

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Βιοχημική και μοριακή ανάλυση των πεπτιδύλ-προλύλ
cis-trans ισομερασών στα φυτά και στους
μικροοργανισμούς

Ευαγγελία-Διαμάντω Μ. Κουρή

Διδακτορική Διατριβή

Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης

Αθήνα 2013

Διδακτορική Διατριβή

Βιοχημική και μοριακή ανάλυση των πεπτιδύλ-προλύλ *cis-trans* ισομερασών στα φυτά και στους μικροοργανισμούς

Ευαγγελία-Διαμάντω Μ. Κουρή

Γεωπόνος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Μ. Sc.
Υπότροφος του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)

Επιβλέπων: Καθηγητής Παναγιώτης Κατινάκης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ
Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής ΓΠΑ
Μπουράνης Δημήτριος, Καθηγητής ΓΠΑ

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ
Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής ΓΠΑ
Μπουράνης Δημήτριος, Καθηγητής ΓΠΑ
Κίντζιος Σπυρίδων, Καθηγητής ΓΠΑ
Καραμπουρνιώτης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ
Αϊβαλάκις Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ
Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Περίληψη

Η *cis/trans* ισομερείωση των πεπτιδικών δεσμών που προηγούνται μιας προλίνης είναι μια αργή διαδικασία που καταλύεται τις Πεπτιδύλ–Προλύλ *cis/trans* Ισομεράσες (PPIases, Peptidyl–Prolyl *cis/trans* Isomerases, E.C. 5.2.1.8). Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί τρεις οικογένειες PPIασών οι κυκλοφιλίνες (Cyclophilins), οι FKBP's (FK506 Binding Proteins) και οι παρβουλίνες (Parvulins) ενώ πρόσφατα βρέθηκε ότι έχει δράση PPIάσης και η PTPA (Phosphatase Two A Phosphatase Activator). Οι PPIάσες είναι ένζυμα καθολικής διάδοσης, εμπλέκονται σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών ενώ μέλη των ευκαρυωτικών παρβουλινών είναι απαραίτητες για την βιωσιμότητα του οργανισμού από τον οποίο προέρχονται. Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη βιοχημική και μοριακή ανάλυση PPIασών που ανήκουν στην οικογένεια των παρβουλινών και προέρχονται από το φυτικό μοντέλο *Lotus japonicus* αλλά και από τον συμβιωτή του *Mesorhizobium loti*.

Στο *L. japonicus* εντοπίστηκαν και μελετήθηκαν τρεις παρβουλίνες οι *LjPar1*, *LjPar2* και *LjPar3*. Οι *LjPar1* και *LjPar2* αποτελούνται μόνο από τη δομική περιοχή παρβουλίνης και είναι ομόλογες των *hPIN1* και *hPar14* από τον άνθρωπο αντίστοιχα. Η *LjPar3* αντιπροσωπεύει μια νέα οικογένεια παρβουλινών που έχουν μια επιπλέον ενεργή δομική περιοχή ροδανάσης/θειομεταφοράσης και εντοπίζονται κυρίως στους φυτικούς οργανισμούς. Οι τρεις παρβουλίνες παρουσιάζουν *in vitro* ενζυμική δραστηριότητα PPIάσης έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων με διαφορετικές σταθερές εξειδίκευσης που οφείλονται στο αμινοξύ που προηγείται της προλίνης. Με τη μέθοδο RNA-RNA *in situ* υβριδισμού μελετήθηκε ο χώρο-χρονικός εντοπισμός των μεταγραφημάτων των *LjPar2* και *LjPar3* σε αναπτυσσόμενα φυμάτια. Με τη χρήση χειμερικών πρωτεϊνών *LjPar-eYFP* (enhanced Yellow Fluorescence Protein) βρέθηκε ότι οι *LjPar1* και *LjPar2* εντοπίζονται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα επιδερμικών φύλλων *Arabidopsis* ενώ η *LjPar3* εντοπίζεται στα πλαστίδια. Η διερεύνηση του δικτύου αλληλεπιδράσεων των παρβουλινών του *L. japonicus* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των δύο υβριδίων σε κύτταρα ζύμης. Στη σάρωση βιβλιοθήκης από φυμάτια και ρίζες του *L. japonicus* χρησιμοποιώντας την *LjPar1* ως δόλωμα απομονώθηκαν 99 κλώνοι, από αυτούς 22 ικανοί να διατηρήσουν την αλληλεπιδράση στον επανέλεγχο ενώ ταυτόχρονα παρουσιαζόταν και το φαινόμενο της αυτόνομης ενεργοποίησης των γονιδίων αναφοράς. Αντίστοιχα, για την *LjPar2* απομονώθηκαν 8 διαφορετικοί κλώνοι που παρουσίαζαν έντονα το φαινόμενο της αυτόνομης ενεργοποίησης. Τέλος, στην σάρωση με την *LjPar3* απομονώθηκαν 64 κλώνοι από τους οποίους ένας κλώνος, που εντοπίστηκε 4 φορές, αλληλεπιδρά με την *LjPar3*, χωρίς να ενεργοποιεί αυτόνομα τα γονίδια αναφοράς. Παράλληλα, για τη μελέτη της λειτουργίας των φυτικών παρβουλινών πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός υποκοτυλίων του *L. japonicus* με σκοπό τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών στα οποία πραγματοποιείται αποσιώπηση των γονιδίων των παρβουλινών. Για την *LjPar1* ελέχθησαν 23 μετασχηματισμένα φυτά και 2 σειρές από αυτά να παρουσίασαν μείωση των επιπέδων μεταγραφημάτων της *LjPar1* σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95%. Αντίστοιχα για την *LjPar2* μελετήθηκαν 19 φυτά και σε 6 σειρές παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων μεταγραφημάτων της *LjPar2* σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95%. Τέλος, για την *LjPar3* μελετήθηκαν 10 φυτά και σε 3 σειρές παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων μεταγραφημάτων της *LjPar3* σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90%.

Ταυτόχρονα, με σκοπό τον εντοπισμό πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με την παρβουλίνη *MIPar1* του *M. loti*, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (LC-MS-MS) πρωτεϊνών του *M. loti* που προέκυψαν από συγκαθίζηση τους με την *MIPar1*.

Λέξεις κλειδιά: cis-trans ισομερείωση, παρβουλίνες, Lotus japonicus, Mesorhizobium loti, σύστημα δύο υβριδίων, αποσιώπηση γονιδίων.

Abstract

The *cis/trans* isomerization of the peptide bond preceding proline is an intrinsically slow processes catalyzed by Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerases (PPIases, E.C. 5.2.1.8). There are three well studied families of PPIases cyclophilins, FK506 Binding Proteins and parvulins, whilst recently PTPA (Phosphatase Two A Phosphatase Activator) was found to exhibit PPIase activity. PPIases are ubiquitous enzymes involved in various biological processes. Interestingly, eukaryotic parvulins compromise the only family having essential members for the survival of the organism they belong. The aim of this thesis is the biochemical and molecular analysis of parvulins in the model legume *Lotus japonicus* as well in the microsymbiot *Mesorhizobium loti*.

In *L. japonicus* there are three parvulins designated as *LjPar1*, *LjPar2* and *LjPar3*. *LjPar1* and *LjPar2* represent single domain parvulins homologous to hPIN1 and hPar14 from human respectively. *LjPar3* represents a novel multidomain parvulin, apparently present only in plants, that contains an active carboxyl-terminal sulfurtransferase domain. All three parvulins exhibit PPIase activity with different substrate specificities depending on the amino acid amino terminal to proline. Spatial localization of *LjPar2* and *LjPar3* gene expression during nodule development was determined by RNA-RNA in situ hybridization. Subcellular localization of LjPar-enhanced Yellow Fluorescence Protein (eYFP) fusions expressed in Arabidopsis leaf epidermal cells revealed that *LjPar1*- and *LjPar2*-eYFP fusions were localized in the cytoplasm and in the nucleus, in contrast to *LjPar3*-eYFP, which was clearly localized in plastids. The interaction network of *L. japonicus* parvulins was explored by a yeast two hybrid library screening. For *LjPar1* 99 clones were initially isolated, only 22 of them were able to interact with *LjPar1* but also were autoactivating the reporter genes. In the screening with *LjPar2* only 8 different clones were isolated and all of them presented to autoactivate the reporter genes. In the case of *LjPar3*, 64 clones were isolated and one of them was able to interact with *LjPar3* without autoactivating the reporter genes. Finally, for the functional characterization of plant parvulins we generated transgenic lines of *L. japonicus* with an RNAi (RNA interference) construct that expresses hairpin double-stranded RNA for each parvulin to induce sequence specific RNA silencing. For *LjPar1* we obtained 23 independent transgenic lines in two of which the transcript levels of *LjPar1* were reduced more than 95%. Accordingly, for *LjPar2* we obtained 19 transgenic lines in 6 of which the transcript levels of *LjPar2* were reduced more than 95% and for *LjPar3* out of 10 transgenic lines 3 exhibited a reduction in the transcript levels of *LjPar3* more than 90%. Furthermore, a co-precipitation approach and analysis with LC-MS-MS was undertaken in order to identify interactions of *MIPar1* with proteins from *M. loti*.

Key words: *cis-trans* isomerisation, parvulin, *Lotus japonicus*, *Mesorhizobium loti*, yeast two hybrid, RNA interference.

Το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής εγκρίθηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας [Συνεδρία 10^η /12-04-2007].

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Μπουράνης Δημήτριος, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή ορίστηκε κατά τη 14^η/04-07-2013 συνεδρία της Γενικής Συνέλευσης του τμήματος με την εξής σύνθεση:

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής ΓΠΑ

Μπουράνης Δημήτριος, Καθηγητής ΓΠΑ

Κίντζιος Σπυρίδων, Καθηγητής ΓΠΑ

Καραμπουρνιώτης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Αϊβαλάκης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Η έγκριση της παρούσας διδακτορικής διατριβής από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών δεν δηλώνει την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ.202 παρ.2).

Στη μνήμη του
πατέρα μου Μαρίνου
(28-11-2002) και του
αδερφού μου Δημήτρη
(21-07-2003)

Αντί προλόγου

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή Κατινάκη Παναγιώτη, τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Καθηγητή Μπουράνη Δημήτριο και Καθηγητή Χατζόπουλο Πολυδεύκη καθώς και τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις υποδείξεις και εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Σε αυτό το σημείο θέλω να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον μέντορά μου, Επίκουρο Καθηγητή Φλεμετάκη Εμμανουήλ για την αμέριστη υποστήριξη και άμεση καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής αυτής.

Επίσης νιώθω το χρέος να ευχαριστήσω μέλη των εργαστηρίων Μοριακής Βιολογίας, Ενζυμικής Τεχνολογίας, Φυσιολογίας Φυτών και Βελτίωσης Φυτών χωρίς την συνεργασία των οποίων δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της μελέτης αυτής. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Καθηγητή Γεώργιο Σκαράκη για την παραχώρηση του θαλάμου ανάπτυξης φυτών. Ευχαριστώ και τους Δρ. Γαρμπή Σπύρο και Δρ. Ρουμेलιώτη Θεόδωρο για την ανάλυση των δειγμάτων πρωτεϊνών με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους συναδέλφους Χρυσάνθη και Catalina.

Τέλος, μα πρώτα από όλους ευχαριστώ την οικογένειά μου. Πραγματικά σε στηρίζατε και με στηρίζετε σε όλες μου τις αποφάσεις. Ευχαριστώ Μαμά, Βαγγέλη, Δήμητρα, Μαρία, Μαρίνα, Αριάννα και Φώτη.

Περιεχόμενα

A. Εισαγωγή	1
A.1. Γενικά.....	3
A.2. Οι κυκλοφιλίνες.....	4
A.2.1. Οι κυκλοφιλίνες στους φυτικούς οργανισμούς.....	5
A.3. Οι FKBP's.....	7
A.3.1. Οι FKBP's στους φυτικούς οργανισμούς.....	8
A.3.2. Οι χλωροπλαστικές FKBP's.....	10
A.4. Οι παρβουλίνες.....	11
A.4.1. Οι παρβουλίνες στους προκαρυωτικούς οργανισμούς.....	11
A.4.1.1. Η Par10 του <i>E. coli</i>	11
A.4.1.2. Η SurA του <i>E. coli</i>	12
A.4.1.3. Η PpiD του <i>E. coli</i>	14
A.4.1.4. Οι παρβουλίνες στους διαζωτροφικούς μικροοργανισμούς.....	14
A.4.2. Οι ευκαρυωτικές παρβουλίνες τύπου PIN.....	15
A.4.3. Ess1, η παρβουλίνη του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
A.4.4. Η παρβουλίνη PIN1 στον άνθρωπο.....	17
A.4.4.1. Δομή και ενεργό κέντρο της hPIN1.....	17
A.4.4.2. Ρόλος της WW δομικής περιοχής.....	18
A.4.4.3. Μηχανισμοί ρύθμισης της λειτουργίας της hPIN1.....	18
A.4.4.4. Η hPIN1 συμμετέχει σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες.....	19
A.4.4.4.α. Η Pin1 συντονίζει την πορεία της μίτωσης.....	19
A.4.4.4.β. Η Pin1 στη μετάβαση από τη G1 φάση στην S.....	20
A.4.4.4.γ. Η hPIN1 υπερεκφράζεται σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου.....	20
A.4.4.4.δ. PIN1 και κυτταρικό στρες.....	21
A.4.4.4.ε. PIN1 και νευρικά κύτταρα.....	22
A.4.5. Η παρβουλίνη hPar14.....	23
A.4.6. Οι παρβουλίνες στους φυτικούς οργανισμούς.....	24
A.4.6.1. Οι παρβουλίνες τύπου PIN1 στα φυτά και η απουσία της WW δομικής περιοχής.....	25
A.4.6.2. Δομή της AtPIN1.....	25
A.4.6.3. Η AtPIN1 ρυθμίζει το χρόνο άνθισης στο <i>Arabidopsis</i>	27
A.5. Το ψυχανθές <i>Lotus japonicus</i>	27
A.6. Το ριζόβιο <i>Mesorhizobium loti</i>	30
A.6.1. Το γονιδίωμα του <i>Mesorhizobium loti</i>	30
B. Υλικά και Μέθοδοι.....	33
B.1. Ανάπτυξη μικροοργανισμών και φυτών.....	35
B.1.1. Ανάπτυξη βακτηρίων.....	35
B.1.2. Ανάπτυξη κυττάρων <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
B.1.3. Βλάστηση σπερμάτων και καλλιέργεια φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
B.1.4. Βλάστηση σπερμάτων και καλλιέργεια φυτών <i>Lotus japonicus</i>	36
B. 2. Απομόνωση, ανάλυση και χειρισμοί νουκλεϊνικών οξέων.....	37
B.2.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>E. coli</i>	37
B.2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
B.2.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
B.2.4. Απομόνωση γενωματικού DNA από φυτικούς ιστούς.....	38
B.2.5. Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.....	39

B.2.6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων.....	39
B.2.7. Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης.....	39
B.2.8. Απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	40
B.2.9. Πέψη DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	40
B.2.10. Ενοποίηση άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης.....	40
B.2.11. Αποφωσφορυλίωση τμημάτων DNA.....	41
B.2.12. Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA.....	41
B.3. Μετασχηματισμός βακτηρίων.....	42
B.3.1. Δημιουργία κυττάρων <i>E. coli</i> ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells).....	42
B.3.2. Δημιουργία κυττάρων <i>E. coli</i> ικανών για μετασχηματισμό υψηλής απόδοσης (High efficiency Competent Cells).....	42
B.3.3. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i>	43
B.3.4. Δημιουργία κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ικανών για μετασχηματισμό... ..	43
B.3.5. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>A. tumefaciens</i>	44
B.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	44
B.4.1. Ενίσχυση ακολουθιών DNA με την χρήση της τεχνικής PCR.....	44
B.4.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).....	46
B.4.3. Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (qPCR).....	46
B.5. <i>In situ</i> υβριδισμός.....	48
B.5.1. Προετοιμασία λεπτών φυτικών τομών.....	48
B.5.1.1. Μονιμοποίηση ιστών.....	48
B.5.1.2. Διαφανοποίηση ιστών.....	48
B.5.1.3. Εγκλεισμός ιστών σε παραφίνη.....	48
B.5.1.4. Καθαρισμός και προετοιμασία των αντικειμενοφόρων.....	49
B.5.1.5. Τομές ιστών.....	49
B.5.1.6. Απομάκρυνση της παραφίνης από τις τομές.....	49
B.5.2. Προετοιμασία του μη ραδιενεργά σημασμένου RNA ανιχνευτή.....	49
B.5.2.1. Πέψη του πλασμιδιακού φορέα για την <i>in vitro</i> μεταγραφή του ένθετου DNA. ..	49
B.5.2.2. <i>In vitro</i> μεταγραφή σημασμένου RNA.....	50
B.5.2.3. Υδρόλυση του σημασμένου RNA ανιχνευτή.....	50
B.5.3. Διαδικασία <i>in situ</i> RNA-RNA υβριδισμού.....	51
B.5.3.1. Διαδικασία προετοιμασίας των τομών για τον υβριδισμό.....	51
B.5.3.2. Προετοιμασία διαλύματος υβριδισμού.....	51
B.5.3.3. Διαδικασία υβριδισμού.....	52
B.5.3.4. Ξεπλύματα υβριδισμού.....	52
B.5.3.5. Ανοσολογική ανίχνευση του υβριδισμένου ανιχνευτή.....	52
B.6. Ανάλυση πρωτεϊνών, παραγωγή ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων και μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας.....	53
B.6.1. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford.....	53
B.6.2. Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.....	53
B.6.3. Μεταφορά πρωτεϊνών κατά Western και ανοσοεντοπισμός.....	54
B.6.4. Έκφραση ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων σε <i>E. coli</i> και απομόνωση τους με χρωματογραφία συγγένειας.....	55
B.6.5. Έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας PPIασών.....	56
B.6.6. Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα ζύμης.....	56
B.7. Υποκυτταρικός εντοπισμός πρωτεϊνών.....	57
B.7.1. Δημιουργία κατασκευών για στον φορέα pAVA554.....	57
B.7.2. Προετοιμασία των μικροσωματιδίων χρυσού και κατακρήμνηση του DNA.....	58
B.7.3. Μετασχηματισμός φύλλων με τη μέθοδο του βομβαρδισμού.....	58
B.8. Εντοπισμός πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με παρβουλίνες με το σύστημα των δύο υβριδίων σε ζύμες.....	60

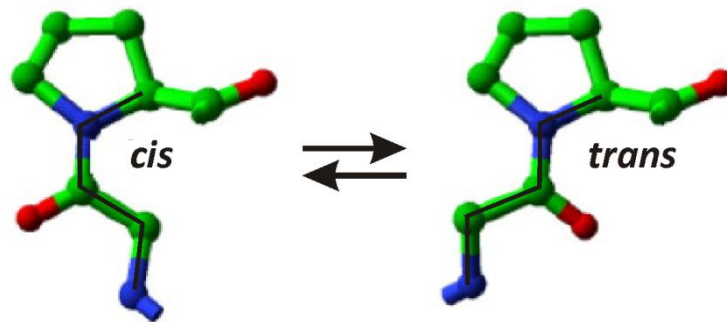
B.8.1. Κλωνοποίηση των παρβουλινών στον φορέα pGBKT7.	60
B.8.2. Μετασηματισμός κυττάρων ζύμης.	61
B.8.3. Σάρωση cDNA βιβλιοθήκης.	62
B.9. Σίγηση (αποσιώπηση) γονιδίων σε φυτά.	63
B.9.1. Κατασκευή δυαδικών φορέων αποσιώπησης με την τεχνολογία GATEWAY.....	64
B.9.2. Μετασηματισμός υποκοτυλίων <i>Lotus japonicus</i> μέσω <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	67
B.9.2.1. Βλάστηση σπόρων.....	67
B.9.2.2. Μόλυνση υποκοτυλίων του <i>L. japonicus</i> με <i>A. tumefaciens</i> AGL1.....	67
B.9.2.3. Επαγωγή κάλλου.	68
B.9.2.4. Επαγωγή και ανάπτυξη βλαστού.	68
B.9.2.5. Επαγωγή και ανάπτυξη ρίζας.	68
B.10. Εύρεση αλληλεπιδράσεων μεταξύ της <i>MIPar1</i> (mll3467) και ολικών πρωτεϊνών από το <i>Mesorhizobium loti</i>	70
B.10.1. Έκφραση και προσρόφηση της ανασυνδυασμένης παρβουλίνης του <i>M. loti</i> με επιτόπιο τη μεταφοράση της γλουταθειόνης.	70
B.10.2. Απομόνωση ολικών διαλυτών πρωτεϊνών από το <i>Mesorhizobium loti</i>	71
B.10.3. Απομόνωση πρωτεϊνών του <i>Mesorhizobium loti</i> που πιθανά αλληλεπιδρούν με την <i>MIPar1</i>	71
Γ. Αποτελέσματα	73
Γ.1. Οι παρβουλίνες στους φυτικούς οργανισμούς.....	75
Γ.1.1. Οι παρβουλίνες τύπου <i>Par1</i> στα φυτά.	75
Γ.1.2. Οι παρβουλίνες τύπου <i>Par2</i> στα φυτά.....	78
Γ.1.3. Οι παρβουλίνες τύπου <i>Par3</i> στα φυτά.....	79
Γ.1.4. Φυλογενετική σχέση των φυτικών παρβουλινών.	81
Γ.2. Μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας των παρβουλινών του <i>Lotus japonicus</i>	83
Γ.3. <i>In situ</i> εντοπισμός των μεταγραφημάτων της <i>LjPar2</i> και <i>LjPar3</i> σε φυμάτια του <i>Lotus japonicus</i>	84
Γ.4. Υποκυτταρικός εντοπισμός των παρβουλινών του <i>Lotus japonicus</i>	87
Γ.5. Εντοπισμός πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με τις παρβουλίνες του <i>Lotus japonicus</i>	89
Γ.5.1. Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών για το σύστημα των δύο υβριδίων.....	89
Γ.5.2. Έλεγχος της παραγωγής των υβριδίων BD-παρβουλίνης στα κύτταρα ζύμης.	90
Γ.5.3. Έλεγχος αυτόνομης ενεργοποίησης των γονιδίων επιλογής από το υβρίδιο BD- παρβουλίνη.....	91
Γ.5.4. Εντοπισμός AD-κλώνων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που πιθανά αλληλεπιδρούν με τις παρβουλίνες του <i>L. japonicus</i>	92
Γ.5.4.1. Ανάλυση των κλώνων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την <i>LjPar1</i>	93
Γ.5.4.2. Ανάλυση των κλώνων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την <i>LjPar2</i>	102
Γ.5.4.3. Ανάλυση των κλώνων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την <i>LjPar3</i>	103
Γ.6. Σίγηση (αποσιώπηση) των παρβουλινών του <i>Lotus japonicus</i>	107
Γ.6.1. Πλασμιδιακές κατασκευές.....	107
Γ.6.2. Μετασηματισμός <i>Agrobacterium</i>	109
Γ.6.3. Μετασηματισμός υποκοτυλίων <i>Lotus japonicus</i> και ανάπτυξη μετασηματισμένων φυτών.	110
Γ.6.4. Έλεγχος επιτυχίας μετασηματισμού.	114
Γ.6.5. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των παρβουλινών στα μετασηματισμένα φυτά.	115
Γ.6.5.1. Μετασηματισμός H7P1.	116
Γ.6.5.2. Μετασηματισμός H7P2	117
Γ.6.5.3. Μετασηματισμός H7P3.	119

Γ.7. Οι παρβουλίνες του <i>Mesorhizobium loti</i>	121
Γ.7.1. Η πρωτεΐνη <i>MIPar1</i>	122
Γ.7.2. Εντοπισμός πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με την <i>MIPar1</i>	122
Γ.7.2.1. Η πρωτεΐνη <i>mlr9276</i>	123
Γ.7.2.2. Η πρωτεΐνη <i>mll6538</i>	124
Γ.7.2.3. Η πρωτεΐνη <i>mlr3769</i>	126
Γ.7.2.4. Η πρωτεΐνη <i>mll5087</i>	128
Γ.7.2.5. Η πρωτεΐνη <i>mlr0295</i>	129
Γ.7.2.6. Η πρωτεΐνη <i>mll0858</i>	130
Γ.7.2.7. Η πρωτεΐνη <i>mll2088</i>	130
Γ.7.2.8. Η πρωτεΐνη <i>mll3844</i>	131
Γ.7.2.9. Η πρωτεΐνη <i>mll4219</i>	132
Γ.7.2.10. Η πρωτεΐνη <i>mll9374</i>	132
Δ. Συζήτηση	133
Δ.1. Τρεις παρβουλίνες εντοπίζονται στο <i>Lotus japonicus</i>	135
Δ.2. Οι τρεις παρβουλίνες του <i>Lotus japonicus</i> είναι ενεργές ΡΡΐάσεις.	136
Δ.3. Η <i>LjPar3</i> είναι μια παρβουλίνη με δύο διαφορετικές λειτουργικές δομικές περιοχές.	138
Δ.4. Τα μεταγραφήματα των παρβουλινών εντοπίζονται στα φυμάτια του <i>Lotus japonicus</i>	139
Δ.5. Οι <i>LjPar1</i> και <i>LjPar2</i> εντοπίζονται σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα ενώ η <i>LjPar3</i> εντοπίζεται στον χλωροπλάστη.	139
Δ.6. Εντοπισμός πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με τις παρβουλίνες του <i>Lotus japonicus</i>	140
Δ.7. Σίγηση των παρβουλινών σε φυτά <i>Lotus japonicus</i>	141
Δ.8. Εντοπισμός πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με τις παρβουλίνες του <i>Mesorhizobium loti</i>	142
Ε. Βιβλιογραφία	143
ΣΤ. Παράρτημα.....	161

A. Εισαγωγή

A.1. Γενικά.

Τα αμινοξέα, που αποτελούν τις δομικές μονάδες των πρωτεϊνών συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Κατά κανόνα ο πεπτιδικός δεσμός μεταξύ των αμινοξέων υιοθετεί τη *trans* διαμόρφωση αφού είναι ενεργειακά προτιμότερη εξαιτίας των μικρότερων στερεοχημικών απώσεων μεταξύ των μη συνδεδεμένων ατόμων. Όμως, η κυκλική πλευρική ομάδα της προλίνης επιτρέπει στον πεπτικό δεσμό που σχηματίζεται μεταξύ ενός αμινοξέος και μιας προλίνης να είναι ενεργειακά σταθερός και στη *cis* διαμόρφωση του (Εικόνα A.1). Αυτή η ιδιότητα του δεσμού της προλίνης εμφανίζεται και σε επίπεδο πρωτεϊνών. Ύστερα από ανάλυση της τριτοταγούς δομής πρωτεϊνών προέκυψε ότι το 50% από αυτές φέρουν τουλάχιστον έναν πεπτικό δεσμό στην *cis* διαμόρφωση, το ποσοστό αυτό αντιστοιχεί στο 0,3% όλων των δεσμών. Το 87% των *cis* δεσμών αφορά δεσμούς που προηγούνται της προλίνης και αφορούν το 5,7% των συνολικών δεσμών προλίνης (Pal and Chakrabarti, 1999).



Εικόνα A.1: Το διπεπτίδιο αλανίνη-προλίνη στη *cis* και *trans* διαμόρφωση.

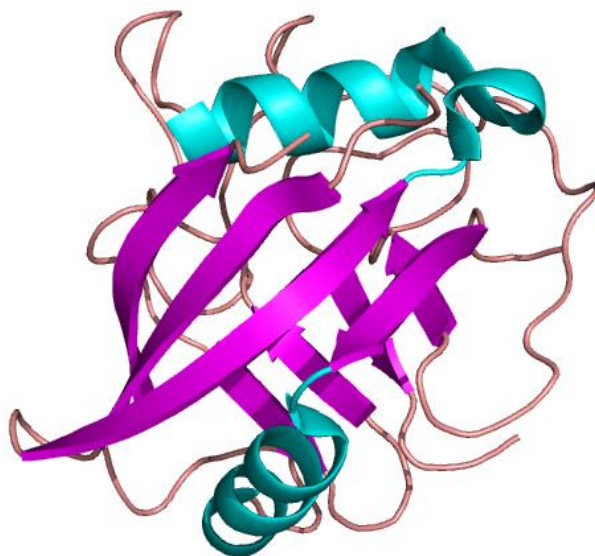
Το ιδιαίτερο αυτό χαρακτηριστικό του ιμιδικού δεσμού ανάμεσα σε ένα αμινοξύ και σε μια προλίνη παρέχει τη δυνατότητα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα μιας πρωτεΐνης να καταλαμβάνει δυο ξεχωριστές διαμορφώσεις. Η κάθε μια διαμόρφωση προσδίδει στην πρωτεΐνη διαφορετικές ιδιότητες, για παράδειγμα η *cis* διαμόρφωση του προλύν-δεσμού προκαλεί συμπαγείς στροφές στην ραχοκοκαλιά μιας πρωτεΐνης που μπορεί να έχει άμεσες επιπτώσεις στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Η μετάβαση από τη μια διαμόρφωση στην άλλη ελέγχεται από μια κατηγορία ενζύμων που ονομάζονται Πεπτιδύλ-Προλύλ *cis/trans* Ισομεράσες (Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerases, PPIases, E.C. 5.2.1.8) (Fischer *et al.*, 1984). Οι PPIάσες είναι ένζυμα καθολικής διάδοσης καθώς έχουν εντοπιστεί σε αρχαιοβακτήρια (Maruyama and Furutani, 2000) προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, εντοπίζονται σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα και αλληλεπιδρούν με μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών συμμετέχοντας σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών (Galat, 2003).

Οι PPIάσες αποτελούνται από τρεις καλά μελετημένες οικογένειες πρωτεϊνών που σε αμινοξικό και δομικό επίπεδο διαφέρουν μεταξύ τους, τις κυκλοφιλίνες (Cyclophilins, CyPs), τις FKBP (FK506 Binding Proteins) και τις παρβουλίνες. Πρόσφατα προτάθηκε να συμπεριληφθεί στις PPIάσες και η PTPA (Phosphatase Two A Phosphatase Activator) που ανακαλύφθηκε ότι παρουσιάζει δράση *cis/trans* ισομεράσης (Jordens *et al.*, 2006). Οι κυκλοφιλίνες και οι FKBP, που μαζί ονομάζονται ανοσοφιλίνες, έχουν μελετηθεί εκτενώς καθώς αποτελούν στόχους των ανοσοκατασταλτικών παραγόντων κυκλοσπορίνη A (CsA)

και FK506 αντίστοιχα, ενώ οι FKBP's αποτελούν και τον στόχο του ανοσοκατασταλτικού και πιθανού αντικαρκινικού παράγοντα ραπαμικίνη (Barik, 2006). Η δράση των παρβουλινών δεν παρεμποδίζεται από τους ανοσοκατασταλείς κυκλοσπορίνη A, FK506 και ραπαμικίνη, όμως παρεμποδίζεται από τη 5-υδρόξυ-1,4-ναφθοκινόνη (juglone) (Hennig *et al.*, 1998).

A.2. Οι κυκλοφιλίνες.

Η πρώτη κυκλοφιλίνη που μελετήθηκε είναι η κυκλοφιλίνη A (CypA) από τον άνθρωπο, εντοπίστηκε κατά τη διάρκεια ερευνών για τον εντοπισμό του ενδοκυτταρικού υποδοχέα της CsA (Handschumacher *et al.*, 1984). Η CypA είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη και εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών. Η δομή της έχει επιλυθεί και αποτελείται από 165 αμινοξέα που σχηματίζουν 8 αντιπαράλληλους β-κλώνους, δημιουργώντας δομή β-βαρελιού και δύο α-έλικες σε κάθε πλευρά του βαρελιού (Εικόνα A.2) (Zhao and Ke, 1996). Η ανοσοκατασταλτική δράση της CsA εξασκείται μέσω της δημιουργίας ενός τριμερούς συμπλόκου μεταξύ της CypA, της CsA και της καλσινευρίνης με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η δράση φωσφατάσης της καλσινευρίνης. Οι πρωτεΐνες στόχοι της καλσινευρίνης παραμένουν φωσφορυλιωμένες και κατά συνέπεια γονίδια υπεύθυνα για την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού δεν εκφράζονται και ο οργανισμός οδηγείται σε ανοσοκαταστολή (Liu *et al.*, 1991).



Εικόνα A.2: Η τριτοταγής δομή της CypA. Διακρίνονται οι 8 αντιπαράλληλοι β-κλώνοι και οι δύο α-έλικες. (PDB ID: 2CYH).

Κοινό χαρακτηριστικό των κυκλοφιλινών είναι η παρουσία μιας δομικής ενότητας PPIάσης μήκους 109 αμινοξέων υπεύθυνης για τη ισομερείωση του δεσμού της προλίνης (Cyclophilin-Like Domain, CLD). Πολλά μέλη της οικογένειας των κυκλοφιλινών εκτός από την περιοχή CLD έχουν επιπλέον δομικές ενότητες που τους προσδίδουν λειτουργική εξειδίκευση ή καθορίζουν την υποκυτταρική τους τοποθέτηση (Wang and Heitman, 2005). Λειτουργικές περιοχές που εντοπίζονται σε κυκλοφιλίνες περιλαμβάνουν επαναλήψεις WD40, επαναλήψεις TPR (Tetratricopeptide Repeats), περιοχές αναγνώρισης RNA (RNA Recognition Motif, RRM) και δάκτυλους ψευδαργύρου.

Οι κυκλοφιλίνες εντοπίζονται σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα και έχει προταθεί ότι συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως η κυτταρική διαίρεση (Schreiber, 1991), η διακίνηση πρωτεϊνών (Price *et al.*, 1994), η μεταγωγή σημάτων (Duina *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1996), το μάτισμα του mRNA (Horowitz *et al.*, 2002), ότι δρουν ως μοριακοί συνοδοί (Schmid, 1993; Weisman *et al.*, 1996), συμμετέχουν σε διαδικασίες αντοχής στο στρες (Andreeva *et al.*, 1999; Dominguez-Solis *et al.*, 2008) και συμμετέχουν στη συναρμολόγηση του συμπλόκου RISC (Iki *et al.*, 2012).

A.2.1. Οι κυκλοφιλίνες στους φυτικούς οργανισμούς.

Η συνεχής αποκωδικοποίηση των γονιδιωμάτων διάφορων οργανισμών έχει οδηγήσει στον εντοπισμό πολλών γονιδίων που πιθανά κωδικοποιούν για κυκλοφιλίνες. Ενώ οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών αυτών φαίνεται να είναι υψηλά συντηρημένες ο αριθμός των κυκλοφιλινών στους διάφορους οργανισμούς διαφέρει σημαντικά. Για παράδειγμα στο *E. coli* έχουν βρεθεί 2, στη ζύμη 8, στη δροσόφιλα 14 και στο *Caenorhabditis elegans* 17, στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς όμως ο αριθμός των γονιδίων που πιθανά κωδικοποιούν για κυκλοφιλίνες φαίνεται να είναι σημαντικά αυξημένος έτσι στο *Chlamydomonas reinhardtii* έχουν εντοπιστεί 26 γονίδια, στο *Arabidopsis* 29, στο ρύζι 27 και στο σόργο 36 (Ahn *et al.*, 2010). Παράλληλα, σημαντικός αριθμός κυκλοφιλινών του *Arabidopsis* πιθανά εντοπίζεται στο εσωτερικό (lumen) των θυλακοειδών (Romano *et al.*, 2005).

Η πρώτη αναφορά σχετικά με τη συμμετοχή των κυκλοφιλινών στη φωτοσυνθετική διαδικασία έγινε με την ανακάλυψη της TLP40 από το σπανάκι (Fulgosi *et al.*, 1998). Η TLP40 έχει μέγεθος 40 kDa και εκτός από την περιοχή κυκλοφιλίνης στο άμινο τελικό της άκρο φέρει ένα μοτίβο αυτόκλειστου λευκίνης. Η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται στο εσωτερικό του θυλακοειδούς των χλωροπλαστών και εμπλέκεται στην ρύθμιση της από-φωσφορύλιωσης της πρωτεΐνης D1 του φωτοσυστήματος II (Rokka *et al.*, 2000). Στο *Arabidopsis* ομόλογος της TLP40 είναι η AtCYP38 (At3g01480) που έχει βρεθεί ότι έχει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και διατήρηση του φωτοσυστήματος II (Fu *et al.*, 2007). Φυτά *Arabidopsis* στα οποία έχει γίνει διακοπή του γονιδίου AtCYP38 με ένθεση T-DNA είναι καχεκτικά και παρουσιάζουν ευαισθησία σε συνθήκες υψηλού φωτισμού. Ανάλυση φθορισμού της χλωροφύλλης και μελέτη της σύνθεσης της μεμβράνης των θυλακοειδών των μεταλλαγμένων φυτών έδειξαν ελαττωματική κατασκευή του φωτοσυστήματος II (Fu *et al.*, 2007).

Μια άλλη κυκλοφιλίνη, που εντοπίζεται στο διαλυτή φάση του στρώματος των χλωροπλαστών είναι η AtCYP20-3 (ROC4, At3g62030) (Lippuner *et al.*, 1994). Η AtCYP20-3 εκφράζεται μόνο σε φωτοσυνθετικούς ιστούς και η έκφρασή της επάγεται από το φως. Αποτελείται μόνο από τη δομική περιοχή κυκλοφιλίνης και η δραστηριότητα ΡΡ1άσης που παρουσιάζει εξαρτάται από την αναγωγή της από την θειορεδοξίνη (Motohashi *et al.*, 2003). Πρόσφατα προτάθηκε ότι η AtCYP20-3 αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ της μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά τη φωτοσύνθεση και τη ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού με τη βιοσύνθεση της κυστεΐνης, καθώς αλληλεπιδρά με την SAT1 (Serine Acetyltransferase, SAT, EC 2.3.1.30) (Dominguez-Solis *et al.*, 2008). Η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της SAT1 και την κανονική συσσώρευση θειόλων. Συνεπώς, μέσω της AtCYP20-3 συνδέεται η βιοσύνθεση της κυστεΐνης με το φως, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό και το στρες.

Η *AtCYP20-2* (TLP20, At5g13120) αποτελείται μόνο από τη περιοχή CLD και είναι η μοναδική κυκλοφιλίνη του lumen που παρουσιάζει *in vitro* δραστηριότητα ΡΡ1άσης (Edvardsson *et al.*, 2003), αν και ο ακριβής της ρόλος δεν είναι γνωστός. Αρχικά, είχε προταθεί ότι σχετίζεται με το σχηματισμό του φωτοσυστήματος II και ιδιαίτερα με την εισαγωγή της αντένας (Light-Harvesting Complex, LHCI) (Romano *et al.*, 2004b). Όμως μια πιο πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι η *AtCYP20-2* εντοπίζεται κυρίως στις μεμβράνες του στρώματος και συνδέεται με το σύμπλοκο της αφυδρογονάσης NAD(P)H του φωτοσυστήματος I (Sirpio *et al.*, 2009).

Οι υπόλοιπες χλωροπλαστικές κυκλοφιλίνες του *Arabidopsis* είναι οι *AtCYP26-2* (At1g74070), *AtCYP28* (At5g35100) και *AtCYP37* (At3g15520) και παρουσιάζουν σχετικά μικρό βαθμό ομολογίας με άλλα μέλη της οικογένειας των κυκλοφιλινών.

