκυτταρικής τοποθέτησης στον πυρήνα (Εικόνα 1.5).

At5g26860	Nucleus	Chloroplast	Prediction Program
<u>484 a.a.</u>	3	7	PSORT
	N.D.	0.49	PREDOTAR
	N.D.	0.687	TARGETP
	N.D.	0.553	CHLOROP
	N.D.	0.576	SLP-Local
	N.D.	1.0	BACELLO
	5.0	N.D.	SUBLOC
	0.925	N.D.	CELLO
	0.74	N.D.	NUCLEO
	1.0	N.D.	NUC-PLOC
	0.69	N.D.	YLOC

Εικόνα 1.5: Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης με νευρωνικά δίκτυα και βάσεις δεδομένων πρόβλεψης της υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης

Πιο λεπτομερής ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας της πρωτεΐνης με εφαρμογή εξειδικευμένων προγραμμάτων βιοπληροφορικής για τον εντοπισμό σινιάλων τοποθέτησης στον πυρήνα, όπως τα NucPred, PredictNLS και NetNES, αποκάλυψε την παρουσία σινιάλου εισόδου στον πυρήνα NLS (Nuclear Localization Signal) του κυττάρου, καθώς και σινιάλο εξόδου NES (Nuclear Export Signal) από τον πυρήνα (Εικόνα 1.4 & 1.5).

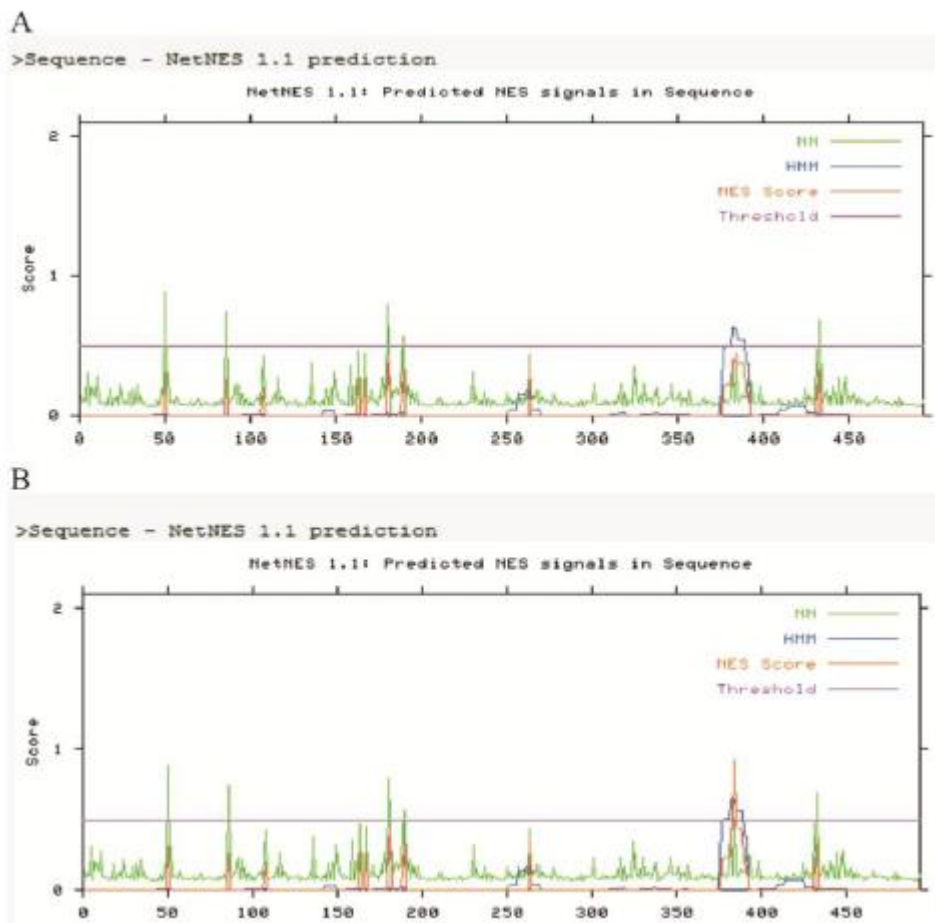
Η στόχευση της πρωτεΐνης στον πυρήνα

Στην αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης εντοπίστηκαν χαρακτηριστικά μονομερή και διμερή σινιάλα πυρηνικής τοποθέτησης NLS (Εικόνα 1.4) (Kosugi et al., 1998). Το πιο τυπικό μονομερές σινιάλο που φαίνεται να ευθύνεται για την τοποθέτηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα είναι το “KRIRREERRK” (αμινοξική θέση 396 έως 405), το οποίο περιέχει αμινοξέα Λυσίνης (K) και Αργινίνης (R) που είναι χαρακτηριστικά σινιάλων τοποθέτησης της πρωτεΐνης στον πυρήνα (Boulikas et al., 1994). Τα πιο χαρακτηριστικά διμερή σινιάλα πυρηνικής τοποθέτησης είναι η ακολουθία KR(X)₉KRR στη θέση 259 έως 272 και η ακολουθία RK(X)₁₁KRK στη θέση 404 έως 419. Αυτά τα διμερή σινιάλα ταιριάζουν απόλυτα με αυτά που έχουν παλαιότερα αναφερθεί (Kosugi et al., 1998). Επιπλέον, τα πρότυπα των παραπάνω ακολουθιών, μονομερών ή διμερών, φαίνεται ότι μπορούν αν προσδεθούν στις ειδικές θέσεις του μηχανισμού εισαγωγής της Ιμπορτίνης-α που ελέγχει την είσοδο πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (Kosugi et al., 1998).

Όσον αφορά στα σινιάλα εξόδου NES από τον πυρήνα, τα πλέον αποδεχόμενα ακολουθούν το πρότυπο L(X)₂₋₃ L(X)₁₋₂ (L: Λευκίνη, X: οποιοδήποτε αμινοξύ) (Bogerd et al., 1996). Επιπλέον, ένα πεπτίδιο για να αποτελεί NES θα πρέπει επιπλέον να πληρεί και άλλες προϋποθέσεις, όπως να έχει δευτεροταγή δομή α-έλικας, να περιλαμβάνει σε μεγάλο ποσοστό τα αμινοξέα Γλουταμινικό οξύ, Ασπαρτικό οξύ και Σερίνη και να είναι αρνητικά φορτισμένο για να βρίσκεται εκτεθειμένο από την υπόλοιπη δομή της πρωτεΐνης (La Cour et al., 2004).

Η πρωτεΐνη LEFKOTHEA περιέχει ένα τέτοιο σινιάλο στη θέση 373 έως 392 που αντιστοιχεί στην ακολουθία “GDLLDKDERLVIRERLIDL” η οποία συμφωνεί αρκετά με το πρότυπο L(X)₂₋₃ L(X)₁₋₂ (Εικόνα 1.4). Επιπλέον, η συγκεκριμένη ακολουθία έχει δευτεροταγή δομή β-πτυχωτής επιφάνειας, είναι αρνητικά φορτισμένη και περιέχει πλήθος αμινοξέων Ασπαρτικού (D) και Γλουταμινικού (E) οξέως (Εικόνα 1.4).

Στη μετάλλαξη *lefk1-1*, όπου το αμινοξύ Γλυκίνη-373 έχει μετατραπεί σε α -Ασπαρτικό οξύ στη θέση 373 (G₃₇₃ → D), η τιμή της πιθανότητας για λειτουργικό σινιάλο εξαγωγής από τον πυρήνα NES αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με την τιμή που προκύπτει όταν στη θέση βρίσκεται το αμινοξύ Γλυκίνη (Εικόνα 1.6). Συνεπώς, η βιοπληροφορική υποδηλώνει ότι η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης *lefk1-1* έχει μεγαλύτερη δυναμική να εξέρχεται από τον πυρήνα του φυτικού κυττάρου σε σχέση με την φυσιολογική πρωτεΐνη.

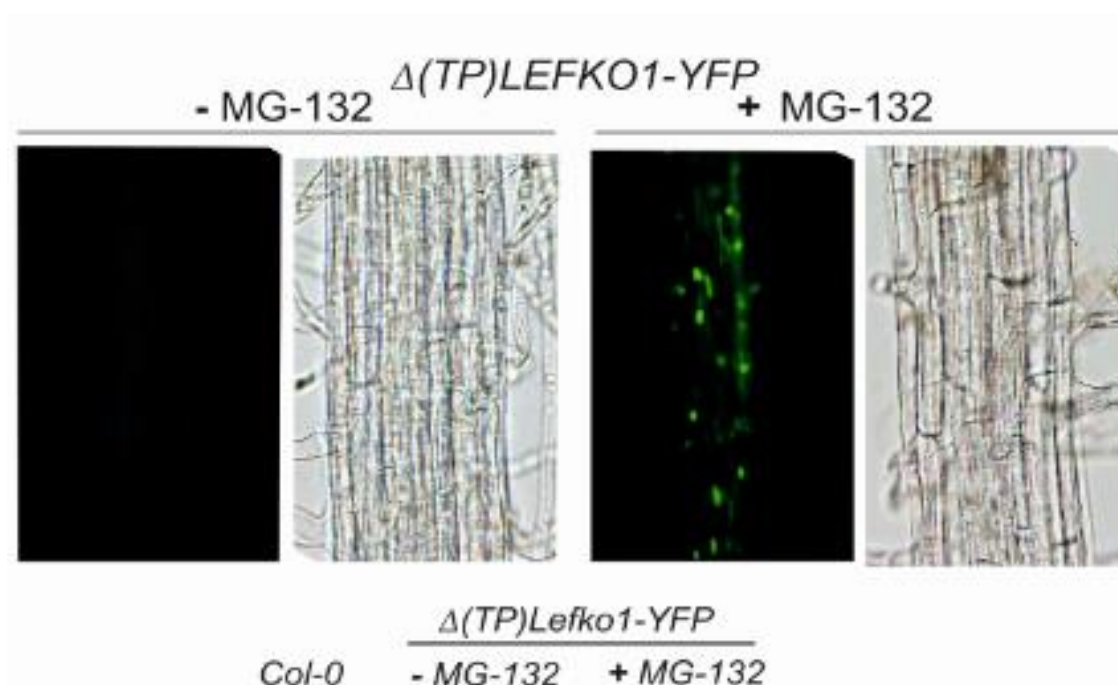


Εικόνα 1.6: Γραφική απεικόνιση της πρόβλεψης για αμινοξική ακολουθία που πιθανόν να αποτελεί σινιάλο εξόδου της πρωτεΐνης από τον πυρήνα εφαρμόζοντας το πρόγραμμα NetNES v1.1

- (Α) Τα αποτελέσματα πρόβλεψης για την αμινοξική ακολουθία που αποτελείται από τα αμινοξέα 370-380 της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Η τιμή ξεπερνά οριακά το όριο αποδοχής ώστε η πρόβλεψη για αναγνώριση περιοχής NES να είναι αποδεκτή
- (Β) Η τιμή όμως της πρόβλεψης που προκύπτει με την αμινοξική υποκατάσταση της ίδιας περιοχής της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης αυξάνεται εντυπωσιακά.

Σκοπός της μελέτης

Η πρωτεΐνη LEFKOTHEA, αν και διαθέτει τα απαραίτητα σινιάλα για στόχευση στον πυρήνα, δεν καθίσταται δυνατή η ανεύρεσή της στον πυρήνα κυττάρων σταθερώς μετασχηματισμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* του οικότυπου *Col-0*, παρά μόνον όταν προηγείται χειρισμός με τον χημικό αναστολέα του 26S- πρωτεασώματος MG-132 (Εικόνα 1.7). Αντιθέτως, εντοπίζεται σε ζωντανά, παροδικώς μετασχηματισμένα κύτταρα καπνού κατασκευών του γονιδίου *LEFKO1* όπου περιέχεται συντηγμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη μάρτυρα YFP επιβεβαιώνοντας την δυαδική τοποθέτηση της πρωτεΐνης στα δύο υποκυτταρικά διαμερίσματα.



Εικόνα 1.7: Μικροσκοπική παρατήρηση μόνιμα μετασχηματισμένων *Arabidopsis thaliana Col-0* 6 ημερών με την κατασκευή $\Delta T P$ -Lefko1-YFP πριν και μετά το πέρας 6 ωρών από την εφαρμογή 100μM MG132 όπου και ανιχνεύεται σήμα φθορισμού στο φίλτρο GFP.

Συνοπλογίζοντας τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα, ως μία πιθανή αιτία για την απουσία της πρωτεΐνης από τον πυρήνα, ενώ διαθέτει όλα τα απαραίτητα στοιχεία στόχευσης στο συγκεκριμένο διαμέρισμα, είναι η αποδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα. Τα Destruction Boxes (D-Boxes) αποτελούν τα σινιάλα που πρέπει να φέρει μία πρωτεΐνη προκειμένου να αναγνωριστεί από το μονοπάτι της Ουμπικουιτίνης/26S πρωτεασώματος και να καταστραφεί. Η LEFKOTHEA αποτελείται από 2 Destruction Boxes (D-Boxes) τα οποία και βρέθηκαν βάσει βιοπληροφορική ανάλυσης της αμινοξικής της ακολουθίας. Προκειμένου να εξεταστεί αν το συγκεκριμένο μονοπάτι ευθύνεται για την μη παρουσία της

πρωτεΐνης στον πυρήνα, θα δημιουργηθούν κατασκευές του γονιδίου *LEFKOTHEA1* με το γονίδιο YFP, οι οποίες θα φέρουν μεταλλάξεις στις ακολουθίες των δύο D-Boxes και συγκεκριμένα αμινοξικές αντικαταστάσεις. Εάν η υπόθεση εργασίας είναι ορθή, στόχο αποτελεί η αλλαγή της ισορροπίας της LEFKOTHEA ανάμεσα τον πυρήνα και τον χλωροπλάστη με το να εμποδιστεί η αποδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα.

2. Υλικά και μέθοδοι

Φυτικό υλικό

Για να πραγματοποιηθεί το παρόν πείραμα έγινε χρήση των ακολούθων υλικών :

- φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου, οικοτύπου *Columbia* (Col-0 N1093) της οικογένειας *Brassicaceae*.
- Φυτά *Nicotiana benthamiana* της οικογένειας *Solanaceae*

Σύσταση και προετοιμασία θρεπτικού υλικού ανάπτυξης φυτών

Τα φυτά ,με τα οποία καταστάθηκε εφικτό το συγκεκριμένο πείραμα μεγάλωσαν υπό συγκεκριμένες και άκρως ελεγχόμενες συνθήκες εντός του εργαστηριακού χώρου.

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των φυτών είναι

½ x MS (Murashige & Skoog, 1962, Duchefa Biochemie B.V.) σε τρυβλία petri, η σύνθεση του οποίου περιγράφεται στον ακόλουθο πίνακα:

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (g ανά 100mL)
MS (including vitamins, DUCHEFA)	0,22
D - Sucrose	1
MES - monohydrate	0,05
Phytigel	0,3
ddH ₂ O	μέχρι 100mL

- ✓ MS: αποτελεί μίγμα μικροστοιχείων, μακροστοιχείων και βιταμινών που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των φυτών.
- ✓ Σουκρόζη: συνιστά την πηγή των απαραίτητων υδατανθράκων.
- ✓ MES: χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του pH του θρεπτικού διαλύματος.
- ✓ Phytigel: αποτελεί το σταθεροποιητικό μέσο του υποστρώματος

Η τελική ρύθμιση της τιμής του pH= 5,7 του υποστρώματος πραγματοποιείται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος KOH 1N και μέτρηση με pHμετρο, μετά την ομογενοποίηση των υπόλοιπων συστατικών, χωρίς τη προσθήκη του

στερεοποιητικού μέσου. Το θρεπτικό αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1,5 atm για περίπου 20 λεπτά. Στη συνέχεια, αφήνεται σε υδατόλουτρο μέχρις ότου η θερμοκρασία σταθεροποιηθεί στους 55°C και εν συνεχεία, το θρεπτικό διάλυμα τοποθετείται σε τρυβλία petri με χρήση απαγωγού νηματικής ροής, όπου επικρατούν ασηπτικές συνθήκες, και φυλάσσεται στους 4°C.

Προετοιμασία και συνθήκες ανάπτυξης φυτικού υλικού

Τα σπέρματα ενυδατώθηκαν για 24 ώρες σε θερμοκρασία 4°C προκειμένου να διακοπεί ο λήθαργος. Η διαδικασία τοποθέτησης των σπερμάτων στο θρεπτικό υλικό πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής, υπό ασηπτικές συνθήκες, ως εξής:

- Τα σπόρια απολυμαίνονται σε διάλυμα 20% χλωρίνη – 0,01% Triton X-10, 2 φορές επί 3 λεπτά maximum.
- Ακολουθούν 5 ξεπλύματα με αποστειρωμένο ddH₂O, ώστε να αραιωθεί και να απομακρυνθεί σταδιακά πλήρως η χλωρίνη.
- Τα σπόρια τοποθετούνται σε σειρά στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με χρήση πιπέτας Gilson, διατηρώντας κατάλληλες αποστάσεις που να επιτρέπουν τη σωστή ανάπτυξη των φυτών.
- Τα τρυβλία ασφαλίζονται με parafilm και τοποθετούνται σε όρθια θέση σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως/ 8 ώρες σκοτάδι και σχετική υγρασία ~50%).

Τα σπέρματα των φυτών βλαστάνουν μετά την πάροδο 3 ημερών περίπου σε ελεγχόμενες συνθήκες βλάστησης. Αρχικά εμφανίζεται η εμβρυακή ρίζα και στη συνέχεια ακολουθεί η έκπτυξη των κοτυληδόνων του φυτού. Σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης τα φυτά αναπτύσσονται στα τρυβλία για διάστημα δύο εβδομάδων και στη συνέχεια μεταφυτεύονται σε γλαστράκια με χώμα, όπου συνεχίζεται η ανάπτυξη μέχρι τη δημιουργία απογόνων και το τέλος του βιολογικού τους κύκλου.

Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση τμημάτων DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθούν σε κάποιο φορέα χρησιμοποιήθηκε η KAPA HiFi DNA Polymerase (1 U/μl) (KK2101), ενώ για κάθε άλλη αντίδραση PCR η DyNAzyme EXT Polymerase (1U/μL) της FINNZYMES.

Ένα γενικό πρωτόκολλο για την ενίσχυση τμημάτων DNA είναι το ακόλουθο:

Συστατικά αντίδρασης	Πυκνό διάλυμα	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10x	1x	5μl
dNTPs	2 mM	200μM	5μl
Ευθύς εκκινητής	3μM	300nM	5μl
Κάτω εκκινητής	3μM	300nM	5μl
DNA μήτρα	-	10ng gDNA	2μl
DNA πολυμεράση : DyNAzyme™ EXT ⁽¹⁾ ή KAPA HiFi DNA Polymerase	1 unit/μl	1 unit	1μl
ddH₂O	Έως τα 50μl		

⁽¹⁾ Η DyNAzyme™ EXT Πολυμεράση της FINNZYMES έχει το χαρακτηριστικό να προσθέτει αδερίνη στο 3' άκρο του DNA χωρίς να έχει προστεθεί αδερίνη ως μήτρα. Αυτό το γνώρισμα διευκολύνει την κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR σε φορείς όπως ο pGEM κ.ά.

Κάθε ένα από τα συστατικά της αντίδρασης προστίθεται σε σωλήνα χωρητικότητας 0.2ml κατάλληλο για αντιδράσεις PCR. Στη συνέχεια αναμειγνύονται καλά, φυγοκεντρώνονται για λίγο ώστε να συγκεντρωθούν στην άκρη του σωλήνα και τοποθετούνται στην κεφαλή της συσκευής C1000 Thermal Cycler που έχει ήδη προγραμματιστεί με το κατάλληλο πρόγραμμα.

Οι θερμοκύκλοι επιλέχθηκαν με βάση το πρότυπο που παρουσιάζεται παρακάτω :

1 x	Αποδιάταξη του DNA για 2 min στους 94 ⁰ C
15-20 x	Αποδιάταξη στους 94 ⁰ C για 30’’ Υβριδισμός εκκινητών στο αντίστοιχο Tm για 30’’ Επιμήκυνση στους 72 ⁰ C για 2’-8’
1 x	Τελική επιμήκυνση προϊόντος στους 72 ⁰ C για 10 min
	Διατήρηση στους 10 ⁰ C για 5’

(¹) Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης Tm του εκκινητή που υπολογίζεται από τον τύπο: $69.3 + 0.41 * GC\% - 650 / \text{αριθμό βάσεων εκκινητή}$

(²) Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που ενισχύεται με βάση τις προδιαγραφές της θερμοανθεκτικής πολυμεράσης οι οποίες είναι 1.3 - 1.5kb/1 min.

- Όταν τελειώσουν οι PCR αντιδράσεις αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 0.8 %.
- Οι αντιδράσεις αποθηκεύονται στους -20⁰C.

Το παραπάνω αποτελεί ένα πολύ γενικευμένο προφίλ θερμοκρασιών και σταδίων PCR αντίδρασης που επιδέχεται μεγάλο αριθμό παρεμβάσεων ανάλογα με τις επιθυμητές εφαρμογές και ιδιαιτερότητες.