Από τις κυκλοφιλίνες του *Arabidopsis* αρκετές εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων και τουλάχιστον πέντε από αυτές εκτός από την περιοχή CLD έχουν περιοχές που σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών και RNA. Για παράδειγμα, η κυκλοφιλίνη *AtCYP59* (At1g53720) εκτός της περιοχής CLD έχει μια κεντρική περιοχή αναγνώρισης RNA (RNA Recognition Motif, RRM) οποία ακολουθείται από μια περιοχή πλούσια στα αμινοξέα αργινίνη-σερίνη. Η *AtCYP59* φαίνεται να αλληλεπιδρά με την SCL33/SR33 (μια SR πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο μάτισμα του RNA) όπως και με τη καρβόξυ τελική περιοχή της μεγάλης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II (C-Terminal Domain, CTD), άρα η *AtCYP59* πιθανά να εμπλέκεται στο στάδιο σύνδεσης μεταξύ μεταγραφής και ωρίμανσης pre-mRNA (Gullerona *et al.*, 2006). Περιοχές RRM εντοπίζονται και στις *AtCYP63* (At3g63400) και *AtCYP95* (At4g32420) και πιθανά να εμπλέκονται σε παρόμοιες διεργασίες με αυτές της *AtCYP59*. Τέλος, στην *AtCYP57* (At4g33060) εντοπίζεται η περιοχή πρόσδεσης στο RNA hnRNP που πιθανά προσδέεται στο ριβόσωμα και συνεισφέρει στο δίπλωμα νεοσυνθετιμένων πρωτεϊνών (Romano *et al.*, 2004a).

Κατά τη μελέτη φυτών τομάτας που φέρουν τη μετάλλαξη *dgt* (*diageotropica*) βρέθηκε ότι το υπεύθυνο γονίδιο είναι μια κυκλοφιλίνη, η *LeCYP1* (Oh *et al.*, 2006). Τα φυτά που φέρουν τη μετάλλαξη *dgt* παρουσιάζουν προβλήματα στην ανάπτυξη όπως μειωμένη κυριαρχία κορυφής, καθυστερημένο γεωτροπισμό, απουσία δευτερογενών ριζών, αλλοιωμένη ανάπτυξη ηθμών καθώς και μειωμένη ανάπτυξη καρπών (Zobel, 1973). Με τη μελέτη αυτών των φυτών βρέθηκε ότι η κυκλοφιλίνη *LeCYP1* συμμετέχει ενεργά στη μεταγωγή σημάτων μέσω της αυξίνης και κατά συνέπεια στην ανάπτυξη των φυτών (Oh *et al.*, 2006). Ορθόλογο γονίδιο της *LeCYP1* στο *Arabidopsis* πιθανά είναι η *AtCYP19-2* (ROC3, At2g16600) για τη λειτουργία της οποίας δεν υπάρχουν διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα.

Μια επίσης καλά μελετημένη κυκλοφιλίνη του *Arabidopsis* είναι η *AtCYP40* (SQUINT, SQN, At2g15790) που περιέχει 3 επαναλήψεις TPR (tetratricopeptide repeat) στο καρβόξυ τελικό της άκρο. Φυτά *Arabidopsis* που φέρουν τη μετάλλαξη *sqn* παρουσιάζουν πρόωρη παραγωγή ενήλικων φύλλων, καθυστέρηση στην έναρξη παραγωγής φύλλων, αυξημένο αριθμό καρπόφυλλων καθώς και διάφορα ελαττώματα στο σχηματισμό των ταξιανθιών χωρίς όμως να επηρεάζεται ο χρόνος άνθησης ή αναπαραγωγική τους ικανότητα (Berardini *et al.*, 2001). Ο φαινότυπος που παρατηρείται στα φυτά αποδόθηκε στην αύξηση της έκφρασης γονιδίων που ελέγχονται από microRNAs που είναι πιθανό να είναι αποτέλεσμα της μειωμένης δραστηριότητας της AGO1 (ARGONAUTE1) που είναι υπεύθυνη για την καταστολή της έκφρασης γονιδίων μέσω miRNAs στο *Arabidopsis* (Smith *et al.*, 2009). Παράλληλα, η *AtCYP40* μέσω των επαναλήψεων TPR αλληλεπιδρά με την

HSP90 στο κυτταρόπλασμα, μια διεργασία που είναι απαραίτητη για τη δράση της AtCYP40 (Earley and Poethig 2011; Iki *et al.*, 2012).

Η AtCYP71 (At3g44600) που εντοπίζεται στον πυρήνα και φέρει επαναλήψεις WD40 στο άμινο τελικό της άκρο είναι σημαντική για την καταστολή γονιδίων και την οργανογένεση στο *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2007a). Μεταλλάγματα *Arabidopsis* με μη λειτουργικό το γονίδιο *AtCYP71* παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα κορυφαίου μεριστώματος, καθυστερημένη και μη κανονική ανάπτυξη δευτερογενών οργάνων καθώς και μη κανονική ανάπτυξη ριζών. Η *AtCYP71* συνδέεται με την ιστόνη H3 και επηρεάζει το βαθμό μεθυλίωσης της και κατά συνέπεια πιθανά με αυτόν τον τρόπο συμμετέχει ενεργά στη διαδικασία αναδιάρθρωσης (remodeling) της χρωματίνης η οποία επηρεάζει την έκφραση ρυθμιστικών γονιδίων (Li *et al.*, 2007a).

Φυτά *Arabidopsis* με μη λειτουργικό το γονίδιο που κωδικοποιεί για την *AtCYP18-3* (At4g38740, ROC1) παρουσιάζουν διαφορές στο πρότυπο φωσφορυλίωσης του παράγοντα μεταγραφής BES1, που αποτελεί κρίσιμο σημείο ελέγχου στην ευαισθησία από τα μπρασινοστεροειδή (Trupkin *et al.*, 2012).

Τα επίπεδα έκφρασης πολλών κυκλοφιλινών αυξάνονται σε καταστάσεις βιοτικού και αβιοτικού στρες (Kumari *et al.*, 2012). Για παράδειγμα η *AtCYP19-4* (CYP5, At2g29960) εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, εκφράζεται κυρίως σε νεαρούς βλαστούς και ιδιαίτερα στο κορυφαίο μερίστωμα και λιγότερο στα φύλλα και στις ρίζες, παράλληλα η έκφρασή του αυξάνεται σημαντικά σε καταστάσεις ψύχους ή αυξημένης αλατότητας ενώ δεν επάγεται σε θερμική καταπόνηση (Saito *et al.*, 1999).

A.3. Οι FKBP's.

Οι FKBP's, σχεδόν ταυτόχρονα με τις κυκλοφιλίνες χαρακτηρίστηκαν ως ο κυτταρικός στόχος ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων. Στις FKBP's βρέθηκε ότι προσδέονται οι μακρολίδες FK506 και ραπαμικύνη (Harding *et al.*, 1989). Κοινό χαρακτηριστικό των FKBP's είναι η παρουσία μιας ή περισσοτέρων δομικών περιοχών πρόσδεσης της FK506 (FK506 binding domain, FKbd), όπου είναι και η περιοχή πρόσδεσης ανάλογων προλίνης όπως και το ενεργό κέντρο για την κατάλυση της *cis/trans* ισομερείωσης. Η περιοχή FKbd αποτελείται από 110 αμινοξέα που σχηματίζουν μια καλά συντηρημένη τριτοταγή δομή αποτελούμενη από 6 αντιπαράλληλους β-κλώνους που συνδέονται με εκτεθειμένους βρόγχους, ένας από τους οποίους σχηματίζει μια α-έλικα (Εικόνα A.3) (Szer *et al.*, 2009). Οι FKBP's εκτός από την περιοχή FKbd μπορεί να φέρουν και άλλες δομικές περιοχές όπως επαναλήψεις TPR και περιοχές πρόσδεσης της καλμοντουλίνης (Calmodulin binding domains, CaM-Bds).



Εικόνα A.3: Η τριτοταγής δομή της FKBP12 από τον άνθρωπο. Διακρίνονται οι 6 αντιπαράλληλοι β-κλώνοι και η α-έλικα (PDB ID: 2PPN).

Οι FKBP, όπως και οι κυκλοφιλίνες, απαντώνται τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ο αριθμός των FKBP διαφέρει στους διάφορους οργανισμούς, έτσι απατώνται 4 στη ζύμη, 7 στη δροσόφιλα, 9 στο *C. elegans*, 18 στον άνθρωπο, ενώ στα ανώτερα φυτά, όπως και στην περίπτωση των κυκλοφιλινών εντοπίζεται αυξημένος αριθμός FKBP έτσι έχουν εντοπιστεί 26 μέλη στο *Arabidopsis* (He *et al.*, 2004) και 29 στο ρύζι (Ahn *et al.*, 2010) με αρκετά μεγάλο αριθμό μελών (11 για το *Arabidopsis*) να εντοπίζονται στο χλωροπλάστη.

A.3.1. Οι FKBP στους φυτικούς οργανισμούς.

Οι φυτικές FKBP διαφέρουν σημαντικά στο μέγεθος τους, έτσι για παράδειγμα υπάρχει η FKBP12 από *Arabidopsis* που έχει μέγεθος μόλις 12 kDa που αποτελείται μόνο μια περιοχή FKBD και υπάρχει η wFKBP77 από το σιτάρι μεγέθους 77 kDa. Οι FKBP που έχουν μεγάλο μέγεθος μπορεί να φέρουν περισσότερες από μία περιοχές FKBD σε σειρά καθώς και άλλες δομικές ενότητες όπως επαναλήψεις TPR και περιοχές πρόσδεσης της καλμοντουλίνης. Μερικές από τις κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν οι FKBP περιλαμβάνουν την ανάπτυξη των φυτών, την αντίδρασή τους σε καταστάσεις καταπόνησης, τη μεταγραφή γονιδίων καθώς και συμμετοχή στη λειτουργία των χλωροπλαστών.

Ένα ζευγάρι καλά μελετημένων FKBP είναι οι AtFKBP62 (At3g25230) και AtFKBP65 (At5g48570), που εναλλακτικά ονομάζονται ROF1 και ROF2 αντίστοιχα, και εμπλέκονται στην ανταπόκριση του φυτού σε θερμική καταπόνηση. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες παρουσιάζουν 85% ομολογία μεταξύ τους και φέρουν επιπλέον δομικές περιοχές TPR και CaM-Bds (He *et al.*, 2004). Οι δύο πρωτεΐνες λειτουργούν ανταγωνιστικά στην ανάπτυξη μακράς διάρκειας αντοχής σε υψηλές θερμοκρασίες ρυθμίζοντας την έκφραση μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (small Heat Shock Proteins, sHSPs) (Meiri and Breiman 2009; Meiri *et al.*, 2010). Σε κατάσταση θερμικής καταπόνησης η FKBP62 μέσω της περιοχής TPR αλληλεπιδρά με τη HSP90, το σύμπλοκο αυτό προσδένεται στον παράγοντα μεταγραφής HsfA2 και κατευθύνονται στον πυρήνα όπου και ενεργοποιείται η μεταγραφή sHSPs όπως

και της FKBP65 (Meiri and Breiman, 2009). Η FKBP65 αλληλεπιδρά με την FKBP62 στην περιοχή FKbD και διασπά το σύμπλοκο FKBP62-HSP90-HsfA2 με αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης των sHSPs κατά τη διάρκεια ανάκαμψης από το θερμική καταπόνηση (Meiri *et al.*, 2010). Πρόσφατα, η AtFKBP65 βρέθηκε ότι συμμετέχει και στη ρύθμιση τη διατήρησης του ενδοκυτταρικού pH καθορίζοντας την ροή ιόντων K^+ (Bissoli *et al.*, 2012). Αντίστοιχα με τις AtFKBP62/ AtFKBP65 του Arabidopsis ορθόλογα γονίδια εντοπίζονται στο σιτάρι, το ρύζι και τον αραβόσιτο έχοντας παρόμοια οργάνωση δομικών περιοχών αλλά και παρόμοιο πρότυπο έκφρασης υποδεικνύοντας ο μηχανισμός δράσης αυτών των δύο πρωτεϊνών είναι συντηρημένος στα ανώτερα φυτά (Gollan *et al.*, 2012).

Ένα επιπλέον ζευγάρι FKBP που πιθανά δρα συνεργιστικά σε συνθήκες στρες είναι οι OsFKBP20-1a και OsFKBP20-1b από το ρύζι. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες παρουσιάζουν 85% ομολογία μεταξύ τους και τα επίπεδά τους αυξάνονται σε θερμική καταπόνηση αλλά και σε συνθήκες ξηρασίας έχοντας όμως διαφορετικό πρότυπο έκφρασης (Ahn *et al.*, 2010). Για παράδειγμα η OsFKBP20-1a παρουσιάζει σχετικά υψηλά επίπεδα έκφρασης σε όλους τους ιστούς τα οποία αυξάνονται ακόμη περισσότερο σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας και σε ξηρασία, αντίθετα τα επίπεδα έκφρασης της OsFKBP20-1b αυξάνονται μετά από 24 ώρες από την έναρξη της καταπόνησης. Οι δύο αυτές FKBP εντοπίζονται στον πυρήνα, ενώ η OsFKBP20-1b εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα (Ahn *et al.*, 2010). Τέλος, ένα τρίτο ζευγάρι πρωτεϊνών που πιθανά συμμετέχει στην αντιμετώπιση συνθηκών καταπόνησης είναι οι AtFKBP15-1 (At3g25220) και AtFKBP15-2 (At5g48580). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες παρουσιάζουν 70% ομολογία μεταξύ τους, εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα επίπεδά τους αυξάνονται σε θερμικό στρες χωρίς να είναι όμως γνωστός ο μηχανισμός δράσης τους (He *et al.*, 2004).

Από το Arabidopsis έχει μελετηθεί και η AtFKBP42 (At3g21640) που ονομάζεται και TWISTED DWARF1 (TWD1) καθώς φυτά που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό παρουσιάζουν μειωμένη ανάπτυξη και ελικοειδής ρίζες και βλαστούς (Kamphausen *et al.*, 2002). Ο φαινότυπος αυτός είναι αποτέλεσμα της διακοπτόμενης μεταφοράς αυξίνης καθώς η TWD1 αλληλεπιδρά με ABC μεταφορείς που ευθύνονται για τη διακίνησή της (Geisler *et al.*, 2004; Geisler *et al.*, 2003). Η μοναδική FKbD περιοχή που φέρει η AtFKBP42 αλληλεπιδρά με την με την καρβόξυ περιοχή των μεταφορέων ABCB1 και ABCB19 που ρυθμίζουν το σχηματισμό του μηχανισμού μεταφοράς αυξίνης στην πλασματική μεμβράνη (Geisler *et al.*, 2003).

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών έχει επίσης η AtFKBP72 (At3g54010) με την συμμετοχή της στη σύνθεση λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (Very Long Chain Fatty Acids, VLCFAs) που είναι συστατικά λιπιδίων όπως τα φωσφολιπίδια και τα σφιγγολιπίδια που μετέχουν στις κυτταρικές μεμβράνες και είναι απαραίτητα κατά τη κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση (Harrar *et al.*, 2003). Φυτά Arabidopsis με μετάλλαξη στο γονίδιο AtFKBP72 παρουσιάζουν τον φαινότυπο PASTICCINO με σοβαρά αναπτυξιακά προβλήματα όπως αλλαγές του εμβρύου στο καρδιόσχημο στάδιο, μη κανονικό σχηματισμό των κοτυληδόνων, επίσης τα νεαρά φυτά παρουσιάζουν κοντά και παχιά υποκοτύλια, τέλος τα ώριμα φυτά σχηματίζουν συμπαγείς ροζέτες με πολλαπλούς βλαστούς και μη κανονική ανάπτυξη ριζών (Vittorioso *et al.*, 1998). Η AtFKBP72 έχει προταθεί ότι χρησιμεύει ως κρίωμα για την συναρμολόγηση του συμπλόκου επιμήκυνσης VLCFAs στο ενδοπλασματικό δίκτυο που περιλαμβάνει ένζυμα όπως αφυδατάσες, καρβοξυλάσες και αναγωγάσες

(Roudier *et al.*, 2010). Επίσης η AtFKBP72 συμμετέχει στη μεταφορά ενός παράγοντα μεταγραφής τύπου NAC στον πυρήνα κυττάρων που διαιρούνται (Smyczynski *et al.*, 2006).

Η AtFKBP12 (At5g64350) αποτελεί τον μικρότερο αντιπρόσωπο των FKBP's στα φυτά και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η AtFKBP12 αλληλεπιδρά με την AtFIP37, μια πρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA και εμπλέκεται στο μάτισμα του mRNA, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην ανάπτυξη του εμβρύου (Faure *et al.*, 1998). Ομόλογος της AtFKBP12 στα κωνοφόρα συμμετέχει στην ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα αλληλεπιδρώντας με την HAP5, μια υπομονάδα ενός παράγοντα μεταγραφής που συνδέεται με τις ιστόνες (Yu *et al.*, 2011).

Άλλη μια FKBP που συμμετέχει στο μηχανισμό ρύθμισης έκφρασης γονιδίων είναι η AtFKBP53 (At4g25340) που εντοπίζεται στον πυρήνα, αλληλεπιδρά με την ιστόνη H3 και πιθανά βοηθά στο σχηματισμό του τετραμερούς H3/H4 (Li and Luan, 2010). Επίσης, η AtFKBP53 εντοπίζεται σε περιοχές της χρωματίνης που βρίσκονται τα 18S rRNA γονίδια υποδηλώνοντας ότι μπορεί να συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης της 18S υπομονάδας του ριβοσώματος (Li and Luan, 2010).

A.3.2. Οι χλωροπλαστικές FKBP's.

Αρκετές από τις FKBP's του *Arabidopsis* έχει προταθεί ότι εντοπίζονται είτε στη μεμβράνη του θυλακοειδούς είτε στο lumen των χλωροπλαστών γεγονός που επαληθεύεται από αναλύσεις του πρωτεώματος των χλωροπλαστών του *Arabidopsis* (Peltier *et al.*, 2002; Schubert *et al.* 2002). Η παρατήρηση αυτή πιθανόν να είναι ο κανόνας στα ανώτερα φυτά καθώς το 30% με 50% των FKBP's σε ανώτερα φυτά παρουσιάζουν πεπτίδια οδηγούς για το χλωροπλάστη (Gollan and Bhave, 2010; He *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2012). Ενώ όμως αρκετές κυκλοφιλίνες και FKBP's εντοπίζονται στο lumen του χλωροπλάστη μόνο η AtFKBP13 και η AtCYP20-2 έχουν δράση PPIάσης (Edvardsson *et al.*, 2007; Shariguzon *et al.*, 2006), ενώ έχει προταθεί ότι οι κυτταρικές λειτουργίες των ανοσοφιλινών μπορεί να μην εξαρτώνται από τη δραστηριότητα *cis/trans* ισομεράσης καθώς φυτά *Arabidopsis* με ταυτόχρονα μη λειτουργικά τα γονίδια AtFKBP13 και AtCYP20-2 δεν παρουσίασαν προβλήματα στη λειτουργία των χλωροπλαστών (Ingelsson *et al.*, 2009).

Πολλές μελέτες σχετικά με το ρόλο των FKBP's του lumen προτείνουν ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της συναρμολόγησης των φωτοσυνθετικών μεμβρανών. Για παράδειγμα μεταλλάγματα του γονιδίου AtFKBP20-2 (At3g60370) παρουσιάζουν μειωμένο αριθμό συναρμολογημένων φωτοσυστημάτων II (PSII) ενώ παρατηρείται αυξημένος αριθμός των ανεξάρτητων υπομονάδων του PSII (Lima *et al.*, 2006). Παράλληλα έχει βρεθεί ότι η TaFKBP16-1 από το σιτάρι αλληλεπιδρά με την PsaL υπομονάδα του φωτοσυστήματος I (PSI), ενώ η TaFKBP16-3 αλληλεπιδρά με τις Thf1 (Thylakoid formation 1) και APO2 (Accumulation of PSI-2) που εμπλέκονται στην ωρίμανση των φωτοσυνθετικών μεμβρανών (Gollan *et al.*, 2011). Επιπλέον, η TaFKBP13 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Rieske του συμπλέγματος του κυτοχρώματος *b₆f* (Gollan *et al.*, 2011). Αντίστοιχα, η AtFKBP13 (At5g45680) αλληλεπιδρά με την με την Rieske (Gupta *et al.*, 2002) αν και η σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης δεν είναι πλήρως κατανοητή (Gollan *et al.*, 2012).

Εκτός από τη συμμετοχή τους στην οργάνωση των φωτοσυνθετικών μεμβρανών κάποιες FKBP's έχουν προταθεί ότι εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά τη φωτοσύνθεση. Για παράδειγμα η AtFKBP16-2 (At4g39710) εντοπίστηκε ως μέλος του

συμπλόκου της αφυδρογονάσης του NADPH που διευκολύνει την κυκλική ροή των ηλεκτρονίων γύρω από το φωτοσύνθεμα I (Peng *et al.*, 2009).

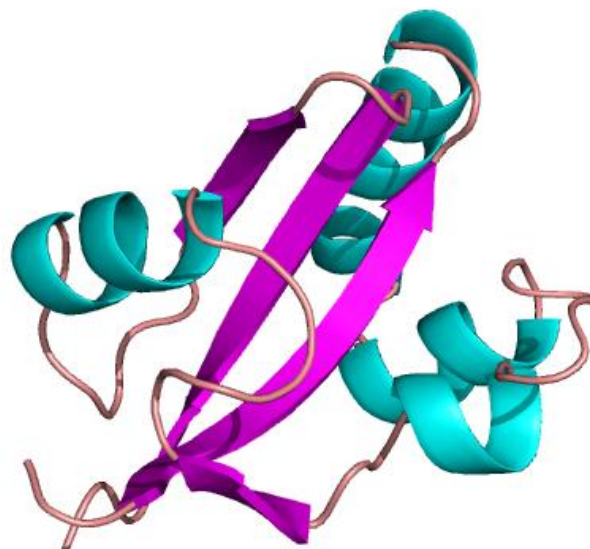
A.4. Οι παρβουλίνες.

Οι παρβουλίνες αποτελούν την τρίτη και μικρότερη οικογένεια των ΡΡΙΑσών και δεν παρουσιάζουν ομολογία με τις κυκλοφιλίνες ή τις FKBP's ούτε σε αμινοξικό ούτε σε δομικό επίπεδο. Όπως και οι ανοσοφιλίνες οι παρβουλίνες εντοπίζονται σε οργανισμούς από αρχαιοβακτήρια (Lederer *et al.*, 2011) έως και τα ανώτερα θηλαστικά (Lu *et al.*, 1996). Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των παρβουλινών σε σχέση με τις άλλες ΡΡΙΑσες είναι ότι αποτελούν τη μόνη οικογένεια ΡΡΙΑσών που μέλη της είναι απαραίτητα για τη διαβίωση του οργανισμού από τον οποίο προέρχονται. Για παράδειγμα στον *Saccharomyces cerevisiae* καμία από τις 8 κυκλοφιλίνες ή τις 4 FKBP's η καθεμιά ξεχωριστά ή όλες μαζί δεν είναι απαραίτητες για τη διαβίωσή του (Dolinski *et al.*, 1997) ενώ η Ess1, η μοναδική ομόλογος των παρβουλινών στη ζύμη, είναι απαραίτητη για τη διαβίωσή της (Hani *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1996). Τέλος, απαραίτητες για την διαβίωση της ζύμης δεν είναι οι αντιπρόσωποι των ΡΤΡΑ's, RRD1 και RRD2 (Rempolo *et al.*, 2000).

A.4.1. Οι παρβουλίνες στους προκαρυωτικούς οργανισμούς.

A.4.1.1. Η Par10 του *E. coli*.

Η πρώτη παρβουλίνη που μελετήθηκε είναι η Par10 και ανακαλύφθηκε κατά τη διάρκεια μελετών των ΡΡΙΑσών στο *E. coli* (Rahfeld *et al.*, 1994a; Rahfeld *et al.*, 1994b). Είναι ένα ένζυμο μικρού μεγέθους, έχει μοριακή μάζα 10,1 kDa και αποτελείται από μόλις 93 αμινοξέα που σχηματίζουν τη δομική ενότητα της *cis/trans* προλύλ-ισομεράσης και η οποία αποτελεί την ελάχιστη καταλυτική δομική περιοχή ανάμεσα στα ένζυμα τύπου παρβουλίνης.



Εικόνα A.4: Η τριτοταγής δομή της Par10 από το *E. coli*. Διακρίνονται οι 4 β-κλώνοι που σχηματίζουν την αντιπαράλληλη κυρτή β-πτυχωτή επιφάνεια και οι τέσσερις α-έλικες που την περικλείουν (PDB ID: 1JNT).

Η τριτοταγής δομή της Par10 σχηματίζεται από τέσσερις β-κλώνους που σχηματίζουν μια αντιπαράλληλη κυρτή β-πτυχωτή επιφάνεια που περικλείεται από τέσσερις α-έλικες (Εικόνα Α.4) (Kuhlewein *et al.*, 2004).

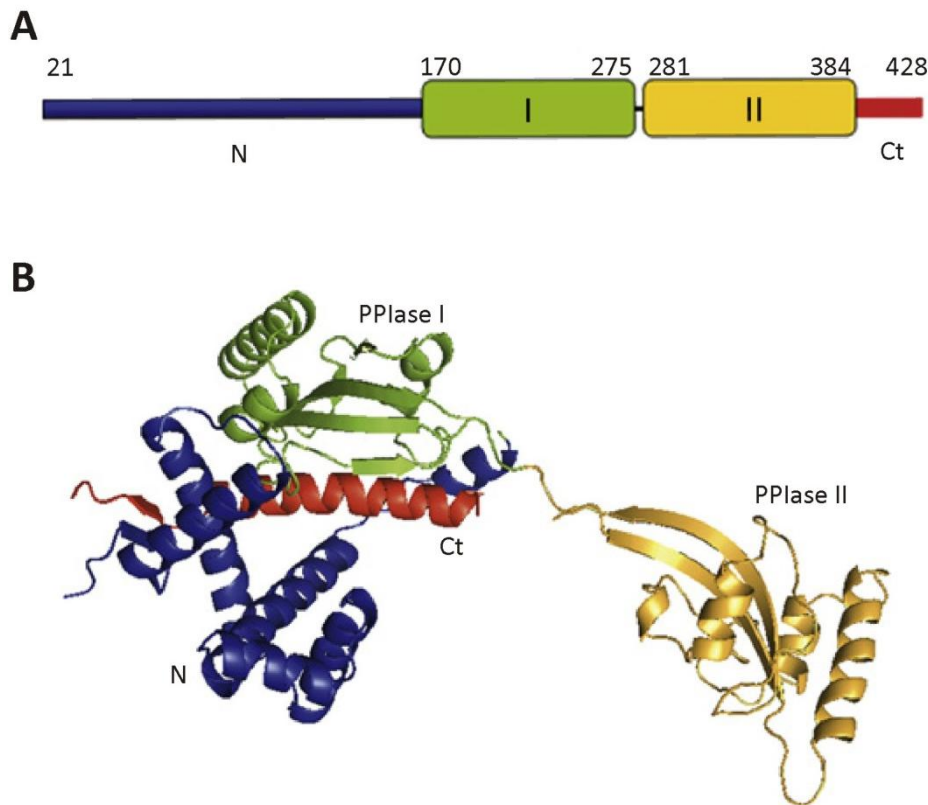
Η Par10 παρουσιάζει ισχυρή δραστηριότητα ΡΡιάσης *in vitro*, με τη σταθερά εξειδίκευσης k_{cat}/K_m απέναντι στο τετραπεπτίδιο ηλεκτρώλο-Ala-Leu-Pro-Phe-(p)-νιτροανιλίδιο, να ανέρχεται στα $1,69 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ μια τιμή η οποία πλησιάζει τις πιο ενεργές κυκλοφιλίνες που γνωρίζουμε ως σήμερα (Rahfeld *et al.*, 1994a). Η Par10 είναι πολύ πιο ενεργή από τις FKBP, αλλά σαν και αυτές, προτιμά υδρόφοβα αμινοξέα όπως λευκίνη ή φαινυλαλανίνη στο άμινο άκρο της προλίνης στα τετραπεπτίδια (Rahfeld *et al.*, 1994a).

Η Par10 έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στο δίπλωμα των πρωτεϊνών ενώ παράλληλα επιταχύνει το δικό της δίπλωμα (Scholz *et al.*, 1997). Παράλληλα αλληλεπιδρά με την alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) σε βακτηριακά εκχυλίσματα και πιθανά συμμετέχει στην προστασία κατά οξειδωτικού στρες καθώς κύτταρα *E. coli* με μη λειτουργική την Par10 παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία έναντι του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε σχέση με τα κύτταρα αγρίου τύπου (Malesevic *et al.*, 2010).

A.4.1.2. Η SurA του *E. coli*.

Το γονίδιο *surA* (survival) εντοπίστηκε κατά τη μελέτη γονιδίων που είναι απαραίτητα για την επιβίωση του *E. coli* κατά την στατική φάση ανάπτυξης, αρχικά ο μηχανισμός δράσης του γονιδίου αυτού δεν ήταν γνωστός (Tormo *et al.*, 1990). Αργότερα, βρέθηκε ότι το γονίδιο της *surA* κωδικοποιεί για μια ΡΡιάση που παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με τις παρβουλίνες ενώ συμμετέχει στο δίπλωμα πορινών της εξωτερικής μεμβράνης του κυττάρου (Lazar and Kolter, 1996).

Η SurA αποτελείται από 428 αμινοξέα τα οποία οργανώνονται σε τέσσερα ξεχωριστά δομικά στοιχεία (Εικόνα Α.5Α). Τα πρώτα 20 αμινοξέα της πρωτεΐνης αποτελούν ένα τυπικό πεπτίδιο μεταφοράς της στον περιπλασμικό χώρο, στη συνέχεια υπάρχει μια άμινο-τελική περιοχή περίπου 150 αμινοξέων που εντοπίζεται μόνο σε πρωτεΐνες ομόλογες της SurA. Ακολουθούν δύο επαναλαμβανόμενες δομικές περιοχές παρβουλίνης και στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης υπάρχει μια αλυσίδα μήκους 35 αμινοξέων. Παρόλο που στην SurA εντοπίζονται δύο περιοχές παρβουλίνης μόνο η δεύτερη παρουσιάζει σημαντική δραστηριότητα ΡΡιάσης. Όσον αφορά τη διάταξη της SurA στο χώρο η μη ενεργή δομική ενότητα ΡΡιάσης διπλώνει μαζί με τις άμινο και καρβόξυ τελικές περιοχές σχηματίζοντας μια σφαιρική συμπτυκνωμένη δομή, ενώ η δεύτερη δομική ενότητα ΡΡιάσης, που είναι ενεργή, προεξέχει των υπόλοιπων περιοχών (Εικόνα Α.5Β).



Εικόνα A.5: **A.** Η οργάνωση των δομικών στοιχείων της SurA, με μπλε και κόκκινο αναπαριστώνται οι άμινο και καρβόξυ τελικές περιοχές αντίστοιχα, ενώ με πράσινο και κίτρινο οι περιοχές PPIάσης. **B.** Η τριτοταγής δομή της SurA από το *E. coli* (PDB ID: 1M5Y) (Behrens-Kneip, 2010).

Σε λειτουργικό επίπεδο η κάθε μια περιοχή της SurA φαίνεται να έχει διαφορετικό ρόλο. Πιο συγκεκριμένα η ανενεργή περιοχή PPIάσης επιλέγει τα κατάλληλα υποστρώματα ενώ οι άμινο και καρβόξυ τελικές περιοχές δρουν ως μοριακοί συνοδοί (Xu *et al.*, 2007a). Παράλληλα, σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι η ταυτόχρονη διαγραφή και των δύο περιοχών PPIάσης δεν οδηγεί σε απώλεια της λειτουργίας της SurA καθώς οι άμινο και καρβόξυ τελικές περιοχές από μόνες τους μπορούν να αναπληρώσουν τη λειτουργία του γονιδίου *surA* στο μεταλλαγμένο στέλεχος *E. coli* (Behrens *et al.* 2001).

Βακτηριακά στελέχη στα οποία δεν εκφράζεται η SurA χάνουν την ικανότητά τους να συναρμολογούν σωστά πορίνες όπως οι OmpA, OmpB και LamB που εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη και έχουν τη διαμόρφωση β-βαρελίου (β-barrel OMPs). Επίσης, η σύνθεση αυτών των πορινών επηρεάζεται αρνητικά από τη συνεχή επαγωγή του παράγοντα σ^E απόκρισης στο εξωκυτταροπλασματικό στρες (Lazar and Kolter, 1996). Η μειωμένη παραγωγή OMPs αλλά και ο αναποτελεσματικός τρόπος διπλώματός τους έχουν ως αποτέλεσμα τη μη διατήρηση της ακεραιότητας της εξωτερικής μεμβράνης και τα στελέχη αυτά να παρουσιάζουν ευαισθησία σε παράγοντες όπως τα αντιβιοτικά βακιτρακίνη (bacitracin), βανκομυκίνη (vancomycin) καθώς και σε άλατα χολικού οξέος. Η είσοδος τέτοιων παραγόντων αποτρέπεται από την εξωτερική μεμβράνη κυττάρων αγρίου τύπου.

Εκτός από τη συμμετοχή της SurA στο σωστό δίπλωμα πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης ομολογές της από άλλους οργανισμούς έχει προταθεί ότι συμμετέχουν στο μηχανισμό μόλυνσης παθογόνων μικροοργανισμών. Για παράδειγμα μεταλλάγματα της

surA του παθογόνου *Salmonella enterica* ορότυπος Typhimurium χάνουν την ικανότητά τους να προσδένονται και να εισβάλουν σε ευκαρυωτικά κύτταρα, ενώ έχουν μειωμένη μολυσματικότητα όταν χορηγούνται στοματικά σε ποντίκια (Sydenham *et al.*, 2000).

A.4.1.3. Η PpiD του *E. coli*.

Η PpiD είναι η τρίτη παρβουλίνη που έχει μελετηθεί στο *E. coli* και το γονίδιο που κωδικοποιεί για την PpiD λειτουργεί ως καταστολέας της έκφρασης της *surA* ενώ βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του δυαδικού συστήματος CpxR- CpxA (Dartigalongue and Raina, 1998). Το γονίδιο *ppiD* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μήκους 623 αμινοξέων, στην άμινοτελική περιοχή της οποίας σχηματίζεται μια α-έλικα η οποία την σταθεροποιεί στην εσωτερική μεμβράνη κοντά στο σύστημα μεταφοράς πρωτεϊνών SecYEG, με την υπόλοιπη πρωτεΐνη να βρίσκεται στο περιπλασματικό χώρο (Dartigalongue and Raina, 1998). Τα κατάλοιπα 264 με 357 σχηματίζουν μια δομική περιοχή παρβουλίνης, ενώ οι περιοχές 35 με 263 και 358 με 623 πιθανά λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί και φαίνεται να αποτελούνται κυρίως από α-έλικες (Stymest and Klappa, 2008). Η δομή της περιοχής παρβουλίνης που βρίσκεται στην PpiD αποτελείται από τέσσερις α-έλικες που περικλείουν μια β-πτυχωτή επιφάνεια που σχηματίζεται από τέσσερις β-κλώνους. Η δομή αυτή που είναι και η τυπική δομή των παρβουλινών, παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τη δομή της πρώτης περιοχής PPIάσης της SurA (Weininger *et al.*, 2010).

Σε παλιότερες μελέτες είχε βρεθεί ότι η PpiD παρουσιάζει δραστηριότητα PPIάσης (Dartigalongue and Raina, 1998), σε πιο πρόσφατες μελέτες όμως η δραστηριότητα αυτή δεν επαληθεύτηκε (Weininger *et al.*, 2010). Παρόλα την έλλειψη ενζυμικής δραστηριότητας η PpiD δρα ως μοριακός συνοδός και πιθανά συμμετέχει στα πρώτα στάδια διπλώματος πρωτεϊνών μόλις αυτές εισέλθουν στον περιπλασματικό χώρο χωρίς όμως να συμμετέχει απαραίτητα στην ωρίμανση των OMPs όπως η SurA (Matern *et al.*, 2010).

A.4.1.4. Οι παρβουλίνες στους διαζωτροφικούς μικροοργανισμούς.

Σε κάποιους μικροοργανισμούς που αζωτοδεσμεύουν έχει βρεθεί ότι σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση του προϊόντος του γονιδίου *nifH* διαδραματίζει μια παρβουλίνη, η NifM (Gavini *et al.*, 2006; Howard *et al.*, 1986). Το προϊόν του γονιδίου *nifH* είναι η Fe-πρωτεΐνη, μέρος του συμπλόκου της νιτρογενάσης. Η Fe-πρωτεΐνη είναι ομοδιμερές που κατά τη διαδικασία της αναγωγής του ατμοσφαιρικού αζώτου, ανάγεται λαμβάνοντας ηλεκτρόνια από τη φερρεδοξίνη και στη συνέχεια με τη κατανάλωση ATP ανάγει τη MoFe-πρωτεΐνη η οποία δίνει τα ηλεκτρόνια στο N_2 παράγοντας $HN=NH$. Με επανάληψη της διαδικασίας αυτή έχουμε την αναγωγή του $HN=NH$ σε $H_2N=NH_2$, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται σε $2NH_3$.

Στην *Klebsiella pneumoniae* τα γονίδια *nif* εδράζονται στο χρωμόσωμα και απαρτίζονται 17 ή 18 γειτονικά σιστρόνια, *nifQBALFMVSUXNEYKDH(C)J*, διευθετημένα σε 7 ή 8 οπερόνια. Η μεταφορά ολόκληρης της περιοχής *nif* από τη *K. pneumoniae* στο *E. coli* έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενεργής νιτρογενάσης στο *E. coli*. Απουσία της NifM, η παραγόμενη NifH δεν είναι ενεργή, ενώ μόνο η παρουσία της NifM είναι απαραίτητη για τη λειτουργία και σταθερότητα της Fe-πρωτεΐνης (Howard *et al.*, 1986).

Αντίστοιχα με την NifM της *K. pneumoniae*, έχει μελετηθεί και η NifM από το *Azotobacter vinelandii*. Η NifM του *A. vinelandii* αποτελείται από 292 αμινοξέα και φέρει μια

δομική περιοχή παρβουλίνης μήκους 96 αμινοξέων που εκτίνεται στις θέσεις 148 με 243. Η NifM είναι ενεργή ΡΡιάση η σταθερά εξειδίκευσής k_{cat}/K_m έναντι του τετραπεπτιδίου ηλεκτρώλο-Ala-Phe-Pro-Phe-(p)-νιτροανιλίδιο, να ανέρχεται στα $1,09 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$, τιμή που είναι συγκρίσιμη με αυτή της *EcPar10* (Gavini *et al.*, 2006).

Η NifM έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την NifH, σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση της NifH από την NifM φαίνεται να έχουν τα πρώτα 126 κατάλοιπα της άμινο τελικής περιοχής της NifM. Η παρατήρηση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι η *hPIN1* μπορεί να συμπληρώσει τη λειτουργία της NifM σε στέλεχος του *A. vinelandii*, μόνο όταν παράγεται σε σύντηξη με την άμινο τελική περιοχή της NifM (Raja *et al.*, 2006).

Ταυτόχρονα έγιναν προσπάθειες εντοπισμού της προλίνης της NifH στην οποία δρα η NifM ως ΡΡιάση. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών της NifH από 60 διαφορετικούς οργανισμούς, όπου και εντοπίστηκαν 7 πλήρως συντηρημένα κατάλοιπα προλίνης. Στη συνέχεια δημιουργήθηκε μια βιβλιοθήκη μεταλλαγμάτων της NifH με την τεχνική της ανακατανομής του DNA (DNA shuffling), με σκοπό τον εντοπισμό κάποιου λειτουργικού μεταλλάγματος που θα είναι ανεξάρτητο από την λειτουργία της NifM. Με αυτόν τον τρόπο εντοπίστηκε ένα μετάλλαγμα της NifH με δύο αμινοξικές αντικαταστάσεις P232K και P258S. Με περαιτέρω μελέτη αυτών των αντικαταστάσεων προέκυψε ότι στην αλληλεπίδραση μεταξύ NifM και NifH συμβάλει η περιοχή γύρω από την P258. Η P258 βρίσκεται στην καρβόξυ-τελική περιοχή της NifH η οποία περιελίσσεται γύρω από την άλλη υπομονάδα του διμερούς της NifH (Gavini *et al.*, 2006).

A.4.2. Οι ευκαρυωτικές παρβουλίνες τύπου PIN.

Η μελέτη των παρβουλινών στους διάφορους οργανισμούς οδήγησε στην ανακάλυψη των παρβουλινών τύπου PIN. Οι παρβουλίνες αυτές είναι ένζυμα ισχυρά συντηρημένα και ισομερειώνουν με μεγάλη εξειδίκευση δεσμούς οι οποίοι είναι φωσφορυλιωμένοι στη σερίνη ή τη θρεονίνη πριν από την προλίνη. Είναι οι μόνες ΡΡιάσες που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα που παρουσιάζουν μια τόσο ισχυρή προτίμηση σε ένα συγκεκριμένο είδος δεσμού (Ranganathan *et al.*, 1997). Οι πρωτεΐνες τύπου PIN έχουν πάρει την ονομασία τους από την *hPIN1* που έχει μελετηθεί στον άνθρωπο.

Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό ρύθμισης πολλών διαφορετικών κυτταρικών διεργασιών (Pawson and Scott, 2005). Πιο συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε Ser/Thr-Pro περιοχές γίνεται από μια κατηγορία κινάσων, τις κινάσες κατευθυνόμενες από την προλίνη (Pro-directed protein kinases). Κινάσες αυτής της κατηγορίας είναι οι κινάσες που εξαρτώνται από τις κυκλίνες (Cyclin-Dependent Kinases, CDKs), οι ERKs (Extracellular signal-Regulated Kinases), οι κινάσες που ενεργοποιούνται από το στρες (SAPKs/JNKs), κινάσες p38, GSK3 (glycogen synthase kinase-3) και PLKs (Polo Like Kinases). Συνδυάζοντας λοιπόν τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε περιοχές Ser/Thr-Pro, την ιδιαιτερότητα της προλίνης να υιοθετεί δύο τελείως ξεχωριστές διαμορφώσεις και την ύπαρξη μιας κατηγορίας ενζύμων τύπου PIN, να στοχεύουν τέτοιους δεσμούς αλλάζοντας τη διαμόρφωση των πρωτεϊνών έχουμε έναν νέο μηχανισμό ελέγχου λειτουργίας των πρωτεϊνών που συμβαίνει μετά τη φωσφορυλίωση (Liou *et al.*, 2011; Lu and Zhou 2007; Lu *et al.*, 2007).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η ενζυμικά καταλυόμενη από πρωτεΐνες τύπου PIN, ρύθμιση της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών έχει προφανή ρόλο σε πολλές πρωτεΐνες που

έχουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση διεργασιών όπως ο κυτταρικός κύκλος (Yeh and Means, 2007), η απόκριση σε καταστάσεις στρες που καταστρέφουν το DNA (Zacchi *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2002), την απόκριση του ανοσοποιητικού (Anderson 2005), την ανάπτυξη γαμετικών κυττάρων (Atchison and Means, 2004) και τη διαφοροποίηση και επιβίωση νευρικών κυττάρων (Butterfield *et al.*, 2006). Η PIN1 λουπόν μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένας νέος διακόπτης που ελέγχει πολλαπλούς στόχους σε πολλά στάδια συμμετέχοντας στη ρύθμιση της έναρξης αλλά και της διάρκειας μια κυτταρικής διεργασίας ή απόκρισης (Lu and Zhou, 2007).

A.4.3. Ess1, η παρβουλίνη του *Saccharomyces cerevisiae*.

Από τις πρώτες παρβουλίνες που μελετήθηκαν είναι η Ptf1/Ess1 (Processing terminator factor 1) από τη ζύμη *S. cerevisiae*, είναι παρβουλίνη τύπου PIN και είναι η μοναδική ΡΡΙΑση που είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την αύξηση της ζύμης (Hani *et al.*, 1995) καθώς καμία άλλη ΡΡΙΑση από μόνη της ή και όλες μαζί δεν είναι απαραίτητες για την βιωσιμότητά της (Dolinski *et al.*, 1997). Αρχικά παρατηρήθηκε ότι μεταλλάγματα του γονιδίου της *ess1*⁻ παρουσίαζαν ελαττώματα στην ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου, πιθανόν κατά την διάρκεια της κυτοκίνησης ή τον διαχωρισμό των κυττάρων (Hanes *et al.*, 1989). Παράλληλα, απενεργοποίηση του προαγωγέα του *ess1*⁻ στην ζύμη και κατά συνέπεια μείωση των επιπέδων έκφρασης της Ess1 είχε ως αποτέλεσμα την παγίδευση του κυττάρου στο στάδιο της μίτωσης και τον θρυμματισμό του πυρήνα (Lu *et al.*, 1996). Ομόλογες της Ess1 είναι επίσης απαραίτητες σε κάποιους οργανισμούς όπως οι *Aspergillus nidulans* (Joseph *et al.*, 2004) και *Candida albicans* (Devasahayam *et al.*, 2002) ενώ σε άλλους όπως ο *Schizosaccharomyces pombe* (Huang *et al.*, 2001) και το ποντίκι (Fujimori *et al.*, 1999) δεν είναι.

Η Ess1 αποτελείται από 170 αμινοξέα και η μοριακή της μάζα είναι περίπου 19kDa. Εκτός από τη δομική περιοχή ΡΡΙΑσης στο καρβόξυ τελικό άκρο της φέρει και μια WW δομική περιοχή στο άμινο άκρο της. Η Ess1 παρουσιάζει ισχυρή ενζυμική δραστηριότητα ΡΡΙΑσης η οποία είναι έως και 1000 φορές μεγαλύτερη σε υπόστρωμα που είναι φωσφορυλιωμένο στη σερίνη πριν την προλίνη σε σχέση με το μη φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα (Hani *et al.*, 1999).

Ταυτόχρονα, η Ess1 εντοπίστηκε και κατά τη μελέτη trans παραγόντων που εμπλέκονται στην διαδικασία σχηματισμού του 3' τελικού άκρου του mRNA (Hani *et al.*, 1995). Πιο αναλυτικά, η Ess1 προσδέεται με την Rpb1, την μεγαλύτερη υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II (PolII), η οποία φέρει 26 καρβόξυ-τελικές επαναλήψεις της αλληλουχίας Tyr₁-Ser₂-Pro₃-Thr₄-Ser₅-Pro₆-Ser₇ (Myers *et al.*, 2001). Η επαναλαμβανόμενη αυτή ακολουθία της CTD (C-Terminal Domain) φωσφορυλιώνεται αντιστρεπτά *in vivo* στις θέσεις Ser2 και Ser5, οι αλλαγές αυτές στην κατάσταση φωσφορυλίωσης σχετίζονται με διακριτά στάδια της μεταγραφής (έναρξη, επιμήκυνση, λήξη) και την διαδικασία ωρίμανσης του mRNA.

Επιπλέον, η Ess1 είναι απαραίτητη και για τη ρύθμιση της έκφρασης μικρών μη κωδικών RNAs, συμπεριλαμβανόμενων των snoRNAs (small nucleolar RNAs), CUTs (Cryptic Unstable Transcripts), SUTs (Stable Unannotated Transcripts) και πιθανών ρυθμιστικών RNAs. Η ρύθμιση αυτή συντελείται μέσω του Nrd1 μονοπατιού που είναι υπεύθυνο για τον τερματισμό της μεταγραφής και οφείλεται στην αλληλεπίδραση της Ess1 με την φωσφορυλιωμένη καρβόξυ τελική περιοχή της RNA πολυμεράσης II (Singh *et al.*, 2009).

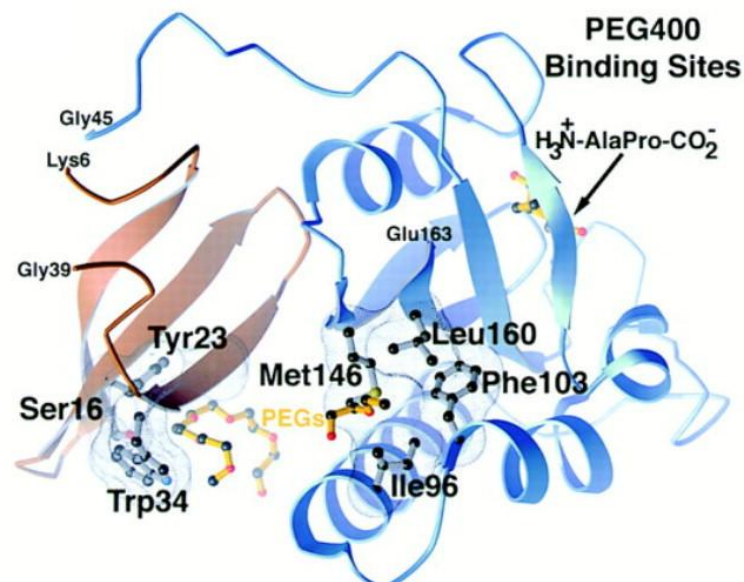
Πρόσφατα μελετήθηκε και η συμμετοχή της Ess1 στην ολοκλήρωση του μεταβολικού μονοπατιού σύνθεσης μη κορεσμένων λιπαρών οξέων (OLE). Πιο συγκεκριμένα η Ess1 ελέγχει τον Spt23 παράγοντα μεταγραφής, υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του γονιδίου OLE1. Το γονίδιο OLE1 κωδικοποιεί για μια αποσατουράση (desaturase) των λιπαρών οξέων, ένζυμο κλειδί για την πορεία του μονοπατιού OLE. Η Ess1 ρυθμίζει τον παράγοντα μεταγραφής Spt23 μέσω του βαθμού ουβικουιτίνωσης του. Όταν η Ess1 αλληλεπιδρά με τον Spt23, παρατηρείται χαμηλός βαθμός ουβικουιτίνωσης του με αποτέλεσμα την μετακίνηση του από το ενδοπλασματικό δίκτυο στον πυρήνα όπου και ενεργοποιεί την έκφραση του OLE1, η μειωμένη όμως δραστηριότητα της Ess1 επιτρέπει την πολυουβικουιτίνωση του με αποτέλεσμα την αποδόμησή του από το πρωτεάσωμα (Siepe and Jentsch, 2009).

A.4.4. Η παρβουλίνη PIN1 στον άνθρωπο.

Η πιο καλά μελετημένη παρβουλίνη είναι η hPIN1 από τον άνθρωπο. Η hPIN1 (Protein Interacting with NIMA) εντοπίστηκε ως η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την κινάση NIMA (Never In Mitosis A) από τον *Aspergillus nidulans* (Lu *et al.*, 1996).

A.4.4.1. Δομή και ενεργό κέντρο της hPIN1.

Η hPIN1 αποτελείται από 163 αμινοξέα και απαρτίζεται από δύο δομικές περιοχές, την αμινο-τελική WW δομική περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1 έως 39 και την καταλυτική δομική περιοχή PPIάσης από τα που σχηματίζεται από τα αμινοξέα 45 έως 163. Η WW περιοχή σχηματίζει μια αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια που αποτελείται από τρεις β-κλώνους, ενώ η δομική περιοχή PPIάσης σχηματίζει μια αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια αποτελούμενη από τέσσερις β-κλώνους που περιβάλλονται από τέσσερις α-έλικες (Εικόνα A.6) (Ranganathan *et al.*, 1997).



Εικόνα A.6: Η τριτοταγής δομή της hPIN1 από τον άνθρωπο. Με μπλε χρώμα διακρίνονται οι 4 β-κλώνοι και οι τέσσερις α-έλικες που αποτελούν τη δομική περιοχή PPIάσης, ενώ με πορτοκαλί η β-πτυχωτή επιφάνεια που σχηματίζει η WW δομική περιοχή (PDB ID: 1PIN). Διακρίνονται οι πλευρικές ομάδες των καταλοίπων που μετέχουν στην πρόσδεση ενός μορίου PEG κατά την επίλυση της κρυσταλλικής δομής (Ranganathan *et al.*, 1997).

Οι δύο δομικές περιοχές διατάσσονται γύρω από μια υδρόφοβη κοιλότητα που αποτελεί και το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στην κοιλότητα αυτή συνεισφέρουν τα κατάλοιπα Leu122, Met130 και Phe134 που είναι υψηλά συντηρημένα ανάμεσα στις παρβουλίνες και σχηματίζουν το σημείο πρόσδεσης της προλίνης και του αμινο-πεπτιδικού δεσμού της ο οποίος τελικά υποβάλλεται στην ισομερείωση. Επιπλέον στο ενεργό κέντρο του ενζύμου φαίνεται ότι συμμετέχουν και τα κατάλοιπα Cys113, His59, His157 και Ser154 καθώς κατανέμονται συμμετρικά γύρω από τον άξονα περιστροφής του πεπτιδυλικού δεσμού.

Η hPIN1, όπως και η Ess1, είναι μια παρβουλίνη που παρουσιάζει ισχυρή ενζυμική εξειδίκευση έναντι υποστρωμάτων που πριν από τη θέση της προλίνης φέρουν φωσφορυλιωμένη σερίνη ή θρεονίνη. Καθοριστικό για την εξειδίκευση αυτή έχουν τα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα Lys63, Arg68 και Arg69 στο βρόγχο β1/α1 που εντοπίζεται στην είσοδο της υδρόφοβης κοιλότητας του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Πράγματι αντικατάσταση των Arg68 και Arg69 με Ala μειώνει τη σταθερά εξειδίκευσης k_{cat}/K_m για το φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα γύρω στις 500 φορές από την τιμή που δίνει η μη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη ενώ η καταλυτική δραστηριότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης απέναντι σε μη φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα είναι παρόμοια με αυτήν της μη μεταλλαγμένης πρωτεΐνης (Yaffe *et al.*, 1997).

A.4.4.2. Ρόλος της WW δομικής περιοχής.

Οι WW δομικές περιοχές αποτελούνται από περίπου 40 ημισυντηρημένα αμινοξέα και έχουν ένα ζεύγος συντηρημένων τρυπτοφανών. Έχουν χαρακτηριστεί τέσσερις τύποι WW δομικών περιοχών, οι τρεις από τους οποίους αναγνωρίζουν περιοχές πλούσιες σε προλίνη ενώ ο τέταρτος τύπος αναγνωρίζει pSer/Thr-Pro περιοχές (Sudol, 1996). Η WW περιοχή της PIN1 ανήκει στον τέταρτο τύπο και αναγνωρίζει pSer/Thr-Pro περιοχές (Lu *et al.*, 1999b; Lu *et al.*, 2002).

Για τη μελέτη του ρόλου των δύο περιοχών χρησιμοποιήθηκε το μετάλλαγμα της ζύμης *ess1*, σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι δύο περιοχές μαζί καθώς και η καθεμιά τους ανεξάρτητα σε κανονικές συνθήκες έκφρασης αλλά και σε συνθήκες υπερέκφρασης. Στις κανονικές συνθήκες έκφρασης της και οι δύο περιοχές είναι απαραίτητες για την επιβίωση του μεταλλάγματος ενώ σε συνθήκες υπερέκφρασης είναι απαραίτητη μόνο η περιοχή PPIάσης (Lu *et al.*, 1999a; Zhou *et al.*, 2000).

A.4.4.3. Μηχανισμοί ρύθμισης της λειτουργίας της hPIN1.

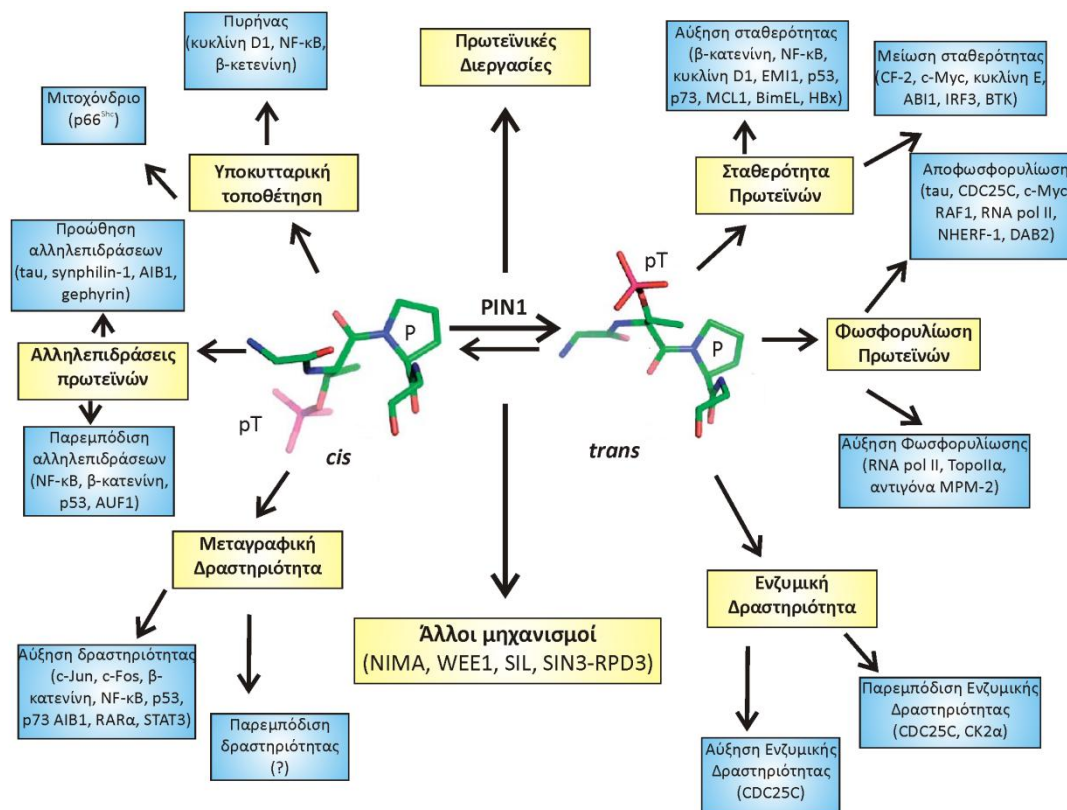
Οι λειτουργίες της hPIN1 ελέγχονται από διαφορετικούς μηχανισμούς και σε πολλαπλά επίπεδα από μεταγραφικό έως μετά-μεταγραφικό. Για παράδειγμα η υποκυτταρική τοποθέτηση της hPIN1 εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων της τα οποία θα πρέπει να είναι φωσφορυλιωμένα σε συγκεκριμένες περιοχές Ser/Thr-Pro (Lu *et al.*, 2002). Επίσης τα επίπεδα έκφρασης της εξαρτώνται άμεσα από τη δυναμική πολλαπλασιασμού των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες ενώ αυξάνονται περεταίρω σε πολλούς τύπους καρκίνου (Ryo *et al.*, 2001; Wulf *et al.*, 2001). Τα επίπεδα έκφρασης της hPIN1 ελέγχονται από παράγοντες μεταγραφής της οικογένειας των E2F, καθώς υπερέκφραση του E2F ενισχύει την δραστηριότητα του προαγωγέα της (Ryo *et al.*, 2002).

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο η δράση της hPIN1 εξαρτάται και από την κατάσταση φωσφορυλίωσής της. Πιο συγκεκριμένα, φωσφορυλίωση στη θέση Ser16, που βρίσκεται

στη WW δομική περιοχή, ελέγχει την υποκυτταρική τοποθέτηση της όπως και την ικανότητα της να προσδένεται σε πρωτεΐνες στόχους της (Lu *et al.*, 2002). Επίσης, φωσφορυλίωση στη Ser65, αν και δεν επηρεάζει την καταλυτική της δραστηριότητα, ρυθμίζει τη σταθερότητα της παρεμποδίζοντας την ουβικουιτίνωσή της και συνεπώς την αποδόμησή της μέσω του πρωτεασώματος (Eckerdt *et al.*, 2005). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η hPIN1 ρυθμίζεται από την κινάση DAPK1 (Death Associated Protein Kinase-1). Η DAPK1 φωσφορυλιώνει την hPIN1 στη Ser71 με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της δράσης ισομεράσης και την υποκυτταρική της τοποθέτηση στον πυρήνα (Lee *et al.*, 2011).

A.4.4.4. Η hPIN1 συμμετέχει σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες.

Η hPIN1 συμμετέχει σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών, τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων αλλά και κάτω από παθολογικές καταστάσεις αλληλεπιδρώντας με πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες. Στην Εικόνα A.7 παρουσιάζονται συνοπτικά μερικές από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την hPIN1 καθώς το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής (Lu and Zhou, 2007).



Εικόνα A.7: Η hPIN1 αλληλεπιδρά με πληθώρα πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες (Lu and Zhou, 2007).

A.4.4.4.α. Η Pin1 συντονίζει την πορεία της μίτωσης.

Ο κυτταρικός κύκλος ρυθμίζεται από την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση τη σωστή χρονική στιγμή πολλών διαφορετικών κινάσεων που εξαρτώνται από κυκλίνες (Cyclin-Dependent Kinases, CDKs). Η ενεργοποίηση της κυκλίνης B-CDC2 προκαλεί την εξαρτώμενη από προλίνη φωσφορυλίωση μερικών εκατοντάδων πρωτεϊνών κατά τη πορεία της μίτωσης. Στη συνέχεια η PIN1 ρυθμίζει την πορεία γεγονότων της μίτωσης δρώντας σε πλήθος πρωτεϊνών όπως η CDC25C φωσφατάση-ενεργοποιητής και η WEE1, κινάση-

παρεμποδιστής της κυκλίνης B-CDC2 αντίστοιχα (Okamoto and Sagata, 2007; Zhou *et al.*, 2000). Η PIN1 μπορεί να παρεμποδίσει ή να αυξήσει την καταλυτική δραστηριότητα της CDC25C ανάλογα με το αν οι συνθήκες προάγουν τη φωσφορυλίωση ή αποφωσφορυλίωση της CDC25C. Σε κύτταρα *Xenopus laevis* η PIN1 παρεμποδίζει τη δράση της κινάσης Wee1 με αποτέλεσμα να μην φωσφορυλιώνεται η CDC2 και το κύτταρο να εισέρχεται στο στάδιο της μίτωσης (Okamoto and Sagata, 2007). Επιπλέον η PIN1, σταθεροποιεί την EMI1 η οποία παρεμποδίζει το σύμπλεγμα προώθησης της ανάφασης (Anaphase-Promoting Complex, APC) να δράσει στις κυκλίνες A και B κατά τη διάρκεια των φάσεων S και G2 επιτρέποντας το συντονισμό των φάσεων σύνθεσης και μίτωσης (Bernis *et al.*, 2007). Παράλληλα, η PIN1 εντοπίζεται στην περιοχή της χρωματίνης κατά τη διάρκεια της G2-M φάσης αλληλεπιδρώντας με την τοποϊσομεράση TopoIIα (Xu and Manley, 2007b).

Συνεπώς η ρύθμιση πολλών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μίτωση όπως οι CDC25C, η EMI1, η Wee1 και η TopoIIα από την PIN1, της δίνει το ρόλο του ενορχηστρωτή που χωροταξικά και χρονικά συντονίζει την πορεία πολλών γεγονότων της μίτωσης που πρέπει να συμβούν απόλυτα συγχρονισμένα (Lu and Zhou, 2007). Πράγματι, παρεμπόδιση ή διαγραφή της PIN1 οδηγεί την παγίδευση του κυττάρου στο στάδιο της μίτωσης, με συμπύκνωση της χρωματίνης και καταστροφή του (Lu *et al.*, 1996).

A.4.4.4.β. Η Pin1 στη μετάβαση από τη G1 φάση στην S.

Τα επίπεδα της PIN1 σε κανονικά κύτταρα αυξάνονται σημαντικά κατά τη μετάβαση από τη G1 φάση στην S (Ryo *et al.*, 2002). Κάποια από τα υποστρώματα της PIN1 ρυθμίζουν τη μετάβαση G0/G1-S, για παράδειγμα η PIN1 αυξάνει τη μεταγραφή και τη σταθερότητα της κυκλίνης D1, που είναι ένζυμο κλειδί για την πρόοδο της G1-S (Wulf *et al.*, 2001). Αντίθετα αποσταθεροποιεί τον παράγοντα μεταγραφής c-Myc και την κυκλίνη E, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την μετάβαση G1-S σε διαφορετικά χρονικά σημεία (van Drogen *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2004). Ένδειξη για τη συμμετοχή της PIN1 στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου αποτελεί και η παρατήρηση ότι εμβρυονικά κύτταρα ινοβλαστών από ποντίκι που δεν εκφράζουν την PIN1 παρουσιάζουν διάφορα ελαττώματα κατά τη μετάβαση G1-G0 και G1-S (van Drogen *et al.*, 2006). Όλα αυτά τα γεγονότα υποδεικνύουν τη σημαντική συνεισφορά της PIN1 στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Επιπλέον η PIN1 έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στο συντονισμό του διπλασιασμού του κεντροσώματος και το διπλασιασμό του DNA κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Suizu *et al.*, 2006). Η PIN1 εντοπίζεται στο κεντρόσωμα και απομάκρυνσή της από αυτό καθυστερεί δραματικά το διπλασιασμό του. Αντίστροφα, υπερέκφραση της PIN1 ενισχύει τον πολλαπλασιασμό του κεντροσώματος, την ανευλοειδία των χρωμοσωμάτων και εν τέλει την ογκογένεση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Suizu *et al.*, 2006). Παράλληλα, τα επίπεδα της PIN1 είναι αυξημένα κατά τη μετάβαση G1-S (Ryo *et al.*, 2002) ενώ η φωσφορυλίωσή της ρυθμίζεται στο στάδιο αυτό του κυτταρικού κύκλου (Lu *et al.*, 2002). Τα γεγονότα αυτά συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι η PIN1 είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση του διπλασιασμού του κεντροσώματος και της σύνθεσης του DNA (Suizu *et al.*, 2006).

A.4.4.4.γ. Η hPIN1 υπερεκφράζεται σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου.

Κοινό χαρακτηριστικό των διάφορων μορφών καρκίνου είναι η μη ελεγχόμενη κυτταρική διαίρεση, ενώ σημαντικό ρόλο στην πρόοδο των διαιρέσεων αυτών έχει η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε περιοχές Ser/Thr-Pro, τέτοιες φωσφορυλιωμένες περιοχές

είναι και ο στόχος της PIN1. Κατά συνέπεια δεν είναι έκπληξη η ανακάλυψη ότι η PIN1 υπερέκφράζεται τουλάχιστον σε 60 διαφορετικούς τύπους καρκίνου σε σχέση με τα επίπεδά της στους φυσιολογικούς ιστούς (Bao *et al.*, 2004).

Τα αυξημένα επίπεδα της PIN1 στους διάφορους καρκινικούς ιστούς βρέθηκε ότι σχετίζονται άμεσα με την υπερέκφραση της κυκλίνης D1. Τα επίπεδα της PIN1 σε όγκους που υπερέκφραζουν την κυκλίνη D1 είναι κατά μέσο όρο διπλάσια από αυτά των όγκων που είναι αρνητικοί στην κυκλίνη D1 (Wulf *et al.*, 2001). Υπερέκφραση της κυκλίνης D1 συνεισφέρει στον μετασχηματισμό των καρκινικών κυττάρων ενώ παρεμπόδιση της έκφρασης της με την τεχνική του αντινοήματος προκαλεί παύση της αύξησης του όγκου. Η PIN1 μπορεί να ενεργοποιήσει τον προαγωγέα της κυκλίνης D1 μέσω της πρόσδεσής της με τους φωσφορυλιωμένους παράγοντες μεταγραφής c-Jun και β-catenin αυξάνοντας την μεταγραφική τους δραστηριότητα (Ryo *et al.*, 2001; Wulf *et al.*, 2001). Η c-Jun φωσφορυλιώνεται μέσω του μεταγωγικού μονοπατιού Ras που ενεργοποιεί τις c-Jun κινάσες (c-Jun N-terminal Kinases, JNKs). Η φωσφορυλιωμένη c-Jun αποτελεί στόχο της PIN1, η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη παρεμπόδιση της πολυουβικουιλίνωσης της c-Jun και αύξηση της σταθερότητάς της με συνέπεια την ενίσχυση της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα της κυκλίνης D1 (Liou *et al.*, 2011). Αντίστοιχα, η αλληλεπίδραση της PIN1 με τη φωσφορυλιωμένη β-catenin παρεμποδίζει την αλληλεπίδρασή της με την APC αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα της β-catenin, τη συσσώρευσή της στον πυρήνα και την ενεργοποίηση γονιδίων στόχους όπως τα c-myc, fibronectin και η κυκλίνη D1 (Ryo *et al.*, 2001).

A.4.4.4.δ. PIN1 και κυτταρικό στρες.

Πολλές πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια καταπονήσεων στοχεύουν σε Ser/Thr-Pro περιοχές, τέτοιες είναι οι SAPKs/JNKs, p38 MAPKs και ERKs (Karin and Gallagher, 2005; Roux and Blenis, 2004). Με τη σειρά της η PIN1 έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει τη λειτουργία πρωτεϊνών σε σημαντικές θέσεις για την ανταπόκριση των κυττάρων σε καταστάσεις στρες. Έτσι, η PIN1 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της p53, την μεταφορά της στον πυρήνα και την προώθηση κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) σε συνθήκες στρες που έχουν ως αποτέλεσμα τη καταστροφή του DNA. Η p53 είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη που συνδέεται άμεσα με τον γενετικά ελεγχόμενο κυτταρικό θάνατο και ενεργοποιείται είτε ως μέρος της κανονικής ανάπτυξης είτε ως αποτέλεσμα μιας γενετικής βλάβης. Η p53 λειτουργεί ως μεταγραφικός ενεργοποιητής, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων με τελικό αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της κυτταρικής διαίρεσης. Βλάβες στο DNA οδηγούν σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της p53 σε περιοχές Ser/Thr-Pro. Έχει αποδειχθεί ότι αφότου η p53 φωσφορυλιωθεί, είναι απαραίτητη η αλληλεπίδρασή της με την PIN1 για την περαιτέρω δράση της (Zacchi *et al.*, 2002, Zheng *et al.*, 2002). Η PIN1 προκαλεί αλλαγή στη στερεοδιάταξη της φωσφορυλιωμένης p53, οπότε αυτή δεν μπορεί να προσδεθεί στην λιγάση της ουβικουιλίνης MDM2, συσσωρεύεται και κατευθύνεται στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί γονίδια υπεύθυνα για τον κυτταρικό θάνατο.

Παράλληλα, η PIN1 δε συμμετέχει μόνο στην αποπτωτική οδό μέσω ενεργοποίησης μεταγραφής γονιδίων αλλά και στον θάνατο μιτοχονδρίων από την p53, καθώς είναι απαραίτητη στα αρχικά στάδια της p53-εξαρτώμενης απόπτωσης ρυθμίζοντας την συσσώρευση της p53 στα μιτοχόνδρια (Sorrentino *et al.*, 2013). Η μετακίνηση της p53 από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή παρεμπόδιση

ρυθμιστών της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο και αποτελεί έναν γρήγορο τρόπο απόκρισης σε έντονη καταπόνηση (Erster and Moll, 2004; Vaseva and Moll, 2009). Η PIN1 ισομερειώνει την p53 στην φωσφορυλιωμένη Ser46, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του σήματος μεταφοράς (π.χ. λόγω μονοουβικουτίνωσης) της p53 στο μιτοχόνδριο. Αυτός ο τρόπος προαγωγής κυτταρικού θανάτου είναι πιο γρήγορος από αυτόν που πραγματοποιείται από την μεταφορά της p53 στον πυρήνα και την ενεργοποίηση γονιδίων.

Ταυτόχρονα, η PIN1 ρυθμίζει και την εισαγωγή στον πυρήνα του p66^{Shc}, προσαρμογέα του παράγοντα ανάπτυξης κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες (Pinton *et al.*, 2007). Ο p66^{Shc} ουσιαστικά μεταφράζει την οξειδωτική καταστροφή σε κυτταρικό θάνατο παράγοντας ενεργές μορφές οξυγόνου μέσα στα μιτοχόνδρια και συνεπώς συμμετέχει στη ρύθμιση της διάρκειας ζωής ενός κυττάρου.

Α.4.4.4.ε. PIN1 και νευρικά κύτταρα.

Η PIN1 εκφράζεται στα περισσότερα νευρικά κύτταρα σε σχετικά υψηλά επίπεδα (Lu *et al.*, 1999b) ενώ η έκφρασή είναι ιδιαίτερα αυξημένη κατά τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων (Hamdane *et al.*, 2006). Αν και ο ακριβής ρόλος της PIN1 στους νευρώνες δεν είναι γνωστός, έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων αυτών, τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι tau, APP (Amyloid Precursor Protein), γεφυρίνη και MCL1 (Myeloid Cell Leukemia sequence 1). Στην περίπτωση της tau, η φωσφορυλίωσή της παρεμποδίζει την ικανότητά της να προσδένεται στους μικροσωληνίσκους και να προωθεί τον πολυμερισμό τους, διαδικασία που είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία των υγιών νευρώνων (Lu *et al.*, 2003), η PIN1 όμως μπορεί να αποκαταστήσει τη βιολογική λειτουργία της tau προωθώντας άμεσα ή έμμεσα την αποφωσφορυλίωσή της (Hamdane *et al.*, 2006). Με παρόμοιο τρόπο η PIN1 επιδρά και στην APP, όπου η φωσφορυλιωμένη APP ισομερειώνεται (από *cis* σε *trans*) και στη συνέχεια μπορούν να παραχθούν αAPPs και να μειωθεί η παραγωγή των τοξικών για το κύτταρο πεπτιδίων του β-αμυλοειδούς (Pastorino *et al.*, 2006). Η PIN1 ενισχύει την ικανότητα της γεφυρίνης να προσδένεται στη β-υπομονάδα υποδοχέων γλυκίνης, διαδικασία που είναι απαραίτητη για τη διατήρηση υψηλών επιπέδων παρεμποδιστών των υποδοχέων γλυκίνης που παρατίθενται στις προσυναπτικές θέσεις απελευθέρωσης (Zita *et al.*, 2007). Τέλος, κατά τη διάρκεια τραυματισμού του νωτιαίου μυελού η PIN1 έχει προστατευτικό ρόλο παρεμποδίζοντας την επαγόμενη από την JNK3 αποδιάταξη του MCL1, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και κατά συνέπεια την απόπτωση (Li *et al.*, 2007b).

Δεδομένων των λειτουργιών της PIN1 σε φυσιολογικά νευρικά κύτταρα, είναι προφανής και η συμμετοχή της σε παθολογικές καταστάσεις του νευρικού συστήματος όπως είναι οι ασθένειες Alzheimer και Parkinson. Τα κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer είναι ο σχηματισμός των νευριτικών πλακών, που είναι εξωκυττάρια αποθέσεις του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Aβ) και τα νευροϊνιδιακά τολύπια που οφείλονται στη συσσώρευση της υπερφωσφορυλιωμένης tau πρωτεΐνης. Τα επίπεδα έκφρασης της PIN1 σε εγκεφάλους με Alzheimer είναι ασυνήθιστα χαμηλά. Η PIN1 μπορεί άμεσα να επαναφέρει τη διαμόρφωση και τη λειτουργία της φωσφορυλιωμένης tau προάγοντας έμμεσα την αποφωσφορυλίωσή της (Lu *et al.*, 1999b), ενώ απώλεια της λειτουργίας της

PIN1 έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της tau αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες η τελευταία να υπερφωσφορυλιωθεί (Lim *et al.*, 2008).

Στη νόσο Parkinson η PIN1 συσσωρεύεται στα σωματία Lewy και ενισχύει το σχηματισμό συσσωματωμάτων α -συνουκλεΐνης, προστατεύοντας την α -συνουκλεΐνη από αποδιάταξη (Ryo *et al.*, 2006). Ωστόσο η αποδιάταξη της α -συνουκλεΐνης δεν σχετίζεται άμεσα με την δραστηριότητα ΡΡιάσης της PIN1 καθώς οι δυο πρωτεΐνες δεν έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν άμεσα. Όμως, η PIN1 αλληλεπιδρά με την συνφιλίνη-1, μια ρυθμιστική πρωτεΐνη της α -συνουκλεΐνης, σε φωσφορυλιωμένες περιοχές Ser-Pro, συμμετέχοντας έτσι έμμεσα στο σχηματισμό των συσσωματωμάτων (Ryo *et al.*, 2006).

A.4.5. Η παρβουλίνη hPar14.

Εκτός από την PIN1 στο γένωμα του ανθρώπου έχει εντοπιστεί μια γονιδιακή περιοχή που κωδικοποιεί για δύο πρωτεΐνες την hPar14 και την hPar17 που έχουν διαφορετικό σημείο έναρξης της μεταγραφής (Mueller *et al.*, 2006). Ομόλογες της hPar14 έχουν εντοπιστεί σε όλους του πολυκύτταρους οργανισμούς από τον *Neurospora crassa* και τον *Caenorhabditis elegans* έως και τα πρωτεύοντα θηλαστικά.

Η hPar14 αποτελείται από 131 αμινοξέα και εκτός από την καρβόξυ τελική περιοχή ΡΡιάσης φέρει στο άμινο τελικό της άκρο μια εύκαμπτη προέκταση μήκους 35 αμινοξέων (Sekerina *et al.*, 2000; Terada *et al.*, 2001). Η περιοχή ΡΡιάσης της hPar14 παρουσιάζει 34% και 39% ομολογία με τη EcPar10 και την δομική περιοχή ΡΡιάσης της hPIN1 αντίστοιχα. Το άμινο τελικό της άκρο δεν παρουσιάζει κάποια συγκεκριμένη δομή, είναι όμως πλούσιο στα αμινοξέα λυσίνη, σερίνη και γλυκίνη. Η άμινο τελική αυτή περιοχή είναι απαραίτητη για την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα (Surmacz *et al.*, 2002) μετά τη φωσφορυλίωσή της στη Ser19, μέσω της κινάσης της καζεΐνης II (Reimer *et al.*, 2003).