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR της παρούσας εργασίας :

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Tm(°C)
AlbtrXhoI	5’-CCTCGAGAAAACAATGGTAGTGAAGCAGAACAGAGTTC-3’	69.4
Dbox2	5’-AACCAGTTTAGACGCACCCGCCCGCCGTGAGATGACAA -3’	77.4
Dbox3	5’ -TTGTCATCTCACGGCGGGGCGGGTGCCTCTAAACTGGTT-3’	77.4
Dbox4	5’-TCTCTTCAAATTTGCACCTCCACCAAGATTCAAGCGCT - 3’	70.9
Dbox5	5’-AGCGCTTGAATCTTGGTGGAGGTGCAAATTTGAAGAGA-3’	70.9
Albino-Flag	5’-CTATCAATCCTTGTAGTCCTTGTTCATCGTCATCCTT GTAGTCACGCGTCCATGATTCCACAGCACTATTTGC-3’	79.55
NLS KpnI For	5’-AGGTACCGCTGGAGGCGCCACACTTGGTGAT-3’	58.24
YFP-LonRev	5’-AACGCGTGGCCCCAGCGGCCGCAGCAGC-3’	78.29

Πίνακας 2.1 : Παρουσιάζεται η ονομασία, η αλληλουχία και το Tm των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

PCR αποικιών

Ο εντοπισμός αποικιών βακτηρίων (*Escherichia coli* ή *Agrobacterium tumefaciens*), που έχουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χωρίς όμως να είναι δυνατή η δοκιμή της β-γαλακτοσιδάσης και κατά συνέπεια η επιλογή μπλε / άσπρων αποικιών, μπορεί να γίνει με μια απλή αντίδραση PCR μέρους της μικροβιακής αποικίας. Συγκεκριμένα, όταν είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία του τμήματος DNA που πρέπει να υποκλωνοποιηθεί στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και να περιέχεται στο μικροοργανισμό, σχεδιάζονται εκκινητές και με μια απλή αντίδραση PCR πιστοποιείται ή όχι η ένθεση. Χρησιμοποιώντας την τεχνική αυτή η πιστοποίηση γίνεται σύντομα ενώ σε σύντομο χρονικό διάστημα από τη στιγμή που αναλυθούν τα αποτελέσματα του PCR μπορεί να αναπτυχθεί καλλιέργεια του μικροοργανισμού που φέρει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

- Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα συλλέγεται και μεταφέρεται μια βακτηριακή αποικία από το στερεό θρεπτικό μέσο σε σωλήνα erpendorf που έχει 15 μl ddH₂O και διατηρείται στους 4⁰C.
- Στην αντίδραση PCR προστίθενται τα συστατικά που αναφέρθηκαν προηγουμένως με τη διαφορά ότι αντί για gDNA ως μήτρα προστίθενται περίπου 3μl από τα 15 μl αιωρήματος βακτηριακών κυττάρων.
- Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται και ο χρόνος επιμήκυνσης από το μέγεθος του τμήματος DNA που αναμένεται. Ο αριθμός των θερμοκύκλων είναι 20-25.
- Μόλις οι αντιδράσεις ολοκληρωθούν τα αποτελέσματα αναλύονται σε πηκτή αгарόζης. Για τις θετικές αποικίες μεταφέρονται περίπου 7μl αιωρήματος βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό μέσο LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό.

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αгарόζης με τη βοήθεια μιας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων. Η χρωστική ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο και έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αгарόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Συνήθως ποικίλλει από 0.8 % ως 2 % αгарόζη w/v.

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε διάλυμα 1xTAE.
- Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το μίγμα να γίνει διαφανές.
- Προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0,005% v/v.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθενται 2 μl χρωστικής (loading dye)
- Μετά την πήξη απομακρύνεται η χτένα και προστίθεται κατάλληλος όγκος 1X TAE, που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120 V, η οποία ποικίλλει ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού, το μέγεθος της πηκτής και την περιεκτικότητά της σε αγαρόζη.

Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

- Ανάλογα με το μέγεθος του προς απομόνωση κλάσματος DNA προετοιμάζεται πηκτή αγαρόζης με συγκέντρωση 0.8 % w/v.
- Το δείγμα αναλύεται με ηλεκτροφόρηση. Εφόσον ο διαχωρισμός του κλάσματος, που πρόκειται να απομονωθεί από τα υπόλοιπα είναι ικανοποιητικός, αφαιρείται η ζώνη που το περικλείει με τη βοήθεια κοπιδιού.
- Το κομμάτι της πηκτής τοποθετείται σε φιαλίδιο Eppendorf 1,5ml.
- Εν συνεχεία τοποθετείται στους – 80°C για 15min
- Ακολουθεί απομόνωση DNA με βάση το πρωτόκολλο της QIAquick Gel Extraction Kit

Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Συνήθως οι πέψεις DNA από ενδονουκλεάσες περιορισμού λαμβάνουν χώρα σε όγκο 40 μλ.

- Σε φιαλίδιο eppendorf προστίθενται κατάλληλος όγκος ddH₂O, 1/10 του όγκου 10x του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, το DNA και τέλος το ένζυμο περιορισμού:

10 x ρυθμιστικό διάλυμα:	10%
Δείγμα DNA:	μέγιστο 80%
Ενδονουκλεάση περιορισμού:	μέγιστο 10%

- Ανάμιξη του δείγματος και επώαση για 1h30'
Η άριστη θερμοκρασία δράσης διαφέρει μεταξύ των ενζύμων περιορισμού. Η πλειονότητα όμως λειτουργεί άριστα στους 37⁰C.

Ενοποίηση τμημάτων με κολλώδη άκρα

Η διαδικασία της ενοποίησης στηρίζεται στην ιδιότητα της T4 DNA λιγάσης να αναγνωρίζει άκρα και να συνδέει τμήματα με συμπληρωματικά (5' ή 3' προεξέχοντα) ή τυφλά άκρα. Οι χρησιμοποιούμενοι πλασμιδιακοί φορείς καθίστανται γραμμικοί μετά από πέψη με ένζυμο περιορισμού, οπότε είναι δυνατή η ενοποίησή τους με κατάλληλο τμήμα DNA μέσω της λιγάσης.

Ο πλασμιδιακός φορέας καθώς και το κλάσμα DNA, του οποίου η κλωνοποίηση επιδιώκεται, απομονώνονται και καθαρίζονται από πηκτή αγαρόζης όπως περιγράφηκε στην παράγραφο “Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης”. Ο τελικός όγκος στον οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση είναι 20 μλ.

Σε φιαλίδιο eppendorf προστίθενται:

1. Κατάλληλη ποσότητα DNA, ώστε με δεδομένη ποσότητα πλασμιδιακού φορέα (συνήθως 25ng) να επιτυγχάνεται η επιθυμητή αναλογία μορίων τμήματος DNA: φορέα. Συνήθως χρησιμοποιείται αναλογία ίση με τη μονάδα αλλά και αναλογίες 3:1 ή 1:3 λειτουργούν ικανοποιητικά.
2. Κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος (Ligation buffer) 10x, μέχρι τελικής συγκέντρωσης 1x.
3. 1μl T4 DNA λιγάσης (1U/μl, #2011A, Takara).
4. ddH₂O μέχρι συμπλήρωσης του όγκου της αντίδρασης.

Το δείγμα αναμιγνύεται και τοποθετείται για 4-12 ώρες στους 16⁰C

Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός

Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* με πλασμιδιακό DNA

- Σε 200μl “δεκτικών” βακτηριακών κυττάρων DH5a προστίθενται 10-50ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μίγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στον πάγο για 30min.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος για 2-3 min στους 42°C.
- Προσθήκη 1.3ml θρεπτικού μέσου LB (37°C) ενώ το δείγμα βρίσκεται στους 42°C και επώαση στη συνέχεια στους 37°C για 1 ώρα.
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 13000r/min για 1min και απομάκρυνση των 4/5 του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος και επίστρωση κατάλληλης ποσότητας του διαλύματος σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB που περιέχει και κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής που διαφέρει κατά περίπτωση. Σε περίπτωση χρήσης πλασμιδιακού φορέα που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης υπάρχει δυνατότητα επιλογής μπλε/άσπρων αποικιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη στο θρεπτικό μέσο του χρωμοφόρου υποστρώματος X-gal και του παράγοντα IPTG που δρα σαν επαγωγέας του υποκινητή του lacZ γονιδίου.
- Επώαση των τρυβλίων για 12-16 ώρες σε θάλαμο 37°C.

Προετοιμασία ηλεκτροδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens*

- Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) αναπτύσσεται σε 2ml υγρό θρεπτικό μέσο LB για 6 ώρες στους 28°C.
- 0.1ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 28°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει $O.D_{550} = 0.5-0.7$
- Τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση για 10 min στις 3500 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 100ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v σε κρύο αποστειρωμένο H₂O) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 50ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 2ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται.

- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 1ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) (πυκνότητα 10^{11} - 10^{12} βακτήρια/ml). Δείγματα των 45μl μοιράζονται σε φιαλίδια erppendorf και καταψύχονται αμέσως με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80°C .

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* με ηλεκτροπόρωση

- Σε 40μl δεκτικών κυττάρων προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται στον πάγο για 5min.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε παγωμένη κυβέττα ηλεκτρισμού διαμέτρου 0.2cm.
- Εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός. Οι παράμετροι για το σύστημα της BioRad® Gene PulserII είναι : χωρητικότητα 25μF, αντίσταση 400Ω ή 600Ω και ηλεκτρικό πεδίο 1.8 kV χρονικής διάρκειας 8-12msec.
- Αμέσως μετά ακολουθεί προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμιξη του δείγματος και επώαση για 2-3 ώρες στους 28°C .
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 1min στις 10000 στροφές/λεπτό και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100μl θρεπτικού μέσου LB.
- Όλη η ποσότητα του δείγματος επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει ως μέσο επιλογής κατάλληλα αντιβιοτικά για την επιλογή του *Agrobacterium*, του πλασμιδίου Ti και του δυαδικού πλασμιδιακού φορέα.
- Επώαση των τρυβλίων για 36-48 ώρες σε θάλαμο 28°C .

Για να επιλεγούν τα μετασχηματισμένα κύτταρα *Agrobacterium* με τον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα εφαρμόζεται η συνδυασμένη δράση τριών αντιβιοτικών. Η επιλογή γίνεται σε στερεά τρυβλία LB που περιέχουν 50mg/L Ριφαμπικίνη για την επιλογή των κυττάρων του *Agrobacterium*, 50mg/L Τζενταμυκίνη για την επιλογή του Ti πλασμιδίου του στελέχους GV3101 και 50mg/L Καναμυκίνη για την επιλογή του δυαδικού φορέα.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *Escherichia coli*

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης

- Μονή βακτηριακή αποικία, που περιέχει το προς απομόνωση πλασμίδιο, καλλιεργείται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB στους 37°C για 12 ώρες με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής.
- Από αυτή την καλλιέργεια 1.5ml μεταφέρεται σε φιαλίδιο erpendorf και φυγοκεντρείται για 1min στις 13000 στροφές/λεπτό.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 μl διαλύματος P1.
- Προσθήκη 200μl από το διάλυμα λύσης P2. Ακολουθεί έντονη μίξη μέχρι το δείγμα να γίνει διαυγές.
- Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για το πολύ 5 λεπτά.
- Προσθήκη 200μl διαλύματος 3M/5M CH₃COOK και ανάμιξη.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 20 min στις 13000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό φιαλίδιο erpendorf. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για 20 min στις 13000 στροφές/λεπτό.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό φιαλίδιο erpendorf. Προστίθεται μισός όγκος ισοπροπανόλης. Ανάμιξη και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10-20 λεπτά στις 13000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 500 μl 70% αιθανόλης. Φυγοκέντρηση του δείγματος για 2-5 min στις 13000 στροφές/λεπτό.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και αφού στεγνώσει το ίζημα διαλύεται σε 30μl dH₂O.

Διαλύματα ενζύμων και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

- **P1 ρυθμιστικό διάλυμα επαναδιάλυσης** : 50mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0 και 100μg/ml RNάση.
- **P2 ρυθμιστικό διάλυμα λύσης** : 0.2N NaOH, 1% (w/v) SDS
- **3M/5M CH₃COOK** : 60ml 5M οξικού καλίου pH 4.8-5.2 αναμιγνύονται με 11.5ml οξικού οξέος και 28.5ml dH₂O
- **RNάση** : Διάλυμα RNάσηςA 10mg/ml σε 10mM Tris-HCl pH7.4, 15mM NaCl. Βρασμός του διαλύματος για 15min. Διακοπή για 20min και

επανάληψη βρασμού - έτσι καταστρέφονται υπολείμματα DNAσης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη βοήθεια κολώνας QIAGEN

Όταν απαιτείται το πλασμιδιακό DNA να είναι υψηλής καθαρότητας, η απομόνωση πραγματοποιείται με τη βοήθεια κολώνας QIAGEN [QIAprep Spin Miniprep Kit (Cat No 27104)] βάσει του πρωτοκόλλου που παρέχει η εταιρεία.

Μετασχηματισμός *Arabidopsis thaliana*

Μέθοδος διείσδυσης με εφαρμογή κενού σε ολόκληρα φυτά *A.thaliana*

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους Bechtold et al. (1993). Είναι προσαρμοσμένη για τη χρησιμοποίηση οικοτύπων *Columbia* και *Landsberg erecta*. Με επιμέρους όμως τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για το σταθερό μετασχηματισμό άλλων οικοτύπων *Arabidopsis thaliana*. Το ποσοστό επιτυχίας σταθερού μετασχηματισμού ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος και το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν τον αριθμό μετασχηματισμένων φυτών που θα δημιουργηθούν είναι η πυκνότητα της καλλιέργειας και το στέλεχος του *Agrobacterium*, η καλή εφαρμογή του κενού και οι συνθήκες ανάπτυξης των φυτών μετά το μετασχηματισμό. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αυτή, 95% περίπου των φυτών δίνουν μετασχηματισμένα σπέρματα. Το ποσοστό των μετασχηματισμένων σπερμάτων για κάθε φυτό μπορεί να φτάσει το 1 ανά 25 σπέρματα.

Ανάπτυξη φυτών και διεΐσδυση με κατάλληλο στέλεχος *A.tumefaciens*

Σπέρματα *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου *Columbia* αναπτύσσονται όπως περιγράφηκε στην αρχή. Όταν τα φυτά φτάσουν ένα ύψος 10-15cm και τα πρώτα άνθη έχουν σχηματιστεί, είναι έτοιμα να χρησιμοποιηθούν.

Αναπτύσσεται μια καλλιέργεια με το κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium* (που φέρει την επιθυμητή κατασκευή του δυαδικού φορέα) σε 5ml θρεπτικό μέσο LB για 48 ώρες στους 28⁰C.

Τα 5ml της καλλιέργειας μεταφέρονται σε 500 ml θρεπτικό μέσο LB και αναπτύσσονται στους 28⁰C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα φτάσει περίπου OD₆₀₀=1.0.

Τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρούνται για 15 min στις 5000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 600 ml διαλύματος διεΐσδυσης (IM). Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί για άλλες 2 ώρες.

Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε ένα δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 250ml και όλο το δοχείο τοποθετείται σε έναν κάδο κενού. Ένα γλαστράκι που περιέχει 2-3 ανεπτυγμένα φυτά αναποδογυρίζεται και τα φυτά εμβαπτίζονται μέσα στην καλλιέργεια του *Agrobacterium*. Προσέχουμε τα φυτά να είναι βυθισμένα ολόκληρα μέσα στην καλλιέργεια, συμπεριλαμβανομένης της ροζέτας και των δευτερογενών βλαστών που αρχίζουν να εμφανίζονται στη βάση της ροζέτας. Συνίσταται το χώμα να ενυδατώνεται καλά πριν τη διεΐσδυση, ώστε να απορροφά όσο το δυνατό λιγότερη καλλιέργεια *Agrobacterium*. Σε αντίθετη περίπτωση το μολυσμένο χώμα παρεμποδίζει την ανάπτυξη των φυτών.

Ο κάδος κενού κλείνεται αεροστεγώς και με τη βοήθεια μιας αντλίας λαδιού εφαρμόζεται κενό 400 mm Hg, για 5-10 λεπτά.

Μεταφορά των φυτών σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασίας 22⁰C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/ 8 ώρες σκοτάδι), μέχρι να κλείσουν τον κύκλο ζωής τους.

Μόλις τα φυτά αφυδατωθούν, γίνεται συγκομιδή των σπερμάτων τους.

Διαλύματα μετασχηματισμού φυτών

- **Διάλυμα διεΐσδυσης (IM)** : Σε 600ml ddH₂O διαλύονται 1.32gr MS θρεπτικό διάλυμα αλάτων, 1x B5 βιταμίνες (από 500x), 30g σακχαρόζη, 0,3g MES, pH 5.7 με 1N KOH. Προστίθενται 0,01 mg/l BAP και 81μl Silwet L-77 (Osi Specialties).

- **Stock βιταμινών 500X B5** : 2.5gr Ινοσιτόλη, 250mg Θειαμίνη, 25mg Νικοτινικό οξύ, 25mg Πυριδοξίνη σε 50ml ddH₂O. Αποθήκευση στους -20°C.
- **BAP** : 5mg/ml σε DMSO. Αποθήκευση στους -20°C.

Επιλογή των μετασηματισμένων φυτών της T1 γενιάς

- Σπέρματα T1 γενιάς απολυμαίνονται και επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο MS. Το θρεπτικό μέσο είναι εμπλουτισμένο με κατάλληλα αντιβιοτικά που θα βοηθήσουν την ορθή επιλογή των μετασηματισμένων φυτών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά Υγρομυκίνη, Καναμυκίνη και Σεφοταξίνη.
- Τα τρυβλία μεταφέρονται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι).
- Τα τρυβλία επωάζονται σε αυτές τις συνθήκες για περίπου 14 ημέρες.
- Μετά από 5-7 ημέρες τα μετασηματισμένα σπέρματα αναπτύσσονται σε σκούρα πράσινα φυτά και έχουν φυσιολογικό φαινότυπο. Η ρίζα τους είναι κοντή αλλά φυσιολογική. Τα μη μετασηματισμένα σπέρματα αναπτύσσουν πολύ κοντό ριζικό σύστημα και έχουν ανοιχτές πράσινες ή υποκίτρινες κοτυληδόνες. Μετά τη δέκατη ημέρα ο διαχωρισμός των μετασηματισμένων φυτών είναι πλέον εμφανής. Τα μετασηματισμένα φυτά αναπτύσσουν σχεδόν φυσιολογική ρίζα και δευτερο ζευγάρι φύλλων, ενώ η ανάπτυξη των μη μετασηματισμένων επιβραδύνεται και τελικά νεκρώνονται.
- Μετά την επιλογή, τα μετασηματισμένα φυτά μεταφέρονται στο χώμα, όπου και παραμένουν μέχρι να κλείσουν τον κύκλο ζωής τους.

Παροδική έκφραση σε φύλλα καπνού

- Χρησιμοποιείται κατάλληλο στέλεχος του *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, μετασηματισμένο με πλασμιδιακό φορέα. Ο μετασηματισμός πραγματοποιείται με ηλεκτροπόρωση.
- Μετά την ηλεκτροπόρωση, τα βακτήρια αφήνονται να αναπτυχθούν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB, με τριπλή επιλογή (ριφαμικίνη Rif, τζενταμυκίνη Gen, και καναμυκίνη Kan). Τα αγροβακτήρια αναπτύσσονται στους 28°C και η ανάπτυξή τους διαρκεί έως και τρεις ημέρες.
- Επιλογή μονής αποικίας και καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB (5ml) με τριπλή επιλογή (ριφαμικίνη Rif, τζενταμυκίνη Gen, και καναμυκίνη Kan).

Ανάπτυξη για μία - δύο ημέρες έως ότου θολώσει καλά. Για ταχύτερη ανάπτυξη τοποθετούνται σε 3ml θρεπτικού μέσου.

- Ακολουθεί επανακαλλιέργεια σε 3 ml θρεπτικού μέσου με διπλή επιλογή (τζενταμυκίνη Gen και καναμυκίνη Kan, 50μg/ml O/N)
- Φωτομετρούνται οι καλλιέργειες σε OD₆₀₀, και τοποθετούνται σε erpendorfs (ανά 1ml)
- Φυγοκέντρωση στις 3500 rpm για 10 λεπτά
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα ξεπλένεται με 1ml dilution buffer (όσος ο όγκος της αρχικής καλλιέργειας στο erpendorf).Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή διότι το βακτηριακό ίζημα μπορεί εύκολα να αποκολληθεί και να χαθεί σημαντικός αριθμός βακτηρίων
- Απομακρύνεται το dilution buffer και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 1ml induction buffer (όσος ο όγκος της αρχικής καλλιέργειας στο erpendorf) όπου και αφήνεται για 3h σε θερμοκρασία δωματίου
- Ακολούθως, φωτομετρούνται ξανά τα βακτηριακά διαλύματα και αραιώνονται, έτσι ώστε να έχουν τελικά την επιθυμητή οπτική πυκνότητα για το infiltration.
- Χρησιμοποιώντας ένεση με μικρή διάμετρο και χωρίς βελόνα, στο κάτω μέρος του φύλλου καπνού, πραγματοποιείται διήθηση των *Agrobacterium tumefaciens* σε όλο το έλασμα του φύλλου.

3. Αποτελέσματα

Ενίσχυση επιθυμητού τμήματος από γενωματικό DNA

In silico ανάλυση προέβλεψε πως η LEFKOTHEA αποτελείται από 2 Destruction Boxes (D-Boxes) τα οποία και ευθύνονται για την αναγνώριση της πρωτεΐνης από το μονοπάτι της Ουμπικουιτίνης/26S πρωτεασώματος (Εικόνα 3.1) με score πολύ πιο υψηλό απ' ό, τι αναφερόταν στη βιβλιογραφία (Heyman et al., 2013).