Η στερεοδιάταξη της δομικής περιοχής ΡΡιάσης της hPar14, που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 36-131, σχηματίζει μια β -πτυχωτή επιφάνεια τεσσάρων β -κλώνων, και τρεις α -έλικες. Η γενική αρχιτεκτονική της δομής της hPar14 είναι παρόμοια με αυτήν της δομικής περιοχής ΡΡιάσης της hPIN1. Τα Met90 και Phe94, που αντιστοιχούν στα Met130 και Phe134 της PIN1 πιθανά εμπλέκονται στη πρόσδεση της προλίνης, ενώ το ρόλο της Leu122 πιθανά έχει η Val91 στη hPar14, η τριάδα αυτή Met90, Val91 και Phe94 είναι συντηρημένη και στην EcPar10 (Terada *et al.*, 2001). Επίσης τα κατάλοιπα His42 και His123 είναι τα αντίστοιχα των His59 και His157 του ενεργού κέντρου της hPIN1, ενώ τη θέση των Cys113 και Ser154 φαίνεται να έχουν τα Asp74 και Phe120 (Terada *et al.*, 2001). Μια σημαντική διαφορά στη τριτοταγή δομή των δύο πρωτεϊνών σχετίζεται με το βρόγχο που ενώνει τον β 1-κλώνο με την α 1-έλικα στην PIN1 και συμμετέχει ενεργά στην εξειδίκευση όσον αφορά τα φωσφορυλιωμένα υποστρώματα της PIN1, η αντίστοιχη περιοχή στην hPar14 είναι μικρότερη σε μήκος και τα κατάλοιπα Asp74 και Glu46 σχηματίζουν μια περιοχή πιο αρνητικά φορτισμένη (Sekerina *et al.*, 2000) που πιθανά σχετίζεται με την εκλεκτικότητα υποστρώματος του ενζύμου. Πράγματι, η hPar14, αν και παρουσιάζει σχετικά μικρή ενζυμική δραστηριότητα σε σχέση με άλλες παρβουλίνες, έχει μεγαλύτερη σταθερά εξειδίκευσης ως προς το τετραπεπτίδιο που έχει αργινίνη πριν από την προλίνη, χωρίς όμως να είναι απαραίτητη η παρουσία του θετικού φορτίου αφού παρουσιάζει χαμηλή σταθερά εξειδίκευσης στα πεπτίδια με ιστιδίνη και λυσίνη πριν από την προλίνη (Uchida *et al.*, 2003).

Η hPar14 εκφράζεται σε διάφορους ιστούς, με σχετικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης στην καρδιά και τους σκελετικούς μύες και λιγότερο αυξημένα στον εγκέφαλο

και τους πνεύμονες (Rulten *et al.*, 1999; Uchida *et al.*, 1999) επίσης έχει εντοπιστεί και σε ιστούς όπως ο πλακούντας, το συκώτι, τα νεφρά και το πάγκρεας αλλά σε σχετικά χαμηλά επίπεδα (Rulten *et al.*, 1999).

Σχετικά με τις λειτουργίες της στο κύτταρο έχει προταθεί ότι συμμετέχει στο σχηματισμό ριβοσωμάτων αφού αλληλεπιδρά με το προ-ριβοσωμικό σύμπλοκο νουκλεοπρωτεϊνών (Fujiyama-Nakamura *et al.*, 2009; Fujiyama *et al.*, 2002). Επίσης αλληλεπιδρά με κυρτές, δίκλωνες, πλούσιες σε AT περιοχές του DNA υποδηλώνοντας συμμετοχή στην τοποθέτηση του νουκλεοσώματος ή στην έναρξη της μεταγραφής (Reimer *et al.*, 2003). Παράλληλα, η *hPar14* αντισταθμίζει έως ένα βαθμό την απώλεια της PIN1 καθώς τα επίπεδα των μεταγραφημάτων της αλλά και της πρωτεΐνης αυξάνονται σε κύτταρα PIN1^{-/-} ινοβλαστών του ενδοθηλίου από ποντίκι (Mouse Endothelial Fibroblasts, MEFs) (Uchida *et al.*, 2003). Ταυτόχρονα, αποσιώπηση της *hPar14* με siRNA προκαλεί μεγαλύτερη καθυστέρηση στην ανάπτυξη των κυττάρων από αυτή κυττάρων που επανεκφράζουν την PIN1 (Uchida *et al.*, 2003). Παρόλα αυτά όμως, η αντιστάθμιση της PIN1 από την *hPar14* δεν είναι καθολική αφού η δεύτερη δεν μπορεί να υποκαταστήσει την Ess1 στη ζύμη (Metzner *et al.*, 2001). Επιπλέον, η σχετικά μικρή της ενζυμική δραστηριότητα δεν είναι εξειδικευμένη προς τα φωσφορυλιωμένα υποστρώματα (Uchida *et al.*, 1999). Τα γεγονότα αυτά υποδηλώνουν αποκλίνουσες αλλά έως ένα βαθμό αλληλεπικαλυπτόμενες κυτταρικές λειτουργίες για τις παρβουλίνες του ανθρώπου (Mueller and Bayer, 2008).

Στον άνθρωπο εκτός από την *hPar14* από την ίδια γενετική περιοχή παράγεται και ένα mRNA μεγαλύτερο σε μήκος από αυτό της *hPar14*, η *hPar17*, που μεταγράφεται σε χαμηλότερα επίπεδα (0,5–1,5% ανάλογα με τον ιστό) από τα μεταγραφήματα της *hPar14* (Mueller *et al.*, 2006). Η *hPar17* έχει επιπλέον 25 αμινοξέα στο άμινο τελικό της άκρο που σχηματίζουν μια α-έλικα που οδηγεί την πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια (Kessler *et al.*, 2007). Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μόνο στα πρωτεύοντα θηλαστικά και πιθανά πρόκειται για έναν από τους πρόσφατους μηχανισμούς υποκυτταρικής τοποθέτησης στην πορεία της εξέλιξης (Kessler *et al.*, 2007). Ενώ ο ρόλος της *hPar17* στα μιτοχόνδρια δεν είναι γνωστός όμως έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στη ρύθμιση του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων (Thiele *et al.*, 2011).

A.4.6. Οι παρβουλίνες στους φυτικούς οργανισμούς.

Όπως οι κυκλοφιλίνες και οι FKBP, έτσι και οι παρβουλίνες απατώνται και στους φυτικούς οργανισμούς, όμως ενώ ο αριθμός των ανοσοφιλίνων στα ανώτερα φυτά είναι σχετικά αυξημένος ο αριθμός των παρβουλινών παραμένει σχετικά μικρός, για παράδειγμα στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* έχουν εντοπιστεί τρία γονίδια που κωδικοποιούν για παρβουλίνες τα *AtPIN1* (At2g18040), *AtPIN2* (At1g26550) και *AtPIN3* (At5g19370) (He *et al.*, 2004). Από τις τρεις αυτές παρβουλίνες του *Arabidopsis* μόνο μία, η *AtPIN1*, έχει απομονωθεί και μελετηθεί (Landrieu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2010). Οι τρεις φυτικές παρβουλίνες φαίνεται να ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες παρβουλινών καθώς η καθεμιά έχει τα δικά της ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, έτσι η *AtPIN1* αποτελείται μόνο από τη δομική περιοχή ΡΡ1άσης και παρουσιάζει 53% ομολογία με την περιοχή ΡΡ1άσης της *hPIN1*, χωρίς όμως να φέρει τη WW δομική περιοχή ή κάποια άλλη αντίστοιχη περιοχή. Η *AtPIN2* παρουσιάζει μόλις 32% ομολογία με την *AtPIN1*, ενώ με την *hPar14* η ομολογία της ανέρχεται στο 53% και επιπλέον, όπως και η *hPar14*, φέρει μια άμινο-τελική προέκταση πλούσια σε βασικά αμινοξέα. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η *AtPIN3*, καθώς η

δομική περιοχή ΡΡ1άσης που φέρει παρουσιάζει 39% ομολογία με την βακτηριακή Par10 και επιπλέον αυτής φέρει στο καρβόξυ άκρο της μια δομική περιοχή που παρουσιάζει ομολογία με ροδανάσες (θειομεταφοράσες). Επίσης, στο άμινο άκρο της AtPIN3 βρίσκεται ένα πεπτίδιο οδηγός που πιθανά κατευθύνει την πρωτεΐνη στον χλωροπλάστη (He *et al.*, 2004).

4.6.1. Οι παρβουλίνες τύπου PIN1 στα φυτά και η απουσία της WW δομικής περιοχής.

Εκτός από την παρβουλίνη AtPIN1 του *Arabidopsis*, άλλες φυτικές παρβουλίνες που έχουν μελετηθεί είναι η MdPin1 από το *Malus domestica* (Yao *et al.*, 2001) και η DPar13 από το *Digitalis lanata* (Metzner *et al.*, 2001). Οι τρεις αυτές παρβουλίνες παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό ομολογίας μεταξύ τους, η AtPIN1 έχει 79% ομολογία με την MdPin1 και 73% με την DPar13, ενώ η MdPin1 με την DPar13 έχει 78% και οι τρεις παρουσιάζουν αυξημένη εξειδίκευση έναντι υποστρωμάτων που είναι έχουν περιοχές pSer/pThr-Pro. Αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των τριών αυτών παρβουλινών είναι ότι τα αμινοξέα που εμπλέκονται στην αναγνώριση υποστρώματος και στον μηχανισμό κατάλυσης σε PIN1 πρωτεΐνες από άλλους οργανισμούς είναι υψηλά συντηρημένα ενώ η WW δομική περιοχή δεν εντοπίζεται σε καμιά φυτική παρβουλίνη. Οι τρεις αυτές παρβουλίνες είναι ικανές να υποκαταστήσουν την Ess1 στη ζύμη με σχεδόν τα ίδια αποτελέσματα όπως η hPIN1 (Metzner *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2001).

Ένα ακόμα κοινό χαρακτηριστικό των φυτικών παρβουλινών, εκτός από την απουσία της WW δομικής περιοχής, είναι η παρουσία τεσσάρων καταλοίπων στο βρόγχο β1/α1, στην περίπτωση της AtPIN1 των Lys31, Ile32, Ile33 και Leu34. Για τη μελέτη της περιοχής αυτής χρησιμοποιήθηκε η AtPIN1Δ από την οποία έχουν διαγραφεί τα τέσσερα αυτά κατάλοιπα και ελέγχθηκε αν μπορεί να συμπληρώσει τη λειτουργία της Ess1. Η AtPIN1Δ μπορεί να συμπληρώσει τη λειτουργία της Ess1 μόνο κάτω από συνθήκες υπερέκφρασης, η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται και από την hPIN1 χωρίς την παρουσία της WW δομικής περιοχής (Yao *et al.*, 2001).

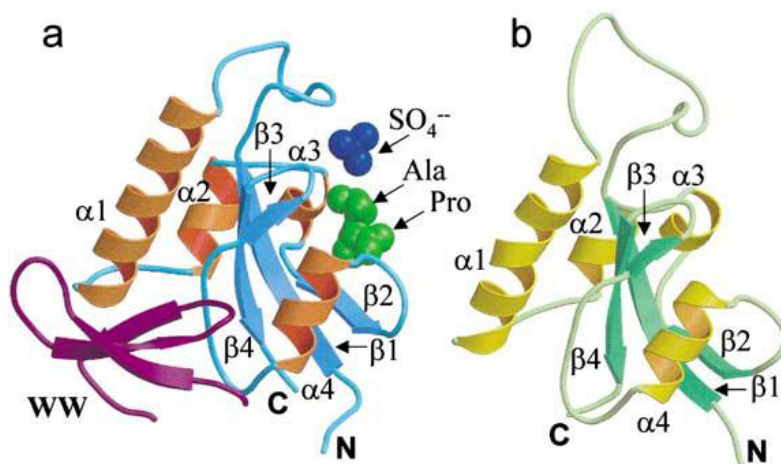
Η DPar13 απομονώθηκε από προεμβρυογενικές μάζες κυττάρων (ProEmbryogenic Masses, PEMS) του *D. lanata* καθώς ακετάργαστο πρωτεϊνικό εκχυλίσμα από PEMS παρουσίασε ενζυμική δραστηριότητα έναντι φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων. Η DPar13 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα και ίσως στα μιτοχόνδρια των κυττάρων, επίσης τα επίπεδα έκφρασής της είναι παρόμοια σε ρίζες ηλικίας 1 και 2 ετών, στους βλαστούς, σε φύλλα ροζέτας ηλικίας 1 και 2 ετών, σε άνθη και σε σπορόφυτα (Metzner *et al.*, 2001).

Τα επίπεδα έκφρασής της MdPin1 είναι στενά συνδεδεμένα με τη διαίρεση των φυτικών κυττάρων αφού τα μεταγραφόμενα της εντοπίζονται κυρίως κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του καρπού του μήλου, διάστημα στο οποίο πραγματοποιούνται κυτταρικές διαιρέσεις, ενώ δεν εντοπίζονται κατά τα τελευταία στάδια ανάπτυξης που χαρακτηρίζονται από την αύξηση των κυττάρων σε όγκο (Yao *et al.*, 2001). Αντίστοιχα, σε καλλιέργεια κυττάρων μήλου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης της MdPin1 κατά τα πρώτα στάδια της καλλιέργειας αλλά όχι κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης (Yao *et al.*, 2001).

A.4.6.2. Δομή της AtPIN1.

Ο τρόπος διπλώματος της AtPIN1 είναι παρόμοιος με αυτόν της hPIN1, αποτελείται δηλαδή από τέσσερις β-κλώνους που περικλείονται από τέσσερις α-έλικες (Εικόνα A.8) και

οι δύο πρωτεΐνες παρουσιάζουν πολλά κοινά στοιχεία σε βασικές δομικές περιοχές που σχετίζονται με την αναγνώριση υποστρώματος και μηχανισμού κατάλυσης (Landrieu *et al.*, 2002).



Εικόνα A.8: Αναπαράσταση των δομών της *hPIN1* (a) (PDB ID: 1PIN) και της *AtPIN1* (b) (PDB ID: 1J6Y) από το *Arabidopsis*.

Πιο αναλυτικά, ο εύκαμπτος βρόγχος $\beta 1/\alpha 1$ της *hPIN1*, περιέχει τα αμινοξέα Lys63, Arg68 και Arg69 που συμμετέχουν στην αναγνώριση υποστρώματος είναι συντηρημένος στην *AtPIN1* και μάλιστα τα αντίστοιχα κατάλοιπα Arg21 και Arg22 και ίσως λιγότερο η Lys16 συμμετέχουν ενεργά στην αναγνώριση υποστρώματος. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από την παρατήρηση ότι κατά την επίλυση της δομής της *AtPIN1* με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) η προσθήκη ιόντων $^{25}\text{SO}_4$ είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία σημαντικών διαταραχών στο φάσμα των καταλοίπων Arg21 και Arg22 και λιγότερες σε αυτό της Lys16. Παράλληλα τα κατάλοιπα Ile32, Ile33 και Leu34, για το οποία έχει προταθεί ότι πιθανά αντικαθιστούν την WW δομική περιοχή, ενώ βρίσκονται πολύ κοντά στη θέση πρόσδεσης του ανιόντος $^{25}\text{SO}_4$ πιθανά δεν έχουν ενεργό ρόλο στη διαδικασία αναγνώρισης υποστρώματος (Landrieu *et al.*, 2002). Τα κατάλοιπα Met87 και Phe91, που είναι τα αντίστοιχα των Met130 και Phe134 της *hPIN1*, συμμετέχουν στην πρόσδεση της προλίνης του δεσμού που υπόκειται την ισομερείωση, ενώ η Leu79 αντίστοιχη της Leu122 πιθανά δεν συμμετέχει στη πρόσδεση της προλίνης και τη θέση της υποκαθιστά η Phe82. Η πλευρική ομάδα της Cys70, αντίστοιχη της Cys113 που μετέχει στο ενεργό κέντρο, έχει αντίθετη φορά ως προς την περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδικού δεσμού και τη λειτουργία της πιθανά αντικαθιστά η Ser71 που έχει προσανατολισμό προς το ενεργό κέντρο και παρουσιάζει αλλαγές στο φάσμα της από την παρουσία πεπτιδίου κατά την επίλυση της δομής (Landrieu *et al.*, 2002). Τέλος, η Ser111 είναι η αντίστοιχη της Ser154 ενώ για τις His12 και His114 (His59 και His157 της *hPIN1*) που είναι υψηλά συντηρημένες δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές που να επιβεβαιώνουν τη συμμετοχή τους στην κατάλυση.

Η απουσία της WW δομικής περιοχής από την *AtPIN1* έχει επίσης ως αποτέλεσμα η επιφάνεια που προστατεύεται από αυτήν στη *hPIN1* να είναι εκτεθειμένη στην *AtPIN1*. Η επιφάνεια αυτή αποτελείται κυρίως από κατάλοιπα των περιοχών $\alpha 4$, $\beta 3$ και $\alpha 1$. Επίσης η περιοχή αυτή παρουσιάζει και διαφορετική κατανομή ηλεκτροστατικού δυναμικού από την *hPIN1* με την *AtPIN1* να έχει αρνητικό φορτίο στην περιοχή αυτή. Τα κατάλοιπα που

συμμετέχουν στη δημιουργία της φορτισμένης αυτής περιοχής, για παράδειγμα τα κατάλοιπα Glu51 και Asp52 είναι συντηρημένα στις φυτικές παρβουλίνες, ενώ και τα Asp105 και Asp108 που συμμετέχουν στη δημιουργία του αρνητικού φορτίου δεν έχουν αντίστοιχα στην *hPIN1* (Landrieu *et al.*, 2002).

A.4.6.3. Η *AtPIN1* ρυθμίζει το χρόνο άνθισης στο *Arbidopsis*.

Μόλις πρόσφατα βρέθηκε ότι η *AtPIN1* ρυθμίζει το χρόνο άνθισης στο *Arbidopsis* αλληλεπιδρώντας με δύο παράγοντες μεταγραφής της οικογένειας MADS, τον SOC1 (Suppressor of overexpression of CO 1) και τον AGL24 (Agamous-like 24) (Wang *et al.*, 2010). Η στερεοδιάταξη των SOC1 και AGL24 ρυθμίζεται ισχυρά από την *AtPIN1*. Όταν η *AtPIN1* υπολειπουργεί η ισομερείωση των δύο πρωτεϊνών από *cis* σε *trans* και από *trans* σε *cis* επιβραδύνεται σημαντικά. Κάτω από αυτές τις συνθήκες αν ένα από τα δύο ισομερή εξαντληθεί τότε η αποκατάσταση της ισορροπίας μεταξύ *cis* και *trans* γίνεται με ιδιαίτερα αργό ρυθμό. Αντίθετα όταν έχουμε υπερέκφραση της *AtPIN1*, ο ρυθμός της ισομερείωσης αυξάνεται σημαντικά, με αποτέλεσμα να γίνεται γρήγορα αποκατάσταση της ισορροπίας αυτής (Wang *et al.*, 2010). Το γεγονός ότι η *AtPIN1* προάγει την άνθιση, υποδηλώνεται από την παρατήρηση ότι η επιτάχυνση της ισομερείωσης των φωσφορυλιωμένων περιοχών Ser/Thr-Pro στις SOC1 και AGL24 διευκολύνει την άνθιση ενώ η επιβράδυνση της την καθυστερεί. Όσον αφορά την AGL24, η *AtPIN1* ουσιαστικά αυξάνει την σταθερότητα της πυρηνικής AGL24 που ενεργοποιεί προαγωγείς της άνθισης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Michaels *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2002).

Οι παράγοντες μεταγραφής SOC1 και AGL24 συνεργιστικά ενσωματώνουν περιβαλλοντικά και ενδογενή σιγνάλα από διαφορετικά μονοπάτια άνθισης, η συμμετοχή της *AtPIN1* στη ρύθμιση της διαμόρφωσης των δύο αυτών πρωτεϊνών μετά τη φωσφορυλίωσή τους αποκαλύπτει έναν άγνωστο έως τώρα μηχανισμό που συμμετέχει στη μετάβαση από την βλαστική στην αναπαραγωγική αύξηση στο *Arbidopsis* (Wang *et al.*, 2010).

A.5. Το ψυχανθές *Lotus japonicus*.

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια Fabaceae (Leguminosae) και έχουν πάρει την ονομασία τους από το σχήμα του άνθους, καθώς η στεφάνη τους μοιάζει με πεταλούδα (ψυχή στα αρχαία ελληνικά) που έχει ανοιγμένα τα φτερά της. Η Fabaceae αποτελεί την τρίτη σε μέγεθος οικογένεια ανθοφόρων φυτών έχοντας 670 με 750 γένη και περισσότερα από 19000 είδη (Polhill *et al.*, 1981). Τα είδη της οικογένειας εξαπλώνονται σε όλο τον κόσμο και παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία καθώς περιλαμβάνει από δέντρα έως και μονοετείς πόες, με την πλειονότητά τους όμως να ανήκουν στις πόες.

Το ένα τρίτο της παγκόσμιας γεωργικής παραγωγής αποτελείται από ψυχανθή (καρποδοτικά και χορτοδοτικά) ενώ μετά τα αγρωστώδη αποτελούν τα πιο σημαντικά φυτικά είδη για τον άνθρωπο (Graham and Vance, 2003). Τα πιο διαδεδομένα καλλιεργούμενα ψυχανθή είναι τα *Glycine max* (σόγια), *Phaseolus vulgaris* (φασόλι), *Pisum sativum* (μπιζέλι), *Lens culinaris* (φακή), *Medicago sativa* (μηδική), *Arachis hypogaea* (φυστίκι), *Cicer arietinum* (ρεβύθι) και *Cajanus cajan*. Τα ψυχανθή είναι πλούσια σε πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας και από αυτά προέρχεται περίπου το ένα τρίτο των πρωτεϊνών που καταναλώνει ο άνθρωπος ενώ αποτελούν και σημαντική πηγή

ιχνοστοιχείων. Σε αναπτυσσόμενες χώρες αποτελούν τη πρωταρχική πηγή πρωτεϊνών στη διατροφή του ανθρώπου. Παράλληλα χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία για τη διατροφή των ζώων είτε για βόσκηση και σανό είτε ως σπόρος. Επίσης στη γεωργία τα ψυχανθή χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση και βελτίωση του εδάφους ως χλωρή λίπανση αλλά και τη φυτοεξυγίανση βεβαρημένων εδαφών. Άλλες χρήσεις τους περιλαμβάνουν την παραγωγή ξυλείας, την παραγωγή βιοαποδομίσιμων πλαστικών, την παραγωγή ελαίων, κόμμεων και φαρμακευτικών ουσιών όπως τα ισοφλαβονοειδή (Dixon and Sumner, 2003).

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα των ψυχανθών είναι η ικανότητα τους να συμβιώνουν με βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Shinorhizobium*, *Mesorhizobium* και *Azorhizobium* σχηματίζοντας ένα νέο όργανο, το φυμάτιο, στο οποίο επιτελείται η διεργασία αφομοίωσης ατμοσφαιρικού αζώτου (ανάγουν το N_2 σε NH_3). Περίπου, το 88% των γνωστών ειδών των ψυχανθών συμβιώνει με ριζόβια, η συμβιωτική αυτή σχέση ανώτερων φυτών με βακτήρια είναι πολύ σημαντική τόσο με οικολογικά, όσο και με καθαρά αγροτο-οικονομικά κριτήρια αφού έχει το μεγαλύτερο βαθμό συμμετοχής στον εμπλουτισμό του εδάφους σε αφομοιώσιμο άζωτο. Έχει υπολογισθεί ότι κάθε χρόνο περίπου 40 με 60 εκατομμύρια τόνοι αζώτου δεσμεύονται από τις καλλιέργειες των ψυχανθών (Smil, 1999).

Παρόλο που ο ρόλος των ψυχανθών τόσο στα φυσικά οικοσυστήματα όσο στη γεωργία και στη διατήρηση των εδαφών είναι ιδιαίτερα σημαντικός οι αποδόσεις των καλλιεργειών είναι αρκετά χαμηλότερες από αυτές των δημητριακών. Συνεπώς είναι απαραίτητη η μελέτη της βιολογίας των ψυχανθών σε μεγαλύτερο βάθος για να καταστεί δυνατή η καλύτερη αξιοποίηση των ιδιοτήτων τους. Αν και η έρευνα σε φυτικά μοντέλα μη-ψυχανθή έχει δώσει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με θεμελιώδεις πλευρές της βιολογίας των φυτών, δεν μπορεί να καλύψει μερικές σημαντικές πλευρές της βιολογίας των ψυχανθών, όπως η συμβιωτική δέσμευση του αζώτου. Παράλληλα, χαρακτηριστικά των καλλιεργουμένων ψυχανθών όπως ο βαθμός πολυπλοειδίας, το μέγεθος του γονιδιώματός τους, το μέγεθος του φυτού, ο βιολογικός τους κύκλος, ο αριθμός των παραγόμενων σπόρων ανά φυτό και η συμπεριφορά σε εργαστηριακές τεχνικές τους όπως ο μετασηματισμός και η αναγέννηση καθιστούν αρκετά από αυτά ακατάλληλα για τη χρήση τους ως φυτικό μοντέλο. Σημαντική ώθηση στη μελέτη της βιολογίας των ψυχανθών παρατηρήθηκε όταν άρχισαν να χρησιμοποιούνται ως φυτά μοντέλα το *Lotus japonicus* και το *Medicago truncatula*.

Το *L. japonicus* είναι ένα διπλοειδές, αυτογόνιμο είδος με έξι ζεύγη χρωματοσωμάτων Το φυσικό ενδιαίτημα (habitat) του *L. japonicus* είναι η Άπω Ανατολή και περιλαμβάνει περιοχές της Ιαπωνίας, της Κορέας και της Κίνας. Ο βιολογικός του κύκλος μπορεί να ολοκληρωθεί σε διάστημα 3-4 μηνών, ενώ ανθίζει σε περίπου 7 εβδομάδες μετά την σπορά και η παραγωγή σπόρων ανά φυτό μπορεί να φτάσει και τις 6000. Επίσης τα νεαρά φυτά έχουν μικρό μέγεθος γεγονός που επιτρέπει την ανάπτυξή τους ακόμη και σε δοκιμαστικούς σωλήνες *in vitro* ενώ μπορούν να αναπτυχθούν και με μεγάλη πυκνότητα σε θήκες σποράς (Handberg and Stougaard, 1992). Το ενήλικο φυτό είναι θαμνώδες και αποτελείται από πολλούς βλαστούς που το μήκος τους μπορεί να ξεπεράσει τα 30 εκατοστά (Εικόνα Α.9). Το *L. japonicus* σχηματίζει καθορισμένα φυμάτια με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*.



Εικόνα A.9: Άνθη και χέδρωπες του ενήλικων φυτών *L. japonicus*.

Το γονιδίωμα *L. japonicus* είναι σχετικά μικρό έχοντας μέγεθος 472 Mb, από αυτό έχουν καθοριστεί 315,1 Mb που αντιστοιχούν στο 67% (Sato *et al.*, 2008). Συνολικά, έχουν εντοπιστεί 10951 ολόκληρα γονίδια και 19848 τμήματα γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες καλύπτοντας έτσι το 91,3% των γονιδιακών περιοχών. Το 63% από τα γονίδια αυτά παρουσιάζει ομολογία με γονίδια γνωστής λειτουργίας, το 22% με γονίδια πιθανής λειτουργίας ενώ το υπόλοιπο 15% δεν παρουσιάζει καμιά ομοιότητα με αλληλουχίες γονιδίων που είναι κατατεθειμένες στις βιολογικές βάσεις δεδομένων. Παράλληλα το 4 % των γονιδίων του εντοπίζεται μόνο σε ψυχανθή. Εκτός του γονιδιώματος είναι διαθέσιμος και μεγάλος αριθμός ESTs (Expressed Sequence Tags) που προέρχονται από διάφορα όργανα του φυτού. Με την αποκρυπτογράφιση του μεγαλύτερου μέρους του γονιδιώματος του έχουν καταρτιστεί και συγκριτικοί γενετικοί χάρτες περιοχών που φέρουν γονίδια που εμπλέκονται στη συμβίωση (Sandal *et al.*, 2006).

Όσον αφορά τη λειτουργία διάφορων γονιδίων σημαντικές πληροφορίες μπορούμε να αντλήσουμε και από τα δεδομένα DNA μικροσυστοιχιών. Για παράδειγμα από τη σύγκριση των δεδομένων μικροσυστοιχιών που κατασκευάστηκαν από ρίζες χωρίς φυμάτια και από ρίζες με φυμάτια προέκυψε σημαντικός αριθμός γονιδίων που συμμετέχουν στη λειτουργία των φυματίων (Colebatch *et al.*, 2002).

Ένα άλλο εργαλείο που έχουν διαθέσιμο οι ερευνητές για τη μελέτη της λειτουργία διαφόρων γονιδίων είναι η τεχνική TILLING με την οποία είναι δυνατό να ανιχνεύσουμε φυτά με σημειακές μεταλλάξεις γονιδίων που μας ενδιαφέρουν μέσα από έναν πληθυσμό φυτών (περίπου 5000) που έχει μεταλλαχθεί με EMS (Ethyl MethaneSulfonate) (Perry *et al.*, 2003). Εκτός αυτού είναι πλέον διαθέσιμος στην επιστημονική κοινότητα μεγάλος αριθμός μετασηματισμένων φυτών με το μεταθετό στοιχείο LORE1 (Fukai *et al.*, 2012, Urbanski *et al.*, 2012).

Ένα επίσης σημαντικό χαρακτηριστικό του *L. japonicus* που συνέβαλλε στην επιλογή του ως φυτικό μοντέλο είναι η ικανότητα του να μετασηματίζεται με τη χρήση *Agrobacterium*. Μια από τις πρώτες τεχνικές που αναπτύχθηκε για το μετασηματισμό του *L. japonicus* περιλάμβανε το μετασηματισμό υποκοτυλίων με *Agrobacterium tumefaciens* η επιλογή των διαγονιδιακών φυτών μπορεί να γίνει με τα αντιβιοτικά υγρομυκίνη ή

καναμυκίνη αναλόγως το γονίδιο επιλογής που χρησιμοποιήθηκε (Handberg and Stougaard, 1992). Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί για τη δημιουργία αναγεννημένων φυτών μπορεί να φτάσει και τους έξι με εννέα μήνες. Παράλληλα για την επιλογή μετασηματισμένων έχει χρησιμοποιηθεί και το γονίδιο *bar* που προσφέρει ανθεκτικότητα έναντι των ζιζανιοκτόνων Ignite και Basta, η επιλογή έναντι των ζιζανιοκτόνων υπερτερεί ως έναν βαθμό αυτής των αντιβιοτικών καθώς είναι πιο οικονομική ενώ τα ποσοστά σωματοκλωνικής ποικιλομορφίας είναι χαμηλότερα (Lohar *et al.*, 2001). Εκτός από το μετασηματισμό υποκοτυλίων του *L. japonicus* έχουν αναπτυχθεί και πρωτόκολλα μετασηματισμού που χρησιμοποιούν νεαρές ρίζες του φυτού ως αρχικό υλικό (Lombardi *et al.*, 2003). Με αυτή τη τεχνική μειώθηκε ο χρόνος μετασηματισμού στους 4 μήνες ενώ είναι δυνατή και η διατήρηση του αρχικού υλικού στους 4°C για μεγάλο χρονικό διάστημα επιτρέποντάς μας να έχουμε διαθέσιμο υλικό για μεγάλο χρονικό διάστημα και συνεχείς μετασηματισμούς.

Παράλληλα για το μετασηματισμό του *L. japonicus* μπορεί να χρησιμοποιηθεί το *Agrobacterium rhizogenes* στις ρίζες νεαρών φυτών. Η μόλυνση των ριζών με το *A. rhizogenes* οδηγεί στη δημιουργία πολλών μετασηματισμένων ριζών που έχουν πολλά ριζικά τριχίδια. Οι μετασηματισμένες ρίζες μπορούν να αναγνωριστούν εύκολα, να διαχωριστούν και να καλλιεργηθούν *in vitro*. Από την καλλιέργεια αυτή των ριζών είναι δυνατό να αναγεννηθούν ολόκληρα φυτά και να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μελέτες (Stougaard, 1996).

Όλα τα παραπάνω κάνουν το *L. japonicus* ένα σημαντικό εργαλείο στα χέρια των ερευνητών που μαζί με πληροφορίες από άλλα ψυχανθή έχουν δώσει ώθηση στην κατανόηση πολλών πλευρών της αζωτοδέσμευσης αλλά και στην δημιουργία νέων ερωτημάτων που πρέπει να απαντηθούν.

A.6. Το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*.

Το *Mesorhizobium loti* είναι ένα Gram⁻ βακτήριο της ριζόσφαιρας του εδάφους και ανήκει στο γένος *Mesorhizobium* της οικογένειας *Phyllobacteriaceae*. Το *M. loti* μπορεί και υιοθετεί δύο διαφορετικούς τρόπους διαβίωσης. Αρχικά, μπορεί να αναπτυχθεί ελεύθερα στο έδαφος αλλά όταν δεν υπάρχει άφθονο διαθέσιμο άζωτο μπορεί και αποικίζει στις ρίζες του *L. japonicus* σχηματίζοντας φυμάτια μέσω των οποίων γίνεται η αζωτοδέσμευση. Η σχέση φυτού-ριζοβίου είναι αμοιβαία, το φυτό παρέχει στον ενδοσυμβιώτη φωτοσυνθετικά προϊόντα με αντάλλαγμα άζωτο σε μορφή αμμωνιακών ιόντων και αμινοξέων (Udvardi and Day, 1997). Η συμβίωση των δύο οργανισμών είναι μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει την αναγνώριση των σημάτων από τον έναν οργανισμό προς τον άλλο, τη διαφοροποίηση της ρίζας του φυτού και το σχηματισμό του φυματίου ενώ από την πλευρά του το ριζόβιο αναλαμβάνει τη δημιουργία και τη λειτουργία του συμπλόκου της νιτρογενάσης.

A.6.1. Το γονίδιο του *Mesorhizobium loti*.

Το γενετικό υλικό του *M. loti* οργανώνεται σε τρία κυκλικά μόρια: ένα χρωμόσωμα των 7.036.071 βάσεων και δύο πλασμίδια, τα pMLa (351.911bp) και pMLb (208.315bp), ολόκληρη η νουκλεοτιδική αλληλουχία του στελέχους MAFF303099 του *M. loti* έχει πλήρως καθοριστεί (Kaneko *et al.*, 2000). Το χρωμόσωμα περιλαμβάνει 6.752 πιθανά γονίδια που

κωδικοποιούν πρωτεΐνες ενώ από τα πλασμίδια pMLa και pMLb κωδικοποιούν για 320 και 209 πρωτεΐνες αντίστοιχα. Κατά μέσο όρο το μέγεθος κάθε γονιδίου είναι 1.042bp και ανάλογο με αυτό των βακτηριακών ειδών που έχουν εξεταστεί μέχρι σήμερα. Το 54% των γονιδίων του χρωμοσώματος παρουσιάζουν ομολογία με γονίδια γνωστής λειτουργίας, το 21% έχει ομοιότητα με γονίδια των οποίων η λειτουργία είναι υποθετική, ενώ το υπόλοιπο 25% δεν παρουσίασε ομοιότητα με κανένα γνωστό γονίδιο. Στα πλασμίδια pMLa και pMLb ο αριθμός των γονιδίων άγνωστης λειτουργίας είναι 50% και 64% αντίστοιχα (Kaneko *et al.*, 2000).

Στα γένη *Rhizobium* και *Sinorhizobium* τα γονίδια που εμπλέκονται στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση εντοπίζονται τόσο στο χρωμόσωμα όσο και σε πλασμίδια που αποκαλούνται συμβιωτικά πλασμίδια (pSym). Αντίθετα, στα γένη *Mesorhizobium* και *Bradyrhizobium* η πλειοψηφία των γονιδίων της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης φαίνεται να εδράζει στα χρωματοσώματα. Η περιοχή αυτή είναι ένα τμήμα μεγέθους 500 Kb και ονομάζεται «συμβιωτική νησίδα». Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι όταν η νησίδα αυτή μεταφερθεί σε μη-συμβιωτικά είδη του *Mesorhizobium*, αυτά αποκτούν την δυνατότητα σχηματισμού φυματίων (Sullivan and Ronson, 1998).

B. Υλικά και Μέθοδοι

B.1. Ανάπτυξη μικροοργανισμών και φυτών.

B.1.1. Ανάπτυξη βακτηρίων.

Τα *Escherichia coli* αναπτύσσονται είτε σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (1% NaCl, 1% Bacto-Trypton, 0,5% Yeast extract), είτε σε στερεό LB με 1,5% άγαρ στους 37°C για περίπου 16 ώρες, παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών. Τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα XL1 Blue, DH5α, DB3.1 και M15[ρ REP4].

Τα *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 αναπτύσσονται είτε σε υγρό θρεπτικό μέσο TY (0,5% Bacto-Trypton, 1,5% Yeast extract, 6mM CaCl₂, pH 7.2), είτε σε στερεό TY με 1,5% άγαρ στους 28°C παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών.

Τα *Mesorhizobium loti* R7A και MAFF303099 αναπτύσσονται σε τρυβλία που περιέχουν στερεό θρεπτικό υλικό YMB (1% μαννιτόλη, 0,01% NaCl, 0,05% Yeast extract, 0,05% K₂HPO₄, 0,02% MgSO₄·7H₂O) είτε σε στερεό YMB με 1,5% άγαρ. Η ανάπτυξη των ριζοβίων γίνεται στους 30°C για 72 ώρες.

B.1.2. Ανάπτυξη κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*.

Τα κύτταρα ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* AH109 και SG335 αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο YPDA (2% Bacto-Trypton, 1% Yeast extract, 2% γλυκόζη, αδενίνη 3,75 mg/ml) είτε σε στερεό YPDA με 2% άγαρ στους 30°C για 48 με 72 ώρες. Για την επιλογή ζυμών κάτω από αυξοτροφικές συνθήκες χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο SC (1% ηλεκτρικό οξύ, 0,6% NaOH, 0,5% (NH₄)₂SO₄, 0,17% yeast nitrogen base w/o (NH₄)₂SO₄), στο οποίο προστίθενται ξεχωριστά τα διάφορα αμινοξέα. Στον Πίνακα B.1 παρουσιάζονται οι τελικές συγκεντρώσεις των διάφορων αμινοξέων στο SC, η έντονη γραφή αφορά τα συστατικά που δεν προστίθενται για τη δημιουργία του κατάλληλου θρεπτικού επιλογής. Για τη παρασκευή SC σε στερεή μορφή χρησιμοποιείται 2% άγαρ.

Πίνακας B.1: Συγκεντρώσεις αμινοξέων (mg/lit) στο SC.

L-Valin	30
Adenine Hemisulfate	20
L-Argine.HCl	20
L-Histidine.HCl	20
L-Methionine	60
L-Tryptophan	20
Uracil	20
L-Leucine	150
L-Lycine.HCl	30
L-Isoleucine	30
L-Serine	375
L-Glutamic acid	100
L-Phenylalanine	50
L-Tyrosine	30
L-Aspartic acid	300
L-Threonine	600

B.1.3. Βλάστηση σπερμάτων και καλλιέργεια φυτών *Arabidopsis thaliana*.

Τα σπέρματα του *A. thaliana* τοποθετούνται σε erpendorf και ενυδατώνονται για περίπου 24 ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια, αφαιρείται το νερό και απολυμαίνονται με αιθανόλη (96%) για 15-20 δευτερόλεπτα, με ήπια ανάδευση. Η αιθανόλη αφαιρείται και προστίθεται διάλυμα 3% υποχλωριώδους νατρίου για 60 δευτερόλεπτα. Τα σπέρματα ξεπλένονται αρκετές φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και τοποθετούνται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS (0.441% Murashige & Skoog μείγμα αλάτων και βιταμινών, 2% σακχαρόζη, 0,05% 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 0,3% phytagel, pH 5.7). Ακολούθως τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας 22°C και φωτοπεριόδου 16 ώρες φώς/8 ώρες σκοτάδι. Μετά από περίπου 10 ημέρες τα φυτά έχουν φτάσει στο στάδιο μεταφύτευσης. Κάθε φυτό για να αναπτυχθεί τοποθετείται σε θήκη σποράς που περιέχει μαύρη τύρφη και ποτίζονται όταν είναι απαραίτητο με νερό βρύσης.

B.1.4. Βλάστηση σπερμάτων και καλλιέργεια φυτών *Lotus japonicus*.

Τα σπέρματα του *L. japonicus* τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο, προστίθενται 5 ml πυκνού θεικού οξέος και ακολουθεί επώαση για περίπου 5 λεπτά, το πυκνό θεικό οξύ αφαιρείται και τα σπέρματα ξεπλένονται καλά με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια οι σπόροι απολυμαίνονται με εμβάπτιση τους σε διάλυμα 2% υποχλωριώδους νατρίου και 0,02% Tween-20 για 20 λεπτά, το διάλυμα αφαιρείται και οι σπόροι ξεπλένονται τουλάχιστον έξι φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Τέλος, τα σπέρματα τοποθετούνται σε τρυβλία με νωπό διηθητικό χαρτί και αφήνονται για προ-φύτρωση σε σκοτεινό μέρος για 72 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά την προ-φύτρωση τα νεαρά έκφυτα μεταφέρονται προσεκτικά σε δοχεία που περιέχουν αποστειρωμένο περλίτη ή αποστειρωμένη χαλαζιακή άμμο. Για το σχηματισμό φυματίων γίνεται διαβροχή των ριζικών τριχιδίων τους με εναιώρημα των ριζοβίων *M. loti* σε θρεπτικό διάλυμα YMB (O.D.₆₀₀: 0,1). Τα φυτά μεταφέρονται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας 24°C και φωτοπεριόδου 18 ώρες φώς/6 ώρες σκοτάδι. Τα φυτά ποτίζονται με θρεπτικό διάλυμα Hoagland χωρίς την προσθήκη αζώτου για το σχηματισμό φυματίων (Πίνακας B.2). Στην περίπτωση που δεν μας ενδιαφέρει ο σχηματισμός φυματίων δεν προσθέτουμε τα CaCl₂ και KCl αλλά Ca(NO₃)₂ και KNO₃ με τελική συγκέντρωση 5 mM το καθένα.

Πίνακας B.2: Θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης φυτών Hoagland.

MgSO ₄ 7H ₂ O	2 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM
FeEDTA	0,1 mM
CaCl ₂	5 mM
KCl	5 mM
H ₃ BO ₃	2,86 mg/lit
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81 mg/lit
ZnCl ₂	0,11 mg/lit
CuCl ₂ ·H ₂ O	0,05 mg/lit
H ₂ MoO ₄	0,02 mg/lit

B. 2. Απομόνωση, ανάλυση και χειρισμοί νουκλεϊνικών οξέων.

B.2.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli*.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E. coli*, ακολουθείται κυρίως η μέθοδος του βρασμού (Holmes and Quigley, 1981). Σε 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB αναπτύσσονται *E. coli*. Από την καλλιέργεια 1,5 ml μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 6.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 150 µl διαλύματος STET (8% σακχαρόζη, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 5% Triton-X) στη συνέχεια προστίθενται 1 µl λυσοζύμη (50 mg/ml), γίνεται επώαση του δείγματος στους 100°C για 45 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και το ίζημα που σχηματίζεται απομακρύνεται με την βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 180 µl ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ξέπλυμα του ιζήματος με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση του σε 20 µl ρυθμιστικού διαλύματος TE (10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0).

Στην περίπτωση που το προς απομόνωση πλασμίδιο θα χρησιμοποιηθεί για αλληλούχιση τότε χρησιμοποιείται είτε το QIAprep Spin Miniprep Kit της εταιρείας QIAGEN είτε το NucleoSpin Plasmid της εταιρείας MACHEREY-NAGEL, σύμφωνα με τις οδηγίες του εκάστοτε κατασκευαστή.

B.2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens*.

Για την απομόνωση πλασμιδίων κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* αναπτύσσονται σε 5 ml υγρού TY. Η καλλιέργεια συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 500 µl διαλύματος I-1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% sarcosil) και προστίθενται άλλα 500 µl διαλύματος I-1. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 µl διαλύματος I (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA, 0,9 % γλυκόζη), στη συνέχεια προστίθενται 12 µl λυσοζύμης (50 mg/ml) και 400 µl διαλύματος II (0,2 N NaOH, 1% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)). Το δείγμα αναδεύεται ήπια και επωάζεται για 5 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια προστίθενται 300 µl διαλύματος 3M οξικού καλίου pH 5.5 με ήπια ανάδευση και επώαση για τουλάχιστον 30 λεπτά στους -80 °C. Το δείγμα αφήνεται να ξεπαγώσει σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο συλλέγεται (περίπου 900 µl), τοποθετείται σε νέο σωλήνα erpendorf όπου και προστίθενται 600 µl διαλύματος φαινόλη/ισοαμυλική αλκοόλη/χλωροφόρμιο (PIC) 25:1:24. Στη συνέχεια το δείγμα αναδεύεται για 30 δευτερόλεπτα με την χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδάτινη φάση (το υπερκείμενο) μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωλήνα erpendorf όπου προστίθενται 600 µl ισοπροπανόλης και γίνεται επώαση του δείγματος για τουλάχιστον 30 λεπτά στους -80 °C. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4 °C και το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως. Το ίζημα ξεπλένεται με 1 ml διαλύματος 70% αιθανόλης πραγματοποιείται φυγοκέντρηση 5 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου, το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και το

ίζημα στεγνώνει με τη βοήθεια κενού και επαναδιαλύεται σε 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

B.2.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα ζύμης χρησιμοποιούνται 5 ml υγρής καλλιέργειας. Τα κύτταρα της καλλιέργειας συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4.000 σ.α.λ. για 4 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως. Τα κύτταρα ζύμης ξεπλένονται με 1 ml αποστειρωμένου ddH₂O, και συλλέγονται με φυγοκέντρηση για μερικά δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 100 μl διαλύματος STET. Στο εναιώρημα των κυττάρων προστίθενται περίπου 200 mg γυάλινων σφαιριδίων διαμέτρου 0.5mm και ακολουθεί vortex για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται επιπλέον 100 μl διαλύματος STET και συνεχίζεται το vortex για επιπλέον 5 λεπτά. Τα δείγματα επώάζονται για 3 λεπτά στους 100°C και στη συνέχεια τοποθετούνται για 1-2 λεπτά στον πάγο. Το διάλυμα αφαιρείται και τοποθετείται σε νέο erpendorf. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. στους 4°C και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf. Στο υπερκείμενο προστίθενται 50 μl διαλύματος 7,5 M οξικού αμμωνίου και τα δείγματα τοποθετούνται για μία ώρα στους -20°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. στους 4°C και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθενται 100 μl ισοπροπανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. στους 4°C και το υπερκείμενο αφαιρείται. Το ίζημα ξεπλένεται με 150 μl διαλύματος 70% αιθανόλης, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. στους 4°C, το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και το ίζημα στεγνώνει με τη βοήθεια κενού και επαναδιαλύεται σε 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

B.2.4. Απομόνωση γενωματικού DNA από φυτικούς ιστούς.

Για την απομόνωση γενωματικού DNA από το *L. jaronicus* ένα φύλλο συλλέγεται και τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf, όπου και προστίθενται 300 μl διαλύματος CEP (2% hexadecyl trimethyl-ammonium bromide (CTAB), 0,2mg/ml Poly(vinylpyrrolidone) (PVPP), 1,4 M NaCl, 0,2% β-μερκαπτοαιθανόλη, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0) προθερμασμένου στους 65 °C, το φύλλο συνθλίβεται με τη βοήθεια πλαστικού εμβόλου, ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και επώαση του δείγματος στους 65°C για 40 έως 50 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 300 μl χλωροφορμίου, ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο συλλέγεται, τοποθετείται σε 500 μl παγωμένης ισοπροπανόλης, επώάζεται στους -80°C για 30 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 150 μl TE που περιέχει 0,1 mg/ml RNase A. Το δείγμα επώάζεται για 40 λεπτά στους 37°C, προστίθενται 150 μl διαλύματος TES (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 0,8% SDS) και ύστερα από μηχανική ανάδευση το δείγμα επώάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθεί προσθήκη 150 μl οξικού αμμωνίου 7.5 M και μηχανική ανάδευση στη συνέχεια το δείγμα επώάζεται για 10 λεπτά στους -20°C και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και τοποθετείται σε 750 μl παγωμένης αιθανόλης και επώζεται για τουλάχιστον 20 λεπτά στους -20°C, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. στους 4°C, το υπερκείμενο απομακρύνεται ενώ το ίζημα

αφήνεται να στεγνώσει καλά και μετά επαναδιαλύεται σε 30 μl ddH₂O και φυλάσσεται στους -20°C.

B.2.5. Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.

Περίπου 0,2 gr φυτικού ιστού κορνιοτοποιούνται σε γουδί λειοτριβήσεως παρουσία υγρού αζώτου. Το δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 300 μl διαλύματος εκχύλισης RNA REB (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Lauryl sarcosine) και 300 μl μείγματος PIC αναμιγνύονται με vortex για 30 δευτερόλεπτα και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με 300 μl μείγματος PIC. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου και η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf από την οποία τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη 1/10 του όγκου 3 M οξικού νατρίου pH 5,2 και ενός όγκου ισοπροπανόλης και παραλαμβάνονται με φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. στους 4°C. Το ίζημα των νουκλεϊνικών οξέων επαναδιαλύεται σε 1125 μl διαλύματος 10T/10E και το RNA κατακρημνίζεται εκλεκτικά με την προσθήκη 375 μl διαλύματος 8 M LiCl και επώαση στους 4°C για τουλάχιστον 12 ώρες. Το ολικό RNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. στους 4°C. Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζονται φωτομετρικά ενώ η ακεραιότητα του RNA διαπιστώνεται με ανάλυση του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης.

B.2.6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμά τους γίνεται με τη χρήση του σπεκτροφωτομέτρου NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA). Για την ποσοτικοποίηση δείγματος νουκλεϊνικών οξέων απαιτείται μόλις 1 μl από το δείγμα που τοποθετείται στη συσκευή και πραγματοποιείται η μέτρηση. Η καθαρότητα ενός δείγματος νουκλεϊνικών οξέων υπολογίζεται από τους λόγους O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ και O.D.₂₄₀/O.D.₂₆₀, όταν οι τιμές των λόγων είναι μεταξύ 1,8 και 2,2 τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

B.2.7. Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης.

Ο διαχωρισμός τμημάτων DNA με βάση το μέγεθος και την διαμόρφωσή τους γίνεται με ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή αγαρόζης. Τα γραμμικά μόρια DNA διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος τους και το εύρος διαχωρισμού τους, που μπορεί να κυμαίνεται από 0,1 έως 100 kb, εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη. Στον Πίνακα B.3 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αγαρόζης ανάλογα, με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού γραμμικών τμημάτων DNA.

Πίνακας B.3: Συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού

Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού τμημάτων DNA (kB)
0,5	1 - 30
0,7	0,8 - 12
1,0	0,5 - 10
1,2	0,4 - 7
1,5	0,2 - 3
2,0	0,1 - 2

Για την προετοιμασία της πηκτής, κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM οξικό οξύ, 1 mM EDTA) και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει. Στην λιωμένη αγαρόζη και αφότου η θερμοκρασία της φτάσει 50^o C προστίθεται 0,001% v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου. Η πηκτή τοποθετείται σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, εφαρμόζεται η κατάλληλη «χτένα» ώστε να σχηματισθούν στην πηκτή τα βοθρία φόρτωσης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή, απομακρύνεται η χτένα και το δοχείο ηλεκτροφόρησης συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE. Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να αναλυθούν, προστίθεται 1/10 του όγκου του διαλύματος, διάλυμα φόρτωσης (0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη). Τα δείγματα τοποθετούνται στα βοθρία φόρτωσης και αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 Vcm⁻¹.

B.2.8. Απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.

Η απομόνωση των τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης έγινε σύμφωνα με QIAquick® Gel Extraction Kit της QIAGEN ή το NucleoSpin® Extract II της εταιρείας MACHEREY-NAGEL σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

B.2.9. Πέψη DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού.

Οι πέψεις των δειγμάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού πραγματοποιούνται σε τελικό όγκο που κυμαίνεται από 20 μl μέχρι και 100 μl, ανάλογα με την ποσότητα και καθαρότητα του DNA που υποβάλλεται σε πέψη. Σε σωλήνα erppendorf τοποθετείται το δείγμα του DNA, η ενδονουκλεάση περιορισμού, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για την δράση του ενζύμου, ddH₂O μέχρι τον επιθυμητό τελικό όγκο. Συνήθως, χρησιμοποιείται μια μονάδα ενζύμου (1 unit) για κάθε μικρογραμμάριο δείγματος DNA. Μια τυπική αντίδραση πέψης με τελικό όγκο 30 μl περιγράφεται στον Πίνακα B.4.

Πίνακας B.4: Τυπική αντίδραση πέψης.

Δείγμα DNA	1-5 μl
Ένζυμο περιορισμού	1 μl
10X ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	3 μl
ddH ₂ O	26-21μl
Τελικός όγκος	30 μl

Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επώαζεται για 3-4 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία. Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

B.2.10. Ενοποίηση άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης.

Η ενοποίηση τμημάτων DNA με συμβατά ή κολλώδη άκρα γίνεται με χρήση της T4 DNA λιγάσης και πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μl. Για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας δημιουργίας ανασυνδυσμένων πλασμιδίων, η αναλογία μορίων πλασμιδικού φορέα και ένθετου DNA ρυθμίζεται στο 1/3. Μια τυπική αντίδραση λιγοποίησης περιγράφεται στον Πίνακα B.5.

Πίνακας Β.5: Τυπική αντίδραση ενοποίησης τμημάτων DNA.

Ένθετο DNA	1 μl
Πλασμιδιακός φορέας	1 μl
10X ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	3 μl
T4 DNA λιγάση (1 unit/μl)	1 μl
ddH ₂ O	6 μl
Τελικός όγκος	10 μl

Το δείγμα επωάζεται στους 4°C για 14-16 ώρες ή εναλλακτικά στους 25°C για 3 ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απενεργοποίηση της λιγάσης με θέρμανση του δείγματος στους 60°C για 10 λεπτά και το μείγμα χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό βακτηρίων για τον πολλαπλασιασμό και έλεγχο των ενοποιημένων πλασμιδίων.

B.2.11. Αποφωσφορυλίωση τμημάτων DNA.

Σε κάποιες περιπτώσεις κλωνοποίησης τμημάτων DNA σε έναν φορέα πριν την ενοποίηση των τμημάτων DNA είναι απαραίτητη η αποφωσφορυλίωση των άκρων του φορέα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση αλκαλικής φωσφατάσης (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIAP) που υδρολύει την 5' φωσφορική ομάδα από μόρια νουκλεοτιδίων. Με αυτόν τον τρόπο η T4 DNA λιγάση, που η δράση της απαιτεί την παρουσία της 5' φωσφορικής ομάδας, ενοποιεί μόνο τα τμήματα του φορέα που περιλαμβάνουν το ένθετο. Μια τυπική αντίδραση αποφωσφορυλίωσης σε τελικό όγκο 50 μl περιγράφεται στον Πίνακα Β.6.

Πίνακας Β.6: Τυπική αντίδραση αποφωσφορυλίωσης τμημάτων DNA.

Δείγμα DNA (1 μg/μl)	1 μl
CIAP	1 μl
10X ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	3 μl
ddH ₂ O	26-21μl
Τελικός όγκος	50 μl

Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 3-4 ώρες στους 37°C. Μετά το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιείται απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση του μείγματος στους 65°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται εκχύλιση και καθαρισμός του DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο.

B.2.12. Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA.

Κατά την απομόνωση ολικού RNA, παρόλο που πραγματοποιείται ένα βήμα εκλεκτικής κατακρήμνισης του με LiCl, ενδέχεται να περιέχει και γονιδιωματικό DNA για το λόγο αυτό είναι απαραίτητος ο χειρισμός του με DNάση για την καταστροφή του DNA. Μια τυπική αντίδραση DNάσης περιγράφεται στον Πίνακα Β.7.

Πίνακας Β.7: Τυπική αντίδραση απομάκρυνσης DNA.

Δείγμα RNA	2 μg
DNase I (1 unit/μl)	2 μl
RNase Out (40 units/μl)	1 μl
10X ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	5 μl
ddH ₂ O	26-21μl
Τελικός όγκος	50 μl

Η DNase I είναι απαλλαγμένη από πιθανή δράση RNάσης, ενώ η παρουσία RNase Out (παρεμποδιστή δράσης RNασών) είναι απαραίτητη για την διαφύλαξη της ακεραιότητας του RNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Τα δείγματα επωάζονται για περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά στους 37°C. Ακολουθεί αύξηση του όγκου της αντίδρασης στα 150 μl με προσθήκη 100 μl ddH₂O. Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/χλωροφόρμιο 1:1, το μείγμα αναδεύεται καλά και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωλήνα erpendorf και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφόρμιου, το μείγμα αναδεύεται καλά και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου στη συνέχεια το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωλήνα erpendorf. Τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη 1/10 όγκου 3 M οξικού νατρίου pH 5,2 και 2,5X όγκων αιθανόλης και αφήνονται στους -20°C για περίπου 16 ώρες. Τα δείγματα μεταφέρονται για 30 λεπτά στους -80°C και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 30 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα ξεπλένεται με 75% v/v αιθανόλη, αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο ddH₂O.

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης πραγματοποιείται αντίδραση PCR στο καθαρό πλέον RNA και η μη παρουσία ενισχυμένου προϊόντος επιβεβαιώνει την επιτυχία της απομάκρυνσης DNA.

B.3. Μετασηματισμός βακτηρίων.

B.3.1. Δημιουργία κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασηματισμό (Competent cells).

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφεται από τους (Cohen *et al.*, 1972). Σε 10 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό για το κάθε στέλεχος βακτηρίων εμβολιάζονται με μια αποικία *E. coli* και επωάζονται για περίπου 18 ώρες στους 37°C, με συνεχή ανακίνηση. 2 ml της προ-καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C, με συνεχή ανακίνηση έως ότου O.D.₆₀₀: 0,2-0,3. Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται με 50 ml παγωμένου διαλύματος 0,1 M MgCl₂. Η επαναδιάλυση να γίνεται πάντα με ανακίνηση μέσα σε πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα που σχηματίζεται επαναδιαλύεται σε 25 ml παγωμένου διαλύματος 0,1 M CaCl₂ και αφήνεται στον πάγο για 20 λεπτά. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C και επαναδιαλύονται σε 10 ml παγωμένου διαλύματος 0,1 M CaCl₂. Τέλος, προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% v/v και γίνεται απαλή ανάμειξη. Τα ικανά κύτταρα αποθηκεύονται σε έτοιμα προς χρήση κλάσματα, των 100μl, σε erpendorf και διατηρούνται στους -80°C.

B.3.2. Δημιουργία κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασηματισμό υψηλής απόδοσης (High efficiency Competent Cells).

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφεται από τους (Inoue *et al.*, 1990). Σε κωνική φιάλη των 100 ml τοποθετούνται 5 ml θρεπτικού διαλύματος SOB (2% Bacto tryptone, 0,5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM

KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) και εμβολιάζονται με μια αποικία *E. coli* ακολουθεί επώαση για περίπου 18 ώρες στους 37°C με συνεχή ανακίνηση. Από την προκαλλιέργεια 0,5 ml της παραπάνω χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 100 ml θρεπτικού διαλύματος SOB που βρίσκονται σε κωνική φιάλη των 1000 ml. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 18°C, με συνεχή ανακίνηση έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι O.D.₆₀₀: 0,6 όπου και τοποθετείται για τουλάχιστον 10 λεπτά στον πάγο. Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C και το ίζημα επαναδιαλύεται με 34 ml παγωμένου διαλύματος TB (10 mM HEPES pH 6.7, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl) και αφήνεται στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται με 8 ml παγωμένου διαλύματος TB. Τέλος, προστίθεται DMSO σε τελική συγκέντρωση 7% v/v, γίνεται απαλή ανάμειξη και τα κύτταρα αφήνονται στον πάγο για 10 λεπτά. Τα δεκτικά κύτταρα αποθηκεύονται σε έτοιμα προς χρήση κλάσματα των 100 μl σε erpendrof, παγώνονται άμεσα με υγρό άζωτο και διατηρούνται στους -80°C.

B.3.3. Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli*.

Σε πάγο τοποθετούνται από τους -80°C 100 μl δεκτικά κύτταρα *E. coli* και προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακό DNA σε όγκο που δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των κυττάρων που χρησιμοποιούνται. Το μείγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων στους 42°C για 1-2 λεπτά. Τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο και προστίθενται 200 μl θρεπτικού διαλύματος LB και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 1 ώρα. Τα κύτταρα απλώνονται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για περίπου 18 ώρες.

B.3.4. Δημιουργία κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* ικανών για μετασηματισμό

Μονή αποικία κυττάρων *A. tumefaciens* AGL1 χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 10 ml θρεπτικού μέσου TY παρουσία των αντιβιοτικών ριφαμπικίνη (Rifampicin 10 μg/ml) και καρβενικιλίνη (Carbenicillin 50 μg/ml) αναπτύσσονται για τουλάχιστον 16 ώρες. 2 ml από την καλλιέργεια χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml TY παρουσία αντιβιοτικών και αφήνονται να αναπτυχθούν έως ότου O.D.₆₀₀≈1. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C και το ίζημα επαναδιαλύεται με ίσο όγκο παγωμένου αποστειρωμένου ddH₂O. Τα κύτταρα συλλέγονται με τον ίδιο τρόπο και το ίζημα επαναδιαλύεται με 1/10 του αρχικού όγκου με παγωμένο αποστειρωμένο ddH₂O. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C και το ίζημα επαναδιαλύεται με 1/20 του αρχικού όγκου με παγωμένο αποστειρωμένο ddH₂O. Τα κύτταρα συλλέγονται και επαναδιαλύονται με 1/50 του αρχικού όγκου με παγωμένο αποστειρωμένο ddH₂O με 10% γλυκερόλη. Τα κύτταρα συλλέγονται και επαναδιαλύονται με 1/100 του αρχικού όγκου με παγωμένο αποστειρωμένο ddH₂O με 10% γλυκερόλη και χωρίζονται σε έτοιμα προς χρήση κλάσματα των 100 μl σε erpendrof, παγώνονται άμεσα με υγρό άζωτο και διατηρούνται στους -80°C.

B.3.5. Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *A. tumefaciens*.

Σε πάγο τοποθετούνται από τους -80°C 100 μl δεκτικά κύτταρα *A. tumefaciens* AGL1 για να ξεπαγώσουν. Σε καθένα κλάσμα προστίθεται 500 ng καλής καθαρότητας πλασμιδίου το μείγμα τοποθετείται στην ειδική κυβέττα ηλεκτροπόρωσης. Η κυβέττα τοποθετείται στη συσκευή και εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός με τα παρακάτω χαρακτηριστικά 1,8 kV/cm, 25 μF , 400 Ω για 10 msec. Τα κύτταρα αφαιρούνται από την κυβέττα και τοποθετούνται σε 900 μl διαλύματος SOC (2% Bacto-Trypton, 0,5% Yeast extract, 100 mM NaCl, 250 mM KCl, 200 mM Mg^{2+} , 200 mM γλυκόζη). Τα βακτήρια αφήνονται να αναπτυχθούν για 4 ώρες με ήπια ανάδευση στους 28°C . Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 4.000 σ.α.λ. για 2 με 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρούνται 700 μl από το υπερκείμενο. Το διάλυμα που παραμένει χρησιμοποιείται για την επαναδύλωση των κυττάρων και την τοποθέτησή τους σε τρυβλίο TY που περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Ο έλεγχος τις επιτυχίας του μετασηματισμού πραγματοποιείται με ανάπτυξη αποικιών που εμφανίζονται στα τρυβλία, απομόνωση πλασμιδιακού DNA και έλεγχος του πλασμιδίου με PCR. Καλλιέργεια βακτηρίων που φέρει τις επιθυμητές κατασκευές αποθηκεύεται στους -80°C παρουσία 20% γλυκερόλης.

B.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

B.4.1. Ενίσχυση ακολουθιών DNA με την χρήση της τεχνικής PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση ακολουθιών DNA. Ο πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών του DNA γίνεται με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων με τη συμμετοχή μιας DNA πολυμεράσης. Στον Πίνακα B.8 αναφέρονται τα απαραίτητα συστατικά μιας τυπικής αντίδρασης PCR.

Πίνακας B.8: Τυπική αντίδραση PCR.

Μήτρα DNA	1 μl
Πρόσθιος εκκινητής (30 μM)	1 μl
Ανάστροφος εκκινητής (30 μM)	1 μl
Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs, 10 mM το καθένα)	1 μl
10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR	5 μl
Πολυμεράση (1 unit/ μl)	1 μl
ddH ₂ O	45 μl
	Τελικός όγκος 50 μl

Η ποσότητα της μήτρας DNA που προσθέτουμε εξαρτάται από την πολυπλοκότητα του και από το μήκος του τμήματος που θέλουμε να ενισχύσουμε. Όταν πρόκειται για πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιούμε από 1 μg έως 10 ng ενώ 50 με 500 ng για γενωματικό DNA. Σε κάθε περίπτωση ο όγκος της μήτρας που χρησιμοποιούμε δεν πρέπει να ξεπερνά το 10% του τελικού όγκου της αντίδρασης.

Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών στην αντίδραση κυμαίνεται μεταξύ 0,1 και 1 μM . Εξειδικευμένοι εκκινητές σχεδιάζονται με βάση τις ανάγκες του κάθε πειράματος, μερικοί από τους παράγοντες που λαμβάνουμε υπόψη είναι το μήκος τους σε νουκλεοτίδια, το περιεχόμενό τους σε GC, η θερμοκρασία υβριδισμού, η δημιουργία φουρκετών και η μεταξύ τους συμπληρωματικότητα.

Η επιλογή της θερμοανθεκτικής DNA πολυμερασής (Taq ή Pfu) εξαρτάται από παράγοντες όπως η ικανότητα διόρθωσης λαθών, η προθήκη τελικής μη συμπληρωματικής αδενίνης ή όχι, η ταχύτητα επιμήκυνσης ή απλά από την ικανότητά της να ενισχύσει ένα τμήμα DNA ή όχι. Το ρυθμιστικό διάλυμα PCR εξαρτάται από την επιλογή της DNA πολυμερασής και κατά περίπτωση μπορεί να ρυθμιστεί η συγκέντρωση ιόντων Mg^{+2} που περιέχει καθώς και η προσθήκη ή όχι διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO).

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός θερμοκυκλοποιητή, οι διάφορες φάσεις της αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα Β.9.

Πίνακας Β.9: Τυπικό πρόγραμμα αντίδρασης PCR

Αρχική αποδιάταξη	94 °C	3 λεπτά	
Αποδιάταξη	94 °C	1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών	57 °C	1 λεπτό	30 – 40 κύκλοι
Επιμήκυνση	72 °C	1 – 3 λεπτά	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 λεπτά	

Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται από την αλληλουχία τους και από τη συγκέντρωση ιόντων στο διάλυμα της αντίδρασης ενώ ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το είδος της πολυμεράσης (Taq ή Pfu) και από το μήκος της περιοχής DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε.

Μετά το πέρας της αντίδρασης τα δείγματα αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης. Όταν είναι απαραίτητο ακολουθεί καθαρισμός των δειγμάτων με QIAquick PCR Purification kit της QIAGEN είτε με το NucleoSpin® Extract II της εταιρείας MACHEREY-NAGEL σύμφωνα με τις οδηγίες του εκάστοτε κατασκευαστή.

Τα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή παρουσιάζονται στον Πίνακα Β.10.

Πίνακας Β.10: Αλληλουχίες εκκινητών.

LjU39Ex2-F	AGAGCTCGTCGTCGTCCTCCAGCGGTGAG
LjU39Ex2-R	AAACTGCAGTTATTTGGTTCTCTTAATAAT
LjU40Ex2-F	AAAGGATCCGAAAAGATAAGACAAAGGAG
LjU40Ex2-R	AAAGAGCTCTCAGTTCTTTCTTCCTTCAGA
LjU41Ex-F	AAAGGATCCTCAGCTTCATATAGCACTGGG
LjU41Ex2-R	AAAGTCGACTCAGTACTGGGGACTGATGG
attB1-pBS/KS-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATACGACTCACTATAGGGCG
attB2-pBS/KS-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCAATTAACCCCTACTAAAGG
AVU39GFP F	CATTCC ATG GCT TCG TCG TCT TCC
AVU39GFP R	GCT GCC CAT GGC TTT GGT TCT CTT AAT
AVGFPU39 F	AAA AAG ATC TAT CAT GTC GTC GTC GTC T
AVGFPU39 R	GTT AGA TCT TTT GGT TCT CTT AAT
AVU40GFP F	CAT TCC ATG GGA AAA GAT AAG
AVU40GFP R	GCT GCC ATG GCG TTC TTT CTT CCT TC
AVGFPU40 F	CGC GGA TCC ATG GGA AAA GAT AAG
AVGFPU40 R	CGC GGA TCC GTT CTT TCT TCC TTC
AVU41GFP F	AAA TCA TGA TCT TGA GAA TTT CTT AT
AVU41GFP R	TTT TCA TGA CGT ACT TGG GGA CTG A
U39pOL-R	AAA AAG TCG ACC TTT GGT TCT CTT AAT AAT GTG

U40pOL-R	AAA AAG TCG ACC GTT CTT TCT TCC TTC AGA TAA GAT
AVU41nlp F	AAATCATGAGCGCTTCATATAGCACT
U41pOL-R	AAA AAG TCG ACC GTA CTT GGG GAC TGA TGG ATC
Hyg F	GACCAATGCGGAGCATATACG
HygR	CAGCTTCGATGTAGGAGGGC
CaMV35Sf	CCA CGT CTT CAA AGC AAG TG
RNAi-intronFnew	CAT AGG GGT TTA GAT GCA AC
RNAi-intronRnew	AGT CTC ATA CCA ACA AGT GC
OCS-termR.new	CTC AAC ACA TGA GCG AAA CC

B.4.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).

Η PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) χρησιμοποιείται για την παραγωγή συμπληρωματικού DNA (cDNA) από RNA. Εδώ χρησιμοποιείται μια RNA εξαρτώμενη πολυμεράση, η αντίστροφη μεταγραφάση που χρησιμοποιεί ως μήτρα RNA. Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA, που απομονώθηκε από διάφορους ιστούς του *L. japonicus*. Ως εκκινητής χρησιμοποιήθηκαν 12 – 18μερή ολιγο (dT). Στον Πίνακα B.11 περιγράφεται μια τυπική αντίδραση RT-PCR.

Πίνακας B.11: Τυπική αντίδραση RT PCR.

Μήτρα RNA (10 ng–5 μg)	Έως 10 μl
Εκκινητής ολιγο (dT) _{12–18μερή} (500 ng)	1 μl
Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs, 10 mM το καθένα)	1 μl
5X ρυθμιστικό διάλυμα πρώτης αλυσίδας	4 μl
RNaseOUT (40 units/μl)	1 μl
0.1 M DTT	2 μl
Αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II (200 units/μl)	1 μl
ddH ₂ O	0-9 μl
	Τελικός όγκος 20 μl

Αναλυτικά, 0,5 μg ολικού RNA αναμιγνύονται στον πάγο με 500 ng oligo(dT)_{12-18μερή} και 1 μl 10 mM dNTPs σε τελικό όγκο 12 μl, στη συνέχεια με θερμαίνονται τους στους 65°C για 5 λεπτά. Μετά την επώαση προστίθενται 4 μl 5X ρυθμιστικό διάλυμα πρώτης αλυσίδας, 1 μl (40 units) RNaseOUT (Invitrogen) και 2 μl 0.1 M DTT το μείγμα αυτό θερμένεται στους 42°C για 2 λεπτά πριν την προσθήκη 1 μl (200 units) SuperScript II αντίστροφης μεταγραφάσης (Invitrogen). Τέλος, η αντίδραση επωάζεται στους 42°C για 50 λεπτά και ακολουθεί ένα βήμα απενεργοποίησης του ενζύμου με θέρμανση στους 70°C για 15 λεπτά.

B.4.3. Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (qPCR).

Η αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) βασίζεται στην κλασική αντίδραση PCR με τη διαφορά ότι μπορούμε να ανιχνεύσουμε σε πραγματικό χρόνο την παραγωγή των τμημάτων DNA που ενισχύονται. Για την ανίχνευση των παραγόμενων προϊόντων μπορούν να χρησιμοποιηθούν τεχνικές που χρησιμοποιούν ιχνηθέτες υβριδισμού–υδρόλυσης (TaqMan probes), ιχνηθέτες υβριδισμού (Beacons, Scorpions) καθώς και χρωστικές που προσδένονται σε δίκλιωνα μόρια DNA (SYBR Green, Eva Green). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η iTaq Fast SYBR GreenI Supermix με ROX (BioRad),

η ROX χρησιμοποιείται ως χρωστική αναφοράς για την εξομάλυνση μικροδιαφορών μεταξύ των διαφορετικών αντιδράσεων. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων qPCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής Mx3005P (Stratagene). Στον Πίνακα Β.12 παρουσιάζονται τα συστατικά μιας τυπικής αντίδρασης qPCR.

Πίνακας Β.12: Τυπική αντίδραση qPCR

cDNA	1 μl
Πρόσθιος εκκινητής (1 μM)	2 μl
Ανάστροφος εκκινητής (1 μM)	2 μl
2X μητρικού διαλύματος qPCR	5 μl
	Τελικός όγκος 10 μl

Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών προσαρμόστηκε στα 0,2 μM ο καθένας και ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε 1 μl cDNA κατάλληλης αραιώσης. Η αντίδραση ξεκινά με αρχική ενεργοποίηση της πολυμεράσης στους 95°C για 10 λεπτά, ακολουθούν 40 κύκλοι με το στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα και ένα στάδιο υβριδισμού και επιμήκυνσης στο 60°C για 1 λεπτό. Στο τέλος κάθε κύκλου η λαμβάνονται οι τιμές απορρόφησης για τις χρωστικές SYBR Green και ROX. Όταν ολοκληρωθούν οι 40 κύκλοι τα ενισχυμένα τμήματα αποδιάσσονται σταδιακά με αύξηση της θερμοκρασίας κάθε 30 δευτερόλεπτα κατά 0,5°C από τους 60°C έως τους 95°C και λαμβάνεται η καμπύλη τήξης του καθενός με σκοπό τον έλεγχο της εξειδίκευσης των εκκινητών, όταν ενισχύεται ένα μόνο προϊόν η καμπύλη έχει μια κορυφή. Επιπλέον τα δείγματα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 4 % (w/v) για την επιβεβαίωση της παρουσίας μοναδικού προϊόντος και κατά συνέπεια της καταλληλότητας των εκκινητών.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις qPCR αναφέρονται στον Πίνακα Β.13. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τη χρήση εξειδικευμένου λογισμικού (Primer Express, Applied Biosystems). Στα γονίδια Par1, Par2 και Par3 ο πρόσθιος εκκινητής έχει σχεδιαστεί εντός εξονίου ενώ ο ανάστροφος στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3'-UTR).

Πίνακας Β.13: Αλληλουχίες εκκινητών στις αντιδράσεις qPCR.

iPar1b-441F	GATACTGACAGTGGCGTCCACATT
iPar1b -599R	GGCTCTGCCATGTCTAAATCATCA
iPar2-392F	CAACGCATGGCTACCATATCA
iPar2-479R	GCTTTAGTGCCGTTGAGACTCA
iPar3-859F	TGCTGTCCAGGTTGATCCATC
iPar3-978R	TGGTCATCCACAAAATCTGGC
LjUBQF	TTCACCTTGCTCCGCTCTTC
LjUBQR	ACCACCAGCACACACAGACAATCC

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της ουβικιτίνης χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς για τον υπολογισμό των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν.

Η αποδοτικότητα Ε της αντίδρασης PCR, για κάθε γονίδιο υπολογίστηκε από την γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της απορρόφησης ανά κύκλο αντίδρασης, χρησιμοποιώντας το λογισμικό LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009).

Σε αυτή τη μελέτη η τεχνική της qPCR χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό επιπέδων των γονιδίων Par1, Par2 και Par3 σε μετασχηματισμένα φυτά. Το σχετικό επίπεδο

έκφρασης του γονιδίου στόχου (PAR) στα μετασηματισμένα φυτά (TP) κανονικοποιημένο ως προς το γονίδιο αναφοράς (UBQ) σε σύγκριση με το σχετικό επίπεδο έκφρασης του ίδιου γονιδίου στα φυτά αγρίου τύπου υπολογίστηκε με τον τύπο $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ όπου $\Delta\Delta Ct = [(Ct^{PAR TP} - Ct^{UBQ TP}) - (Ct^{PAR WT} - Ct^{UBQ WT})]$. Η τιμή Ct αφορά στον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται η απορρόφηση να φτάσει ένα επίπεδο φθορισμού και η αντίδραση εισέρχεται στην εκθετική της φάση. Όλες οι αντιδράσεις qPCR πραγματοποιήθηκαν με τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

B.5. *In situ* υβριδισμός.

Για να μελετηθεί η χωροταξική και χρονική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων *LjPar2* και *LjPar3*, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του *in situ* RNA-RNA υβριδισμού σε λεπτές τομές φυτικών ιστών. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση των τεχνικών που έχουν δημοσιευτεί μέχρι σήμερα (Flemetakis *et al.*, 2000; Kouchi and Hata 1993; Vandewiel *et al.*, 1990).

B.5.1. Προετοιμασία λεπτών φυτικών τομών.

B.5.1.1. Μονιμοποίηση ιστών.

Τα φυτικά όργανα (φυμάτια στην παρούσα εργασία) που βρίσκονται στο κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο (14, 21 και 28 ημερών) συλλέγονται προσεκτικά και τοποθετούνται σε διάλυμα μονιμοποίησης (10 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6,8, 100 mM NaCl, 4% παραφολμαδεΰδη, 1% γλουταραλδεΰδη) σε γυάλινα φιαλίδια. Οι ιστοί παραμένουν στο διάλυμα μονιμοποίησης για 1 ώρα σε κενό αέρος για την απομάκρυνση του αέρα που βρίσκεται παγιδευμένος στον ιστό. Το διάλυμα μονιμοποίησης αντικαθίσταται με νέο όπου και οι ιστοί παραμένουν για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για 12 ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια οι ιστοί ξεπλένονται με εμβάπτισή τους για 20 λεπτά σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα μονιμοποίησης (10 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6,8, 100 mM NaCl). Οι ιστοί αφυδατώνονται με σειρά υδατικών διαλυμάτων αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης (10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%) για 20 λεπτά στο κάθε διάλυμα. Όταν οι ιστοί βρίσκονται στο διάλυμα αφυδάτωσης 50% αιθανόλη γίνεται η χρώση τους με την προσθήκη 5% (w/v) σαφρανίνης και στο οποίο οι ιστοί πρέπει να παραμείνουν για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τέλος της διαδικασίας οι ιστοί εμβαπτίζονται σε 100% αιθανόλη με τρεις αλλαγές ανά μία ώρα.

B.5.1.2. Διαφανοποίηση ιστών.

Η 100% αιθανόλη αντικαθίσταται με διάλυμα 25% ξυλενίου (v/v σε αιθανόλη) όπου οι ιστοί παραμένουν για 1 ώρα. Ακολουθούν αλλαγές του διαλύματος με 50%, 75% και 100% ξυλένιο ανά 1 ώρα. Η εμβάπτιση σε 100% ξυλένιο για μία ώρα επαναλαμβάνεται 3 φορές.

B.5.1.3. Εγκλεισμός ιστών σε παραφίνη.