LEFKOTHEA			
D-BoxA	185 - 188	LLMLSSH RRL L LSKLVHI	4,297
D-BoxB	264 - 267	KFKRLNL RRGL NLKRRHQ	4,514

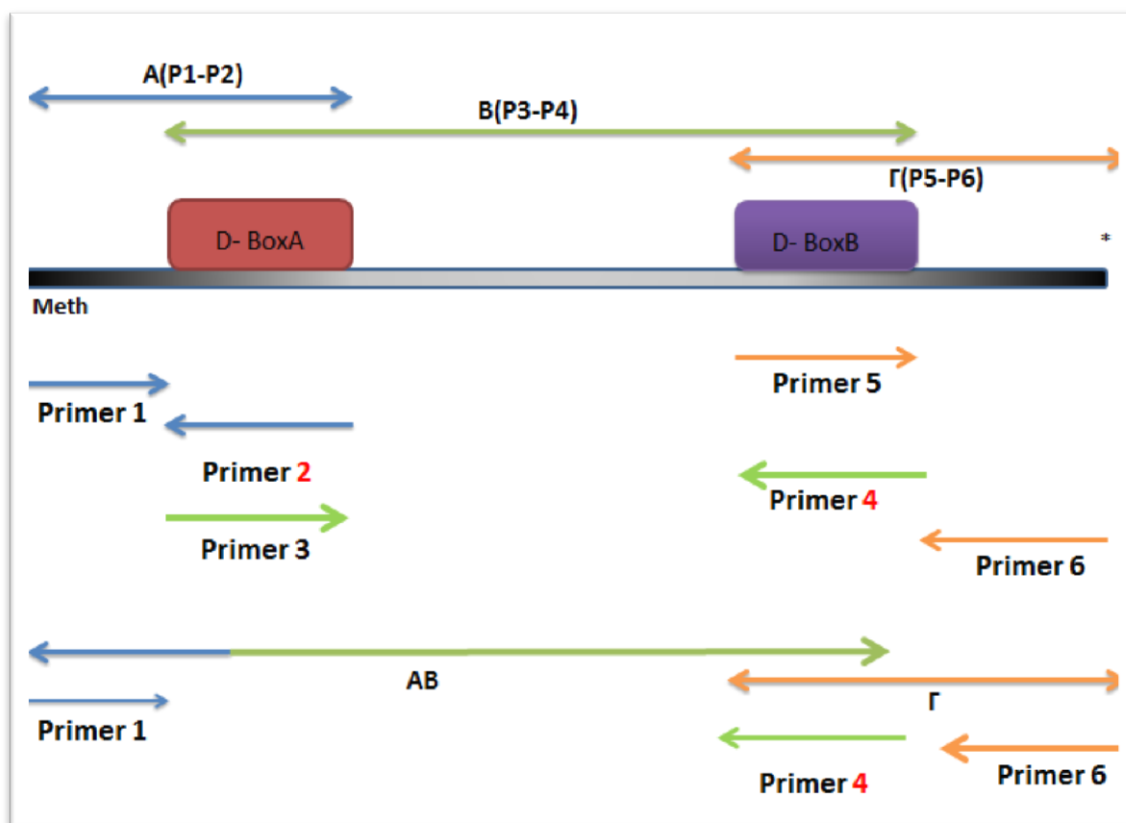
Εικόνα 3.1: Αποτελέσματα ανάλυσης αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης LEFKOTHEA με τη χρήση του προγράμματος GPS-ARM (<http://arm.biocuckoo.org/>)

Τα δεδομένα, όντας ενθαρρυντικά για την ενίσχυση της θεωρίας περί ρύθμισης των επιπέδων της πρωτεΐνης εντός του κυττάρου από τα D-Boxes- 26S-πρωτεάσωμα, έστρεψαν την πειραματική έρευνα προς την δοκιμή αλλαγής των δύο χαρακτηριστικών αλληλουχιών D-Boxes (RxxL) που η πρωτεΐνη LEFKOTHEA φέρει, με αντικατάσταση αμινοξέων από άλλα προκειμένου να μην αποτελούν πια μοτίβα. Οι τροποποιημένες αλληλουχίες αναλύθηκαν και πάλι με τη βοήθεια του προγράμματος GPS-ARM (<http://arm.biocuckoo.org/>) και τα scores των άλλων μοτίβων, είχαν μειωθεί σε τέτοιο βαθμό, ώστε να μην αποτελούν πια θέσεις αναγνώρισης για προσθήκη Ουβικουιτίνης (Εικόνα 3.2).

Lefkothea after change			
DBoxA	185-188	LLMLSSH GGAGAL SKLVHI	-
DBoxB	264-267	KFK GGAGG RGLNL KRRHQ	-

Εικόνα 3.2: Αποτελέσματα ανάλυσης αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης LEFKOTHEA ΔDBoxes με τη χρήση του προγράμματος GPS-ARM (<http://arm.biocuckoo.org/>).

Προκειμένου να γίνουν οι επιθυμητές αλλαγές στα τμήματα εκείνα της κωδικής περιοχής της αλληλουχίας του γονιδίου LEFKO1 όπου εδράζονται τα D- Boxes, πραγματοποιήθηκε διαδοχική ενίσχυση τμημάτων με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών (βλέπε Εικόνα 3.3) :

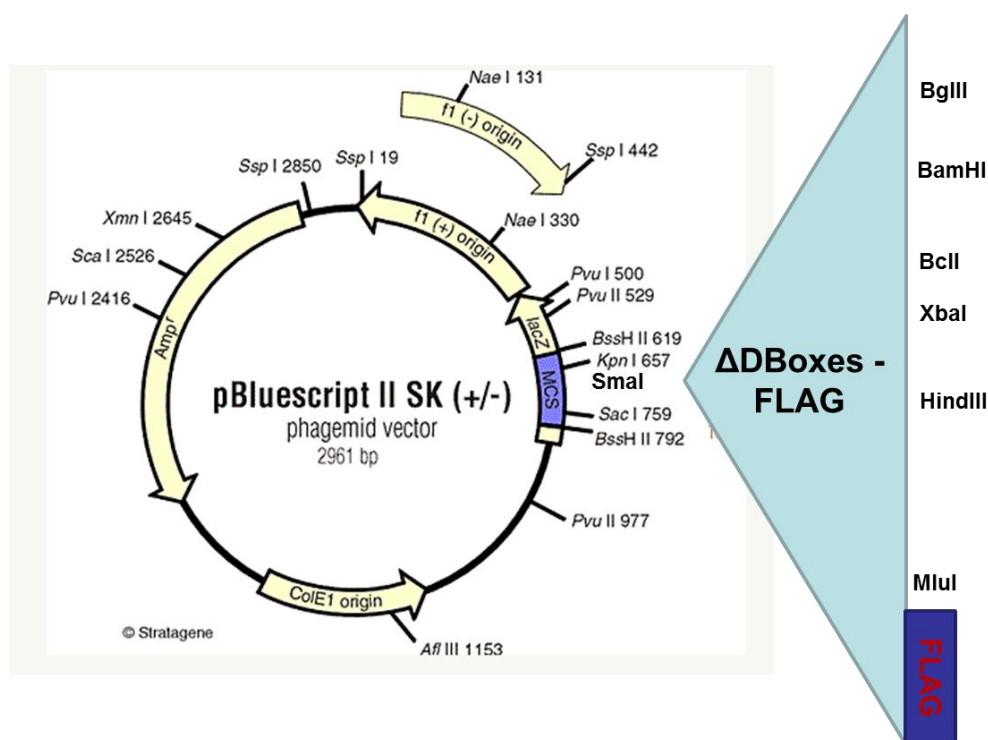


Εικόνα 3.3 : Αναλυτική απεικόνιση των Αλυσιδωτών αντιδράσεων Πολυμεράσης(PCR) που πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να ενισχυθούν ξεχωριστά τα τμήματα A, B, και Γ, να πραγματοποιηθούν οι αλλαγές στα D- Boxes και τελικώς τα επιμέρους τμήματα να ενωθούν.

Αρχικά, ενισχύθηκε το κομμάτι Γ με τη χρήση των εκκινητών 5 και 6, εν συνεχεία του τμήματος A με τους εκκινητές 1 και 2, καθώς και του τμήματος B με τους εκκινητές 3 και 4. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ένωση των τμημάτων A και B με τους εκκινητές 1 και 4, και αυτού του τμήματος AB με το τμήμα Γ με τη χρήση των εκκινητών 1 και 6. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε triple template PCR όπου τα τμήματα A, B, και Γ ενώθηκαν με τους εξωτερικούς εκκινητές 1 και 6. Αυτό κατέστη δυνατό λόγω την επικαλύψεων που υπήρχαν μεταξύ τους (βλέπε Εικόνα 3.3). Επίσης, ενισχύθηκε ξεχωριστά και το πεπτιδίο-σύνθημα για στόχευση στον χλωροπλάστη (TP) ώστε να είναι εφικτή η πραγματοποίηση κατασκευών με και χωρίς το σινιάλο.

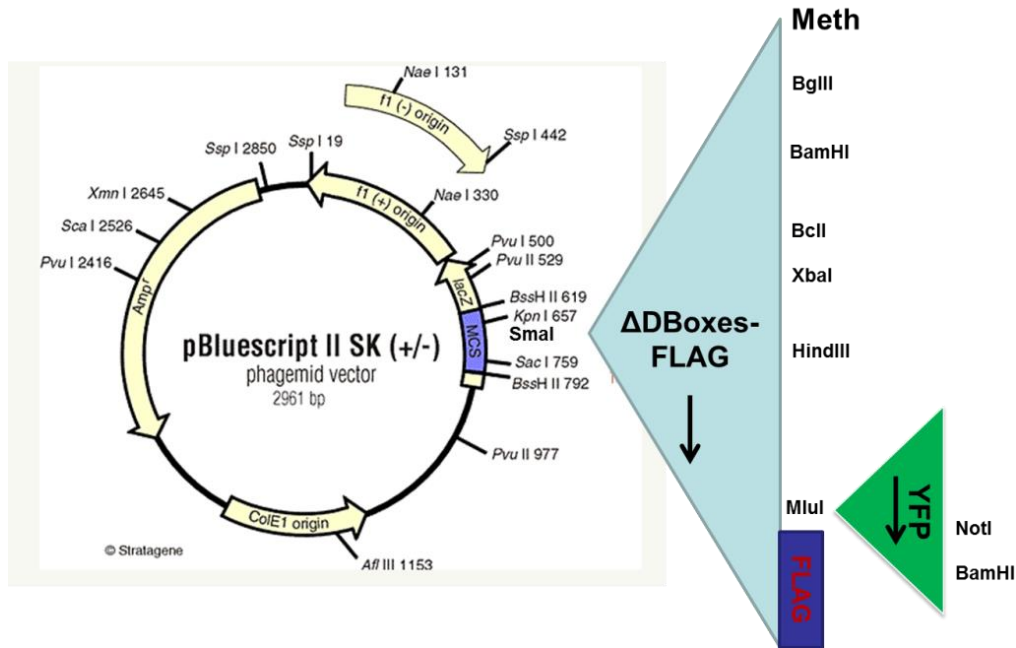
Κλωνοποιήσεις και κατασκευές

Τα ενωμένα τμήματα ΑΒΓ, κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pBluescriptSK(-) στην θέση SmaI(Εικόνα 3.4) και στάλθηκαν για αλληλούχηση(sequencing), όπου και πιστοποιήθηκε πως οι μόνες μεταλλαγές που έφεραν ήταν οι επιθυμητές (Παράρτημα Εικόνα 1&2).



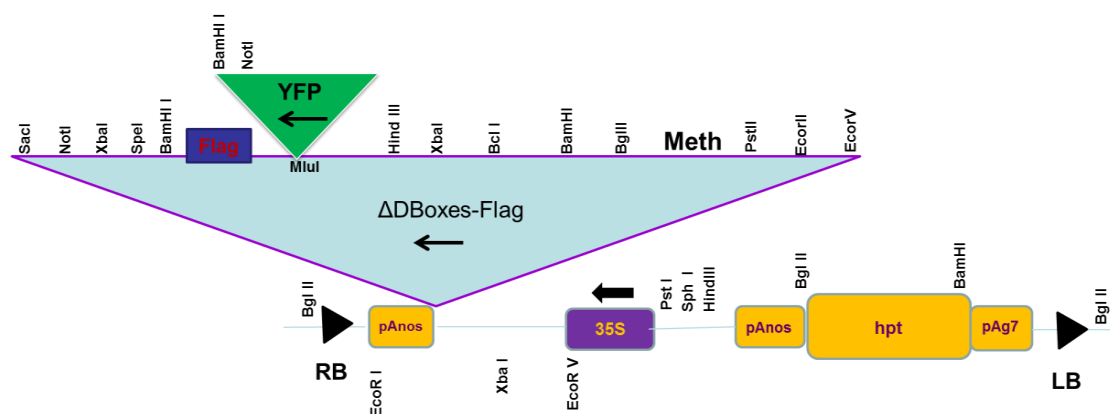
Εικόνα 3.4: Απεικόνιση της πρώτης κλωνοποίησης που πραγματοποιήθηκε στον pBluescriptSK(-) στην θέση SmaI με την κατάλληλη κατεύθυνση.

Εν συνεχεία, εισάγαμε το γονίδιο που κωδικοποιεί για την φθορίζουσα πρωτεΐνη-μάρτυρα YFP στην θέση MluI (Εικόνα 3.5). Έλεγχος έγινε με PCR σε αποικίες *E.coli* (φορά κλωνοποίησης και YFP), καθώς και με διαγνωστικές πέψεις .



Εικόνα 3.5 : Απεικόνιση της δεύτερης κλωνοποίησης που πραγματοποιήθηκε και εισήχθη το YFP στην θέση MluI με την κατάλληλη κατεύθυνση

Η κατασκευή της Εικόνας 3.3, μετά την πέψη με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, κλωνοποιήθηκε στον δυαδικό φορέα έκφρασης HYG-35S στις θέσεις EcoRV/SacI (Εικόνα 3.6).

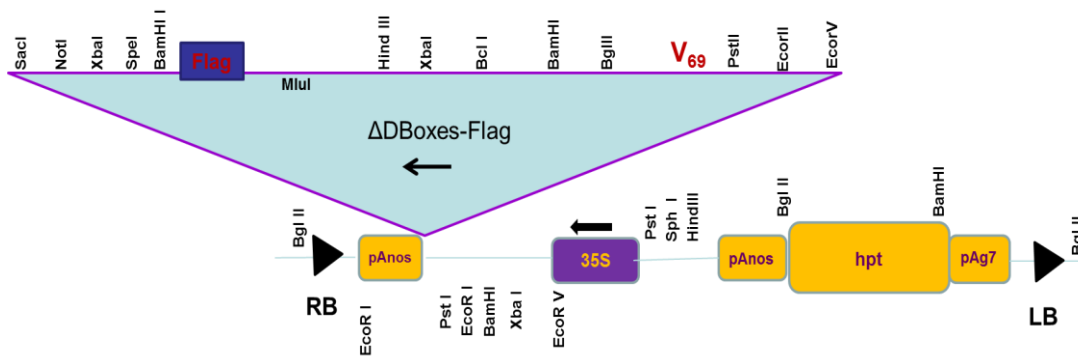


Εικόνα 3.6 : Απεικόνιση της τελικής κλωνοποίησης που πραγματοποιήθηκε και εισήχθη η κατασκευή στον τελικό φορέα HYG-35S στις θέσεις EcoRV/SacI.

Συνολικά, με την ίδια ακριβώς μεθοδολογία, φτιάχτηκαν 4 κατασκευές (Βλέπε παράρτημα Εικόνες 3 & 4 για τα Agarose gels όπου επιβεβαιώνεται με πέψεις η ορθή κλωνοποίηση των τελικών κατασκευών):

1) 35S-pGPTV-hpt-ΔTP-ΔDBoxes-FLAG (w/o TP)

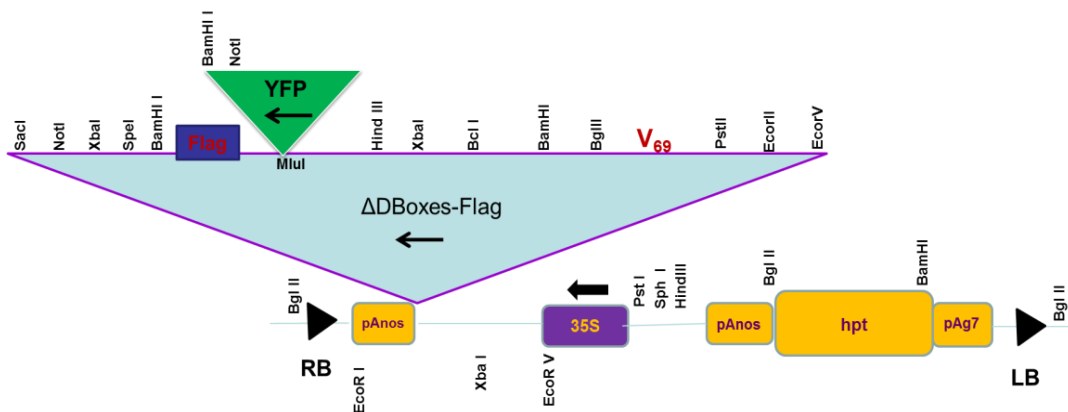
(Έλεγχος έγινε με BamHI, Hind III και EcoRII (έλεγχος ένθεσης και φορέα))



Εικόνα 3.7 Απεικόνιση της τελικής κλωνοποίησης που πραγματοποιήθηκε και εισήχθη η κατασκευή στον τελικό φορέα HYG-35S στις θέσεις EcoRV/SacI.

2) HYG-35S-ΔTP-ΔDBoxes-YFP-FLAG (w/o TP)

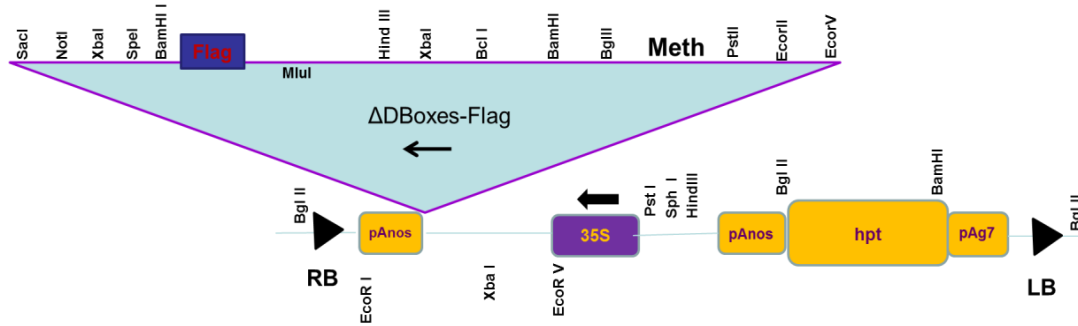
(Έλεγχος έγινε με BamHI, Hind III και EcoRII (έλεγχος ένθεσης και φορέα))



Εικόνα 3.8 Απεικόνιση της τελικής κλωνοποίησης που πραγματοποιήθηκε και εισήχθη η κατασκευή στον τελικό φορέα HYG-35S στις θέσεις EcoRV/SacI.

3) HYG-35S-alb-ΔDBoxes-FLAG

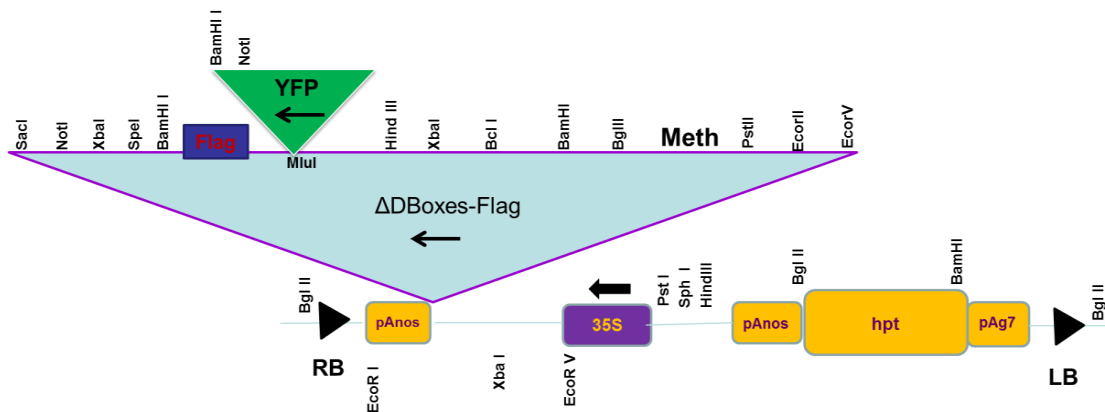
(Έλεγχος έγινε με BamHI, Hind III και EcoRII (έλεγχος ένθεσης και φορέα))



Εικόνα 3.9 Απεικόνιση της τελικής κλωνοποίησης που πραγματοποιήθηκε και εισήχθη η κατασκευή στον τελικό φορέα HYG-35S στις θέσεις EcoRV/SacI.

4) HYG-35S-alb-ΔDBoxes-YFP-FLAG

(Έλεγχος έγινε με BamHI, Hind III και EcoRII (έλεγχος ένθεσης και φορέα))



Εικόνα 3.10 Απεικόνιση της τελικής κλωνοποίησης που πραγματοποιήθηκε και εισήχθη η κατασκευή στον τελικό φορέα HYG-35S στις θέσεις EcoRV/SacI.

Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη **YFP** χρησιμοποιείται ευρέως ως γονίδιο αναφοράς για τη μελέτη της τοπολογίας πρωτεϊνών, φαινόμενων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών και έκφρασης γονιδίων. Με τη χρήση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, η κωδική αλληλουχία της πρωτεΐνης YFP μπορεί να συζευχθεί με άλλες πρωτεΐνες και να σχηματιστεί μια πρωτεΐνη υβρίδιο. Τα υβρίδια αυτά χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ιστοειδικής και υποκυτταρικής τοπολογίας της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Ο φθορισμός της πρωτεΐνης είναι άμεσος, σταθερός και άμεσα ανιχνεύσιμος χρησιμοποιώντας τις κλασικές τεχνικές της μικροσκοπίας φθορισμού.

Με τις 4 αυτές κατασκευές μετασηματίστηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης βακτήρια κατάλληλου στελέχους *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101).