Στα φιαλίδια που περιέχουν τους φυτικούς ιστούς εντός 100% ξυλενίου, προστίθενται σταδιακά κομμάτια παραφίνης σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τον κορεσμό του ξυλενίου, η διαδικασία συνεχίζεται στους 42°C, μέχρι να επέλθει εκ νέου κορεσμός του ξυλενίου με παραφίνη. Το μείγμα ξυλενίου-παραφίνης απομακρύνεται γρήγορα και αντικαθίσταται με λιωμένη και φιλτραρισμένη παραφίνη στους 60°C. Οι ιστοί

τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 60°C, όπου η παραφίνη αντικαθίσταται με νέα δύο φορές την ημέρα. Σε κάθε περίπτωση, η θερμοκρασία του θαλάμου δε θα πρέπει να υπερβεί τους 62°C, για να μην αλλιωθεί η δομή της παραφίνης. Η διάρκεια αυτής της διαδικασίας εξαρτάται από το είδος και το μέγεθος του φυτικού τμήματος. Στην περίπτωση των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, 7 ημέρες ήταν αρκετές. Μετά το πέρας της παραπάνω διαδικασίας, η παραφίνη με τους ιστούς μεταφέρεται σε προθερμασμένα ειδικά μεταλλικά εκμαγεία, τα οποία περιέχουν λιωμένη παραφίνη στους 60°C. Οι ιστοί προσανατολίζονται, κατά το δυνατό, εντός της παραφίνης με τη βοήθεια προθερμασμένης βελόνας και τα εκμαγεία μεταφέρονται προσεκτικά σε κρύα επιφάνεια, όπου αφήνονται μέχρι να στερεοποιηθεί η παραφίνη. Οι εγκλεισμένοι ιστοί μπορούν να φυλαχτούν στους 4°C για μεγάλο χρονικό διάστημα, μέχρι τη λήψη των τομών.

B.5.1.4. Καθαρισμός και προετοιμασία των αντικειμενοφόρων.

Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται σε γυάλινα δοχεία χρώσεως και πλένονται σχολαστικά με απορρυπαντικό για τουλάχιστον 4 ώρες. Ακολούθως, ξεπλένονται καλά με άφθονο νερό για 2 ώρες και εμβαπτίζονται σε 10% v/v διάλυμα HCl. Το υδροχλωρικό οξύ ξεπλένεται καλά με απιονισμένο νερό και οι αντικειμενοφόροι αποστειρώνονται. Πριν στεγνώσουν από την αποστείρωση, οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται σε διάλυμα πόλυ-L-λυσίνης (100 µg/ml σε 10 mM Tris-HCl pH 8,0) για τουλάχιστον 10 λεπτά. Η περίσσεια του διαλύματος απομακρύνεται και οι αντικειμενοφόροι αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Οι αντικειμενοφόροι φυλάσσονται στους -20°C μέχρι τη χρήση τους, μέσα σε καλά κλεισμένα κουτιά, ώστε να αποφευχθεί η είσοδος υγρασίας.

B.5.1.5. Τομές ιστών.

Οι λεπτές τομές των ιστών (7 µm) λαμβάνονται με τη βοήθεια μικροτόμου (LEICA Jung RM2025) με αναλώσιμο μεταλλικό μαχαίρι. Οι κατάλληλες τομές επιλέγονται στο στερεοσκόπιο και μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους στους 42°C. Πάνω στις αντικειμενοφόρους έχει τοποθετηθεί μία σταγόνα αποστειρωμένου νερού για το καλύτερο τέντωμα της τομής. Η περίσσεια του νερού απομακρύνεται και οι τομές αφήνονται στους 42°C για τουλάχιστον 12 ώρες.

B.5.1.6. Απομάκρυνση της παραφίνης από τις τομές.

Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές εμβαπτίζονται σε 100% ξυλένιο για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με τακτική ανακίνηση. Το ξυλένιο αντικαθίσταται με διάλυμα ξυλενίου/αιθανόλης 1:1 για 15 λεπτά. Τέλος, οι αντικειμενοφόροι μεταφέρονται σε 100% αιθανόλη για 15 λεπτά. Αφού στεγνώσουν καλά, σε θερμοκρασία δωματίου, οι τομές φυλάσσονται στους -20°C σε καλά κλεισμένα κουτιά, ώστε να αποφευχθεί η είσοδος υγρασίας.

B.5.2. Προετοιμασία του μη ραδιενεργά σημασμένου RNA ανιχνευτή.

B.5.2.1. Πέψη του πλασμιδιακού φορέα για την in vitro μεταγραφή του ένθετου DNA.

Ο πλασμιδιακός φορέας που φέρει το ένθετο DNA, υπόκειται σε πέψη με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού με σκοπό την παραγωγή γραμμικού DNA. Στην περίπτωση μεταγραφής πληροφοριακού (sense) RNA το ένζυμο περιορισμού επιλέγεται έτσι ώστε να

κόβει το πλασμίδιο στο 3'-άκρο του ένθετου DNA. Αντίστοιχα, για την παραγωγή αντιπληροφοριακού (anti-sense) RNA, το ένζυμο περιορισμού επιλέγεται έτσι ώστε να κόβει το πλασμίδιο στο 5'-άκρο του ένθετου DNA. Μετά το τέλος της πέψης το πλασμίδιο καθαρίζεται με εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο. Το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 0,1 όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και 2 όγκων καθαρής αιθανόλης. Το δείγμα επωάζεται στους -20°C για τουλάχιστον 2 ώρες. Ακολουθεί συλλογή του DNA με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C. Το γραμμικό πλασμίδιο ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου νερού.

B.5.2.2. *In vitro* μεταγραφή σημασμένου RNA.

Σε κάθε πείραμα *in situ* υβριδισμού προετοιμάζεται πληροφοριακό και αντιπληροφοριακό σημασμένο RNA. Το πρώτο χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση υβριδισμού ώστε να εντοπιστεί τυχόν μη εξειδικευμένο σήμα υποβάθρου. Η μεταγραφή των δύο τύπων RNA καθορίζεται από την πέψη του πλασμιδίου και από την επιλογή της RNA πολυμεράσης. Η σήμανση γίνεται με την χρήση DIG-11-dUTP σημασμένων νουκλεοτιδίων. Μια τυπική αντίδραση *in vitro* μεταγραφής περιγράφεται στον Πίνακα B.14.

Πίνακας B.14: *In vitro* μεταγραφή σημασμένου RNA

Γραμμικό πλασμιδιακό DNA(1-2 µg)	11 µl
10X σημασμένα dNTPs	2 µl
5X ρυθμιστικό διάλυμα RNA πολυμεράσης	4 µl
RNase Out (40 units/µl) (Invitrogen)	1 µl
SP6 ή T3 RNA πολυμεράση (20 units/µl)	2 µl
Τελικός όγκος	20 µl

Το μείγμα επωάζεται στους 37°C για δύο ώρες. Για την απομάκρυνση του πλασμιδιακού DNA προστίθεται 1 µl DNase (2 units/µl) και η επώαση στους 37°C συνεχίζεται για 10 λεπτά. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 2 µl διαλύματος 0,2 M EDTA pH 8,0 και το σημασμένο RNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 2,5 µl 4 M LiCl και 75 µl αιθανόλης. Ακολουθεί επώαση στους -20°C για τουλάχιστον 2 ώρες και το RNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά, στους 4°C. Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 100 µl dH₂O. Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίζεται φωτομετρικά ενώ η ποιότητα του ελέγχεται με ανάλυση δείγματος σε πηκτική αгарόζη.

B.5.2.3. Υδρόλυση του σημασμένου RNA ανιχνευτή.

Η υδρόλυση μέρους του ανιχνευτή που θα χρησιμοποιηθεί (περίπου το 80% της συνολικής ποσότητας ανιχνευτή) γίνεται για την καλύτερη διείσδυση του ανιχνευτή μέσα στην τομή του ιστού. Το ιδανικό μέγεθος του ανιχνευτή είναι περίπου 150 βάσεις. Στην κατάλληλη ποσότητα ανιχνευτή προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 0,2 M Na₂CO₃/NaHCO₃. Το μείγμα επωάζεται στους 60°C για χρονικό διάστημα που εξαρτάται από το αρχικό μέγεθος του ανιχνευτή και δίνεται από τον τύπο: $t = (L_{\alpha\rho\chi} - L_{\tau\epsilon\lambda}) / (K * L_{\alpha\rho\chi} * L_{\tau\epsilon\lambda})$, όπου t η διάρκεια της υδρόλυσης σε λεπτά, L_{αρχ} το αρχικό μέγεθος του ανιχνευτή σε kb, L_{τελ}=0.15 kb και K σταθερά που ισούται με 0,11 kb/λεπτό. Η υδρόλυση σταματά με την προσθήκη 2 µl 5% οξικού οξέος. Ο υδρολυμένος ανιχνευτής κατακρημνίζεται με την προσθήκη 2,5 µl 3 M

οξεικού νατρίου pH 5,2, διπλάσιου όγκου αιθανόλης και 1 μl γλυκογόνου (1 μg/μl), το οποίο δρα ως φορέας καθίζησης. Το δείγμα επωάζεται στους -20°C για τουλάχιστον 12 ώρες και ο ανιχνευτής συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά, στους 4°C. Το ίζημα ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου νερού.

B.5.3. Διαδικασία *in situ* RNA-RNA υβριδισμού.

B.5.3.1. Διαδικασία προετοιμασίας των τομών για τον υβριδισμό.

Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον μία ώρα, χωρίς να ανοιχθούν, για να ξεπαγώσουν. Ακολούθως, οι τομές ενυδατώνονται με εμβάπτισή τους σε υδατικά διαλύματα αιθανόλης 100% δύο φορές, 90%, 70%, 50%, 30%, 10%, για 1 λεπτό σε κάθε συγκέντρωση. Αφού ξεπλυθούν μία φορά με ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνάσης K (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM EDTA), μεταφέρονται σε νέο διάλυμα πρωτεΐνάσης που περιέχει 1 μg/ml πρωτεΐνάση K, όπου και επωάζονται για 30 λεπτά στους 37°C. Μετά την επώαση, οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται δύο φορές με αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε διάλυμα 0,1 M τριαιθανολαμίνης/0,25% οξικού ανυδρίτη, όπου και επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση. Ακολούθως ξεπλένονται σε διάλυμα 2X SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M κιτρικό νάτριο, pH 7,0) για 5 λεπτά και αφυδατώνονται χρησιμοποιώντας αντίστροφα τη σειρά αλκοολών. Τέλος, οι αντικειμενοφόροι αφήνονται να στεγνώσουν για τουλάχιστον 1 ώρα σε κενό αέρος.

B.5.3.2. Προετοιμασία διαλύματος υβριδισμού.

Οι ποσότητες που αναφέρονται αφορούν μία αντικειμενοφόρο, ο αριθμός των αντικειμενοφόρων που χρησιμοποιούνται εξαρτάται από τον αριθμό των τομών που υπάρχει σε κάθε μια από αυτές. Σε 8 μl υδρολυμένου ανιχνευτή προστίθενται 2 μl μη υδρολυμένου. Η συγκέντρωση του ανιχνευτή έχει ρυθμιστεί έτσι ώστε στα 10 μl τελικού όγκου να περιέχονται 100-500 ng RNA. Για την αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής του RNA προστίθενται 10 μl απιονισμένου φορμαμίδιου και το μείγμα επωάζεται στους 68°C για 10 λεπτά. Μετά το τέλος της αποδιάταξης, το δείγμα μεταφέρεται στον πάγο. Στον αποδιατεταγμένο ανιχνευτή προστίθενται 80 μl διαλύματος υβριδισμού (Πίνακας Β.15).

Πίνακας Β.15: Διάλυμα υβριδισμού

Απιονισμένο φορμαμίδιο	40 μl
5M NaCl	6 μl
50X Denhardt's (1% Ficoll, 1% Polyvinylpyrrolidone, 1% BSA)	2 μl
100X TE pH:7,5	1 μl
1M DTT (BDH)	7 μl
50 % Dextran sulphate (BDH)	20 μl
ddH ₂ O	4 μl
Τελικός όγκος	100

Το μείγμα θερμαίνεται στους 60°C για 3 λεπτά και αφού ανακατευτεί καλά τοποθετείται πάνω στις τομές. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται ώστε να αποφευχθεί ο εγκλωβισμός φυσαλίδων αέρα μέσα στο διάλυμα υβριδισμού.

B.5.3.3. Διαδικασία υβριδισμού.

Οι αντικειμενοφόροι σκεπάζονται με καλυπτρίδες με ιδιαίτερη προσοχή καθώς πρέπει να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε κουτί, η βάση του οποίου καλύπτεται με διηθητικό χαρτί εμποτισμένο σε διάλυμα 2X SSC, για να μη στεγνώσουν οι τομές. Ο υβριδισμός πραγματοποιείται στους 42°C, για τουλάχιστον 12-16 ώρες.

B.5.3.4. Ξεπλύματα υβριδισμού.

Μετά το τέλος του υβριδισμού οι καλυπτρίδες απομακρύνονται με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε διάλυμα 4X SSC/5 mM DTT, μετά από 10 λεπτά το διάλυμα αντικαθίσταται με νέο όπου οι αντικειμενοφόροι αφήνονται για 10 λεπτά με τακτική ήπια ανάδευση, η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι επωάζονται σε 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος (500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) που περιέχει 50 µg/ml RNase A, στους 37°C για 30 λεπτά. Η RNase A απομακρύνεται με 4 ξεπλύματα σε ρυθμιστικό διάλυμα RNase (500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) στους 37°C για 20 λεπτά το καθένα. Τέλος, οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται με διάλυμα 2X SSC/1 mM DTT σε θερμοκρασία δωματίου με τακτική ήπια ανακίνηση.

B.5.3.5. Ανοσολογική ανίχνευση του υβριδισμένου ανιχνευτή.

Η ανίχνευση του σήματος υβριδισμού γίνεται με τη χρήση ενός συμπλόκου αντισώματος αντι-DIG που φέρει συζευγμένη αλκαλική φωσφατάση. Το αντίσωμα αναγνωρίζει και προσκολλάται στο σημασμένο με διγοξιγενίνη ανιχνευτή ενώ η αλκαλική φωσφατάση καταλύει το σχηματισμό χρωμοφόρου ιζήματος με την προσθήκη των αντιδραστηρίων BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) και NBT (Nitro blue tetrazolium chloride).

Σε πρώτη φάση οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα Buf.1 (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7,5) για 3-5 λεπτά ακολούθως μεταφέρονται σε διάλυμα Buf.1, που περιέχει 0,5% αντιδραστήριο μπλοκαρίσματος και αφήνονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αντικαθίσταται με ρυθμιστικό διάλυμα TBB (0,3% Tween 20, 1% BSA σε Buf.1), όπου και αφήνονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι τομές καλύπτονται με ρυθμιστικό διάλυμα Buf.1 που περιέχει 1:500 αντίσωμα αντι-DIG και αφήνονται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το μη δεσμευμένο αντίσωμα ξεπλένεται με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε διάλυμα TBB για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρία ξεπλύματα με ρυθμιστικό διάλυμα Buf.1, για 20 λεπτά το καθένα, σε θερμοκρασία δωματίου. Οι τομές εξισορροπούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα Buf.3 (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 9,2) για 10 λεπτά και καλύπτονται με διάλυμα χρωματικής αντίδρασης, αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται στο σκοτάδι και η ανάπτυξη του χρώματος ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα στο μικροσκόπιο. Όταν εμφανιστεί το σήμα η χρωματική αντίδραση τερματίζεται με ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων με ρυθμιστικό διάλυμα TE. Τέλος οι τομές πρέπει να αφυδατωθούν με σειρά διαλυμάτων αιθανόλης 10%, 30%, 50%, 70%, 90% και δύο φορές σε 100% για ένα λεπτό σε κάθε διάλυμα. Όταν στεγνώσουν καλά μονιμοποιούνται με την προσθήκη DPX πριν την τοποθέτηση της καλυπτρίδας.

B.6. Ανάλυση πρωτεϊνών, παραγωγή ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων και μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας.

B.6.1. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Bradford και βασίζεται στην δέσμευση της χρωστικής Coomassie blue G250 σε πρωτεΐνες σε ισχυρά όξινο περιβάλλον (Bradford, 1976). Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού δείγματος, λαμβάνονται 50μl και προστίθενται σε 950 μl διαλύματος χρωστικής (0,1 mg/ml Coomassie blue G250, 5% μεθανόλη, 8,5% H₃PO₄), αναμιγνύονται καλά και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος για 20-35 λεπτά και λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595 nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρέπει να δημιουργηθεί μια καμπύλη αναφοράς με γνωστές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης BSA.

B.6.2. Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

Η ανάλυση πρωτεϊνών γίνεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Οι πρωτεΐνες που θερμαίνονται παρουσία του απορρυπαντικού SDS και του ισχυρού αναγωγικού παράγοντα β-μερκαπτοαιθανόλη, αποδιατάσσονται και αποκτούν αρνητικό φορτίο ανάλογο του μεγέθους τους. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης (Πίνακας B.16).

Πίνακας B.16: Συγκέντρωση πηκτής Ακρυλαμίδης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού

Ακρυλαμίδη (%)	Εύρος διαχωρισμού πολυπεπτιδικών αλυσίδων (kDa)
15	10-43
12	12-60
10	20-80
7.5	36-94
5	57-212

Στον Πίνακα B.17 παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και της πηκτής επιστοίβασης.

Πίνακας B.17: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης.

	Πηκτή διαχωρισμού				Πηκτή επιστοίβασης
	7.5%	10%	15%	20%	
30% Ακρυλαμίδη	7.5	10	15	20	1.30
1% δις-Ακρυλαμίδη	5.20	3.90	2.60	1.90	1.00
3 M Tris pH:8,8	3.75	3.75	3.75	3.75	-
1M Tris pH:6,8	-	-	-	-	1.25
10% SDS	0.30	0.30	0.30	0.30	0.10
ddH ₂ O	13.09	11.90	8.19	3.84	6.24
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
10% APS	0.15	0.15	0.15	0.15	0.10

Τα υλικά αναμιγνύονται με τη σειρά που αναγράφονται, στο τέλος και σχεδόν ταυτόχρονα προσθέτονται το TEMED (Tetramethylethylenediamine) και το APS (Ammonium persulfate). Το μείγμα τοποθετείται στο κενό ανάμεσα στα τζάμια της συσκευής και αφήνεται να πολυμεριστεί για τουλάχιστον 1 ώρα. Αφότου πολυμεριστεί η κυρίως πηκτή διαχωρισμού με τον ίδιο τρόπο παρασκευάζεται η πηκτή επιστοίβασης και αφού τοποθετηθεί ανάμεσα στα τζάμια τοποθετείται η χτένα προσεκτικά για τον σχηματισμό των βοθρίων φόρτωσης. Η πηκτή αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου μισή ώρα. Μετά τον πολυμερισμό και της πηκτής επιστοίβασης η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στην συσκευή προστίθεται 1X ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0.1% SDS).

Τα πρωτεϊνικά δείγματα πριν την εφαρμογή τους στην πηκτή, αναμιγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος 2X Sample Buffer (4% SDS, 10% 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0,1 M Tris-HCl pH 6,8, 20% γλυκερόλη) ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 100°C για 5 λεπτά και φυγοκέντρωσή τους στις 13.000 για 5 λεπτά. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται με 8 Volts/cm όσο βρίσκονται στη πηκτή επιστοίβασης και με 15 Volts/cm στην πηκτή διαχωρισμού μέχρις ότου η χρωστική φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης (0.1% Coomassie R250, 10% οξικό οξύ, 40% μεθανόλη) για 30 λεπτά στους 60°C με ελαφρά ανακίνηση. Στη συνέχεια ακολουθεί αποχρωματισμός της πηκτής με εμβάπτιση της σε διάλυμα αποχρωματισμού (20% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) σε θερμοκρασία δωματίου, με ελαφρά ανακίνηση. Το διάλυμα αποχρωματισμού αντικαθίσταται με νέο ανά 1 ώρα.

B.6.3. Μεταφορά πρωτεϊνών κατά Western και ανοσοεντοπισμός.

Μετά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης είναι δυνατή η μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με σκοπό τον εντοπισμό συγκεκριμένης πρωτεΐνης με τη χρήση εξειδικευμένου αντισώματος.

Αφότου ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση η πηκτή πολυακρυλαμίδης τοποθετείται για 10 λεπτά σε 30X ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης υπό ήπια ανάδευση. Στο μέγεθος της πηκτής κόβονται 10 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM καθώς και ένα φύλλο νιτροκυτταρίνης. Στη συσκευή μεταφοράς τοποθετούνται πέντε από τα φύλλα 3MM τα οποία εμποτίζονται καλά με 30X ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης χωρίς να δημιουργηθούν φουσκάλες. Πάνω στα φύλλα 3MM τοποθετείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και πάνω από αυτή η πηκτή πολυακρυλαμίδης. Πάνω από την πηκτή τοποθετούνται τα υπόλοιπα φύλλα που είναι και αυτά καλά εμβαπτισμένα με 30X ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Με τη βοήθεια κυλινδρικής ράβδου αφαιρούνται φυσαλίδες αέρα που πιθανά έχουν δημιουργηθεί, καθώς η παρουσία τους θα εμποδίσει τη μεταφορά των πρωτεϊνών. Η μεταφορά για περίπου δύο ώρες με την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης 32 Volt για περίπου 2 ώρες. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς η συσκευή είναι συνδεδεμένη με τρεχούμενο νερό για την αποφυγή υπερθέρμανσης.

Μετά τη μεταφορά η μεμβράνη ξεπλένεται 2 φορές για 10 λεπτά με TBS (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) με ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια η μεμβράνη μεταφέρεται για 1 ώρα σε διάλυμα με ήπια ανάδευση. Η μεμβράνη τοποθετείται 2 φορές για 10 λεπτά σε TBS που επιπλέον περιέχει 0,05% Tween 20 και 0,2% Triton X-100 σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση. Στην συνέχεια ξεπλένεται δύο φορές για 10 λεπτά με TBS σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση. Η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα TBS με

3% BSA και το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση και επώάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση. Ακολουθούν 2 ξεπλύματα για 10 λεπτά σε TBS με 0,05% Tween 20 και 0,2% Triton X-100 και 1 για 10 λεπτά με TBS. Στη συνέχεια εφαρμόζεται το δευτερογενές αντίσωμα στο οποίο είναι συνδυασμένο με την αλκαλική φωσφατάση σε διάλυμα TBS με 3% BSA για 1 ώρα. Η μεμβράνη ξεπλένεται 4 φορές με TBS με 0,05% Tween 20 και 0,2% Triton X-100 για 10 λεπτά η καθεμία. Η μεμβράνη τοποθετείται στο διάλυμα ανίχνευσης (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,33 mg/ml NBT, 0,165 mg/ml BCIP) σε σκοτεινό περιβάλλον έως την ανάπτυξη σήματος. Όταν εμφανιστεί το σήμα η μεμβράνη ξεπλένεται με νερό.

Β.6.4. Έκφραση ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων σε *E. coli* και απομόνωση τους με χρωματογραφία συγγένειας.

Η έκφραση και η απομόνωση των ανασυνδυασμένων φυτικών παρβουλινών έγινε με τη με χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιώντας το QIAexpress System Type IV της εταιρείας QIAGEN. Οι τρεις παρβουλίνες βρίσκονται κλωνοποιημένες στον φορέα έκφρασης pQE-30. Η έκφραση των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων που φέρουν ένα επίτοπο 6 ιστιδινών στο άμινο τελικό τους άκρο γίνεται σε *E. coli* M15 [pREP4]. Η απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης γίνεται με τη χρήση σφαιριδίων αραρόζης που είναι φορτισμένα με νικέλιο (Ni-NTA Agarose, QIAGEN).

Για την έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένων παρβουλινών 10 ml θρεπτικού διαλύματος LB με 100 µg/ml αμπικιλίνη και 25 µg/ml καναμυκίνη εμβολιάζονται με μια αποικία μετασηματισμένων *E. coli* στέλεχος M15[pREP4] με τον ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης και επώάζονται για περίπου 14 ώρες στους 37°C, με συνεχή ανακίνηση. 5 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 100 ml διαλύματος LB (αμπικιλίνη 100 µg/ml και καναμυκίνη 25 µg/ml). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C, έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι O.D.₆₀₀: 0,6 όπου και προστίθεται IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C για άλλες 5 ώρες. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά στους 4°C και επαναδιαλύονται με 3 ml διαλύματος λύσης (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο) ανά gr πάστας κυττάρων στη συνέχεια προστίθεται λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml και αφήνονται για 30 λεπτά στον πάγο. Μετά ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπέρηχους (6 φορές για 10sec στα 200-300 Watt με ενδιάμεση παύση 10 sec). Τα θραύσματα των κυττάρων απομακρύνονται με φυγοκέντρηση στις 10.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο συλλέγεται και αναμιγνύεται με 0,5 ml 50% Ni-NTA. Το μείγμα επώάζεται υπό συνεχή ήπια ανακίνηση στους 4 °C για 30 λεπτά και τοποθετείται σε ειδική στήλη χρωματογραφίας. Ακολουθεί καθαρισμός της στήλης με τουλάχιστον τετραπλάσιο όγκο στήλης διαλύματος ξεπλύματος (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο) για δύο φορές. Τέλος, ακολουθούν 4 εκλούσεις της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από την στήλη με 0,25 ml διαλύματος έκλουσης (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM ιμιδαζόλιο) τη φορά.

Τα κλάσματα της έκλουσης που περιέχουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι 2000 όγκων κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για κάθε πρωτεΐνη. Η διαπίδυση πραγματοποιείται με ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης (Sigma) για 16-18 ώρες στους 4°C υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Οι μεμβράνες διαπίδυσης πριν τη χρήση τους προετοιμάζονται με βρασμό τους για 1 ώρα σε 1 λίτρο διαλύματος που περιέχει

5 gr EDTA και 8,5 gr NaHCO₃, στη συνέχεια ξεπλένονται καλά με απιονισμένο νερό και φυλάσσονται στους 4°C βυθισμένες σε αποστειρωμένο δις- απιονισμένο νερό.

B.6.5. Έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας ΡΡΙΑσών.

Η ενζυμική δραστηριότητα των ΡΡΙΑσών μελετήθηκε έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων της μορφής ηλεκτρουλο-Ala-Xaa-Pro-Phe-p-νιτροανιλίδιο, όπου Xaa ένα από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ και αργινίνη (Fischer *et al.*, 1984; Kofron *et al.*, 1991). Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της α-χυμοθρυψίνης να διασπά το πεπτίδιο και να απελευθερώνεται το pNA όταν ο δεσμός Xaa-Pro βρίσκεται στην *trans* διαμόρφωση. Το pNA όταν απελευθερωθεί απορροφά στα 390 nm όπου και ποσοτικοποιείται φασματοφωτομετρικά. Η αυθόρμητη μετατροπή από την *cis* στην *trans* διαμόρφωση των πεπτιδύλ-προλύλ δεσμών πραγματοποιείται με αργούς ρυθμούς και η δραστηριότητα της ισομεράσης επιταχύνει τον ρυθμό με τον οποίο η *cis* μορφή ισομεριώνεται στην ευαίσθητη στην χυμοθρυψίνη *trans* μορφή.

Σε erpendorf αναμιγνύονται 930 ml ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM HEPES pH 8.0, 100 mM NaCl με 20 ml διαλύματος α-χυμοθρυψίνης συγκέντρωσης 15 mg/ml σε 0,001M HCl. Σε κυβέττα που βρίσκεται στο φωτόμετρο προστίθεται διάλυμα πεπτιδίου συγκέντρωσης 5mM διαλυμένο σε 470 mM LiCl σε TFE (2,2,2-Trifluoroethanol). Στο σωλήνα erpendorf προσθέτουμε την ΡΡΙΑση, αναμιγνύουμε γρήγορα και τοποθετούμε το διάλυμα στην κυβέτα που βρίσκεται στο φωτόμετρο. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 1 ml. Αμέσως παίρνουμε συνεχώς τις τιμές απορρόφησης στα 390 nm μέχρι να τελειώσει η αντίδραση. Από τα σημεία της απορρόφησης τα πρώτα 10 δευτερόλεπτα, όπου είναι γραμμική υπολογίζεται η κλίση της ευθείας που αντιστοιχεί στην αρχική ταχύτητα της αντίδρασης. Παράλληλα κάτω από τις ίδιες συνθήκες μετράται και η ταχύτητα της μη καταλυόμενης *cis/trans* ισομερείωσης. Από τις τιμές της αρχικής ταχύτητας σε σχέση με διαφορετικές συγκεντρώσεις ΡΡΙΑσης υπολογίζεται η σταθερά εξειδίκευσης σύμφωνα με τον τύπο $K_{cat}/K_m=(k_{obs}-k_u)/[PPIase]$.

B.6.6. Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα ζύμης.

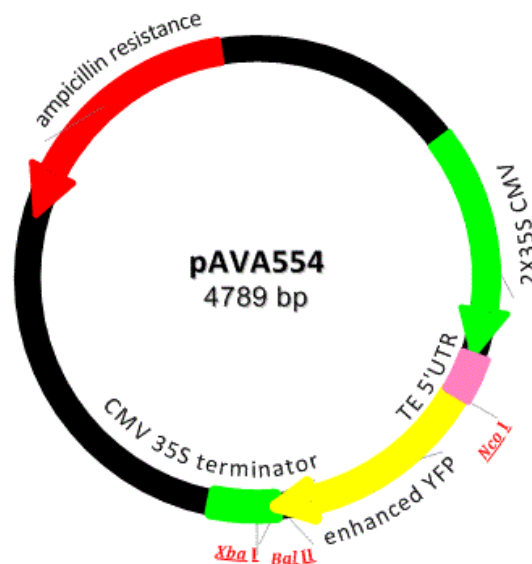
Κύτταρα ζύμης αναπτύσσονται σε 10 ml κατάλληλου θρεπτικού έως ότου O.D.₆₀₀: 1. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια ξεπλένονται 2 φορές με παγωμένο νερό, φυγοκεντρώνονται και το απομακρύνεται το υπερκείμενο. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 150 ml διαλύματος λύσης (20 mM Tris, pH 7.6, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% Triton X-100, 1% SDS, 10 mM PMSF) και προστίθενται περίπου 200 mg γυάλινων σφαιριδίων διαμέτρου 0.5 mm και ακολουθεί μηχανική ανάδευση (vortex) για 5 λεπτά στους 4°C. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο φυλάσσεται σε νέο erpendorf και μπορεί να αποθηκευτεί στους -80°C. Κλάσμα από το υπερκείμενο μπορεί να αναμιχθεί με ίσο όγκο διαλύματος 2X Sample Buffer και να ακολουθηθεί η αντίστοιχη διαδικασία για την ανάλυσή τους σε πηκτή ακρυλαμίδης.

B.7. Υποκυτταρικός εντοπισμός πρωτεϊνών.

Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των παρβουλινών στο φυτικό κύτταρο πραγματοποιήθηκε παροδικός μετασηματισμός επιδερμικών κυττάρων φύλλων *Arabidopsis* με τη χρήση επιταχυνόμενων μικροσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με DNA.

B.7.1. Δημιουργία κατασκευών για στον φορέα pAVA554.

Οι κωδικές περιοχές των παρβουλινών του *L. japonicus* κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pAVA554 (Εικόνα B.1). Ο φορέας αυτός έχει σχεδιαστεί για την παροδική έκφραση γονιδίων στο φυτικό κύτταρο. Η πρωτεΐνη στόχος μπορεί να κλωνοποιηθεί σε σύντηξη με την eYFP (enhanced YFP) είτε στο άμινο είτε στο καρβόξυ τελικό της άκρο. Η έκφραση χημικαίης πρωτεΐνης βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο διπλού προαγωγέα CaMV35S, ταυτόχρονα υπάρχουν αλληλουχίες ενίσχυσης της μετάφρασης (TE 5'UTR, Translational Enhancer) και στο 3' άκρο χρησιμοποιείται η ληκτική ακολουθία του 35S του CaMV (CaMV 35S terminator).



Εικόνα B.1: Ο φορέας pAVA554 που χρησιμοποιήθηκε για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των παρβουλινών.

Για τις *LjPar1* και *LjPar2* δημιουργήθηκαν δύο πλασμιδιακές κατασκευές με σκοπό τη σύντηξη της eYFP είτε στο άμινο τελικό (eYFP-*LjPar1* και eYFP-*LjPar2*) είτε στο καρβόξυ τελικό τους άκρο (*LjPar1*-eYFP και *LjPar2*-eYFP). Για την κατασκευή eYFP-*LjPar1*, η *LjPar1* ενισχύθηκε με τους εκκινητές AVGFPU39 F και AVGFPU39 R, η εισαγωγή στο φορέα έγινε στη θέση περιορισμού BglIII ενώ για την κατασκευή *LjPar1*-eYFP ενισχύθηκε με τους εκκινητές AVU39GFP F και AVU39GFP R, η εισαγωγή στο φορέα έγινε στη θέση περιορισμού NcoI. Για την κατασκευή eYFP-*LjPar2*, η *LjPar2* ενισχύθηκε με τους εκκινητές AVGFPU40 F και AVGFPU40 R, η εισαγωγή στο φορέα έγινε στη θέση περιορισμού BglIII ενώ για την κατασκευή *LjPar2*-eYFP ενισχύθηκε με τους εκκινητές AVU40GFP F και AVU40GFP R, η εισαγωγή στο φορέα έγινε στη θέση περιορισμού NcoI. Για την κατασκευή *LjPar3*-eYFP, η

LjPar3 ενισχύθηκε με τους εκκινητές AVU41GFP F και AVU41GFP R, η εισαγωγή στο φορέα έγινε στη θέση περιορισμού NcoI.

Όλες οι κατασκευές ελέγχθηκαν με αλληλούχιση για την επιβεβαίωση των ενθέσεων στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με την eYFP.

B.7.2. Προετοιμασία των μικροσωματιδίων χρυσού και κατακρήμνηση του DNA.

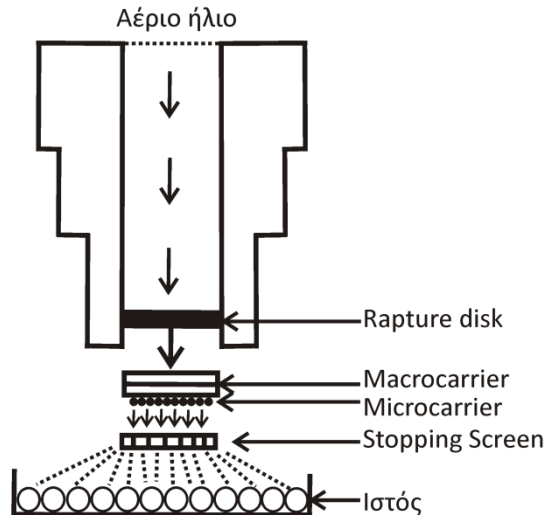
60 mg μικροσωματιδίων χρυσού διαμέτρου 1 μm τοποθετούνται σε 1 ml 100% αιθανόλης. Ακολουθεί vortex για 2 λεπτά, φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 10000 σ.α.λ. απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ξέπλυμα με αιθανόλη επαναλαμβάνεται 3 φορές. Στο τέλος απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml ddH₂O, τα σωματίδια ξεπλένονται άλλη μία φορά, επαναδιαλύονται σε 500 μl ddH₂O και χωρίζονται σε κλάσματα των 50 μl έτοιμων για χρήση.

Σε erpendorf που περιέχει 50 μl μικροσωματιδίων χρυσού προστίθενται με την σειρά που αναφέρονται: 5 μl πλασμιδιακό DNA (1 μg/μl) ακολουθεί σύντομο vortex, 50 μl 2,5 M CaCl₂ ακολουθεί σύντομο vortex, 20 μl 0,1 M σπερμιδίνη ακολουθεί vortex για 3 λεπτά. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 10000 σ.α.λ. και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Τα μικροσωματίδια ξεπλένονται με 140 μl 70% αιθανόλης, ακολουθεί vortex για 10 δευτερόλεπτα, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Τέλος, τα μικροσωματίδια επαναδιαλύονται σε 50 μl 100% αιθανόλης που είναι αρκετά για την πραγματοποίηση 4-8 βομβαρδισμών.

B.7.3. Μετασηματισμός φύλλων με τη μέθοδο του βομβαρδισμού.

Ο βομβαρδισμός πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή PDS-1000/He της εταιρίας Bio-Rad. Η διάταξη της συσκευής βομβαρδισμού με τις θέσεις των διαφόρων εξαρτημάτων παρουσιάζονται στην Εικόνα Β.2. Η βελτιστοποίηση των διαφόρων παραμέτρων που πρέπει να εφαρμοστούν στο κάθε πείραμα βομβαρδισμού απαιτεί την πραγματοποίηση αρκετών μετασηματισμών καθώς οι παράγοντες που επηρεάζουν την επιτυχία του είναι πολλοί και αλληλεπιδρούν με σύνθετο τρόπο. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς είναι:

- Το επίπεδο του κενού που πρέπει να εφαρμοστεί στο θάλαμο της συσκευής καθώς έχει σκοπό να μειώσει την τριβή που θα έχουν τα επιταχυνόμενα σωματίδια. Το επίπεδο του κενού πρέπει να είναι 28-29 inches Hg για φυτικούς ιστούς.
- Η πίεση με την οποία θα επιταχυνθούν τα σωματίδια χρυσού. Η πίεση αυτή ρυθμίζεται από τα δισκία διάρρηξης (rupture discs) που είναι κατασκευασμένα να διαρρηγνύονται όταν σε αυτά εφαρμοστεί συγκεκριμένη πίεση. Για φυτικούς ιστούς χρησιμοποιούνται δισκία που σπάνε στα 1100 psi.
- Η απόσταση μεταξύ του δισκίου διάρρηξης και δισκίου (macrocarrier) στο οποίο εναποτίθενται τα σωματίδια χρυσού. Στη περίπτωση μας η απόσταση ήταν 1/4".
- Η απόσταση μεταξύ του macrocarrier και του πλέγματος μείωσης της ταχύτητας (stopping screen) των σωματιδίων χρυσού. Στη περίπτωση μας η απόσταση 11 mm.
- Η απόσταση μεταξύ του πλέγματος μείωσης της ταχύτητας των σωματιδίων και του ιστού. Στη περίπτωση μας η απόσταση ήταν 6 cm.
- Τέλος, σημαντικό ρόλο έχει και η διάμετρος των σωματιδίων χρυσού που χρησιμοποιούνται. Στη περίπτωση μας χρησιμοποιήθηκαν σωματίδια διαμέτρου 1 μm.



Εικόνα Β.2: Η διάταξη της συσκευής βομβαρδισμού.

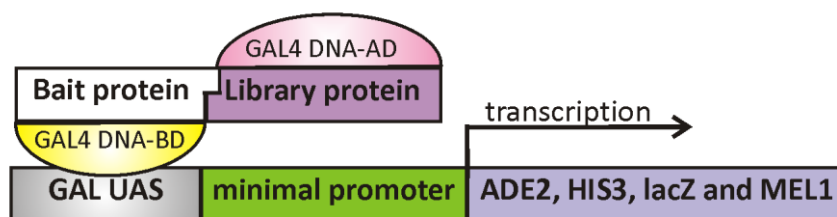
Τα νεαρά φύλλα ροζέτας από *Arabidopsis* που πρόκειται να μετασχηματιστούν κόβονται προσεκτικά και ξεπλένονται με αποστειρωμένο ddH₂O. Τα φύλλα τοποθετούνται με την κάτω επιδερμίδα τους προς τα πάνω σε τρυβλία τα με θρεπτικό MS. Ο περιβάλλον χώρος και η συσκευή και απολυμαίνονται με 70% αιθανόλη. Παράλληλα απολυμαίνονται με 100% αιθανόλη τα δισκία διάρρηξης (rapture discs), τα δισκία στα οποία εναποτίθενται τα σωματίδια χρυσού (macrocarriers) και το πλέγμα μείωσης της πίεσης του αέριου ήλιου όπως και οποιοδήποτε άλλο εξάρτημα χρησιμοποιείται. Τα υλικά αφήνονται στο θάλαμο νηματικής ροής (laminar) για να στεγνώσουν. Για κάθε μετασχηματισμό 6-8 μl μικροσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένα με DNA τοποθετούνται στα ειδικά δισκία macrocarrier και αφήνονται να στεγνώσουν. Τα διάφορα εξαρτήματα τοποθετούνται στις κατάλληλες θέσεις στο θάλαμο της συσκευής. Με αντλία κενού εφαρμόζεται το κενό αέρος και όταν έχει την κατάλληλη τιμή σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα αφήνεται το ήλιο να επιταχύνει τα σωματίδια χρυσού να εισχωρήσουν στον ιστό.

Τα τρυβλία με φύλλα που βομβαρδίστηκαν τοποθετήθηκαν μέχρι τη παρατήρηση τους σε θάλαμο με θερμοκρασία 22-25°C με χαμηλό φωτισμό. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα είναι ορατά εξαιτίας της παραγωγής eYFP και μελετήθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Confocal Laser Scanning Microscopy). Η διεγερση της eYFP και της χλωροφύλλης έγινε στα 488 nm.

B.8. Εντοπισμός πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με παρβουλίνες με το σύστημα των δύο υβριδίων σε ζύμες.

Σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία των διαφόρων πρωτεϊνών μπορούμε να αντλήσουμε από τη μελέτη των αλληλεπιδράσεών τους. Εφαρμόζοντας την μεθοδολογία των δύο υβριδίων σε ζύμη (Yeast Two Hybrid, YTH) έγινε μια προσπάθεια εντοπισμού πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τις παρβουλίνες του *L. jaronicus*.

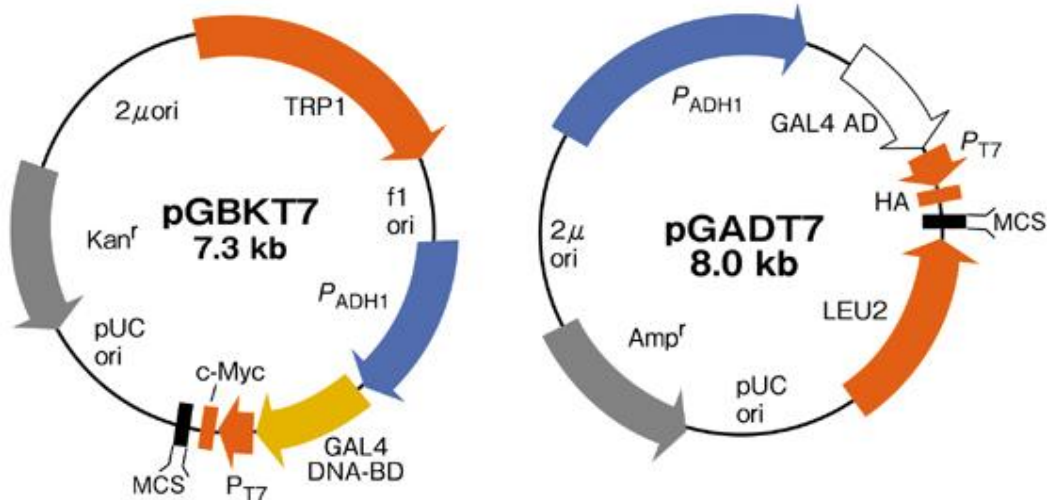
Το σύστημα αυτό εκμεταλλεύεται τη δομή και την λειτουργία των μεταγραφικών παραγόντων, στους οποίους ένα τμήμα της πρωτεΐνης τους αναγνωρίζει και προσδένεται συγκεκριμένες αλληλουχίες των προαγωγέων ή των ενισχυτών και ένα δεύτερο τμήμα αλληλεπιδρά με άλλα στοιχεία της μεταγραφικής μηχανής. Τα πρωτεϊνικά αυτά τμήματα των μεταγραφικών παραγόντων μπορούν να δράσουν ακόμα και χωρίς να βρίσκονται στο ίδιο μόριο αλλά αρκεί να είναι αρκετά κοντά το ένα με το άλλο. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Matchmaker Two-Hybrid της εταιρείας Clontech. Το γονίδιο στόχος (bait) εκφράζεται ως υβρίδιο με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain, BD) του παράγοντα μεταγραφής GAL4 ενώ ένα άλλο γονίδιο ή cDNA εκφράζεται ως υβρίδιο με την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (Activation Domain, AD) του GAL4 (Chien *et al.*, 1991). Όταν τα δύο υβρίδια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε στελέχη ζύμης όπως η AH109, οι περιοχές BD και AD έρχονται κοντά η μία στην άλλη και ενεργοποιούν την μεταγραφή γονιδίων επιλογής όπως είναι τα *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* και *MEL1* (Εικόνα B.3). Τα γονίδια επιλογής βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο διαφορετικών περιοχών UAS (Upstream Activation Sequence) για μεγαλύτερη αξιοπιστία του συστήματος.



Εικόνα B.3: Η βασική αρχή του συστήματος των δύο υβριδίων (Clontech, PT3955-1).

B.8.1. Κλωνοποίηση των παρβουλινών στον φορέα pGBKT7.

Για την παραγωγή χιμαιρικών παρβουλινών με την BD περιοχή χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pGBKT7 (Εικόνα B.4). Ο φορέας αυτός οδηγεί στην έκφραση των πρωτεϊνών στόχων σε σύντηξη με τα αμινοξέα 1-147 του BD του GAL4. Επίσης μεταξύ των δύο περιοχών παρεμβάλλεται ένα επιτόπιο c-Myc που μας επιτρέπει τον εύκολο εντοπισμό του υβριδίου με τη χρήση αντι-c-Myc αντισώματος.



Εικόνα Β.4: Οι πλασμιδιακοί φορείς pGBKT7 και pGADT7

Στα κύτταρα ζύμης οι συντηγμένες πρωτεΐνες εκφράζονται σε υψηλά ποσοστά από τον συστατικό υποκινητή *ADH1* (*PADH1*). Η μεταγραφή σταματά αποτελεσματικά εξαιτίας των σημάτων τερματισμού T7 & TADH1. Το πλασμίδιο pGBKT7 αντιγράφεται αυτόνομα σε κύτταρα *E. coli* και στην *S. cerevisiae* από τις ορί ρUC και 2μ αντίστοιχα. Επίσης φέρει γονίδιο παραγωγής τρυπτοφάνης για επιλογή σε αυξοτροφικά στελέχη ζύμης.

Οι κωδικές περιοχές των παρβουλινών ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές AVU39GFP F και U39pOL-R για την *LjPar1* και ένθεσή της στις θέσεις NcoI και Sall του pGBKT7. Για την *LjPar2* χρησιμοποιήθηκαν οι AVU40GFP F και U40pOL-R και ένθεσή της στις θέσεις NcoI και Sall του φορέα. Τέλος, για την *LjPar3* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές AVU41nlp F και U41pOL-R για κλωνοποίηση στις θέσεις NcoI και Sall. Οι κατασκευές ελέχθησαν με πέψεις και αλληλούχιση.

B.8.2. Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης.

Για το μετασχηματισμό κυττάρων *S. cerevisiae* αποικία κυττάρων εμβολιάζεται στο κατάλληλο θρεπτικό (YPDA ή SC χωρίς τα αντίστοιχα αμινοξέα επιλογής) και αναπτύσσεται έως OD₆₀₀ τουλάχιστον 0,4. Τα κύτταρα συλλέγονται (περίπου 3ml καλλιέργειας για κάθε μετασχηματισμό) με φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 13000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρείται το υπερκείμενο. Τα κύτταρα ξεπλένονται με 500 μl αποστειρωμένου ddH₂O και φυγοκεντρώνονται για 30 δευτερόλεπτα στις 13000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρείται το υπερκείμενο πολύ καλά. Στο ίζημα κυττάρων προσθέτονται, με τη σειρά που αναφέρονται, τα αντιδραστήρια του Πίνακα Β.18 και αναμιγνύονται καλά αλλά με ήπιες κινήσεις.

Πίνακας Β.18: Μείγμα μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης.

Συστατικό	Ποσότητα (μl)
PEG 3500 50% w/v	240
LiAc 1.0 M	36
Boiled SS-Carrier DNA (2 mg/ml)	50
Πλασμιδιακό DNA (0.1 to 1 μg) μαζί με ddH ₂ O	34
Τελικός όγκος	360

Με αυτή τη μέθοδο μπορεί να γίνει ταυτόχρονος μετασχηματισμός των κυττάρων με τα πλασμίδια AD και BD.

Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται στους 42°C για 40 με 50 λεπτά, κατά διαστήματα τα ανακινούμε με ήπιες κινήσεις. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 2000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρείται πολύ καλά όλο το υπερκείμενο. Τα κύτταρα ξεπλένονται με 600 μl αποστειρωμένου ddH₂O και 200 με 300 μl απλώνονται σε τρυβλίο με κατάλληλο θρεπτικό επιλογής. Τα τρυβλία τοποθετούνται στους 30°C μέχρι να εμφανιστούν αποικίες (3-4 ημέρες).

B.8.3. Σάρωση cDNA βιβλιοθήκης.

Η cDNA βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε κατασκευάστηκε από τους Roulsen and Podenphant, 2002, από ρίζες του *L. japonicus* που προηγουμένως είχαν μολυνθεί με το *Mesorhizobium loti* για χρονικό διάστημα μεταξύ 5 και 12 ημερών. Η cDNA βιβλιοθήκη έχει κατασκευαστεί στον φορέα pAD-GAL4 και ο τίτλος της ήταν $1,5 \cdot 10^9$ cfu/μg.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σάρωση της βιβλιοθήκης περιγράφεται από τον Gietz 2006, με μερικές τροποποιήσεις. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν 3 μετασχηματισμοί κυττάρων *S. cerevisiae* SG335 με τα πλασμίδια pGB-Par1, pGB-Par2 και pGB-Par3 αντίστοιχα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ένα μετασχηματισμός με διαφορετικές ποσότητες από τη βιβλιοθήκη για να υπολογιστεί η σχέση ποσότητας της βιβλιοθήκης με τον όγκο κυττάρων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν ώστε να έχουμε τη μεγαλύτερη δυνατή αποδοτικότητα μετασχηματισμού (αποικίες ανά μg βιβλιοθήκης ανά κύτταρα ζύμης) και το μεγαλύτερο αριθμό μετασχηματισμένων κυττάρων. Για το μετασχηματισμό αυτό αποικία κυττάρων ζύμης SG335 που φέρει το πλασμίδιο pGB-Par αναπτύσσεται ολονύκτια σε 25 ml θρεπτικού SC χωρίς τρυπτοφάνη (SC-Trp), η καλλιέργεια αναπτύσσεται έως τίτλο 2×10^7 κύτταρα/ml (10^6 κύτταρα/ml έχουν O.D.₅₄₅: 0,1). Ποσότητα από την καλλιέργεια που περιέχει $2,5 \times 10^8$ κύτταρα χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 50 ml προθερμασμένου YPDA και αναπτύσσονται στους 30°C για 4 με 5 ώρες έως ότου 2×10^7 κύτταρα/ml, στο διάστημα αυτό έχουν πραγματοποιηθεί τουλάχιστον δύο διπλασιασμοί χωρίς απώλεια του πλασμιδίου pGB-Par από τα κύτταρα. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4000 σ.α.λ. για 5 λεπτά στους 4°C. Στο διάστημα αυτό τοποθετείται το DNA μεταφορέας (carrier DNA) στους 100°C για 5 λεπτά και αμέσως τοποθετείται στον πάγο. Τα κύτταρα ξεπλένονται αρχικά με 25 ml αποστειρωμένου ddH₂O, συλλέγονται και στη συνέχεια ξεπλένονται με 1 ml αποστειρωμένου ddH₂O και τελικά επαναδιαλύονται σε 1 ml αποστειρωμένου ddH₂O. Τα κύτταρα χωρίζονται σε κλάσματα των 100 μl (το κάθε ένα περιέχει 10^8 κύτταρα) φυγοκεντρώνονται για 20 δευτερόλεπτα και το υπερκείμενο αφαιρείται. Στη συνέχεια παρασκευάζουμε το μίγμα μετασχηματισμού όπως περιγράφεται στον Πίνακα B.18, χωρίς την προσθήκη πλασμιδιακού DNA, με το οποίο επαναδιαλύουμε τα κύτταρα. Σε κάθε ένα κλάσμα κυττάρων προθέτουμε από 100 ng έως 5 μg από την βιβλιοθήκη και αναμιγνύουμε πολύ καλά. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 42°C για 40 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 30 δευτερόλεπτα στις 2000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρείται πολύ καλά όλο το υπερκείμενο. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 1000 μl αποστειρωμένου ddH₂O και πραγματοποιείται αραιώση 10^{-2} του κάθε δείγματος με αποστειρωμένο ddH₂O. Σε τρυβλίο απλώνονται 10 και 100 μl από την αραιώση της κάθε συγκέντρωσης βιβλιοθήκης. Ύστερα από 3-4 ημέρες μετρώνται οι αποικίες που εμφανιστήκαν στην κάθε αραιώση και υπολογίζεται η αποδοτικότητα μετασχηματισμού

(αποικίες ανά μg βιβλιοθήκης ανά κύτταρα ζύμης) και ο αριθμός μετασηματισμένων κυττάρων. Στην περίπτωση μας βρέθηκε ότι για να επιτύχουμε την σάρωση ικανού αριθμού αποικιών πρέπει να χρησιμοποιήσουμε $40 \mu\text{g}$ βιβλιοθήκης με 8×10^9 κύτταρα. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια.

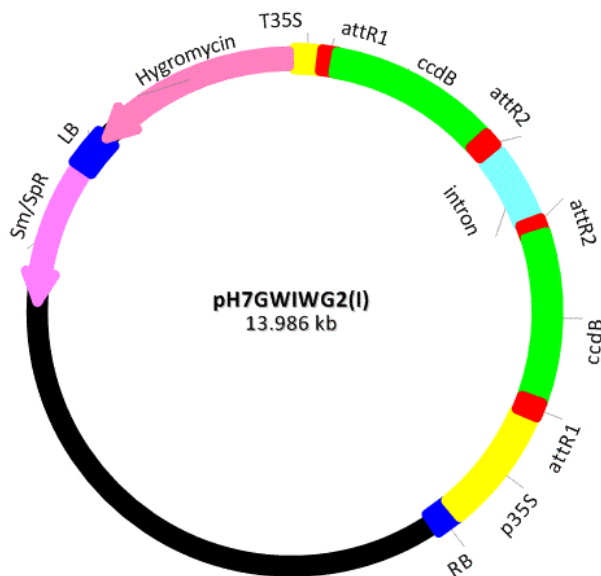
Για το μετασηματισμό αυτό αποικία κυττάρων ζύμης SG335 που φέρει το πλασμίδιο pGB-Pag αναπτύσσεται ολονύκτια σε 130 ml θρεπτικού SC χωρίς τρυπτοφάνη (SC-Trp), η καλλιέργεια αναπτύσσεται έως τίτλο 2×10^7 κύτταρα/ml. Ποσότητα από την καλλιέργεια που περιέχει $2,5 \times 10^8$ κύτταρα χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 400 ml προθερμασμένου YPDA και αναπτύσσονται στους 30°C για 4 με 5 ώρες έως ότου 2×10^7 κύτταρα/ml. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4000 σ.α.λ. για 5 λεπτά στους 4°C . Στο διάστημα αυτό τοποθετείται το DNA μεταφορέας (carrier DNA) στους 100°C για 5 λεπτά και αμέσως τοποθετείται στον πάγο. Τα κύτταρα ξεπλένονται με 200 ml αποστειρωμένου ddH₂O και συλλέγονται όπως παραπάνω. Το υπερκείμενο αφαιρείται τα κύτταρα επαναδιαλύονται με 8 ml διαλύματος 100 mM LiAc, επωάζονται για 15 λεπτά στους 30°C και συλλέγονται όπως παραπάνω. Στη συνέχεια παρασκευάζουμε το μίγμα μετασηματισμού όπως περιγράφεται στον Πίνακα Β.18 χρησιμοποιώντας τις ποσότητες που αναφέρονται πολλαπλασιασμένες κατά 78 φορές με το οποίο επαναδιαλύουμε καλά τα κύτταρα. Για κάθε σάρωση χρησιμοποιήσαμε $40 \mu\text{g}$ βιβλιοθήκης. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά στους 30°C και στη συνέχεια για περίπου 1 ώρα στους 42°C , κατά διαστήματα 10 με 15 λεπτών πραγματοποιείται ήπια ανάδευση. Τα κύτταρα συλλέγονται όπως παραπάνω και επαναδιαλύονται απαλά με 50 ml αποστειρωμένου ddH₂O. 1000 μl από το μίγμα κυττάρων απλώνονται σε τρυβλία (διαμέτρου 15 mm) με θρεπτικό SC χωρίς τα αμινοξέα λευκίνη, τρυπτοφάνη και ιστιδίνη ή σε θρεπτικό SC χωρίς τα αμινοξέα λευκίνη, τρυπτοφάνη, ιστιδίνη και αδερίνη, ανάλογα με την πρωτεΐνη στόχο. Τα τρυβλία επωάζονται μέχρι την εμφάνιση αποικιών στους 30°C . Οι αποικίες που εμφανίζονται τοποθετούνται πάλι σε θρεπτικό επιλογής και από αυτές που αναπτύσσονται γίνεται απομόνωση πλασμιδιακού DNA για περαιτέρω μελέτη.

B.9. Σίγηση (αποσιώπηση) γονιδίων σε φυτά.

Με τον όρο σίγηση (αποσιώπηση) γονιδίων περιγράφουμε το μηχανισμό που έχουν αναπτύξει οι ανώτεροι ευκαρυώτες για την αποδόμηση τμημάτων RNA που εξαρτάται από την αλληλουχία τους. Ο όρος αυτός περιλαμβάνει την μετά-μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίων (Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS) αλλά και την RNA παρεμβολή (RNA interference, RNAi). Ο μηχανισμός αποδόμησης RNA περιλαμβάνει τη δημιουργία μικρών τμημάτων siRNAs (short interfering RNAs) από δίκλωνο RNA (dsRNA) μέσω της DICER. Στη συνέχεια τα siRNAs ενσωματώνονται στο σύμπλοκο RISC (RNA Induced Silencing Complex) και αφότου απομακρυνθεί η μια αλυσίδα RNA το υπόλοιπο σύμπλοκο καθοδηγεί την εκλεκτική αποδόμηση του RNA στόχου (Kalantidis *et al.*, 2008).

Η τεχνική της σίγησης χρησιμοποιείται ως εργαλείο για τη διερεύνηση της λειτουργίας γονιδίων στους διάφορους οργανισμούς. Στην παρούσα μελέτη προχωρήσαμε στο μετασηματισμό φυτών *L. jaronicus* με σκοπό να φέρουν μια κατασκευή που παράγει δίκλιωνα μόρια RNA (hairpin RNA) που θα οδηγήσει στην συν-καταστολή των αντίστοιχων γονιδίων. Για να πραγματοποιηθεί αυτό επιλέχθηκε ο φορέας pH7GWIWG2(I) (Karimi *et al.*, 2002). Η αλληλουχία του γονιδίου που θέλουμε να καταστείλουμε εισάγεται στον φορέα σε δύο διαφορετικές θέσεις μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται ένα ιντρόνιο από το

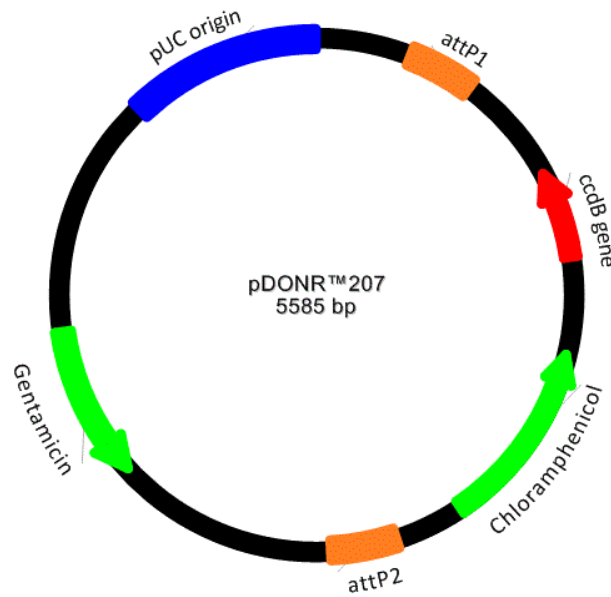
Arabidopsis που έχει ιδανικά χαρακτηριστικά για αποτελεσματική συρραφή. Στη μία θέση τοποθετείται μέρος ή τμήμα της κωδικής περιοχής του γονιδίου ενώ στη δεύτερη η ίδια περιοχή τοποθετείται έχοντας όμως αντίστροφη και συμπληρωματική φορά της πρώτης. Τα τμήματα αυτά του γονιδίου εισάγονται εντός των θέσεων *attR1* και *attR2* στον φορέα *pH7GWIWG2(I)* (Εικόνα Β.5) με την τεχνολογία GATEWAY. Η ρύθμιση της έκφρασης των δίκλωνων μορίων RNA βρίσκεται υπό τον έλεγχο του συστατικού προαγωγέα 35S και της ληκτικής του ακολουθίας από τον ιό του CaMV. Παράλληλα, εντός των δύο συνοριακών άκρων του T-DNA βρίσκεται και το γονίδιο φωσφοτρανσφεράση της υγρομικίνης (*hpt*) για να είναι δυνατή η επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών με το αντιβιοτικό υγρομικίνη.



Εικόνα Β.5: Ο φορέας *pH7GWIWG2(I)* που χρησιμοποιήθηκε για τη σίγηση των παρβουλινών.

Β.9.1. Κατασκευή δυαδικών φορέων αποσιώπησης με την τεχνολογία GATEWAY.

Για τη δημιουργία των δυαδικών φορέων αποσιώπησης χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία GATEWAY, όπως αυτή περιγράφεται από την Invitrogen (Gateway® Technology, Version E, 25-0522). Για να ενσωματωθούν τα γονίδια στόχοι στον τελικό φορέα πρέπει να προηγηθεί η εισαγωγή τους σε έναν φορέα «δότη» τον *pDONR207* (Εικόνα Β.6). Ο φορέας *pDONR207* φέρει τις περιοχές *attP* που αναγνωρίζονται από την κλωνάση BP. Μεταξύ των θέσεων *attP* υπάρχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη καθώς και το γονίδιο *ccdB*. Το προϊόν του γονιδίου *ccdB* είναι τοξικό για τα περισσότερα στελέχη *E. coli* και διευκολύνει την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το πλασμίδιο στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς η αντίδραση BP.



Εικόνα Β.6: Ο φορέας pDONR207.

Το πρώτο βήμα της διαδικασίας εισαγωγής στον pDONR207 περιλαμβάνει τη δημιουργία *attB* άκρων στα γονίδια στόχους. Αυτό πραγματοποιείται με μια αντίδραση PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *attB1*-pBS/KS F και *attB2*-pBS/KS R και μήτρα DNA κατασκευές των παρβουλινών στον φορέα pBluescript II KS⁺. Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την πολυμεράση DyNAzyme EXT (FINNZYMES) ακολουθώντας το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που αναφέρεται στον Πίνακα Β.19.

Πίνακας Β.19: Πρόγραμμα αντίδρασης PCR για τη δημιουργία BP άκρων

Αρχική αποδιάταξη	94°C	3 min	
Αποδιάταξη	95°C	45 sec	
Υβριδισμός εκκινητών	60°C	45 sec	2 κύκλοι
Επιμήκυνση	72°C	45 sec	
Αποδιάταξη	95°C	45 sec	
Υβριδισμός εκκινητών	58°C	45 sec	2 κύκλοι
Επιμήκυνση	72°C	45 sec	
Αποδιάταξη	95°C	45 sec	
Υβριδισμός εκκινητών	56°C	45 sec	22 κύκλοι
Επιμήκυνση	72°C	45 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

Το προϊόν της αντίδρασης PCR ελέγχθηκε σε πηκτή αγαρόζης καθαρίστηκε με τη χρήση του NucleoSpin® Extract II (MACHEREY-NAGEL).

Η ένθεση των καθαρών απλικονίων στον φορέα pDONR207 πραγματοποιήθηκε με μια BP αντίδραση με τη χρήση της κλωνάσης BP. Η κλωνάση BP αναγνωρίζει τις θέσεις *attB1* και *attB2* στα απλικόνια και τις θέσεις *attP1* και *attP2* στον φορέα και πραγματοποιώντας μια αντίδραση ανασυνδυασμού τα απλικόνια ενσωματώνονται στο φορέα και ταυτόχρονα σχηματίζονται οι θέσεις αναγνώρισης *attL1* και *attL2*. Στον Πίνακα Β.20 περιγράφονται τα συστατικά τη αντίδρασης BP.

Πίνακας Β.20: Συστατικά αντίδρασης BP

pDONR207 (150 ng, 50 fmol)	1 μl
attBPar (50 fmol)	1 μl
Μείγμα κλωνάσης BP	1 μl
TE pH 8.0	6 μl
ddH ₂ O	1 μl
	Τελικός όγκος 10 μl

Τα δείγματα επωάζονται στους 25°C για 18 ώρες. Η αντίδραση απενεργοποιείται με την προσθήκη 1 μl πρωτεϊνάσης K και επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 10 λεπτά. 5 μl από την αντίδραση χρησιμοποιούνται για τον μετασχηματισμό υψηλής δεκτικότητας κυττάρων *E. coli* DH5α. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα LB, γενταμικίνης (10 μg/ml). Κύτταρα *E. coli* DH5α που περιέχουν το πλασμίδιο pDONR207 στο οποίο δεν έχει πραγματοποιηθεί ανασυνδυασμός δεν είναι δυνατόν να επιβιώσουν καθώς το προϊόν του γονιδίου *ccdB* είναι τοξικό. Σε μερικές από τις αποικίες που αναπτύσσονται γίνεται έλεγχος στα πλασμίδια τους για την επιτυχία της αντίδρασης με πέψεις αλλά και με αλληλούχιση. Ο κλώνοι που σχηματίστηκαν ονομάζονται pENTRY-Par1, pENTRY-Par2 και pENTRY-Par3.

Οι κλώνοι pENTRY-Par, στους οποίους επιβεβαιώθηκε η παρουσία των ενθέτων χρησιμοποιούνται για τη πραγματοποίηση μιας αντίδρασης LR και την εισαγωγή του γονιδίου στόχου στον τελικό φορέα pH7GWIWG2(I). Η κλωνάση LR αναγνωρίζει τις θέσεις *attL1* και *attL2* στους κλώνους pENTRY-Par και τις θέσεις *attR1* και *attR2* στον pH7GWIWG2(I) και πραγματοποιώντας μια αντίδραση ανασυνδυασμού τα γονίδια Par ενσωματώνονται και στις δύο θέσεις του φορέα. Στον Πίνακα Β.21 περιγράφονται τα συστατικά τη αντίδρασης LR.

Πίνακας Β.21: Συστατικά αντίδρασης LR

pENTRY-Par (150 ng)	1 μl
pH7GWIWG2(I) (150 ng)	1 μl
Μείγμα κλωνάσης LR	1 μl
TE pH 8.0	6 μl
ddH ₂ O	1 μl
Τελικός όγκος	10 μl

Τα δείγματα επωάζονται στους 25°C για 18 ώρες. Η αντίδραση απενεργοποιείται με την προσθήκη 1 μl πρωτεϊνάσης K και επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 10 λεπτά. 5 μl από την αντίδραση χρησιμοποιούνται για τον μετασχηματισμό υψηλής δεκτικότητας κυττάρων *E. coli* DH5α. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα LB με αντιβιοτικό σπεκτινομυκίνη (50 μg/ml). Κύτταρα *E. coli* DH5α που περιέχουν το πλασμίδιο pH7GWIWG2(I) στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί ανασυνδυασμός και στις δύο θέσεις μπορούν να επιβιώσουν καθώς δεν παράγεται το τοξικό προϊόν του γονιδίου *ccdB*. Αποικίες αναπτύσσονται γίνεται έλεγχος της διπλής ένθεσης στα πλασμίδια με αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές εκατέρωθεν της κάθε ένθεσης. Ο κλώνοι που σχηματίστηκαν ονομάζονται pH7-Par1, pH7-Par2 και pH7-Par3.

Ο κατασκευές pH7-Par1, pH7-Par2 και pH7-Par3 χρησιμοποιούνται για το μετασχηματισμό κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* AGL1.

B.9.2. Μετασηματισμός υποκοτυλίων *Lotus japonicus* μέσω *Agrobacterium tumefaciens*.

Η δημιουργία μετασηματισμένων φυτών *L. japonicus* με σκοπό την σίγηση των παρβουλινών έγινε με βάση την τεχνική που αναπτύχθηκε από τους Handberg and Stougaard 1992, και Lombardi *et al.*, 2003. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τέσσερις μετασηματισμοί ένας για κάθε μια παρβουλίνη και ένας με άδειο τον φορέα. Η διαδικασία για τον κάθε ένα μετασηματισμό περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

B.9.2.1. Βλάστηση σπόρων.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε βλάστηση περίπου 250 σπερμάτων του *L. japonicus* σύμφωνα με την παράγραφο B.1.3. Τα προς βλάστηση σπέρματα τοποθετούνται σε σκοτεινό μέρος στους 22°C για 5 μέρες, στη συνέχεια μεταφέρονται σε θάλαμο με συνεχές φως για άλλες 2 μέρες ώστε να επιμηκυνθούν περαιτέρω τα υποκοτύλια.

B.9.2.2. Μόλυνση υποκοτυλίων του *L. japonicus* με *A. tumefaciens* AGL1.

Για την μόλυνση των υποκοτυλίων κύτταρα *A. tumefaciens* AGL1, μετασηματισμένα με την κατάλληλη πλασμιδιακή κατασκευή σίγησης pH7-Par ή με τον φορέα pH7GWIWG2(I) αναπτύσσονται σε τρυβλία TY παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών, για 2 με 3 μέρες στους 28°C. Η καλλιέργεια των αγροβακτηρίων θα πρέπει να έχει αναπτυχθεί πολύ καλά και να είναι έτοιμη την ημέρα του μετασηματισμού. Για κάθε μετασηματισμό χρειάζονται περίπου 3 με 4 τρυβλία.

Την ημέρα του μετασηματισμού η καλλιέργεια των βακτηρίων μεταφέρεται με αποστειρωμένη σπάτουλα σε 10 ml TY και επαναδιαλύεται σε τέτοια πυκνότητα ώστε να υπάρχουν περίπου 5×10^9 κύτταρα/ml και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή σε θάλαμο νηματικής ροής όπως και τα υπόλοιπα στάδια του μετασηματισμού.

Στη συνέχεια ετοιμάζονται τα τρυβλία όπου θα γίνει η ταυτόχρονη καλλιέργεια των βακτηρίων και των υποκοτυλίων. Η συγκαλλιέργεια αγροβακτηρίων με τα υποκοτύλια γίνεται σε τρυβλία με διηθητικό χαρτί που προηγουμένως έχει αποστειρωθεί. Έτσι αρκετά φύλλα διηθητικού χαρτιού (έως περίπου 5 cm πάχος) τοποθετούνται σε τρυβλία και εμβαπτίζονται καλά με διάλυμα συγκαλλιέργειας (1/10 δυναμικότητας υγρού θρεπτικού Gamborg's B5 παρουσία βιταμινών pH 5,7, 0,5 mg/l 6- βενζυλαμινοπουρίνη (BA), 0,05 mg/l 1-ναφθλινοξικό οξύ (NAA)). Τα τρυβλία αυτά θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια.

Σε νέο τρυβλίο τοποθετούνται 2-3 φύλλα αποστειρωμένου διηθητικού χαρτιού και εμβαπτίζονται με την καλλιέργεια των βακτηρίων. Μερικά από τα έκφυτα, 4 με 5, μεταφέρονται στο τρυβλίο με το διηθητικό χαρτί και την καλλιέργεια βακτηρίων και με τη βοήθεια ξυραφιού και λαβίδας, που έχουν προηγουμένως αποστειρωθεί, απομακρύνεται η ρίζα και το τμήμα του φυτού ακριβώς κάτω από τις κοτυληδόνες. Στη συνέχεια τα υποκοτύλια κόβονται σε κομμάτια μεγέθους 2-3 mm φροντίζοντας η επιφάνεια κοπής να είναι όσο το δυνατό μεγαλύτερη. Τα τμήματα των κομμένων υποκοτυλίων τοποθετούνται στα τρυβλία της συγκαλλιέργειας έχοντας απόσταση περίπου 1 cm το ένα από το άλλο. Τέλος, τα τρυβλία σφραγίζονται με πάραφιλμ, στο οποίο ανοίγονται μερικές τρύπες και μεταφέρονται σε σκοτεινό θάλαμο για 7 μέρες στους 18°C.

Μετά τις 7 μέρες το πρώτο διηθητικό χαρτί μαζί με τα υποκοτύλια μεταφέρεται προσεκτικά σε τρυβλία που έχουν θρεπτικό επαγωγής κάλλου (Callus Inducing Medium,

CIM) (Gamborg's B5 παρουσία βιταμινών, 5 mM MES pH 5,7, 0,5 mg/l BA, 0,05 mg/l NAA, 2% σακχαρόζη, 0,3% Phytigel). Στο CIM είναι ιδιαίτερα σημαντικός ο λόγος των ορμονών αυξίνης προς κυτοκίνη για την επαγωγή του κάλλου. Ταυτόχρονα, σε αυτό το στάδιο στο CIM είναι απαραίτητη η παρουσία του αντιβιοτικού κεφοταξίμη (300 mg/l) για την απομάκρυνση του αγροβακτηρίου. Τα τρυβλία με τα υποκοτύλια μεταφέρονται σε συνεχές φως για 5 μέρες στους 22 °C.

B.9.2.3. Επαγωγή κάλλου.

Η επαγωγή του κάλλου συνεχίζεται για τις επόμενες 5-6 εβδομάδες. Στο διάστημα αυτό τα υποκοτύλια μεταφέρονται μία φορά κάθε εβδομάδα σε νέα τρυβλία CIM με κεφοταξίμη (300 mg/l) αλλά και με το αντιβιοτικό υγρομυκίνη (15 mg/l) για την επιλογή των μετασηματισμένων κάλλων. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε συνεχές φως στους 22°C. Μετά από μια με δύο εβδομάδες διακρίνονται μικρές πράσινες δομές κυρίως στα άκρα των υποκοτυλίων ή σε περιοχές που έχουν τραυματιστεί. Όταν οι πράσινοι κάλλοι αποκτήσουν διάμετρο μερικών χιλιοστών απομακρύνονται από τα νεκρά υποκοτύλια και αναπτύσσονται ξεχωριστά.

B.9.2.4. Επαγωγή και ανάπτυξη βλαστού.

Μετά από αρκετές ανακαλλιέργειες και όταν οι κάλλοι αναπτυχθούν αρκετά, έχοντας διάμετρο 0,5–1 cm μπορούν να μεταφερθούν σε τρυβλία με θρεπτικό επαγωγής βλαστού SIM (Shoot Inducing Medium) (Gamborg's B5 παρουσία βιταμινών, 5 mM MES pH 5,7, 0.2 mg/l BA, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 2% σακχαρόζη, 0,3% Phytigel, 300 mg/l κεφοταξίμη, 15 mg/l υγρομυκίνη). Σε αυτό το θρεπτικό ο λόγος κυτοκίνης προς αυξίνης είναι σχετικά μεγάλος και προωθείται ο σχηματισμός βλαστού. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η προσθήκη αμμωνιακών ωθεί προς αυτήν την κατεύθυνση τους κάλλους του *L. jaronicus*. Και σε αυτό το στάδιο είναι απαραίτητη η μεταφορά των κάλλων σε φρέσκο SIM. Κατά τη μεταφορά και απομακρύνονται καφέ και κίτρινες περιοχές που αντιστοιχούν σε νεκρό ιστό. Δομές βλαστού θα αρχίσουν να σχηματίζονται μετά από περίπου 6-7 εβδομάδες, στη ζώνη σκούρου πράσινου χρώματος περιμετρικά του κάλλου.

Μετά την επαγωγή βλαστού, ο κάλλος μεταφέρεται σε θρεπτικό SGM (Shoot Growth Medium) (Gamborg's B5 παρουσία βιταμινών, 5 mM MES pH 5,7, 0.2 mg/l BA, 2% σακχαρόζη, 0,3% Phytigel, 300 mg/l κεφοταξίμη, 15 mg/l υγρομυκίνη) για την ανάπτυξη του βλαστού με αντιβιοτικό επιλογής για περίπου τρεις εβδομάδες. Κάθε εβδομάδα οι αναπτυσσόμενοι βλαστοί τοποθετούνται σε νέο θρεπτικό SGM. Όταν σχηματισθεί κατάλληλη δομή βλαστού, τοποθετείται σε θρεπτικό SEM (Shoot Elongation Medium) (Gamborg's B5 παρουσία βιταμινών, 5 mM MES pH 5,7, 2% σακχαρόζη, 0,3% Phytigel) για την επιμήκυνση του βλαστού.

B.9.2.5. Επαγωγή και ανάπτυξη ρίζας.

Καλά ανεπτυγμένοι βλαστοί (ύψους περίπου 2 cm) μεταφέρονται σε δοχεία ιστοκαλλιέργειας με θρεπτικό RIM (Root Inducing Medium) (1/2 δυναμικότητας θρεπτικό Gamborg's B5 παρουσία βιταμινών, 5 mM MES pH 5,7, 0.5 mg/l NAA, 1% σακχαρόζη, 0,6% Phytigel) για 7 με 10 μέρες. Στο θρεπτικό RIM ο σχετικός λόγος αυξίνης προς κυτοκίνη είναι μεγαλύτερος και υποστηρίζεται η δημιουργία κάλλου και η διαφοροποίηση της ρίζας. Έτσι αρχικά στη βάση του βλαστού σχηματίζεται ένας μικρός λευκός κάλος από όπου θα

εκπτυχθούν ρίζες. Όταν εμφανιστούν οι πρώτες ρίζες τα νεαρά φυτά μεταφέρονται σε δοχεία ιστοκαλλιέργειας με θρεπτικό REM (Root Elongation Medium) (1/2 δυναμικότητας θρεπτικό Gamborg's B5 παρουσία βιταμινών, 5 mM MES pH 5,7, 1% σακχαρόζη, 0,6% Phytigel) για 3 με 4 εβδομάδες. Όταν η ρίζα αναπτυχθεί αρκετά τα φυτά μεταφέρονται σε θήκη σποράς με τύρφη και περλίτη σε αναλογία 1/1. Τα φυτά αναπτύσσονται για την παραγωγή σπόρων όπως αναφέρεται στην παράγραφο B.1.4.

B.10. Εύρεση αλληλεπιδράσεων μεταξύ της *MIPar1* (mII3467) και ολικών πρωτεϊνών από το *Mesorhizobium loti*.