Μελέτη παροδικού μετασχηματισμού φυτών *Nicotiana benthamiana*

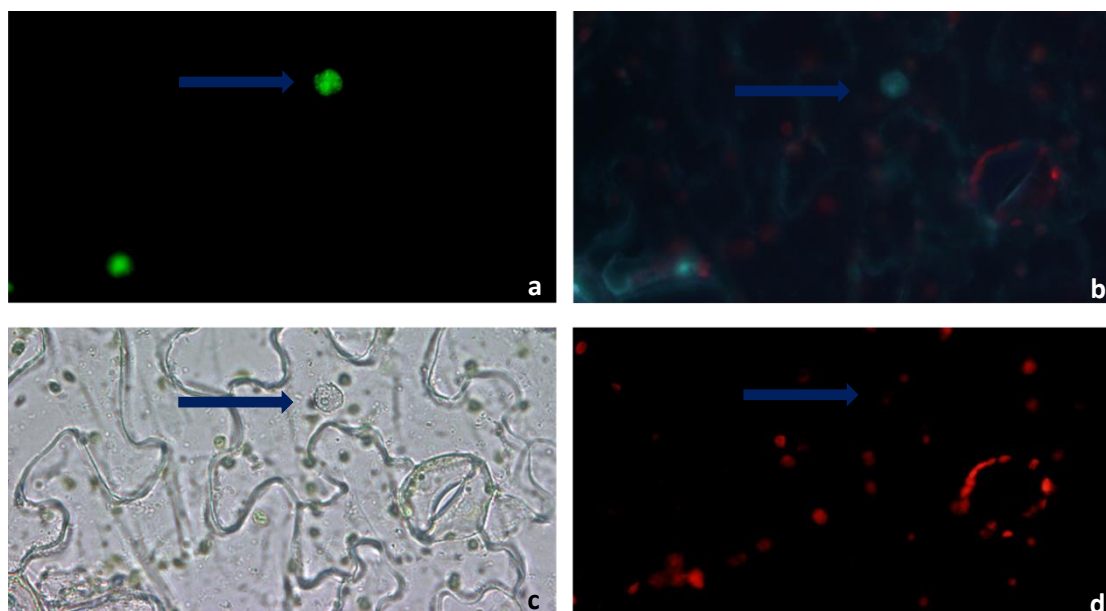
Μία στρατηγική εκτοπικής έκφρασης ενός διαγονιδίου, είναι η παροδική έκφρασή του (transient expression) σε φύλλα καπνού *Nicotiana benthamiana*. Στόχος ήταν ο γρήγορος έλεγχος των κατασκευών.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με το μικροσκόπιο φθορισμού, το οποίο επιτρέπει τον εντοπισμό μακρομορίων στα κύτταρα με παρατήρηση σε φίλτρο GFP και φίλτρο ροδαμίνης, εφόσον αυτά έχουν σημειωθεί με ειδικές φθορίζουσες χρωστικές, όπως η πρωτεΐνη YFP στις 2 από τις 4 διαγονιδιακές κατασκευές :

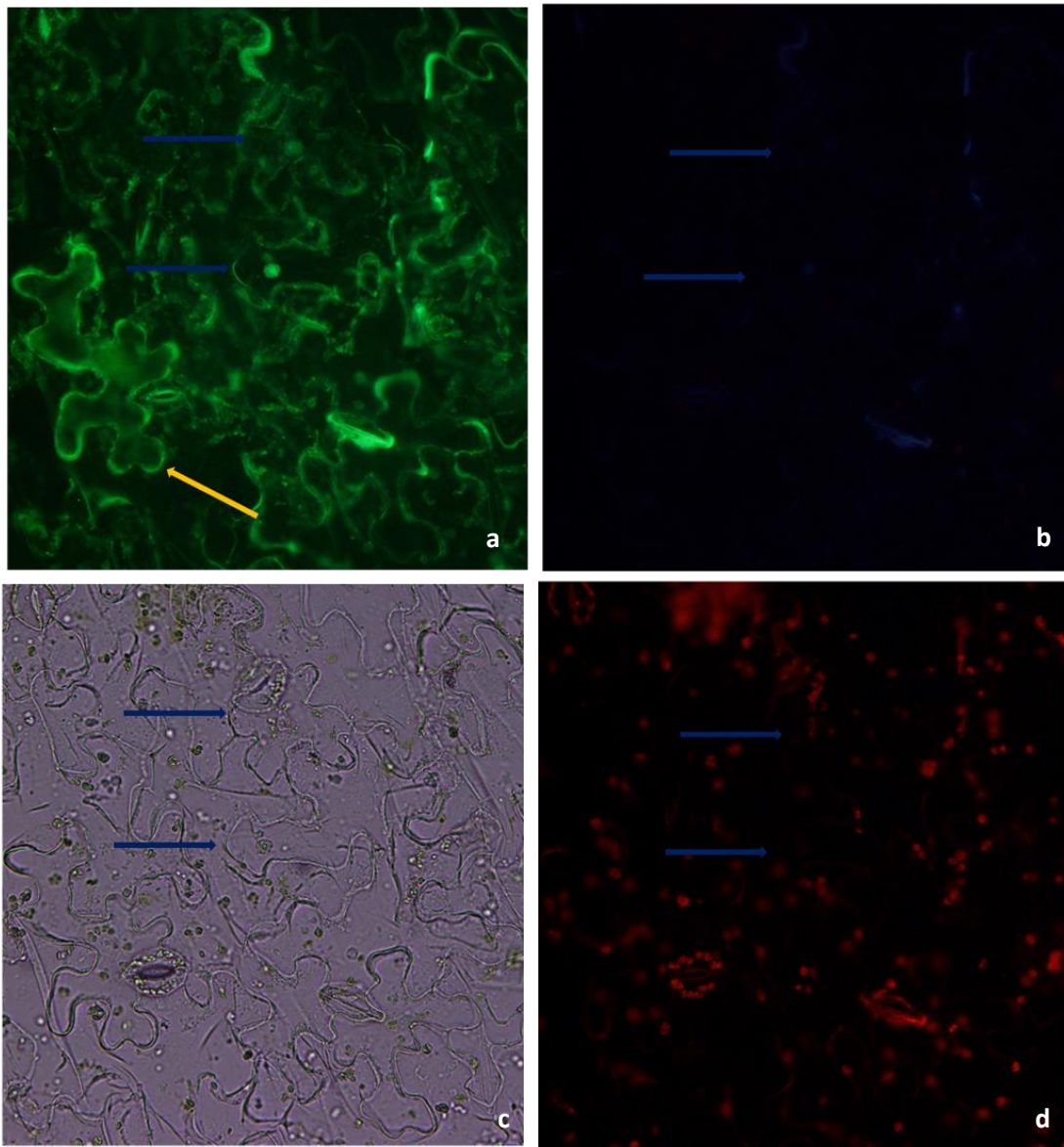
- HYG-35S-ΔTP-ΔDBoxes-YFP-FLAG (w/o TP)
- HYG-35S-alb-ΔDBoxes-YFP-FLAG

Ως κατασκευές –αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες, χωρίς όμως να έχει προηγηθεί αλλαγή των αλληλουχιών που κωδικοποιούν για τα D-Boxes, προκειμένου να έχουμε μέτρο σύγκρισης και να μπορέσουμε να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματά μας. Έτσι, ως control χρησιμοποιήθηκαν :

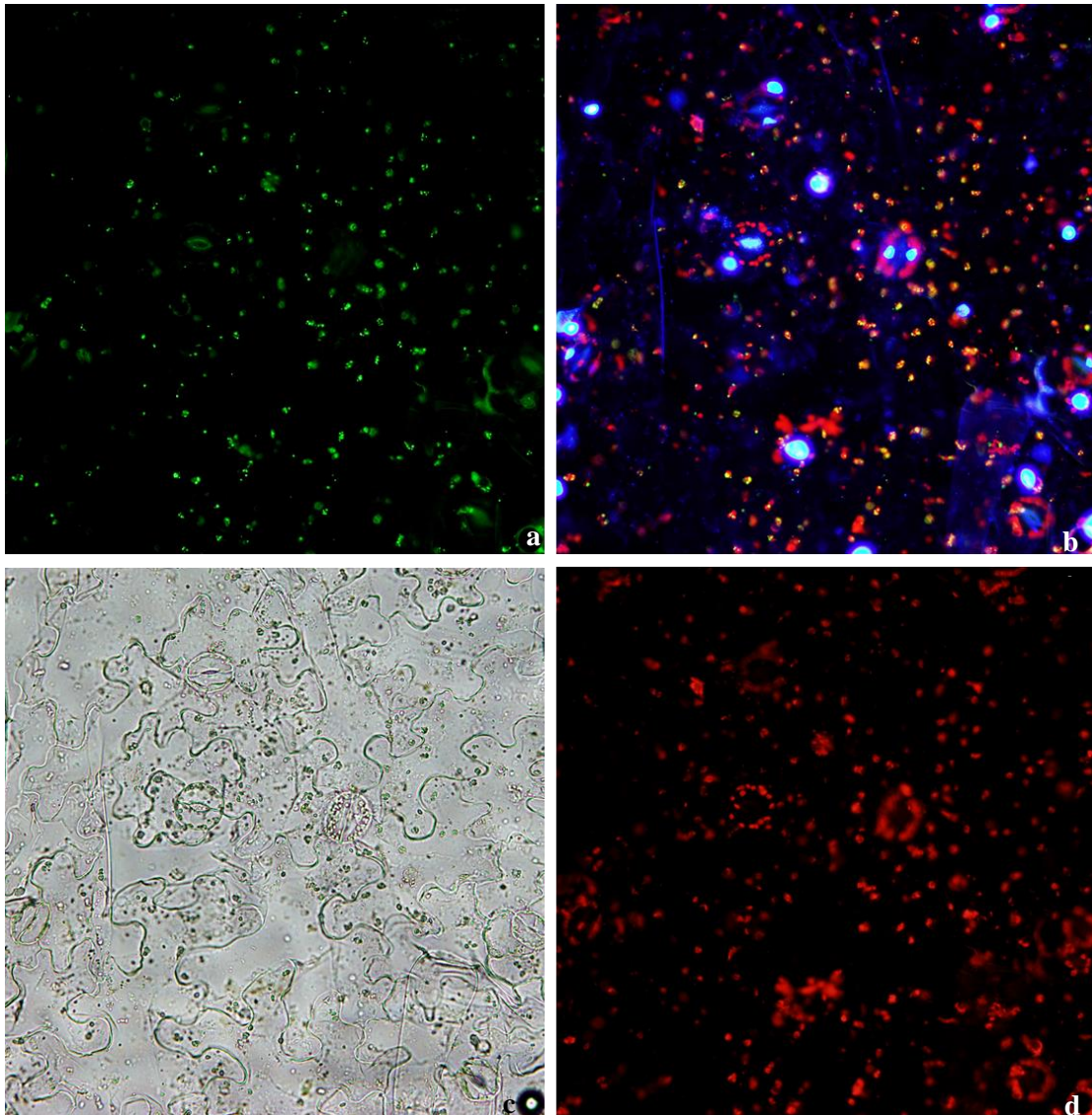
- 35S-pGPTV-hpt-ΔTP-YFP-FLAG για την κατασκευή HYG-35S-ΔTP-ΔDBoxes-YFP-FLAG
- 35S-pGPTV-hpt-alb-YFP-FLAG για την κατασκευή HYG-35S-alb-ΔDBoxes-YFP-FLAG



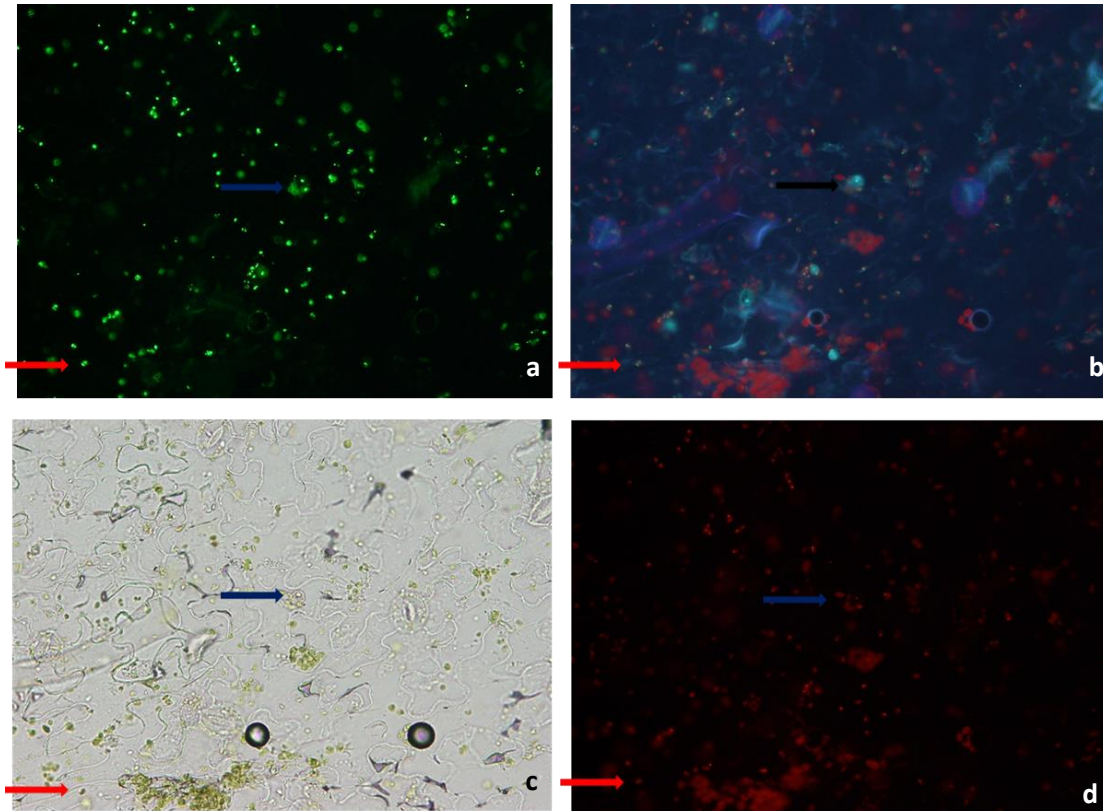
Εικόνα 3.11 : Παροδικός μετασχηματισμός *Nicotiana benthamiana* με την κατασκευή αναφοράς 35S-pGPTV-hpt-ΔTP-YFP-FLAG. Παρατήρηση πυρήνων, ένας εκ των οποίων ενδεικτικά σημειώνεται με μπλε βέλος. Αντίστοιχα, στις φωτογραφίες **a** ως **d** απεικονίζονται το φίλτρο GFP, το φίλτρο που καταγράφει τον μπλε φθορισμό από τη χρώση DAPI του πυρήνα, τον φακό οπτικού τύπου Nomarski και το φίλτρο ροδαμίνης που καταγράφει τον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης.



Εικόνα 3.12 : Αποτελέσματα στόχευσης της κατασκευής **HYG-35S-ΔTP-ΔDBoxes-YFP-FLAG** στον πυρήνα, κάποιιοι εκ των οποίων ενδεικτικά σημειώνονται με μπλε βέλος, ενώ με πορτοκαλί βέλος σημειώνεται ο φθορισμός που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου από πειράματα in planta παροδικής έκφρασης σε επιδερμικά κύτταρα καπνού . Αντίστοιχα, στις φωτογραφίες **a** ως **d** απεικονίζονται το φίλτρο GFP, το φίλτρο που καταγράφει τον το μπλε φθορισμό από τη χρώση DAPI του πυρήνα, τον φακό οπτικού τύπου Nomarski και το φίλτρο ροδαμίνης που καταγράφει τον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης.



Εικόνα 3.13: Παροδικός μετασχηματισμός *Nicotiana benthamiana* με την κατασκευή αναφοράς **35S-pGPTV-hpt-alb-YFP-FLAG**. Παρατήρηση τοποθέτησης πρωτεΐνης. Αντίστοιχα, στις φωτογραφίες **a** ως **d** απεικονίζονται το φίλτρο GFP, το φίλτρο που καταγράφει το μπλε φθορισμό από τη χρώση DAPI του πυρήνα συντηγμένο με το φίλτρο της ροδαμίνης και το φίλτρο GFP, τον φακό οπτικού τύπου Nomarski και το φίλτρο ροδαμίνης που καταγράφει τον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης.



Εικόνα 3.14 : Παροδικός μετασχηματισμός *Nicotiana benthamiana* με την κατασκευή **HYG-35S-alb-ΔDBoxes-YFP-FLAG** . Παρατήρηση πυρήνων, κάποιοι εκ των οποίων ενδεικτικά σημειώνονται με μπλε βέλος, ενώ με κόκκινο βέλος σημειώνεται ο φθορισμός που εντοπίζεται στους χλωροπλάστες. Αντίστοιχα, στις φωτογραφίες **a** ως **d** απεικονίζονται το φίλτρο GFP, το φίλτρο που καταγράφει τον μπλε φθορισμό από τη χρώση DAPI του πυρήνα, τον φακό οπτικού τύπου Nomarski και το φίλτρο ροδαμίνης που καταγράφει τον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης.

Η μικροσκοπική παρατήρηση στόχευσης όλων των κατασκευών πραγματοποιήθηκε σε 4 βιολογικές επαναλήψεις, ούτως ώστε τα αποτελέσματα να χαρακτηρίζονται από επαναληψιμότητα και αξιοπιστία, καθώς επίσης και όλα τα δείγματα παρατηρήθηκαν 72 ώρες μετά την προσβολή των επιδερμικών κυττάρων του φύλλου του καπνού.

Η κατασκευή HYG-35S-ΔTP-ΔDBoxes-YFP-FLAG παρουσίασε στόχευση στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 3.9) όλων των μετασχηματισμένων κυττάρων, ενώ η κατασκευή HYG-35S-alb-ΔDBoxes-YFP-FLAG χαρακτηρίζεται από τοποθέτηση της παραγόμενης πρωτεΐνης κυρίως στους χλωροπλάστες, αλλά πιθανώς να οδηγείται και στον πυρήνα σε μικρότερο όμως ποσοστό, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.10, καθιστώντας δύσκολο τον εντοπισμό της καθώς το σήμα από την στόχευση στους χλωροπλάστες επισκιάζει την ανίχνευση της πρωτεΐνης αναφοράς YFP στον πυρήνα.

Στατιστική καταγραφή του προτύπου υποκυτταρικής τοποθέτησης της κατασκευής HYG-35S-ΔTP-ΔDBoxes-YFP-FLAG αποκάλυψε ότι μειώνεται σημαντικά η αποκλειστική τοποθέτηση της στον πυρήνα (όπως στην κατασκευή αναφοράς

35S-pGPTV-hpt-ΔTP-YFP-FLAG) αφού ο αριθμός των κυττάρων με την πρωτεΐνη ταυτόχρονα στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα αυξάνουν αρκετά.

Μελέτη μόνιμα μετασηματισμένων φυτών *Arabidopsis thaliana*

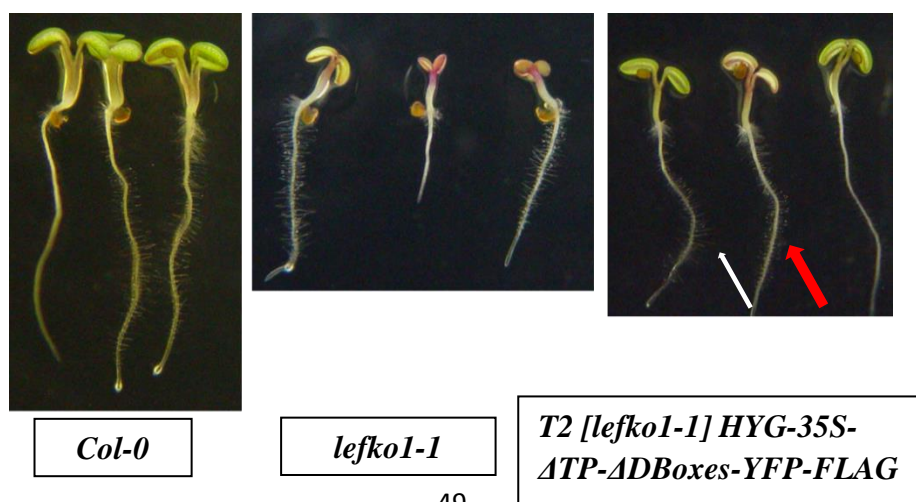
Προκειμένου να εξετασθεί αν η αλλαγή των D-Boxes καθιστά εφικτό τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στους πυρήνες των σταθερώς μετασηματισμένων φυτών, πραγματοποιήθηκε ο μόνιμος μετασηματισμός φυτών *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου (*Col -0* N1093) καθώς και *lefkol-1* εφαρμόζοντας την τεχνική του μόνιμου μετασηματισμού (stable transformation).

Μετά την επιλογή ανθεκτικών φυτών στο αντιβιοτικό Υγρομυκίνη T1 γενιάς, ακολούθησε μεταφορά τους σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο και τελικά μεταφύτευσή τους σε χώμα.

Από τα φυτά *lefkol-1* που μετασηματίστηκαν με την κατασκευή HYG-35S-ΔTP-ΔDBoxes-YFP-FLAG, μετά την επιλογή των ανθεκτικών φυτών T1, μεταφέρθηκαν στο χώμα και συλλέχθηκαν T2 απόγονοι οι οποίοι τοποθετήθηκαν να μεγαλώσουν κάθετα σε τρυβλία με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο MS, και σε ηλικία 5 ημερών, παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού τα ριζικά τους τριχίδια. Συνολικά, μελετήθηκαν T2 σπόρια από 32 σειρές.

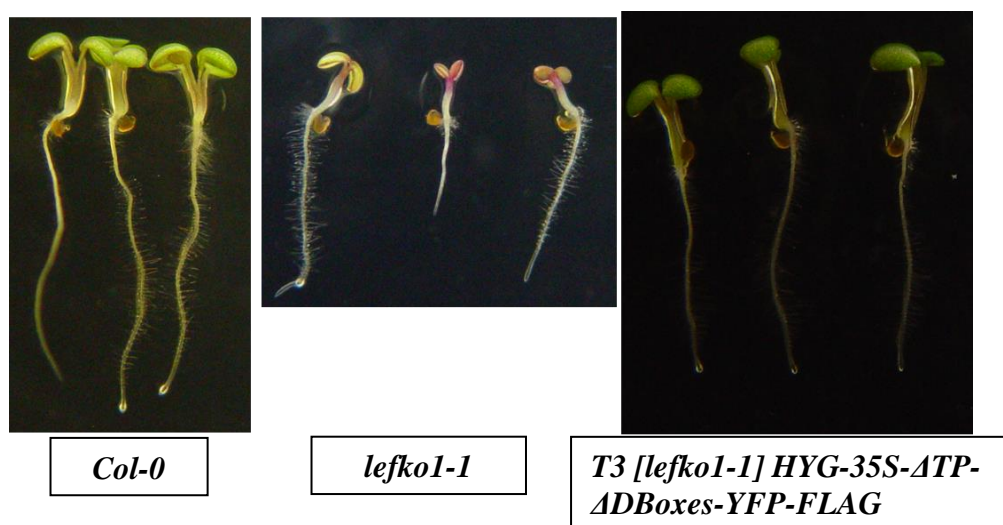
Τα ριζικά τριχίδια αποτελούν μονοκύτταρα διαφοροποιημένα επιδερμικά κύτταρα του φυτού και κατ' επέκταση πλούσια σε οργανίδια όπως πλαστίδια. Ακόμα, είναι αδιαφανή και διευκολύνεται ο εντοπισμός σήματος φθορισμού στο μικροσκόπιο.

Η ανάπτυξη των φυτών παρουσίαζε φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν των φυτών αγρίου τύπου *Col -0* N1093, δηλαδή συμπλήρωναν τον φαινότυπο των φυτών *lefkol-1* και τον ανέστρεφαν στην ίδια μέρα ανάπτυξης, αλλά υπήρχαν και άτομα εντός του πληθυσμού τα οποία ομοίαζαν σε φυτά *lefkol-1* (Εικόνα 3.15).



Εικόνα 3.15 : Μόνιμος μετασχηματισμός *Arabidopsis thaliana*/T2 γενιάς. Στις εικόνες παριστάνονται φυτά 5 ημερών πριν από τη μικροσκοπική παρατήρηση. Εντός τη ίδιας σειράς φυτών περιλαμβάνονται φυτά με φαινότυπο αγρίου τύπου(λευκό βέλος), αλλά και φυτά που ομοιάζουν σε *lefko1-1*(κόκκινο βέλος).

Μετά την παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού των σποριόφυτων 5 ημερών T2 μετασχηματισμένης γενιάς, παρατηρήθηκε πιθανός φθορισμός στα ριζικά τριχίδια 4 σειρών, τα οποία και τοποθετήθηκαν να μεγαλώσουν κάθετα σε τρυβλία με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο MS προκειμένου να δώσουν απογόνους T3 γενιάς όπου ο φαινότυπος σε όλο το πληθυσμό ομοιάζει σε αγρίου τύπου φυτά *Col-0* (Εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.16: Μόνιμος μετασχηματισμός *Arabidopsis thaliana*/T3 γενιάς. Στις εικόνες παριστάνονται φυτά 5 ημερών πριν από τη μικροσκοπική παρατήρηση.

4. Συζήτηση

Η ομοιότητα της LEFKOTHEA στο κύτταρο και η συσχέτισή της με τα D-Boxes

Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη LEFKOTHEA εντοπίζεται μόνο στον πυρήνα των κυττάρων των παροδικώς μετασχηματισμένων φυτών καπνού, κι όχι στα σταθερώς μετασχηματισμένα *Arabidopsis thaliana*, παρά μόνον υπό της επίδραση του MG132, υπόθεση εργασίας αποτέλεσε πως η διαταραγμένη διανομή της πρωτεΐνης εντός του φυτικού κυττάρου, αποτελεί αποτέλεσμα αποδόμησής της από το 26S-πρωτεάσωμα. Αρχικά, το μάτισμα ιντρονίων της ομάδας II χλωροπλαστικών γονιδίων είχε χαρακτηριστεί ως αυτοκαταλυτικό σύστημα χωρίς τη συμμετοχή ενζυμικών συμπλόκων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι είναι αναγκαία η συμμετοχή πρωτεϊνικών συμπλόκων προκειμένου να πραγματοποιηθεί (Longevialle et al., 2010). Ο μηχανισμός ματίσματος των ιντρονίων της ομάδας II παρουσιάζεται στα βακτήρια, στα αρχαία, και στα ευκαρυωτικά οργανίδια (Chalamcharla et al., 2010) και είναι αρκετά όμοιος με τον μηχανισμό ματίσματος των προ-mRNA του πυρήνα.

Για αυτό τον λόγο, προτείνεται ότι ο μηχανισμός ματίσματος των ιντρονίων της ομάδας II είναι εξελικτικά ο πρόγονος του μηχανισμού ματίσματος που συμβαίνει στον πυρήνα (Cech, 1986). Συνεπώς, είναι πιθανό η πρωτεΐνη LEFKOTHEA να συμμετέχει ταυτόχρονα σε δύο απομακρυσμένους μηχανισμούς επεξεργασίας των mRNA οι οποίοι όμως έχουν κοινά χαρακτηριστικά και συνδέονται εξελικτικά. Ο ένας είναι ο μηχανισμός ματίσματος των ιντρονίων της ομάδας II στους χλωροπλάστες και ο δεύτερος που εδράζεται στον πυρήνα, μάλλον είναι ένας διαφορετικός μηχανισμός ματίσματος από τον μηχανισμό των προ-mRNA, ο οποίος φαίνεται να έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με τον μηχανισμό ματίσματος των ιντρονίων της ομάδας II. Λόγω της ενδοσυμβίωσης και της μεταφοράς γενετικού υλικού από τους ενδοσυμβιώτες στον πυρήνα του κυττάρου, προτείνεται ότι μεταφέρθηκαν παράλληλα και μηχανισμοί επεξεργασίας των mRNA, συστατικό των οποίων αποτελεί η πρωτεΐνη LEFKOTHEA.

Έτσι, η πρωτεΐνη LEFKOTHEA υπό συνθήκες μπορεί να τοποθετηθεί ταυτόχρονα στον πυρήνα και στο χλωροπλάστη. Η λειτουργία της στον πυρήνα συσχετίζεται με την επεξεργασία mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται άμεσα με τον χλωροπλάστη. Εναλλακτικά, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η πρωτεΐνη να εξέρχεται από τον χλωροπλάστη, ώστε στην συνέχεια να οδηγηθεί στον πυρήνα, αφού δεν έχει πλέον το πεπτιδιο-οδηγό καθώς έχει αποκοπεί. Σε αυτήν την περίπτωση, υπάρχει επικοινωνία πυρήνα-χλωροπλάστη, πιθανώς για την συντονισμένη επεξεργασία των mRNA στα δύο αυτά διαμερίσματα.

Το έλλειμμα της πρωτεΐνης στον πυρήνα, το οποίο δημιουργείται εξαιτίας της ισχυροποίησης του σινιάλου εξόδου (NES) από την αμινοξική υποκατάσταση G σε D, φαίνεται να ευθύνεται για τον φαινότυπο του μεταλλάγματος *lefko1-1*. Η αποδεδειγμένη είσοδος και έξοδος της πρωτεΐνης στον πυρήνα, καθώς και η παρουσία μη-ώριμων πυρήνικών mRNA στο θνησιγόνο μετάλλαγμα *lefko1-2*,

αναδεικνύουν τον κρίσιμο ρόλο της πρωτεΐνης στο μηχανισμό επεξεργασίας συγκεκριμένων mRNA στον πυρήνα (Daras, 2008).

Ανάλυση που πραγματοποιήθηκε *in silico* στην αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης αποκάλυψε την παρουσία δύο χαρακτηριστικών αλληλουχιών D-Boxes, τα οποία και αποτελούν θέσεις-σινιάλα για την πρόσδεση του πρώτου μορίου Ουβικουιτίνης.

Η δομή του D-box

Αν και πολλές μελέτες έχουν αποδείξει πως πληθώρα σινιάλων είναι υπεύθυνα για την προσθήκη της πρώτης και εν συνεχεία των επομένων μορίων Ουβικουιτίνης πάνω στις πρωτεΐνες-στόχους, λίγα είναι γνωστά για το πώς ακριβώς γίνεται αυτή η αρχική αναγνώριση. Ο τρόπος αναγνώρισης είναι εξαιρετικά ακριβής και πλήρως ελεγχόμενος, καθώς ο συγκεκριμένος τρόπος πρωτεόλυσης χρησιμοποιείται από πληθώρα κυτταρικών διεργασιών. Η στόχευση εξαρτάται από ένα χαρακτηριστικό μοτίβο που φέρουν οι πρωτεΐνες και το οποίο ονομάζεται «degron» ή D-Box(=Destruction Box). Η παρουσία τους εντός των πρωτεϊνών-στόχων είναι απαραίτητη για την αποδόμηση των ουσιών, και είναι πιθανό να βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα, μερικώς επαναλαμβανόμενα (Min et al., 2013).

Το μοτίβο του πιστευόταν αρχικά ότι αποτελείται από μία χαρακτηριστική ακολουθία 9 αμινοξέων, ξεκινώντας από μια Αργινίνη(R) και τελειώνοντας σε μία Ασπαραγίνη(N), δηλαδή ήταν της μορφής (R_xALG_xL_xN) όπου x: οποιοδήποτε αμινοξύ. Αργότερα βρέθηκε πως το πλέον διατηρημένο και λειτουργικό μοτίβο ήταν το R_xxL όπου στην αρχή του εντοπίζεται μία Αργινίνη(R) και στο τέλος του μία Λευκίνη(L). Οι πρωτεΐνες, στις οποίες εντοπίζεται αυτό το μοτίβο, αλληλεπιδρούν με μία λιγάση Ουβικουιτίνης-πρωτεΐνης η οποία ονομάζεται anaphase-promoting complex(APC/C) ή κυκλόσωμα (cyclosome) καταλήγοντας στην ουβικουιτίνωση της πρωτεΐνης και τελικώς στην καταστροφή της από το πρωτεάσωμα 26S (Morgan, 2013). Το APC/C έχει την ικανότητα να προσδένεται πάνω στον στόχο ισχυρά, με υψηλή συγγένεια και επιπροσθέτως, μπορεί να τροποποιεί πολλαπλές Λυσίνες σε μία του και μόνο σύνδεση. Η στρατολόγηση των ουσιών στο σύμπλοκο αυτό μέσω υπομονάδων -ενεργοποιητών οι οποίες είναι αυστηρώς ρυθμιζόμενες σύμφωνα με τις ανάγκες του κυττάρου, ανακυκλώσιμες και δομικά αποτελούνται από έναν WD40 τομέα, όπου και επιτελείται η αλληλεπίδραση με τον στόχο. Έπειτα από συγκρίσεις γνωστών D-Boxes απεδείχθη πως διαφορετικά D-Boxes μπορεί να χρησιμοποιούν τον ίδιο ενεργοποιητή, ή το ίδιο D-Box μπορεί να έχει διαφορετικούς ενεργοποιητές στη διάθεσή της.

Η δομή αυτή του D-Box φαίνεται να είναι κρίσιμη για την σταθερότητα των πρωτεϊνών καθώς μεταλλάξεις εσωτερικά του μοτίβου ή αφαίρεσή του, σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες που το φέρουν σε ανοικτά συστήματα, σε σταθερώς μετασχηματισμένα κύτταρα σπονδυλωτών, σε ωοκύτταρα βατράχου, σε έμβρυα Δροσόφιλας, καθώς και στη Ζύμη(Genschik et al., 1998)

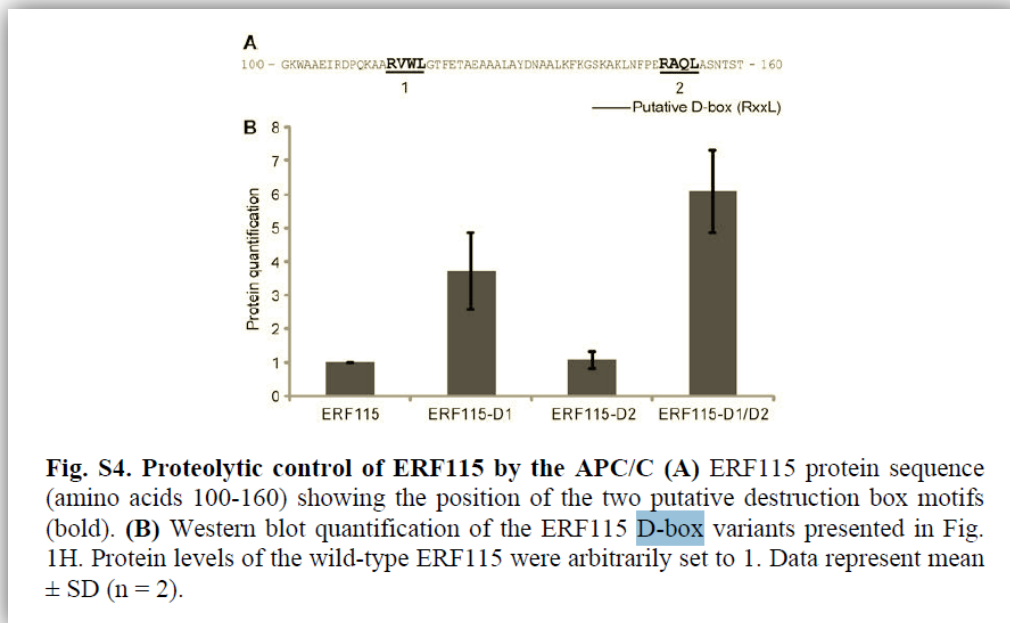
Το D-box στον φυτικό οργανισμό

Μέχρι προσφάτως, κανένα δεδομένο δεν υπήρχε στην διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με αυτού του τύπου την πρωτεόλυση στα φυτά. Νέα πειραματικά δεδομένα έφεραν στο φως πως και στους οργανισμούς αυτούς, η αναγνώριση χαρακτηριστικού μοτίβου degron συναντάται αρκετά συχνά σε πρωτεΐνες-κλειδιά σε κρίσιμες διαδικασίες και ειδικότερα, σε διεργασίες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο (πχ στον διαχωρισμό των αδερφών χρωματίδων). Απόδειξη αυτού είναι πως η αμινοξική αυτή ακολουθία συναντάται και είναι διατηρημένη σε όλες τις μιτωτικές φυτικές κυκλίνες (Plesse et al., 1998), καθώς επίσης και στα κύτταρα της καλύπτρας της ρίζας, όπου ο ρυθμός των κυτταρικών διαιρέσεων είναι εξαιρετικά υψηλός (Mews et al., 1997). Πειραματική μελέτη που διεξήχθη σε σταθερώς μετασχηματισμένα φυτά καπνού με χειμερινές κατασκευές που κωδικοποιούν για μιτωτικές κυκλίνες στον καπνό συντηγμένες με την πρωτεΐνη-μάρτυρα CAT (chloramphenicol acetyltransferase) υπό την καθοδήγηση του καθολικά εκφραζόμενου προαγωγέα CaMV 35S, έδειξε πως η διακύμανση που παρατηρείται στα επίπεδα των κυκλινών τύπου A και B κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου οφείλεται στα D-boxes που αυτές φέρουν. Επίσης, η χρήση MG132 (carbobenzoylleucinyl-leucinyl-leucinal-αναστολέας πρωτεασώματος), έδειξε πως πραγματοποιεί αναστολή της προγραμματισμένης πρωτεόλυσης στις παραπάνω χημεικές κατασκευές, αποδεικνύοντας πως στα φυτά, όπως και στα ζώα, το πρωτεολυτικό μονοπάτι ενεργοποιείται σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, και αυτό το μονοπάτι αναγνωρίζει το υψηλά συντηρημένο μοτίβο του D-box (Genschik et al., 1998).

Δεύτερο ισχυρό πειραματικό δεδομένο που επιβεβαίωσε την ισχυρή σχέση μεταξύ πρωτεόλυσης φυτικών πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα 26S και μοτίβου αναγνώρισης (D-Box) που αυτές έφεραν, ήταν ένα πείραμα που διεξήχθη σε σταθερώς μετασχηματισμένα φυτά *Arabidopsis thaliana* με την χειμερινή κατασκευή ERF115-GFP όπου σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη του μεταγραφικού παράγοντα ERF115 ο οποίος ταυτοποιήθηκε ως ρυθμιστής της διαίρεσης των κυττάρων του εφησυχάζοντος κέντρου (QC- quiescent center) της ρίζας. Το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για τον ERF115 (At5g07310) έχει δύο D-box μοτίβα αναγνώρισης τα οποία αναλύθηκαν *in silico* μέσω προγράμματος ανάλυσης και πρόβλεψης (GPS-ARM 1.0-<http://arm.biocuckoo.org/>) και χαρακτηρίζονταν από υψηλό score να αποτελούν αληθινά μοτίβα και να αναγνωρίζονται από το APC/C (Εικόνα 4.1). Η «απενεργοποίηση» των δύο αυτών μοτίβων σταθεροποίησε τον ERF115 και αυτό έγινε ανιχνεύσιμο μέσω του φθορισμού της πρωτεΐνης-μάρτυρα GFP μετά την εφαρμογή MG132 στις ρίζες των φυτών αυτών, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.2 (Heyman et al., 2013).

115 - 118	RDPOKAA RVWL GTFETAE	3,851	0	D-box
150 - 153	AKLNFFE RAQL ASNTSTT	4,838	0	D-box

i



ii

Fig. S4. Proteolytic control of ERF115 by the APC/C (A) ERF115 protein sequence (amino acids 100-160) showing the position of the two putative destruction box motifs (bold). **(B)** Western blot quantification of the ERF115 D-box variants presented in Fig. 1H. Protein levels of the wild-type ERF115 were arbitrarily set to 1. Data represent mean \pm SD (n = 2).

Εικόνα 4.1 : (i) Αποτελέσματα πρόβλεψης πιθανοτήτων ύπαρξης D-Box in silico από το πρόγραμμα GPS-ARM (<http://arm.biocuckoo.org/>). (ii) (A) Η θέση των δύο D-Boxes στην αμινοξική αλληλουχία του μεταγραφικού παράγοντα ERF115 (B) Η ποσοτική ανάλυση της συσσώρευσης του ERF115 μετά την αλλαγή και των δύο D-Boxes (D1/D2) είναι υψηλότερη συγκριτικά με την αλλαγή μεμονωμένων των Dbox1(D1) και Dbox2(D2).

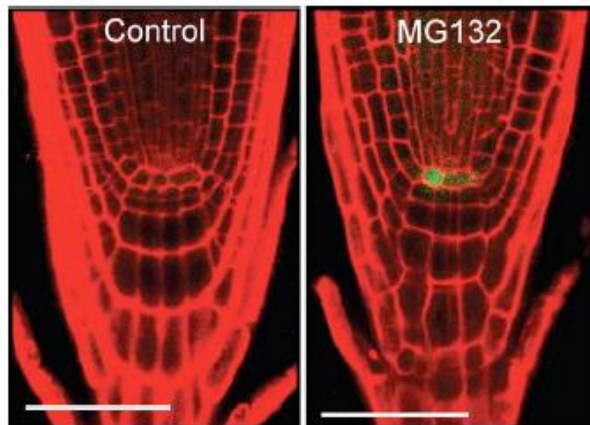


Fig. S5. ERF115 accumulates in QC cells upon proteasome inhibition. Confocal microscopy image of one-week-old *pERF115:ERF115-GFP* root tips showing QC specific ERF115-GFP accumulation upon treatment with the MG132 proteasome inhibitor (100 μ M) at 24°C. Bars = 50 μ m.

Εικόνα 4.2 : Μόνιμος μετασχηματισμός *Arabidopsis thaliana* με την κατασκευή ERF115 –GFP και μελέτη της συγκέντρωσης του μεταγραφικού παράγοντα ERF115 στο εφησυχάζον κέντρο QC της ρίζας μετά την εφαρμογή MG132.

Το προφίλ των μόνιμα μετασχηματισμένων φυτών

Έχοντας σοβαρές ενδείξεις πως ο μηχανισμός ο οποίος πιθανώς να οφείλεται για την πρωτεόλυση της πρωτεΐνης LEFKOTHEA είναι το πρωτεάσωμα 26S με την αναγνώριση των μοτίβων DBoxes, πραγματοποιήθηκε σταθερός μετασχηματισμός φυτών. Οι απόγονοι των επιτυχώς μετασχηματισμένων φυτών T3, όταν συμπλήρωσαν την 5^η ημέρα της ανάπτυξής τους, μελετήθηκαν με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου φθορισμού, και συγκεκριμένα με τη χρήση φίλτρου GFP προκειμένου να εξεταστεί η υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης. Η ύπαρξη φθορισμού θα σήμαινε την παρουσία της πρωτεΐνης, και συνεπώς την μη αποδόμησή της από το 26S-πρωτεάσωμα εξαιτίας της ανικανότητας του μηχανισμού πρωτεόλυσης να αναγνωρίσει τη πρωτεΐνη LEFKOTHEA ως στόχο (μη ύπαρξη μοτίβων D-Box).

Από τον φαινότυπο των T2 απογόνων των φυτών *lefk1-1* που είχαν μετασχηματιστεί σταθερώς με την κατασκευή HYG-35S-ΔTP-ΔDBoxes-YFP-FLAG, παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός τους αποτελείτο από φυτά που ομοιάζαν σε *lefk1-1*, αλλά και από στελέχη τα οποία ήταν παρόμοια με αυτά του αγρίου τύπου *Col-0* (Εικόνα 3.11). Η διαφοροποίηση αυτή εξομαλύνθηκε στους απογόνους T3 όπου και

ο φαινότυπος των στελεχών του πληθυσμού ήταν ομοιόμορφος και ενιαίος, ομοιάζοντας σε φυτά αγρίου τύπου *Col-0*.

Η παρατήρηση αυτή για την διαβάθμιση της πρωτεΐνης με αντίκτυπο στον φαινότυπο, υπήρξε μία σοβαρή ένδειξη για την ισχυροποίηση της υπόθεσης πως η μη-λύση της LEFKOTHEA από το πρωτεάσωμα «συμπληρώνει» την έλλειψη της πρωτεΐνης που χαρακτηρίζει το *lefko1-1*, με αποτέλεσμα την συμπλήρωση του φαινοτύπου των απογόνων 2^{ης} και 3^{ης} γενεάς (*Col-0-like*), επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι η έλλειψη της πρωτεΐνης από τον πυρήνα δημιουργεί το μορφολογικό πρόβλημα στον εμβρυακής καταγωγής ιστό που είναι οι κοτυληδόνες.

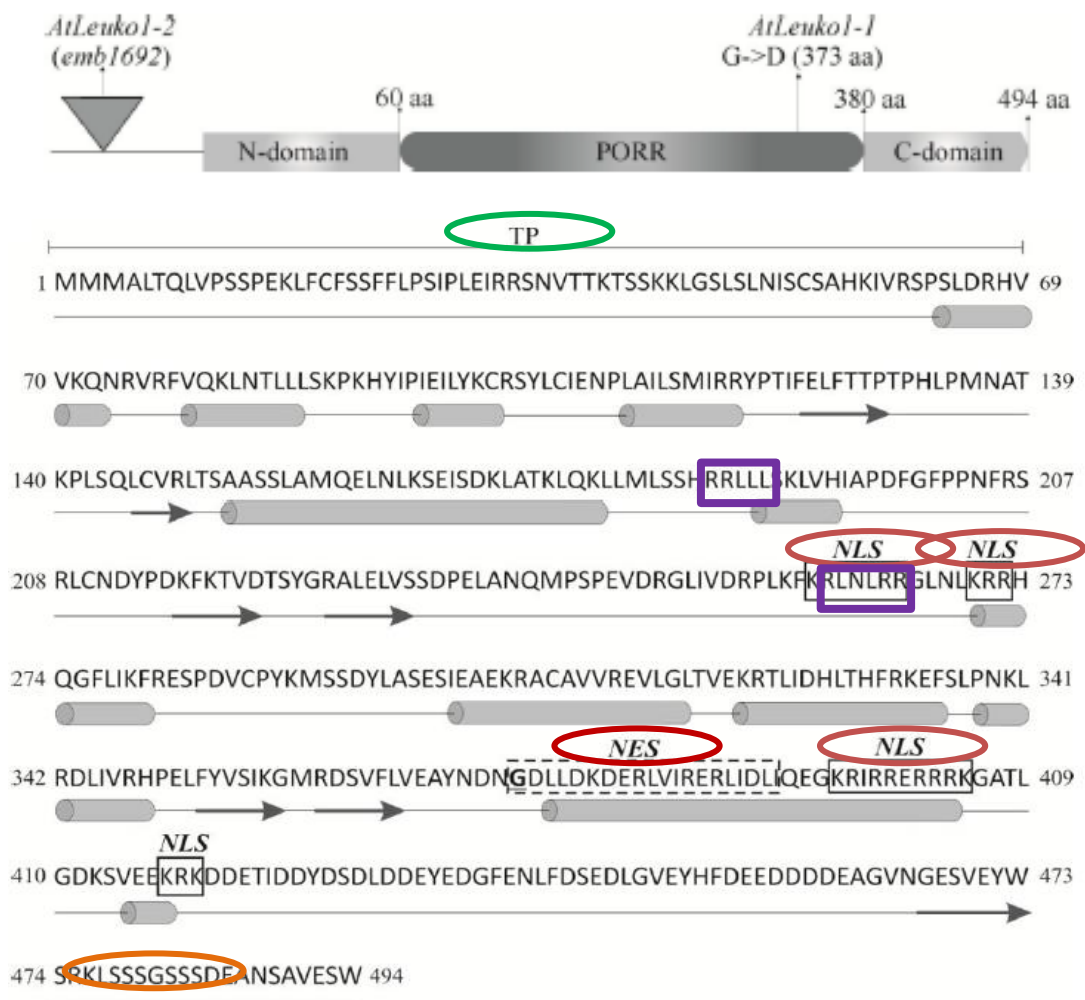
Έχοντας υπόψη τα πρώτα αποτελέσματα από την μικροσκοπική παρατήρηση των κατασκευών στον παροδικό μετασχηματισμό φύλλων καπνού, εικαζόταν η ανεύρεση ενεργούς πρωτεΐνης στους πυρήνες και ίσως και στο κυτταρόπλασμα (λόγω τοπολογίας δράσεως του πρωτεασώματος 26S) των σταθερά μετασχηματισμένων φυταρίων. Η πειραματική αυτή προσέγγιση δεν έδωσε τα προσδοκώμενα αποτελέσματα καθώς δεν παρατηρήθηκε φθορισμός λόγω της πρωτεΐνης-μάρτυρα YFP, άρα και απουσία σημαντικής και ανιχνεύσιμης ποσότητας πρωτεΐνης LEFKOTHEA (ΔDBoxes) στον πυρήνα και πιθανώς και στο κυτταρόπλασμα των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί ένα επιπλέον στοιχείο που δικαιολογεί την πολυπλοκότητα των συστημάτων και ανοίγει νέους δρόμους στην οπτική της μελέτης της πρωτεΐνης LEFKOTHEA, καθώς αν και φέρει τα απαιτούμενα «μοτίβα-σινιάλα», με τον τρόπο τουλάχιστον που μελετήθηκε ο εν λόγω μηχανισμός πρωτεόλυσης, δεν φαίνεται να ρυθμίζει την ύπαρξη της.

Καθώς γνωρίζουμε από την διεθνή βιβλιογραφία, μία πρωτεΐνη είναι πολύ σπάνιο, αν όχι αδύνατο για πολλούς λόγους (πχ δαπάνη ενέργειας κτλ), να φέρει επί ματαίω αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τους ποικίλους ενδοκυττάριους μηχανισμούς, χωρίς να χρησιμεύουν κάποια συγκεκριμένη, έστω στιγμιαία, χρονική περίοδο στον οργανισμό. Έτσι, η συλλογιστική πορεία οδηγεί στο συμπέρασμα πως ή ο μηχανισμός του 26S-πρωτεασώματος δεν δρα υπό τις συνθήκες και τη χρονική στιγμή που μελετήθηκε στην συγκεκριμένη περίπτωση με τα D-Boxes και γι αυτό δεν ανιχνεύεται το αποτέλεσμα της δράσης του, ή η δράση του είναι εξαιρετικά σύντομη σε κάποιο καίριο αναπτυξιακό στάδιο του οργανισμού που δεν μελετήθηκε, είτε τα επίπεδα της πρωτεΐνης LEFKOTHEA ρυθμίζονται από κάποιον άλλο πρωτεολυτικό σινιάλο που αναγνωρίζει το πρωτεάσωμα 26S. Είναι σημαντικό να ειπωθεί πως δομικά η πρωτεΐνη LEFKOTHEA πέρα από τα διάφορα σινιάλα (NLS, NES κτλ) και τα μοτίβα DBoxes που φέρει, χαρακτηρίζεται από έναν σημαντικά μεγάλο αριθμό αμινοξέων Σερίνης (S) στο καρβοξυ-τελικό της άκρο(C-term) (Εικόνα 4.3). Οι Σερίνες αποτελούν στόχο φωσφορυλίωσης πρωτεϊνικών κινασών.

Η φωσφορυλίωση αποτελεί μια απαραίτητη, γρήγορη και αναστρέψιμη αντίδραση η οποία έχει στόχο να μεταβάλλει λειτουργικά μια πρωτεΐνη για όσο χρονικό διάστημα χρειάζεται και να την καταστήσει ενεργή. Χρησιμοποιεί σαν πρώτη ύλη το άφθονο ATP. Με την φωσφορυλίωση αλλάζει η στερεοτακτική διαμόρφωση της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα κάποιο ενεργό κέντρο να ανοίγει ή να κλείνει, κάποιο υπόστρωμα (μόριο προσαρμογής) να δεσμεύεται ή να αποδεσμεύεται και αυτό με τη

σειρά του να σηματοδοτεί περαιτέρω αντιδράσεις (ενεργοποίηση μονοπατιών της μεταγωγής σήματος). Η φωσφορυλίωση, με την αλλαγή του σχήματος της πρωτεΐνης την οποία προκαλεί, μπορεί να αλλάξει την θέση της πρωτεΐνης στο κύτταρο επιτρέποντας την μετακίνηση της προς τον πυρήνα, όπου ασκεί πλέον διαφορετική δράση και τέλος μπορεί να στοχοποιήσει μια πρωτεΐνη για καταστροφή από το πρωτεολυτικό μηχανισμό του κυττάρου. Από τις 2000 γνωστές κινάσες υπάρχουν 518 γνωστές πρωτεϊνικές κινάσες, την πλειοψηφία των οποίων αποτελούν οι κινάσες σερίνης-θρεονίνης (385), οι οποίες φωσφορυλιώνουν την υδροξυλική ομάδα της πλάγιας αλυσίδας των αμινοξέων της σερίνης ή της θρεονίνης (αμινοξέα που έχουν παρόμοια δομή). Έτσι, είναι εξαιρετικά πιθανό, η ομοιόσταση της πρωτεΐνης LEFKOTHEA να ελέγχεται από αυτόν τον μετα-μεταφραστικό μηχανισμό (Heldin et. Al., 1995).



Εικόνα 4.3 : Αποτελέσματα αμινοξικής ανάλυσης της πρωτεΐνης LEFKOTHEA, όπου με μωβ τετράγωνο σημειώνονται τα μοτίβα D-Boxes, με κόκκινο κύκλο τα σινιάλα εισόδου στον πυρήνα(NLS) και εξόδου από τον πυρήνα(NES), και με πορτοκαλί κύκλο οι Σερίνες που φέρει η πρωτεΐνη στο C-άκρο της.

Βιβλιογραφία

- **Barkan A. et al., 2000.** Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie* 82, 559–572
- **Barkan A., 2014.** Expression of Plastid Genes: Organelle-Specific Elaborations on a Prokaryotic Scaffold. *Plant Physiol.* 155, 1520-1532
- **Been M., Cech t., 1986.** One Binding Site Determines Sequence Specificity of Tetrahymena Pre-rRNA Self-Splicing, Trans-Splicing, and RNA Enzyme Activity. *Cell*, Vol. 47, 207-216.
- **Boulikas T., 1994.** Putative Nuclear Localization Signals (NLS) in Protein Transcription Factors. *Journal of Cellular Biochemistry* 55, 32-58
- **Castro A. et al., 2003.** Xkid Is Degraded in a D-Box, KEN-Box, and A-Box-Independent Pathway. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 4126–4138
- **Ciechanover A. 2005.** Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *MOLECULAR CELL BIOLOGY* 6, 79-86
- **Chalamcharla V. et al., 2015.** Nuclear expression of a group II intron is consistent with spliceosomal intron ancestry. *Genes Dev.* 2010 24, 827-836
- **Colas des Francs-Small C et al., 2012.** A PORR domain protein required for rpl2 and ccmFC intron splicing and for the biogenesis of c-type cytochromes in *Arabidopsis thaliana* mitochondria. *The Plant Journal* 69, 996–1005
- **Falcon de Longevialle A., et al. 2010.** Nuclearly Encoded Splicing Factors Implicated in RNA Splicing in Higher Plant Organelles. *Molecular Plant*, 3 ,691–705
- **Germain A. et al., 2013.** RNA processing and decay in plastids. *WIREs RNA* 4, 295–316
- **Genschik P. et al., 1998.** Cell Cycle–Dependent Proteolysis in Plants: Identification of the Destruction Box Pathway and Metaphase Arrest Produced by the Proteasome Inhibitor MG132. *The Plant Cell* 10, 2063–2075
- **GLICKMAN M., CIECHANOVER A., 2002.** The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol Rev* 82, 373–428
- **He J., C.H. et al., 2013.** Insights into Degron Recognition by APC/C Coactivators from the Structure of an Acm1-Cdh1 Complex. *Molecular Cell* 50, 649–660

- **Heldin C., 1995.** Dimerization of Cell Surface Receptors in Signal Transduction. *Cell*, Vol. 80, 213-223
- **Hershko A., Ciechanover A. 1992.** THE UBIQUITIN SYSTEM FOR PROTEIN DEGRADATION. *Annu. Rev. Biochem* 61, 761-807
- **Heyman J. et al., 2013.** ERF115 Controls Root Quiescent Center Cell Division and Stem Cell Replenishment. *Science* 342, 860
- **Jacobs J., Kuck U. 2011.** Function of chloroplast RNA-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 735–748
- **King R. et al., 1996.** Mutagenic Analysis of the Destruction Signal of Mitotic Cyclins and Structural Characterization of Ubiquitinated Intermediates. *Molecular Biology of the Cell* 7, 1343-1357
- **Kravtsova-Ivantsiv Y., Ciechanover A. 2012.** Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *Journal of Cell Science* 125, 539–548
- **Kroeger et al., 2009.** A plant-specific RNA-binding domain revealed through analysis of chloroplast group II intron splicing. *PNAS* 106, 4537-4542
- **Kosugi et al., 2009.** Six Classes of Nuclear Localization Signals Specific to Different Binding Grooves of Importin. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 284, 478 –485
- **La Cour T. et al., 2004.** Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering, Design & Selection* 17, 527–536
- **Min., Mayor., Lindon 2013.** Ubiquitination site preferences in anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) substrates. *Open Biol* 3, 130097
- **Morgan D., 2013.** The D Box Meets Its Match. *Molecular Cell.* 50, 609–610
- **Ostheimer G. et al., 2005.** Structural Analysis of the Group II Intron Splicing Factor CRS2 Yields Insights into its Protein and RNA Interaction Surfaces. *J. Mol. Biol.* 345, 51–68
- **Paila Y. et al., 2014.** New insights into the mechanism of chloroplast protein import and its integration with protein quality control, organelle biogenesis and development. *Journal of Molecular Biology*

- **Ravid., Hochstrasser 2008.** Degradation signal diversity in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(9), 679–690
- **Ruwe H. et al., 2011.** The RNA-recognition motif in chloroplasts. *Journal of Plant Physiology* 168,1361– 1371
- **Santner A., Estelle M., 2010.** The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant J.* 61(6), 1029–1040
- **Solary E. et al., 1998.** Proteases, proteolysis, and apoptosis. *Cell Biology and Toxicology* 14, 121-132
- **Thrower J. et al., 2000.** Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal* 19, .94–102
- **Vierstra R., 1996.** Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology* 32, 275-302.
- **Yamano H. et al., 1998.** The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitindependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor. *The EMBO Journal* 17, 5670–5678
- **Yang C. et al., 2013.** Cyclin B1 Destruction Box-Mediated Protein Instability:The Enhanced Sensitivity of Fluorescent-Protein-Based Reporter Gene System. *BioMed Research International*, 2013
- **Zwickl P. et al., 1999.** The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 354, 1501-1511

Παράρτημα

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
M13For : MALTQLVPSSPEKLCFSSFFLPSIPLERIRSNVTTKTSKKLGLSLNISC SAHKIVRSPSLDRHVVKQNRVRFVQKLN TLLSKPKHYIPIEILYKCRSYLCIENPLAII : 112
albino : MALTQLVPSSPEKLCFSSFFLPSIPLERIRSNVTTKTSKKLGLSLNISC SAHKIVRSPSLDRHVVKQNRVRFVQKLN TLLSKPKHYIPIEILYKCRSYLCIENPLAII : 112
      MALTQLVPSSPEKLCFSSFFLPSIPLERIRSNVTTKTSKKLGLSLNISC SAHKIVRSPSLDRHVVKQNRVRFVQKLN TLLSKPKHYIPIEILYKCRSYLCIENPLAII

      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220
M13For : SMIRRYPTIFELFTTPTPHLPMNATKPLSQCVRVLTSAASSLAMQELNLKSEISDKLATKQKLLMLSSGGAGGSKLVHIA PDGFGFPNFRSRLCNDYDPDKFKTVDTSYGR : 224
albino : SMIRRYPTIFELFTTPTPHLPMNATKPLSQCVRVLTSAASSLAMQELNLKSEISDKLATKQKLLMLSSRRLLLSKLVHIA PDGFGFPNFRSRLCNDYDPDKFKTVDTSYGR : 224
SMIRRYPTIFELFTTPTPHLPMNATKPLSQCVRVLTSAASSLAMQELNLKSEISDKLATKQKLLMLSSH SKLVHIA PDGFGFPNFRSRLCNDYDPDKFKTVDTSYGR

      *      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *
M13For : ALELVSSDPELANQMPSPVDRGLIVDRPLKFKRLNLGGGNLKRHRHQGFLIKFRESE----- : 282
albino : ALELVSSDPELANQMPSPVDRGLIVDRPLKFKRLNRRGNLKRHRHQGFLIKFRESDVCPYKMSDDYLASESIEAEKRACAVVREVLGLTVEKRTLIDHLTHFRKEFSLP : 336
ALELVSSDPELANQMPSPVDRGLIVDRPLKFKRLNL G NLKRHRHQGFLIKFRESE

      340      *      360      *      380      *      400      *      420      *      440
M13For : ----- : -
albino : NKLRDLIVRHPELFFVSIKGRDVSFLVEAYNDNGDLLDKDERLIVIRERLIDLIQEGKRIRRRRRRKGATLGDKSVEEKRKDDETIDDDYSDLDDEYEDGFENLFDSEDLGV : 448

      *      460      *      480      *
M13For : ----- : -
albino : EYHFDEEDDDDEAGVNGESVEYWSRKLSSSGSSSDEANSAVESW : 492

```

Αμινοξική ευθυγράμμιση του κλώνου p-bluescript- alb-ΔDBoxes-FLAG #1 που εστάλη γι αλληλούχιση . Με κόκκινα πλαίσια σημειώνονται οι αλλαγές που υπάρχουν μεταξύ του κλώνου και της ακολουθίας της πρωτεΐνης LEFKOTHEA και οι οποίες αποτελούν τις αλλαγές που έγιναν με τους primers που σχεδιάστηκαν προκειμένου να τροποποιηθούν οι αλληλουχίες των D-Boxes.

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
M13 : LIGNRAPPSS-----RSTVSIISLISN-----SCS-----PLEKTMVVKQNRVRFVQKLN TLLSKPKHYIPIEILYKCRSYLCIENPLAII
albino : MALTQLVPSSPEKLCFSSFFLPSIPLERIRSNVTTKTSKKLGLSLNISC SAHKIVRSPSLDRHVVKQNRVRFVQKLN TLLSKPKHYIPIEILYKCRSYLCIENPLAII
      L P S RS V3 S SCS P VVKQNRVRFVQKLN TLLSKPKHYIPIEILYKCRSYLCIENPLAII

      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220
M13 : SMIRRYPTIFELFTTPTPHLPMNATKPLSQCVRVLTSAASSLAMQELNLKSEISDKLATKQKLLMLSSGGAGGSKLVHIA PDGFGFPNFRSRLCNDYDPDKFKTVDTSYGR
albino : SMIRRYPTIFELFTTPTPHLPMNATKPLSQCVRVLTSAASSLAMQELNLKSEISDKLATKQKLLMLSSRRLLLSKLVHIA PDGFGFPNFRSRLCNDYDPDKFKTVDTSYGR
SMIRRYPTIFELFTTPTPHLPMNATKPLSQCVRVLTSAASSLAMQELNLKSEISDKLATKQKLLMLSSH SKLVHIA PDGFGFPNFRSRLCNDYDPDKFKTVDTSYGR

      *      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *
M13 : ALELVSSDPELANQMPSPVDRGLIVDRPLKFKRLNLGGGNLKRHRHQGFLIKFRESEPDVCPYKMSDDYLASESIEAEKRACAVVREVLGLTVEKRTLIDHLTHFRKEFSLP
albino : ALELVSSDPELANQMPSPVDRGLIVDRPLKFKRLNRRGNLKRHRHQGFLIKFRESEPDVCPYKMSDDYLASESIEAEKRACAVVREVLGLTVEKRTLIDHLTHFRKEFSLP
ALELVSSDPELANQMPSPVDRGLIVDRPLKFKRLNL G NLKRHRHQGFLIKFRESEPDVCPYKMSDDYLASESIEAEKRACAVVREVLGLTVEKRTLIDHLTHFRKEFSLP

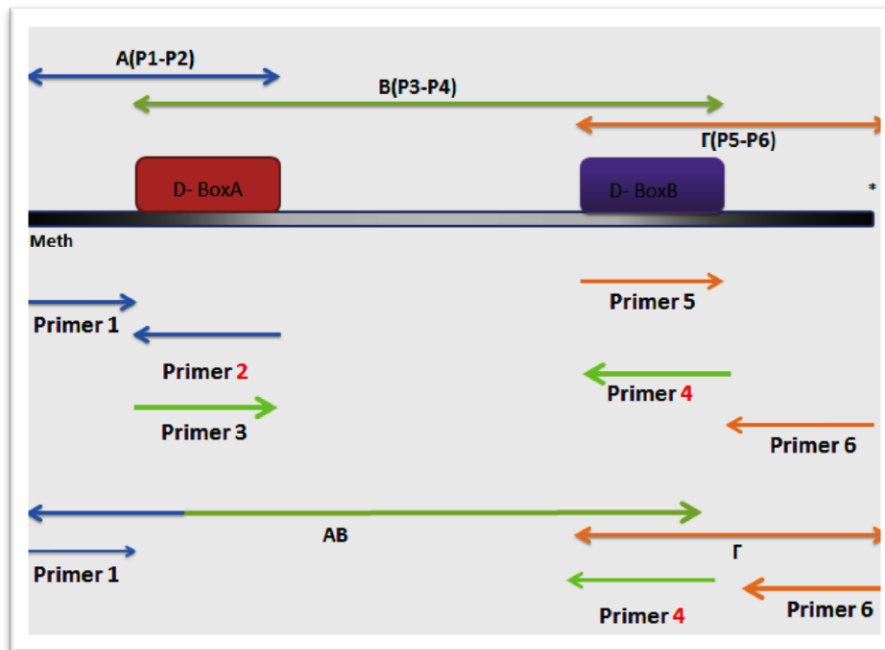
      340      *      360      *      380      *      400      *      420      *      440
M13 : NKLRDLIVRHPELFFVSIKGR----- : -
albino : NKLRDLIVRHPELFFVSIKGRDVSFLVEAYNDNGDLLDKDERLIVIRERLIDLIQEGKRIRRRRRRKGATLGDKSVEEKRKDDETIDDDYSDLDDEYEDGFENLFDSEDLGV
NKLRDLIVRHPELFFVSIKGR

      *      460      *      480      *
M13 : ----- : -
albino : EYHFDEEDDDDEAGVNGESVEYWSRKLSSSGSSSDEANSAVESW : 492

```

Αμινοξική ευθυγράμμιση του κλώνου p-bluescript- ΔTP-ΔDBoxes-FLAG (w/o TP) #2.2 που εστάλη γι αλληλούχιση . Με κόκκινα πλαίσια σημειώνονται οι αλλαγές που υπάρχουν μεταξύ του κλώνου και της ακολουθίας της πρωτεΐνης LEFKOTHEA και οι οποίες αποτελούν τις αλλαγές που έγιναν με τους primers που σχεδιάστηκαν προκειμένου να τροποποιηθούν οι αλληλουχίες των D-Boxes.

Cloning for ΔTP-ΔDBoxes



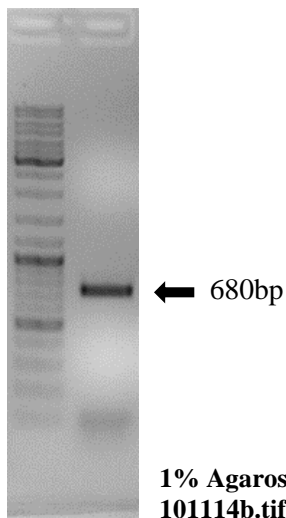
Ενίσχυση των τμημάτων A, B, Γ Τμήμα Γ(680bp)

PCR set-up

- Dbox5(3μM) : 5μL
- Albino-FLAG(3μM) : 5μL
- Kapa Hi-fi(KK2101)(1Unit/μL) : 1μL
- Buffer HF (5x) : 10μL
- dNTPS(2mM): 5μL
- DNA (n-alb-flag-SK-1-)1/100 : 3μL
- ddH2O : 21μL
- TOTAL : 50μL

PCR program (17 cycles)

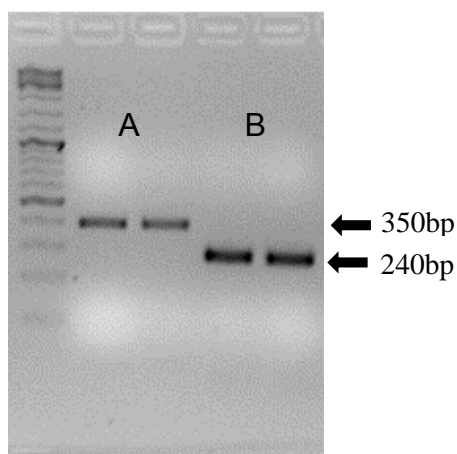
1. 94 °C for 2 min
2. 94 °C for 30 sec
3. 64 °C for 30 sec
4. 72 °C for 1 min
5. Go to 2 for 16 times
6. 72 °C for 10 min
7. 12 °C for 5 min
8. End



PCR program (Κομμάτι A)

1. 94 °C for 2 min
2. 94 °C for 30 sec
3. 64 °C for 30 sec
4. 72 °C for 40 sec
5. Go to 2 for 20 times
6. 72 °C for 10 min
7. 12 °C for 5 min
8. End

Τμήμα A(350bp) & Τμήμα B(240bp)



2% Agarose gel
121114.tif

PCR set-up (A)

- AltrXhoI(3μM) : 5μL
- Dbox2(3μM) : 5μL
- Kapa Hi-fi(KK2101)(1Unit/μL) : 1μL
- Buffer HF (5x) : 10μL
- dNTPS(2mM): 5μL
- DNA (n-alb-flag-SK-1-)1/100 : 3μL
- ddH2O : 21μL
- TOTAL : 50μL

PCR program (Κομμάτι B)

1. 94 °C for 2 min
2. 94 °C for 30 sec
3. 59 °C for 30 sec
4. 72 °C for 40 sec
5. Go to 2 for 16 times
6. 72 °C for 10 min
7. 12 °C for 5 min
8. End

PCR set-up (B)

- Dbox3I(3μM) : 5μL
- Dbox4(3μM) : 5μL
- Kapa Hi-fi(KK2101)(1Unit/μL) : 1μL
- Buffer HF (5x) : 10μL
- dNTPS(2mM): 5μL
- DNA (n-alb-flag-SK-1-)1/100 : 3μL
- ddH2O : 21μL
- TOTAL : 50μL

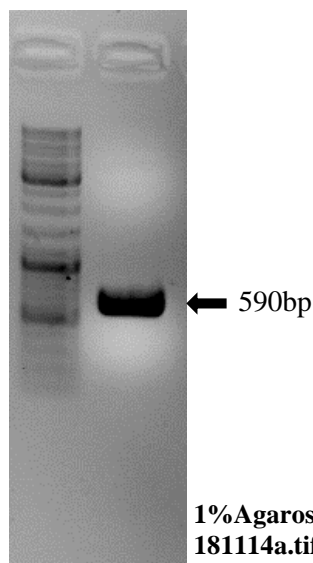
Ένωση κομματιού A(350bp) και B(240bp)

Τελικό προϊόν PCR αντίδρασης : 590bp

- AltrXhoI (3μM) : 5μL
- Dbox4(3μM) : 5μL
- Kapa Hi-fi(KK2101)(1Unit/μL) : 1μL
- Buffer HF (5x) : 10μL
- dNTPS (2mM): 5μL
- DNA (κομμάτι A)1/100 : 3μL
- DNA (κομμάτι B)1/100 : 3μL
- ddH2O : 18μL
- TOTAL : 50μL

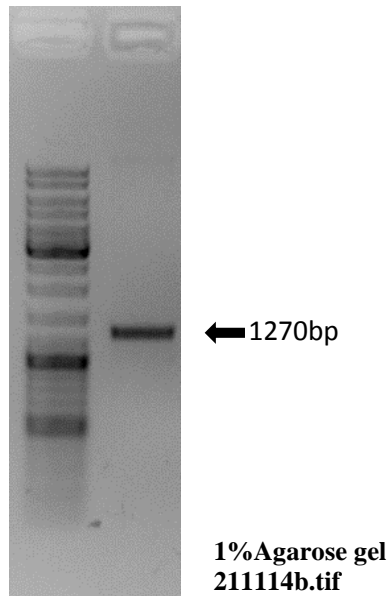
PCR program

1. 94 °C for 2 min
2. 94 °C for 30 sec
3. 59 °C for 30 sec
4. 72 °C for 1 min
5. Go to 2 for 19 times
6. 72 °C for 10 min
7. 12 °C for 5 min
8. End

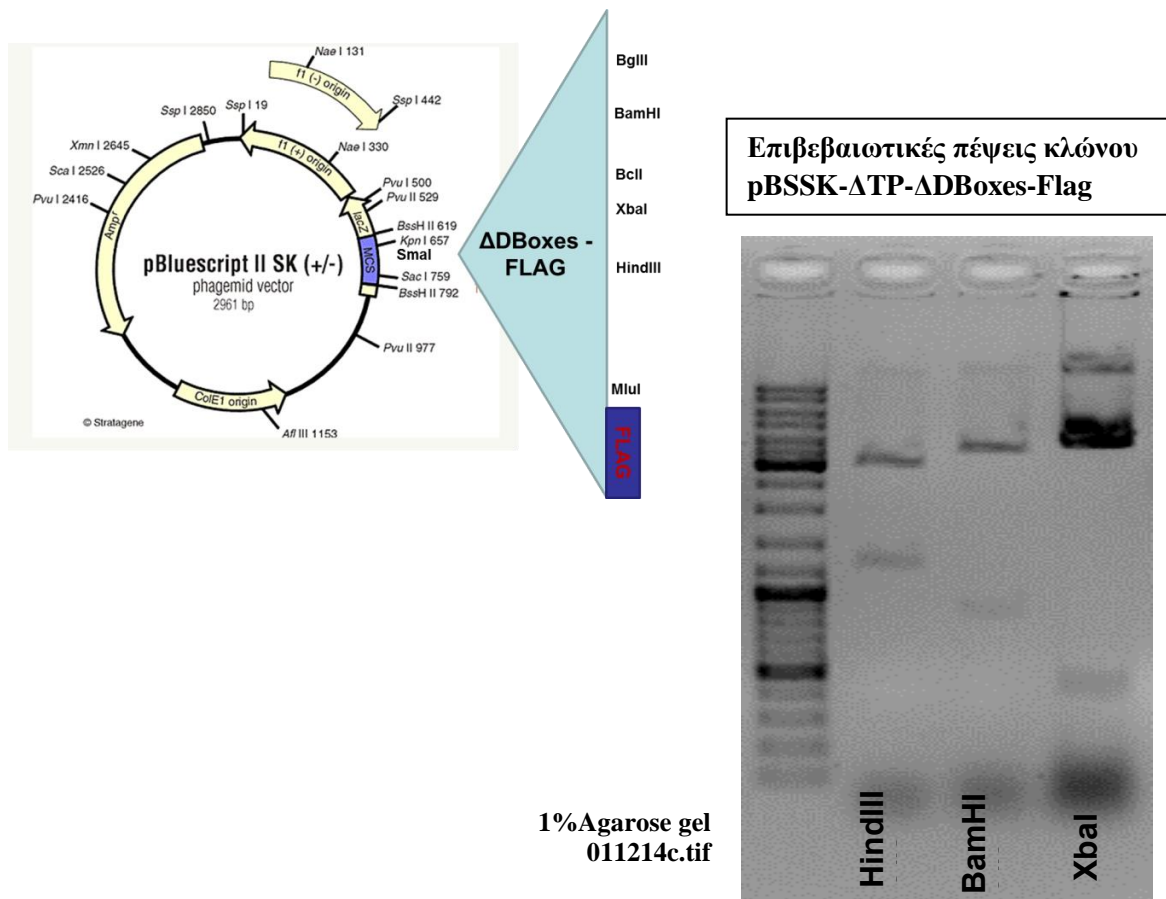


1% Agarose gel
181114a.tif

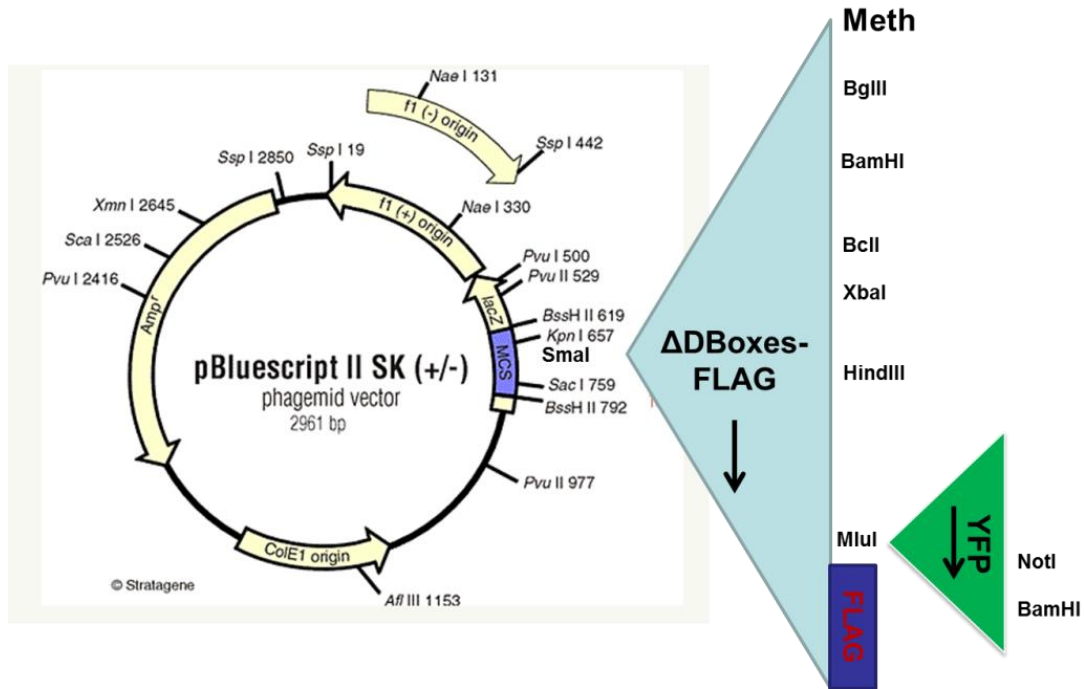
Ένωση κομματιού AB(590bp) και Γ(680bp)
Τελικό προϊόν PCR αντίδρασης : 1270bp



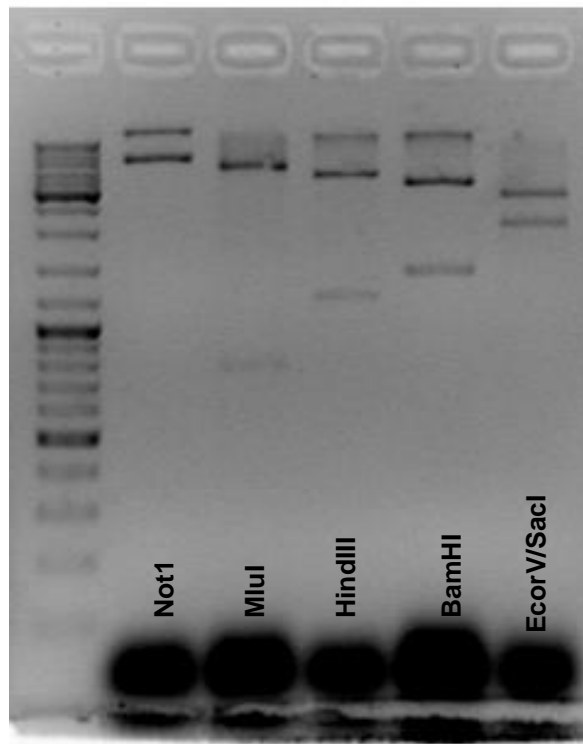
**1^η κλωνοποίηση του τμήματος ABΓ σε pBluescriptSK II στη θέση SmaI –
 Επιλογή κλώνου pBSSK-ΔTP-ΔDBoxes-Flag #2.2**



Εισαγωγή της πρωτεΐνης – μάρτυρα YFP(780bp) στην κατασκευή pBSSK-ΔTP- ΔDBoxes-Flag #2.2



Επιβεβαιωτικές πέψεις κλώνου pBSSK-ΔTP-ΔDBoxes-YFP-Flag #8

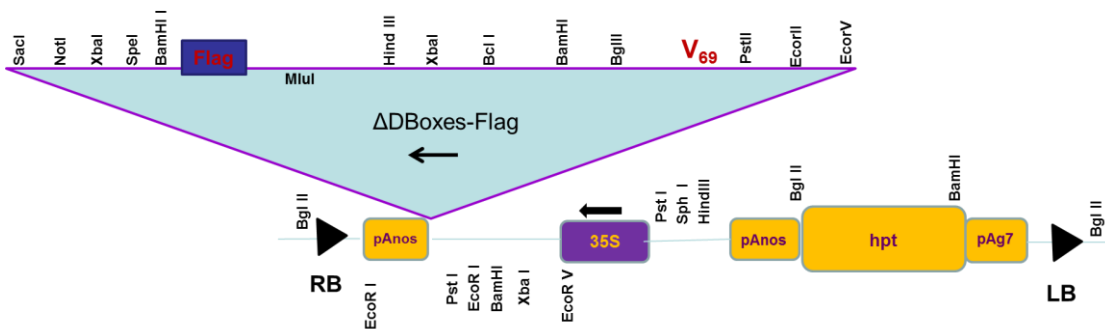


- HindIII : 1219bp & 3795 bp
- BamHI : 1573 bp & 3441 bp
- NotI : 30bp & 4984 bp
- MluI : 783bp & 4231bp
- EcorV/SacI : 2101bp & 2913 bp

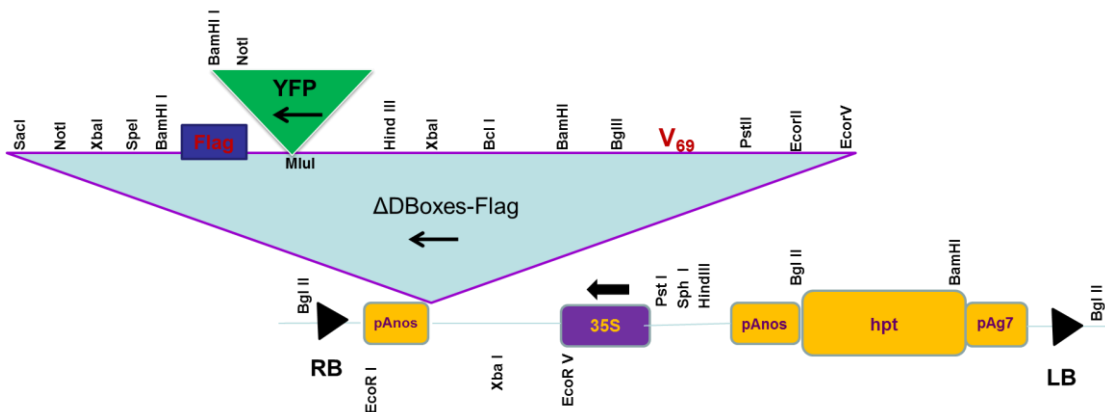
**Εισαγωγή του κλώνου pBSSK-ΔTP-ΔDBoxes-Flag #2.2
στον δυαδικό φορέα έκφρασης 35S-pGPTV-hpt στις θέσεις EcoRV/SacI - Επιλογή
κλώνου 35S-pGPTV-hpt-ΔTP-ΔDBoxes-FLAG (w/o TP) #2
&**

**Εισαγωγή του κλώνου pBSSK-ΔTP-ΔDBoxes-YFP-Flag #8 στον δυαδικό φορέα
έκφρασης HYG35S στις θέσεις EcoRV/SacI - Επιλογή κλώνου HYG35S-ΔTP-ΔDBoxes-
YFP-FLAG (w/o TP) #6**

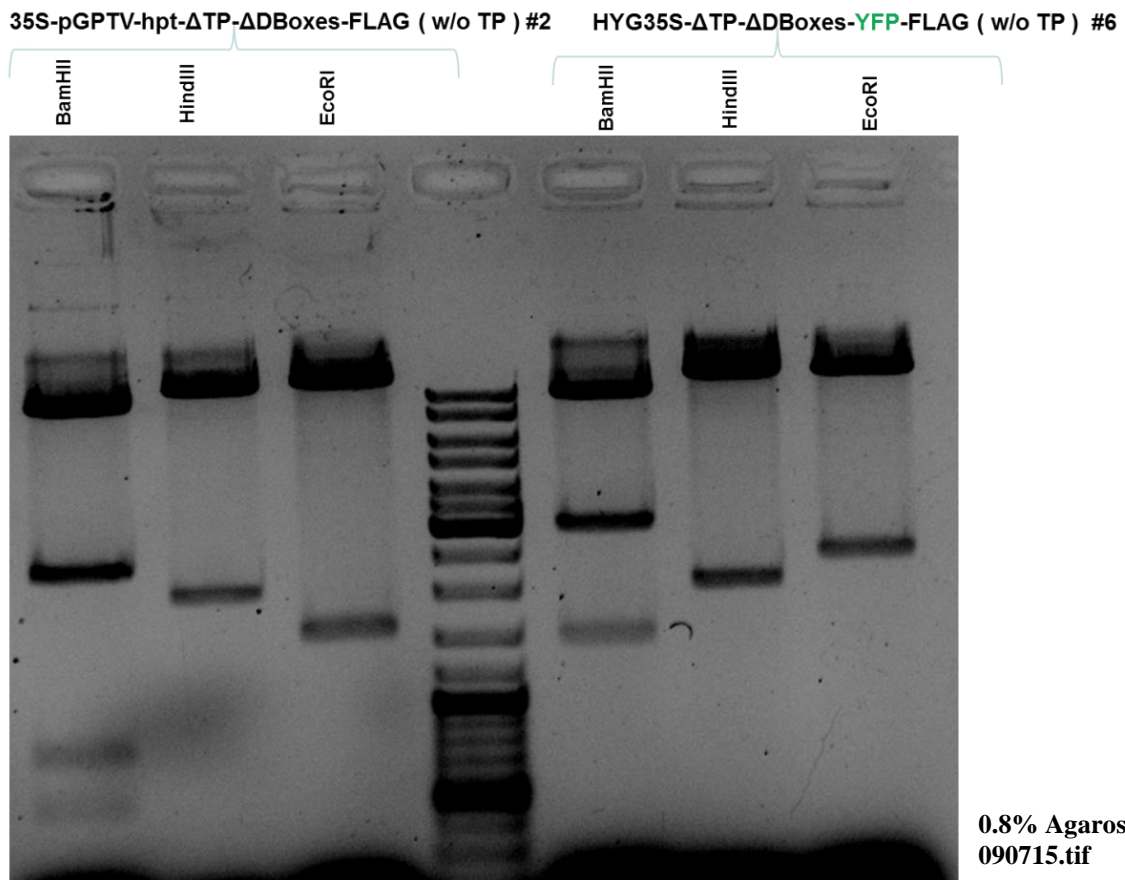
35S-pGPTV-hpt-ΔTP-ΔDBoxes-FLAG (w/o TP) #2



HYG35S-ΔTP-ΔDBoxes-YFP-FLAG (w/o TP) #6



**Επιβεβαιωτικές πέψεις κλώνων 35S-pGPTV-hpt-ΔTP-ΔDBoxes-FLAG (w/o TP) #2
&
HYG35S-ΔTP-ΔDBoxes-YFP-FLAG (w/o TP) #6**



**Ενίσχυση του πεπτιδίου-συνθήματος (TP) και του
τμήματος ΔTP-ΔDBoxes-FLAG και ένωσή τους**

PCR για ενίσχυση n-ΔDBoxes-FLAG από το SK-n-ΔDBoxB-FLAG

PCR set-up

- 90.2 For(3μM) : 5μL
- Albino-Flag(3μM) : 5μL
- Kapa Hi-fi(KK2101)(1Unit/μL) : 1μL
- Buffer HF (5x) : 10μL
- dNTPS(2mM): 5μL
- DNA 1/100 : 3μL
- ddH₂O : 21μL
- TOTAL : 50μL

PCR program

1. 94 °C for 2 min
2. 94 °C for 30 sec
3. 57 °C for 30 sec
4. 72 °C for 1min 30sec
5. Go to 2 for 11 times
6. 72 °C for 10 min
7. 12 °C for 5 min
8. End

PCR για ενίσχυση TP από τον Puc18-alb-Flag

PCR set-up

- Alba-For(3 μ M) : 5 μ L
- Alba-Rev-L(3 μ M) : 5 μ L
- Kapa Hi-fi(KK2101)(1Unit/ μ L) : 1 μ L
- Buffer HF (5x) : 10 μ L
- dNTPS(2mM): 5 μ L
- DNA 1/100 : 3 μ L
- ddH₂O : 21 μ L
- TOTAL : 50 μ L

PCR program

1. 94^o C for 2 min
2. 94^o C for 30 sec
3. 53^o C for 30 sec
4. 72^o C for 50 sec
5. Go to 2 for 16 times
6. 72^o C for 10 min
7. 12^o C for 5 min
8. End

PCR για ένωση TP και n-ΔDBoxes-FLAG

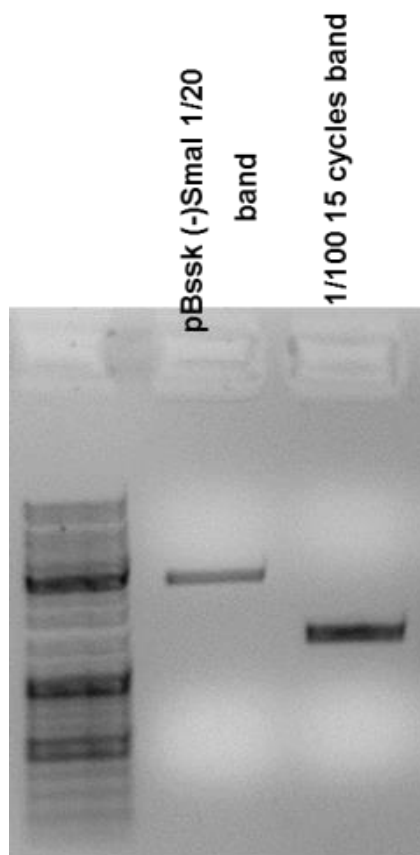
Τελικό προϊόν PCR αντίδρασης : 1490bp

PCR set-up

- Alba-For (3 μ M) : 5 μ L
- Albino-Flag (3 μ M) : 5 μ L
- Kapa Hi-fi(KK2101)(1Unit/ μ L) : 1 μ L
- Buffer HF (5x) : 10 μ L
- dNTPS(2mM): 5 μ L
- DNA TP **1/100** : 3 μ L
- DNA DBOX **1/100** : 3 μ L
- ddH₂O : 18 μ L

PCR program

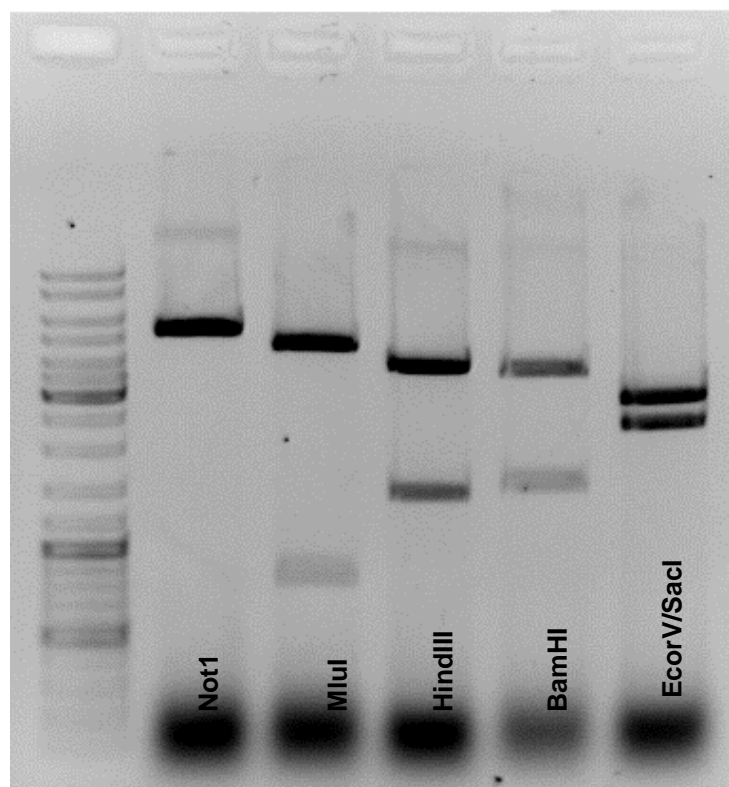
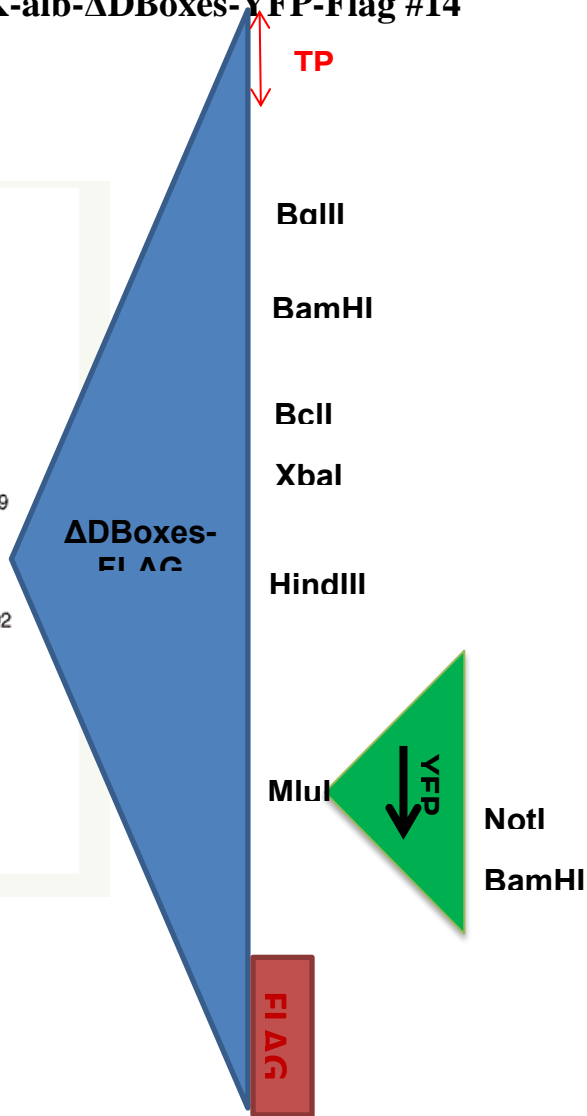
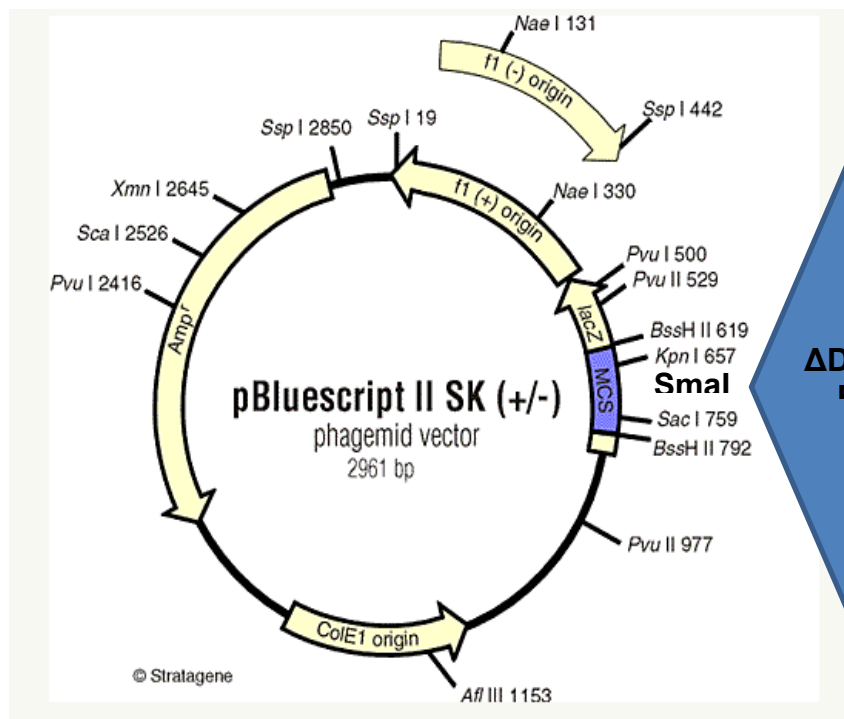
1. 94^o C for 2 min
2. 94^o C for 30 sec
3. 55^o C for 30 sec
4. 72^o C for 2min
5. Go to 2 for **14** times
6. 72^o C for 10 min
7. 12^o C for 5 min
8. End



0.8% Agarose gel
200215m2.tif

Εισαγωγή της πρωτεΐνης – μάρτυρα YFP(780bp) στην κατασκευή pBSSK-alb-ΔDBoxes-Flag #1

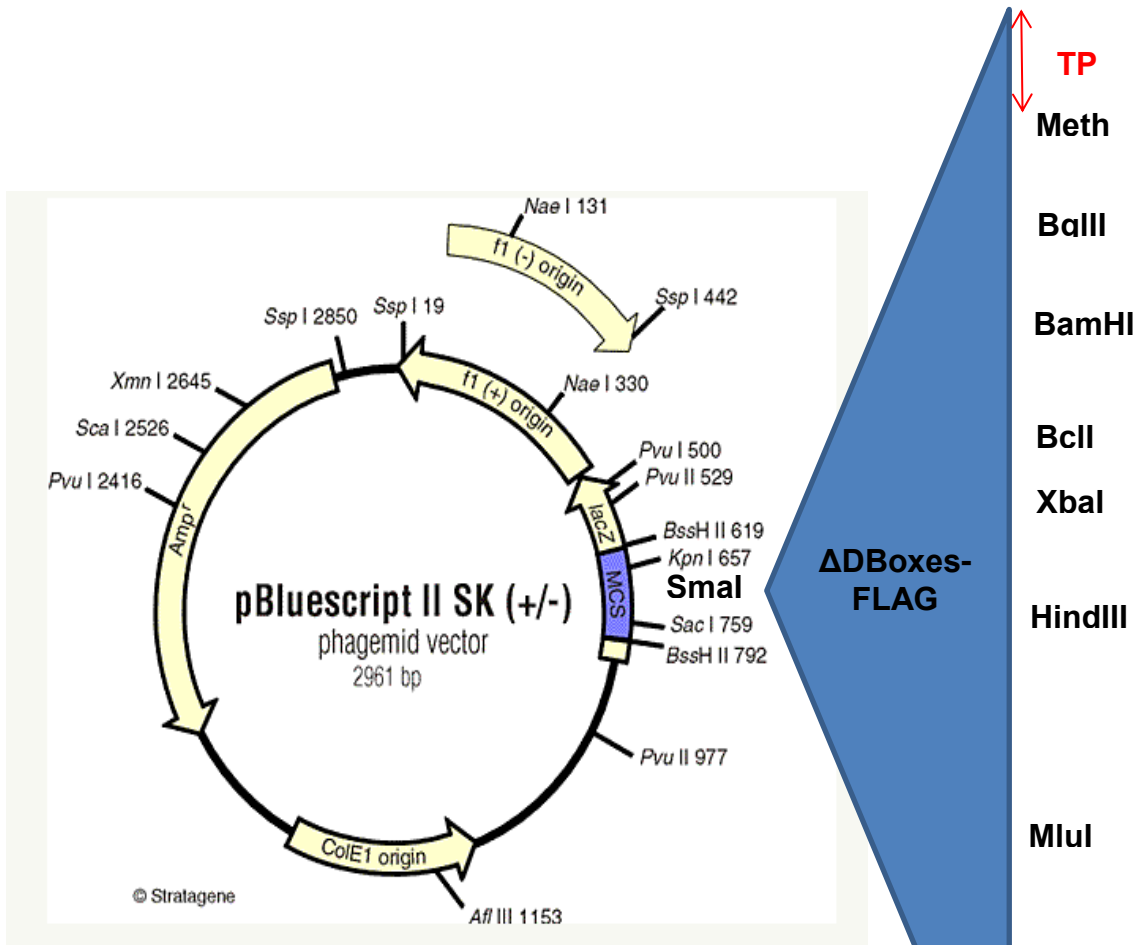
Επιλογή κλώνου pBSSK-alb-ΔDBoxes-YFP-Flag #14



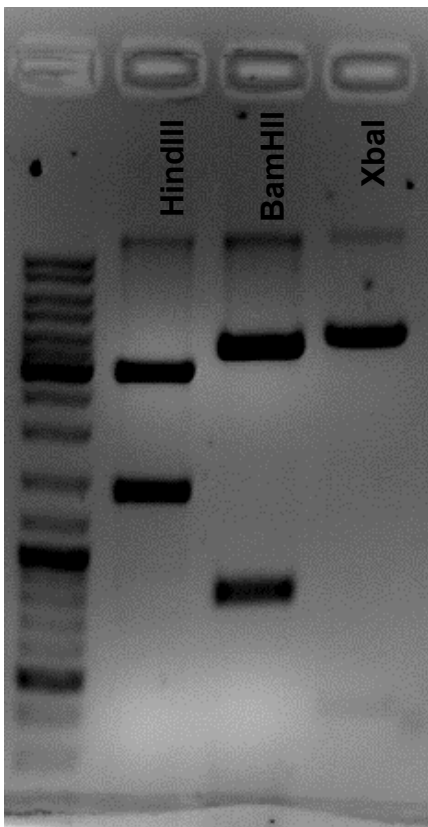
Επιβεβαιωτικές πέψεις κλώνου pBSSK-alb-ΔDBoxes-YFP-Flag #14

1^η κλωνοποίηση του τμήματος TP-ΑΒΓ σε pBluescriptSK II στη θέση SmaI –

Επιλογή κλώνου pBSSK-alb-ΔDBoxes-Flag #1



Επιβεβαιωτικές πέψεις κλώνου pBSSK-alb-ΔDBoxes-Flag #1

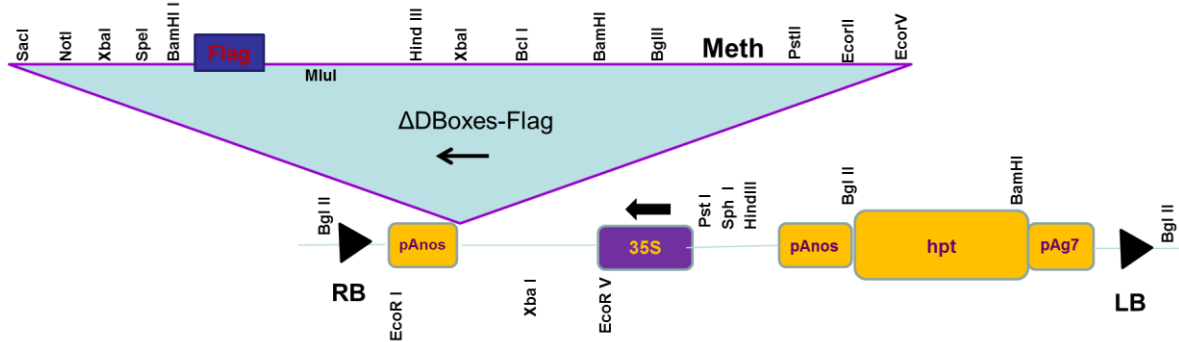


0.8 % Agarose gel
260215m2.tif

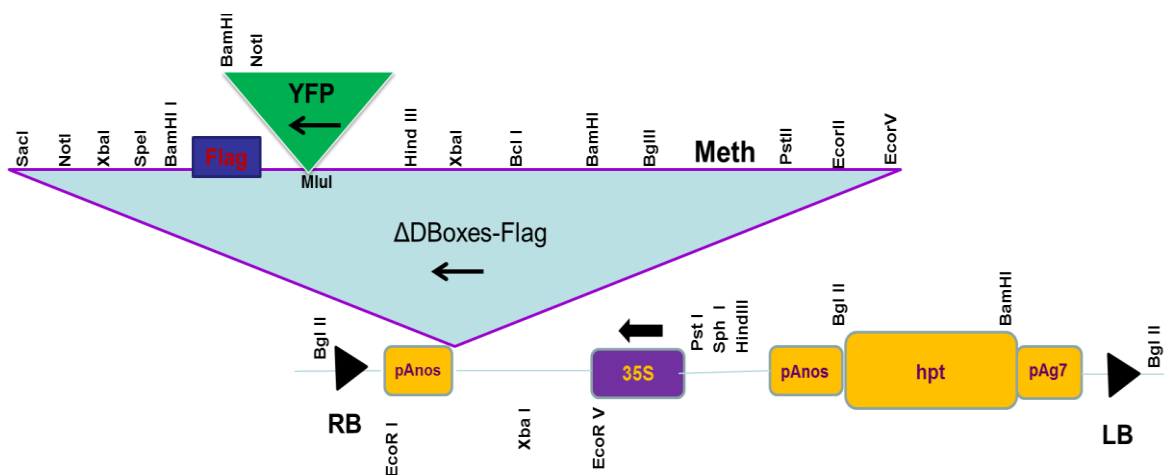
**Εισαγωγή του κλώνου ρBSSK-alb-ΔDBoxes-Flag #1
 στον δυαδικό φορέα έκφρασης 35S-pGPTV-hpt στις θέσεις EcoRV/SacI –
 Επιλογή κλώνου HYG35S -alb-ΔDBoxes-FLAG #1
 &**

**Εισαγωγή του κλώνου ρBSSK-alb-ΔDBoxes-YFP-Flag #14 στον δυαδικό φορέα έκφρασης
 HYG35S στις θέσεις EcoRV/SacI –
 Επιλογή κλώνου HYG35S-alb-ΔDBoxes-YFP-FLAG #2**

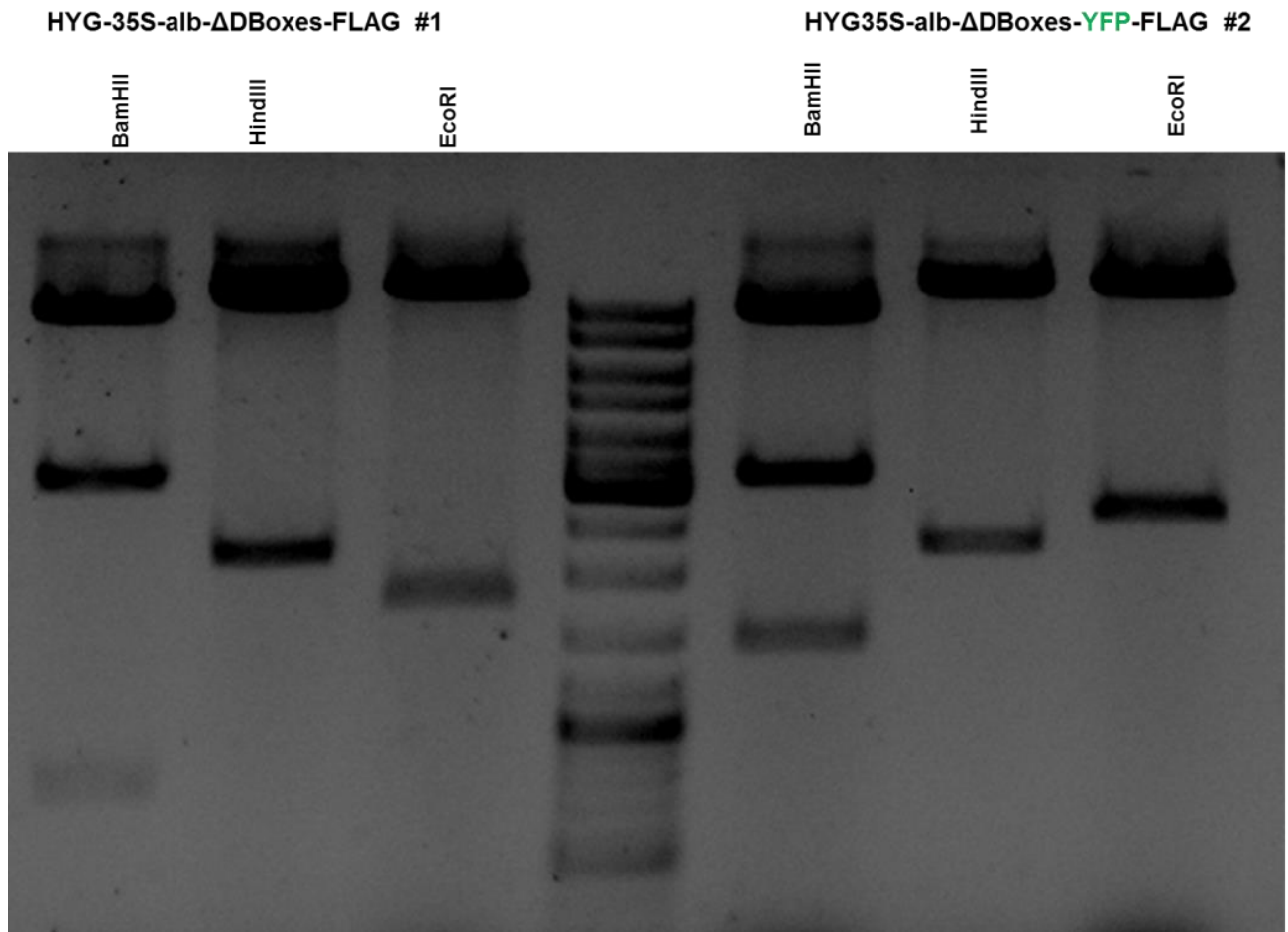
HYG35S -alb-ΔDBoxes-FLAG #1



HYG35S-alb-ΔDBoxes-YFP-FLAG #2



**Επιβεβαιωτικές πέψεις κλώνων HYG35S -alb-ΔDBoxes-FLAG #1
&
HYG35S-alb-ΔDBoxes-YFP-FLAG #2**



**0.8% Agarose gel
090715.tif**