Για τον εντοπισμό πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την παρβουλίνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mII3467* του *M. loti* MAFF303099 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συν-καθίζησης. Κατά τη διαδικασία αυτή αρχικά πραγματοποιείται ετερόλογη έκφραση της *MIPar1* με επιτόπιο τη μεταφοράση της γλουταθειόνης (GST) και προσρόφησης της σε στήλη χρωματογραφίας με ακινητοποιημένη γλουταθειόνη, στη συνέχεια γίνεται ανάμειξη της στήλης με ολικές διαλυτές πρωτεΐνες από το *M. loti*. Για την ανάμειξη της στήλης με τις διαλυτές πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα που είχαν διαφορετική ιοντική ισχύ (50 mM, 100 mM και 200 mM NaCl) ενώ διέφεραν και στην παρουσία ή όχι ATP.

B.10.1. Έκφραση και προσρόφηση της ανασυνδυασμένης παρβουλίνης του *M. loti* με επιτόπιο τη μεταφοράση της γλουταθειόνης.

Η έκφραση και απομόνωση της ανασυνδυασμένης παρβουλίνης του *M. loti* έγινε με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένη γλουταθειόνη (Pierce Immobilized Glutathione, Thermo Scientific). Η παρβουλίνη βρίσκεται κλωνοποιημένη στον φορέα έκφρασης pGEX-2T που οδηγεί στην έκφραση της μεταφοράσης της γλουταθειόνης (GST) στο άμινο τελικό άκρο της *MIPar1*. Η έκφραση των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων γίνεται σε *E. coli* στέλεχος BL21.

Για την έκφραση και απομόνωση της ανασυνδυασμένης παρβουλίνης 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB με 100 µg/ml αμπικιλίνη εμβολιάζονται με μια αποικία μετασηματισμένων *E. coli* στέλεχος BL21 με τον ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης και επωάζονται για περίπου 16 ώρες στους 37°C, με συνεχή ανακίνηση. 1,25 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 30 ml διαλύματος LB (αμπικιλίνη 100 µg/ml). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C, έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι O.D.₆₀₀: 0,6 όπου και προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 25°C για άλλες 5 ώρες. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4.000 Σ.Ε. για 20 λεπτά στους 4°C και επαναδιαλύονται με 500 µl διαλύματος Dulbecco's PBS (8 mM Na₂HPO₄·2 H₂O, 2 mM KH₂PO₄, 0,14 M NaCl, 10 mM KCl, pH 7.4). Μετά ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπέρηχους (6 φορές για 10sec στα 200-300Watt με ενδιάμεση παύση 10 sec). Τα θραύσματα των κυττάρων απομακρύνονται με φυγοκέντρηση στις 10.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά, στους 4°C, το υπερκείμενο συλλέγεται. 100 µl από της διαλυτές πρωτεΐνες αναμειγνύεται με 50 µl 50% εξισορροπημένης στήλης γλουταθειόνης. Η αναλογία διαλυτών πρωτεϊνών προς τη στήλη γλουταθειόνης είναι τέτοια ώστε η στήλη να κορεστεί με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Το μείγμα επωάζεται υπό συνεχή ήπια ανακίνηση στους 4°C για 30 λεπτά. Η στήλη φυγοκεντρείται στις 1700 σ.α.λ. για 5 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf. Ακολουθεί καθαρισμός της στήλης με 150 µl Dulbecco's PBS και φυγοκέντρηση στις 1700 σ.α.λ. για 2 λεπτά στους 4°C. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται τρεις φορές με την τελευταία φυγοκέντρηση να διαρκεί 5 λεπτά. Στο τέλος κάθε σταδίου συλλέγονται δείγματα για ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

B.10.2. Απομόνωση ολικών διαλυτών πρωτεϊνών από το *Mesorhizobium loti*.

Καλλιέργεια κυττάρων *M. loti* χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 30 ml θρεπτικού διαλύματος YMB και επωάζονται για περίπου 48 ώρες στους 30°C με συνεχή ανακίνηση. Κλάσμα της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 250 ml YMB, η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 30°C με συνεχή ανάδευση έως ότου O.D.₆₀₀: 1. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα φυλάσσονται στον πάγο. Ακολουθεί επαναδύαση των κυττάρων σε 10 ml διαλύματος 150 mM NaCl και συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 4.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά στους 4°C, απομάκρυνση του υπερκειμένου και επανάληψη της επαναδύασης σε 150 mM NaCl και συλλογής των κυττάρων. Τελικά τα κύτταρα επαναδυσούνται σε 2 ml διαλύματος TE και συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4700 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C. Τα κύτταρα επαναδυσούνται σε 1 ml διαλύματος αλληλεπίδρασης (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, 0.5% NP-40 και 50 mM ή 100 mM ή 200 mM NaCl), επίσης προστίθεται βενζαμιδίνη και PMSF σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπέρηχους (4 φορές για 10sec στα 200-300 Watt με ενδιάμεση παύση 10 sec). Τα κυτταρικά θραύσματα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά, στους 4°C και το υπερκείμενο που περιέχει τις ολικές διαλυτές πρωτεΐνες συλλέγεται προσεκτικά.

B.10.3. Απομόνωση πρωτεϊνών του *Mesorhizobium loti* που πιθανά αλληλεπιδρούν με την *MIPar1*.

Για τον εντοπισμό πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με την *MIPar1* 200 μl ολικών πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από το *M. loti* αναμείχτηκαν με την στήλη γλουταθειόνης στην οποία έχει γίνει προσρόφηση της *MIPar1* που φέρει το επιτόπιο της GST. Παράλληλα, η ίδια διαδικασία ακολουθείται και με στήλη γλουταθειόνης στην οποία έχει γίνει προσρόφηση μόνο της GST. Συνολικά, για κάθε πρωτεΐνη (GST-*MIPar1* ή GST), πραγματοποιήθηκαν έξι διαφορετικοί χειρισμοί, που διέφεραν στην ιοντική ισχύ του διαλύματος αλληλεπίδρασης (50, 100 και 200 mM NaCl) και στην παρουσία ή όχι ATP. Η ανάμειξη των ολικών πρωτεϊνών του *M. loti* με τις προσροφημένες πρωτεΐνες πραγματοποιήθηκε αρχικά στους 4°C για μία ώρα και στη συνέχεια για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1700 σ.α.λ. για 2 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και φυλάσσεται. Σε κάθε στήλη προστίθενται 50 μl διαλύματος έκλουσης με γλουταθειόνη (50 mM Tris, pH 8.0, 10 mM ανηγμένη γλουταθειόνη), το μείγμα αναδεύεται ήπια για 5 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1700 σ.α.λ. για 2 λεπτά στους 4°C και συλλέγεται το υπερκείμενο. Συνολικά πραγματοποιούνται τέσσερις εκλούσεις. Τμήμα των εκλοσεων αναλύθηκε σε ηχηρή πολυακρυλαμίδης.

Τα προϊόντα της έκλουσης αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (LC-MS-MS) η οποία πραγματοποιήθηκε στον τομέα Βιοτεχνολογίας του κέντρου βασικής έρευνας II, του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Γ. Αποτελέσματα

Γ.1. Οι παρβουλίνες στους φυτικούς οργανισμούς.

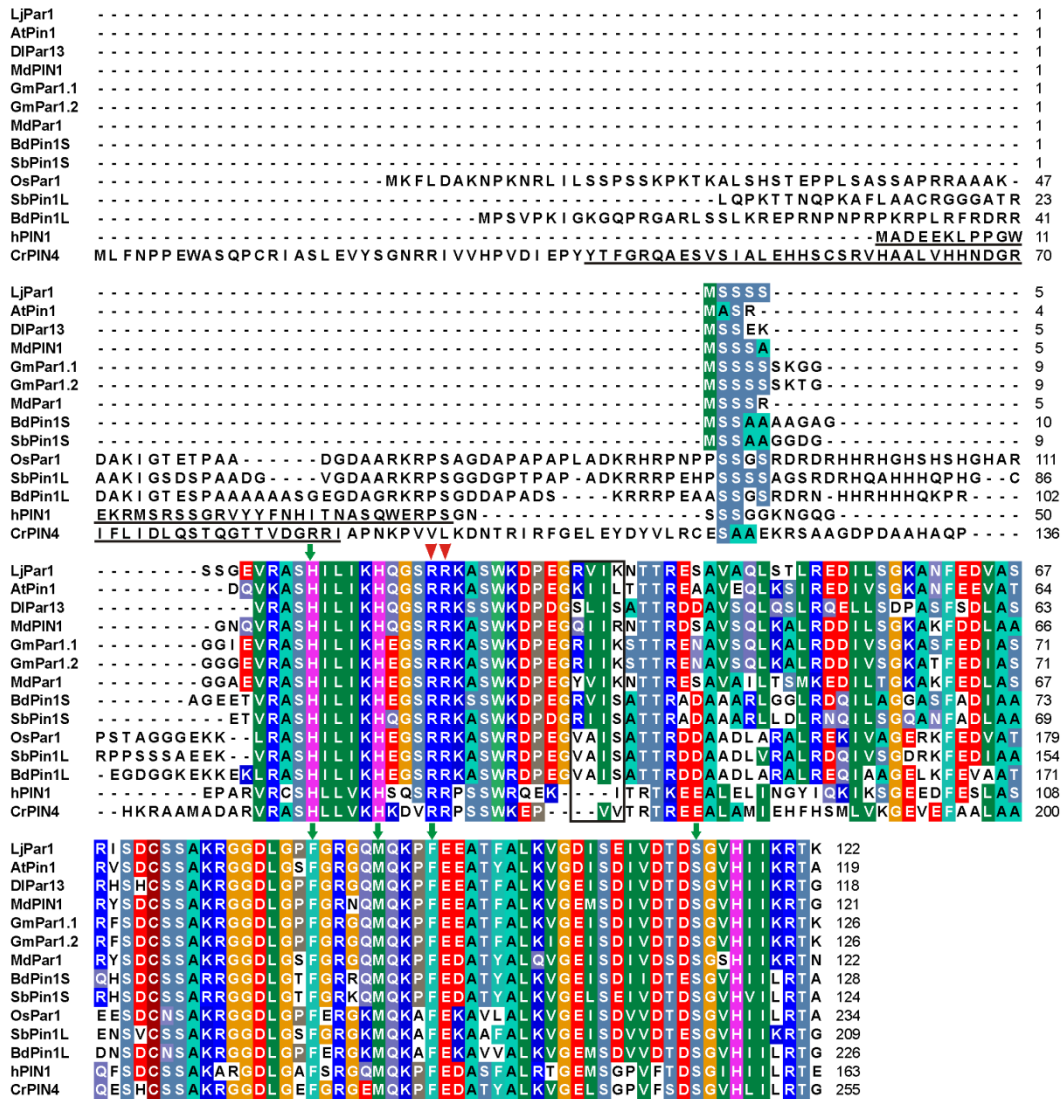
Παρόλο που οι παρβουλίνες αποτελούν τη μικρότερη οικογένεια των ΡΡΙΑσών παρουσιάζουν ιδιαίτερα μεγάλο ενδιαφέρον καθώς μέλη τους συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Τα περισσότερα δεδομένα που έχουμε για τη λειτουργία και τη δράση τους προέρχονται κυρίως από τον ανθρώπινο οργανισμό και τις ζύμες. Αντίστοιχα, οι γνώσεις που έχουμε για τη λειτουργία τους στους φυτικούς οργανισμούς περιορίζονται κυρίως γύρω από τις παρβουλίνες τύπου PIN, δηλαδή παρβουλίνες που προτιμούν υποστρώματα που φέρουν φωσφορυλιωμένη σερίνη ή θρεονίνη στον προλυλ-δεσμό. Σκοπός της μελέτης αυτής είναι η απομόνωση και διερεύνηση του ρόλου των διαφορετικών παρβουλινών που εντοπίζονται στο ψυχανθές *Lotus japonicus*.

Στα διάφορα φυτικά είδη ο αριθμός των κυκλοφιλινών και των FKBP's είναι σχετικά υψηλός, αντίθετα αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων των γονιδιωμάτων φυτών έδειξε ότι σε αυτά εντοπίζονται τουλάχιστον τρία γονίδια που πιθανά κωδικοποιούν για παρβουλίνες. Οι παρβουλίνες αυτές μπορούν να διαχωριστούν βάση της ομολογίας τους με τις παρβουλίνες που έχουν μελετηθεί σε άλλους οργανισμούς. Το ένα γονίδιο αφορά παρβουλίνες τύπου PIN, δηλαδή παρβουλίνες που παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά ομολογίας με την *hPIN1* από τον άνθρωπο. Το δεύτερο γονίδιο αφορά παρβουλίνες που παρουσιάζουν κάποια χαρακτηριστικά κοινά με την *hPar14* από τον άνθρωπο. Τέλος, η τρίτη που εντοπίζεται κυρίως στους φυτικούς οργανισμούς, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομολογία με την *EcPar10*, ενώ επιπλέον της δομικής περιοχής ΡΡΙΑσης φέρει μια δομική περιοχή ροδανάσης (θειομεταφοράσης) καθώς και ένα πεπτίδιο οδηγό για τον χλωροπλάστη.

Γ.1.1. Οι παρβουλίνες τύπου PIN στα φυτά.

Με οδηγό την αλληλουχία της *AtPIN1* από το *Arabidopsis* εντοπίστηκαν παρβουλίνες τύπου PIN σε σχεδόν όλα τα φυτικά είδη. Στο γονιδίωμα του *L. japonicus* εντοπίζεται ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μια παρβουλίνη τύπου PIN1, την *LjPar1* που αποτελείται από 122 αμινοξέα, με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 13.2 kDa και θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο pI 9.46. Στα περισσότερα φυτικά είδη εντοπίζεται ένα μόνο γονίδιο που κωδικοποιεί για παρβουλίνες τύπου PIN ενώ σε κάποια είδη όπως η *Glycine max* ή μερικά μονοκότυλα εντοπίζονται δύο (Εικόνα Γ.1).

Ανάλυση των παρβουλινών τύπου PIN στα διάφορα είδη έδειξε κάποιες διαφορές μεταξύ τους. Η πιο σημαντική από αυτές είναι η απουσία της WW δομικής περιοχής στις φυτικές παρβουλίνες. Σε καμία από τις φυτικές παρβουλίνες που εντοπίστηκαν δεν βρέθηκε κάποια άμινο τελική προέκταση που να έχει τα χαρακτηριστικά της WW δομικής περιοχής. Μια φυτική παρβουλίνη, που πιθανά είναι τύπου PIN και έχει μια επιπλέον δομική περιοχή είναι η *CrPIN4* από το *Chlamydomonas reinhardtii* που στο άμινο τελικό της έχει μια περιοχή FHA (ForkHead Associated domain) μήκους περίπου 100 αμινοξέων. Οι περιοχές FHA έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με τη μεταγωγή πυρηνικών σημάτων όπως και με την αναγνώριση φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων (Durocher and Jackson, 2002).



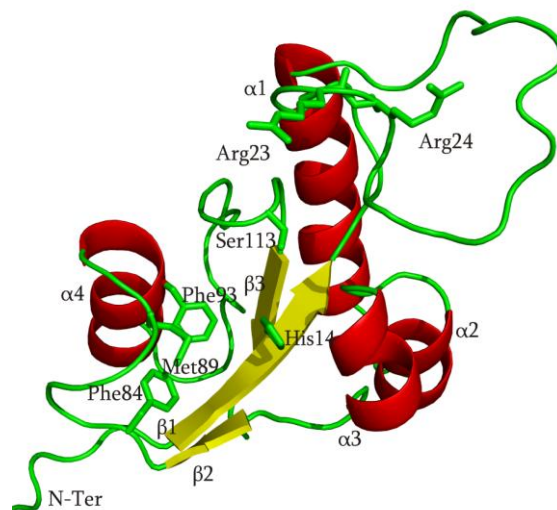
Εικόνα Γ.1: Πολλαπλή ευθυγράμμιση παρβουλινών τύπου PIN από φυτικούς οργανισμούς. Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν είναι η AtPIN1 από το *Arabidopsis* (Q9SL42), η DfPar13 από το *D. lanata* (Q9LEK8), η MdPIN1 από το *M. domestica* (Q94G00), οι GmPar1.1 (I1MN74) και GmPar1.2 (I1JC17) από την *Glycine max*, η MtPar1 (Medtr8g076070.1) από τη *Medicago truncatula*, οι BdPin1S (I1IVR5) και BdPin1L (XP_003579437.1) από το *Brachypodium distachyon*, οι SbPin1S (C5YBR7) και SbPin1L (C5Y9Y9) από το *Sorghum bicolor*, η OsPar1 (LOC_Os04g56800.1) από το ρύζι, η hPIN1 από τον άνθρωπο (Q13526) και η CrPIN4 (A8J3E3) από το *Chlamydomonas reinhardtii*. Τα βέλη δείχνουν τα αμινοξέα που είναι σημαντικά για την ενζυμική κατάλυση, τα τρίγωνα δείχνουν τα αμινοξέα που είναι υπεύθυνα για την εξειδίκευση υποστρώματος. Το ορθογώνιο πλαίσιο περικλείει τα τέσσερα αμινοξέα του βρόγχου β1/α1 που εντοπίζονται μόνο στους φυτικούς οργανισμούς. Η WW δομική περιοχή της hPIN1 και η FHA περιοχή της CrPIN4 είναι υπογραμμισμένες.

Η ομολογία της δομικής περιοχής ΡΡ1άσης μεταξύ των διαφόρων φυτικών παρβουλινών τύπου PIN είναι αρκετά υψηλή για παράδειγμα κυμαίνεται από 63.8% μεταξύ της LjPar1 και BdPin1L από το *Brachypodium distachyon* έως και 86.2% μεταξύ LjPar1 και GmPar1.1 από τη σόγια. Παράλληλα ενδιαφέρον είναι και το γεγονός ότι ενώ οι δύο παρβουλίνες τύπου PIN που εντοπίζονται στη σόγια παρουσιάζουν 96% ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους δεν ισχύει το ίδιο για αυτές των μονοκότυλων. Έτσι στις δύο παρβουλίνες

SbPin1S και *SbPin1L* τύπου PIN που εντοπίζονται στο *Sorghum bicolor* η μεταξύ τους ομολογία στην περιοχή ΡΡιάσης είναι 67% ενώ διαφέρουν στο μέγεθος κατά 85 αμινοξέα. Η προέκταση αυτή στο άμινο τελικό άκρο της *SbPin1L*, καθώς και οι προεκτάσεις ομολόγων της σε άλλα είδη δεν παρουσιάζουν ομολογία με κάποια γνωστή δομική ενότητα. Η ομολογία της αμινο τελικής προέκτασης ανάμεσα σε διαφορετικά είδη κυμαίνεται από 33% έως 40%. Η αμινο τελική προέκταση των περίπου 100 αμινοξέων που εντοπίζεται σε μερικές φυτικές παρβουλίνες τύπου PIN δεν φέρει κάποιο χαρακτηριστικό WW ή FHA δομικών περιοχών.

Από την ανάλυση της τριτοταγούς δομής των παρβουλινών τύπου PIN προκύπτει ότι ένα σημαντικό κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία ενός εκτεταμένου βρόγχου μεταξύ του πρώτου β-κλώνου και της πρώτης έλικας ($\beta 1/\alpha 1$). Ο βρόγχος αυτός φαίνεται να εκτείνεται πάνω από το ενεργό κέντρο του ενζύμου ενώ παράλληλα στην περιοχή αυτή εντοπίζονται δύο συντηρημένες αργινίνες οι οποίες σχετίζονται με την εξειδίκευση υποστρώματος. Παράλληλα, σε όλες τις φυτικές παρβουλίνες στον βρόγχο $\beta 1/\alpha 1$ εντοπίζεται και μια περιοχή των τεσσάρων αμινοξέων που έχει προταθεί ότι ίσως υποκαθιστά την WW δομική περιοχή στον προσδιορισμό του κατάλληλου υποστρώματος (Yao *et al.*, 2001).

Για την πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της *LjPar1* χρησιμοποιήθηκε ο διακομιστής Phyre2 (Kelley and Sternberg, 2009). Η πρόβλεψη της δομής βασίστηκε στη δομή της *AtPIN1* από το *Arabidopsis* (PDB ID: 1J6Y). Το μοντέλο της *LjPar1* που προέκυψε παρουσιάζεται στην Εικόνα Γ.2 και αποτελείται από 3 β-κλώνους που περικλείονται από 4 α -έλικες.



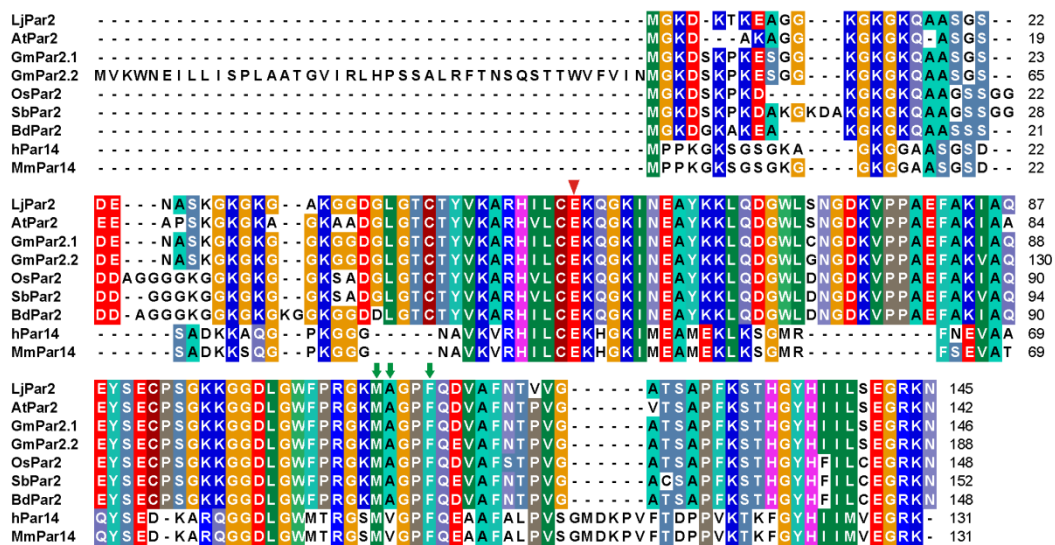
Εικόνα Γ.2: Αναπαράσταση της τριτοταγούς δομής της *LjPar1*, όπως προέκυψε μετά την πρόβλεψή της μέσω του Phyre2. Διακρίνονται οι πλευρικές ομάδες των καταλοίπων που πιθανά συμμετέχουν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου καθώς και τα κατάλοιπα που εμπλέκονται στην αναγνώριση υποστρώματος. Η αναπαράσταση της δομής έγινε μέσω του εφαρμογής PyMOL.

Το ενεργό κέντρο της *LjPar1*, σε αντιστοιχία με αυτό της *AtPIN1*, απαρτίζεται από δύο διακριτές περιοχές. Η πρώτη αφορά την περιοχή αναγνώρισης αρνητικά φορτισμένων υποστρωμάτων που εντοπίζεται στον εκτεταμένο βρόγχο $\beta 1/\alpha 1$ και περιλαμβάνει τα κατάλοιπα Arg23 και Arg24. Η δεύτερη αφορά την υδρόφοβη κοιλότητα που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Phe84, Met89 και Phe93 και αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης της

προλίνης. Τέλος, συντηρημένα είναι και τα κατάλοιπα His14 και Ser113 που βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και πιθανά εμπλέκονται στον μηχανισμό κατάλυσης.

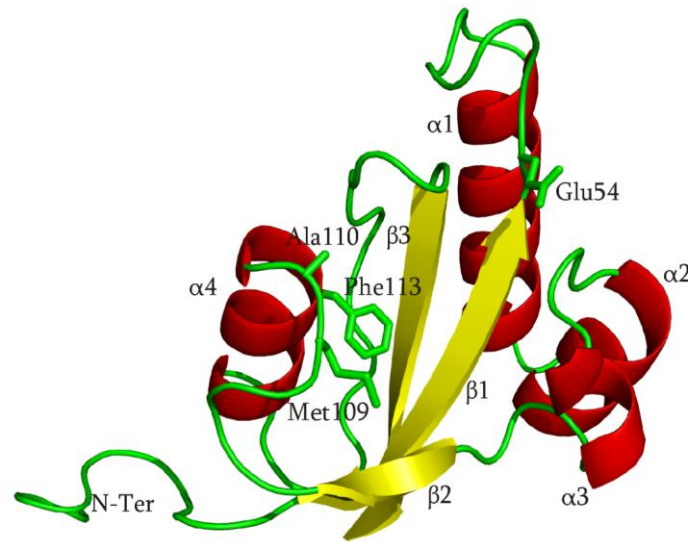
Γ.1.2. Οι παρβουλίνες τύπου Par2 στα φυτά.

Η δεύτερη ομάδα παρβουλινών στους φυτικούς οργανισμούς αφορά πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομολογία με την *hPar14* από ότι με την *hPin1* από τον άνθρωπο. Στο *L. jaronicus* εντοπίζεται μια παρβουλίνη αυτού του τύπου η *LjPar2*, που έχει μέγεθος 145 αμινοξέα με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 15.2 kDa και θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο pI 9.54. Οι παρβουλίνες αυτού του τύπου έχουν στο άμινο τελικό τους άκρο μια προέκταση περίπου 50 αμινοξέων. Η προέκταση αυτή δεν παρουσιάζει κάποια συγκεκριμένη δομή ενώ, όπως η προέκταση της *hPar14*, είναι πλούσια σε βασικά αμινοξέα (Εικόνα Γ.3).



Εικόνα Γ.3: Πολλαπλή ευθυγράμμιση παρβουλινών τύπου Par2 από φυτικούς οργανισμούς. Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν είναι η *AtPIN2* από το *Arabidopsis* (At1g26550), οι *GmPar2.1* (Glyma04g33180) και *GmPar2.2* (Glyma06g21080) από την *G. max*, η *OsPar2* (LOC_Os09g24540) από το ρύζι, η *SbPar2* (Sb02g024520) από το *S. bicolor*, η *BdPar2* (XP_003578104) από το *B. distachyon*, η *hPar14* (Q9Y237) από τον άνθρωπο και η *MmPar14* (Q9CWW16) από το ποντίκι.

Παράλληλα έγινε πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της *LjPar2* χρησιμοποιώντας τον διακομιστή Phyre2 (Kelley and Sternberg, 2009). Η πρόβλεψη της δομής βασίστηκε κυρίως στη δομή της *hPIN1* από τον άνθρωπο (PDB ID: 1PIN).

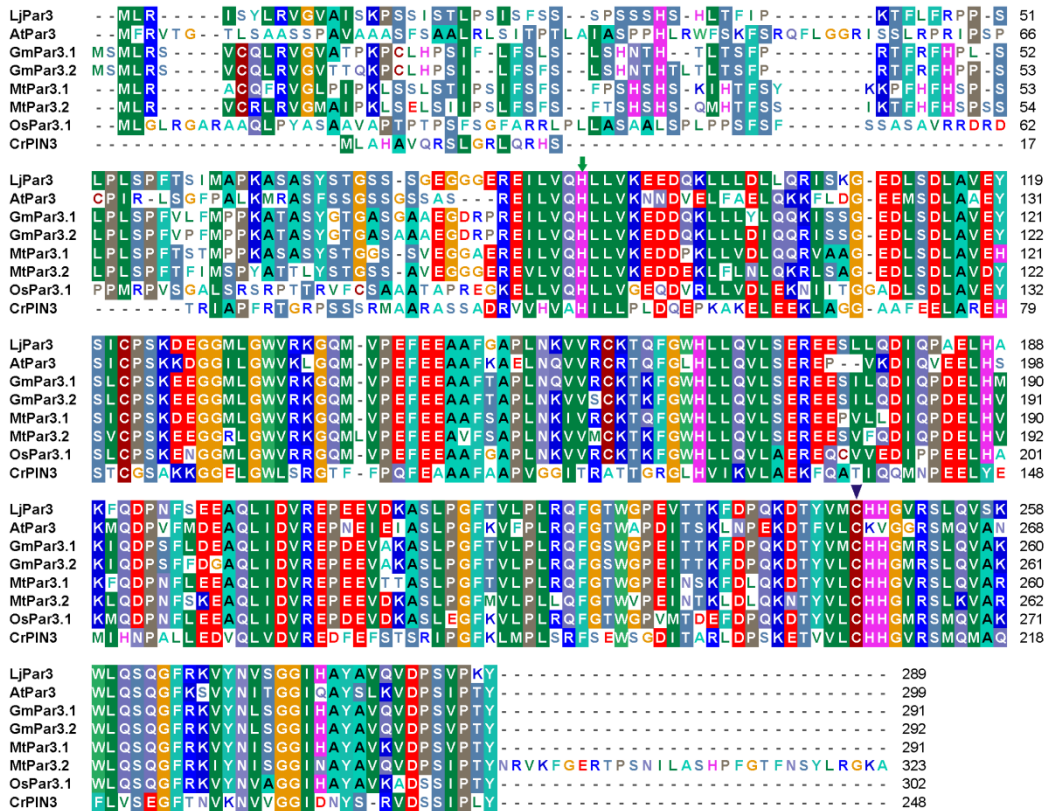


Εικόνα Γ.4: Αναπαράσταση της τριτοταγούς δομής της *LjPar2*, όπως προέκυψε μετά την πρόβλεψη της μέσω του Rhyge2. Διακρίνονται οι πλευρικές ομάδες των καταλοίπων που πιθανά συμμετέχουν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Η *LjPar2*, όπως και η *LjPar1* αποτελείται από 3 β-κλώνους που περικλείονται από 4 α-έλικες (Εικόνα Γ.4). Μια σημαντική διαφορά ανάμεσα στην *LjPar1* και στην *LjPar2* είναι το μήκος του βρόγχου β1/α1 που πιθανά συμμετέχει στην εξειδίκευση υποστρώματος. Στην *LjPar2* ο βρόγχος αυτός είναι μικρότερος σε μήκος και στην θέση των δύο αργινινών βρίσκεται ένα γλουταμινικό οξύ.

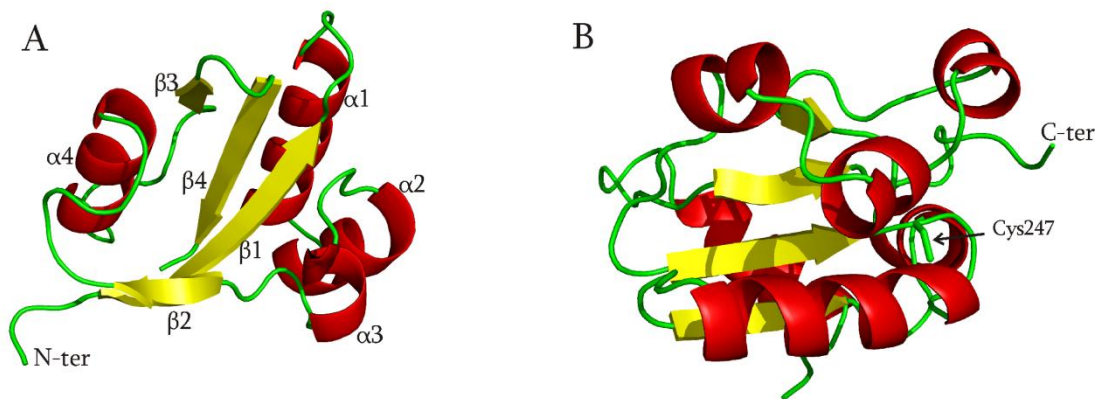
Γ.1.3. Οι παρβουλίνες τύπου Par3 στα φυτά.

Στα φυτά, εκτός από τις δύο προηγούμενες ομάδες παρβουλινών που εντοπίζονται και στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, εντοπίζεται και μια τρίτη ομάδα που φέρει στο καρβόξυ άκρο της μια δομική περιοχή ροδανάσης-θειομεταφοράσης (InterPro no. IPR001763), όπως και ένα πεπτίδιο οδηγό για το χλωροπλάστη. Στο *L. jaronicus* η *LjPar3*, έχει μέγεθος 289 αμινοξέα με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 32 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο pI 6.08. Η περιοχή PPIάσης εκτίνεται στα κατάλοιπα 81 έως 171 ενώ η περιοχή ροδανάσης στα καταλαμβάνει τα κατάλοιπα 195 με 287. Η περιοχή PPIάσης παρουσιάζει ιδιαίτερα χαμηλό ποσοστό ομολογίας με τις *hPIN1* και *hPar14*, ενώ η ομολογία της με την *EcPar10* από το *E. coli* είναι της τάξεως του 30%. Σε αρκετά φυτικά είδη εντοπίζονται περισσότερα από ένα γονίδια που κωδικοποιούν για παρβουλίνες τύπου Par3 (Εικόνα Γ.5). Επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι ενώ κατά κανόνα η συνύπαρξη των δύο αυτών δομικών περιοχών, PPIάσης και ροδανάσης, εντοπίζεται κυρίως στα φυτά πρόσφατα εντοπίστηκε σε ένα βακτήριο (uncultured Desulfobacterales bacterium HF0200_07G10) μια νουκλεοτιδική αλληλουχία που πιθανά κωδικοποιεί για μια τέτοια πρωτεΐνη (Rich *et al.*, 2011).



Εικόνα Γ.5: Πολλαπλή ευθυγράμμιση παρβουλινών τύπου Par3 από φυτικούς οργανισμούς. Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν είναι η *AtPIN3* από το *Arabidopsis* (At5g19370), οι *GmPar3.1* (Glyma14g04000.1) και *GmPar3.2* (Glyma02g44730) από την *G. max*, οι *MtPar3.1* (Medtr5g096430) και *MtPar3.2* (Medtr5g096440) από τη μηδική, η *OsPar3.1* (LOC_Os07g48810) από το ρύζι και η *CrPIN3* από το *C. reinhardtii* (A8IU62).

Η πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της *LjPar3* έγινε χωριστά για κάθε δομική περιοχή αφού μέχρι στιγμής δεν έχει επιλυθεί η δομή κάποιας πρωτεΐνης που να έχει και τις δύο αυτές περιοχές. Η πρόβλεψη των δύο δομών έγινε χρησιμοποιώντας τον διακομιστή Phyre2 (Kelley and Sternberg 2009). Η πρόβλεψη της δομής της δομικής περιοχής ΡΡ1άσης βασίστηκε κυρίως στη δομή της *CaEss1* από την *Candida albicans* (PDB ID: 1YW5), η περιοχή ΡΡ1άσης αποτελείται από 3 β-κλώνους που περικλείονται από 4 α-έλικες (Εικόνα Γ.6Α). Η πρόβλεψη της δομής της δομικής περιοχής ροδανάσης βασίστηκε κυρίως στη δομή της *MOCS3* από τον άνθρωπο (PDB ID: 3I2V), η περιοχή ροδανάσης αποτελείται από 4 β-κλώνους που περικλείονται από 4 α-έλικες (Εικόνα Γ.6Β).



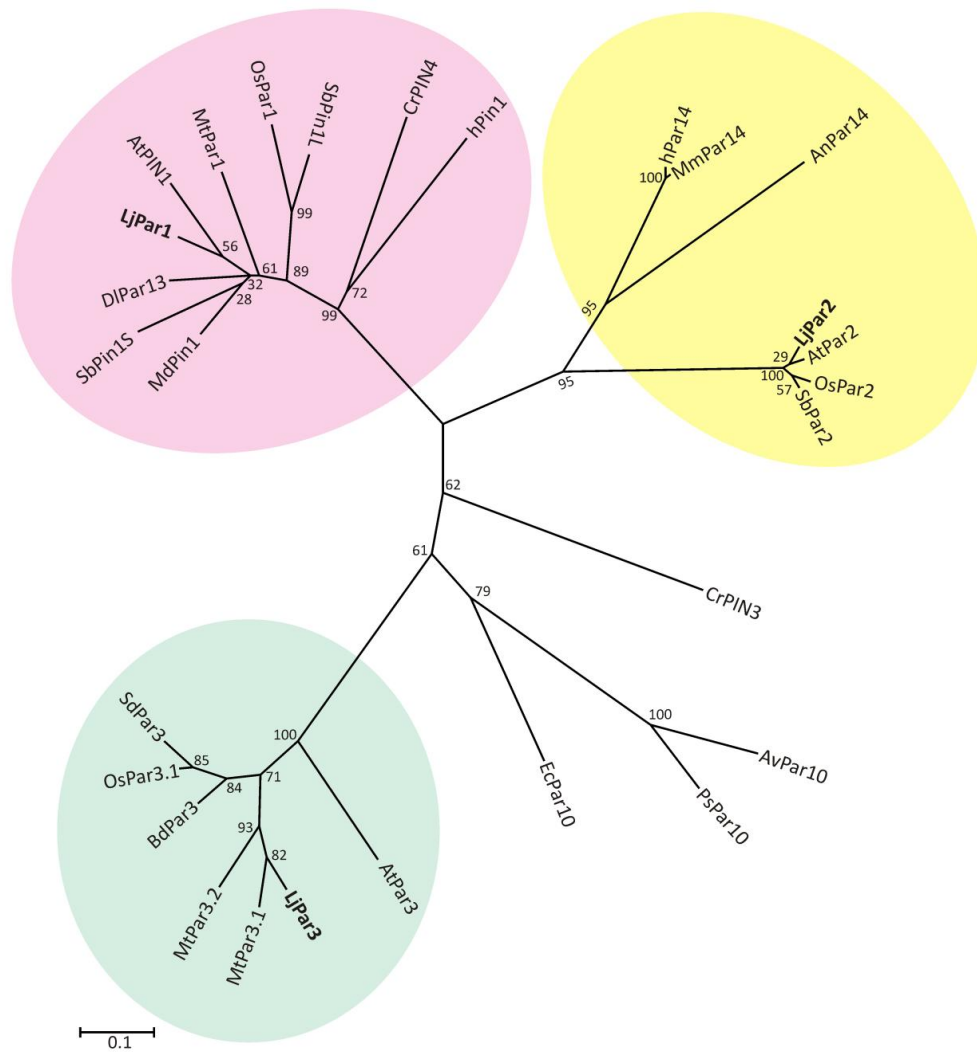
Εικόνα Γ.6: Αναπαράσταση της τριτοταγούς δομής των δομικών περιοχών της *LjPar3* όπως προέκυψε μετά την πρόβλεψή της μέσω του Rhyge2, της ΡΡΐάσης **A**. Η περιοχή ΡΡΐάσης, **B**. Η περιοχή ροδανάσης, διακρίνεται και η πλευρική ομάδα της Cys247 που πιθανά ανήκει στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Ένα κοινό χαρακτηριστικό των δύο διαφορετικών δομικών ενοτήτων της *LjPar3* είναι ότι οι β-κλώνοι βρίσκονται ουσιαστικά περικυκλωμένες από τις α-έλικες αν και στην περιοχή ροδανάσης οι α-έλικες βρίσκονται σε εναλλαγή με τους β-κλώνους. Στην περιοχή ΡΡΐάσης τον πρώτο β-κλώνο τον διαδέχονται οι 4 α-έλικες και στο τέλος σχηματίζονται οι άλλοι δυο β-κλώνοι.

Γ.1.4. Φυλογενετική σχέση των φυτικών παρβουλινών.

Με σκοπό τον εντοπισμό της φυλογενετικής σχέσης των παρβουλινών του *L. jarroñicus* σε σχέση με παρβουλίνες που έχουν μελετηθεί σε άλλους οργανισμούς ή με παρβουλίνες που έχουν χαρακτηριστεί *in silico* κατασκευάστηκε ένα δενδρόγραμμα χρησιμοποιώντας τη δομική περιοχή ΡΡΐάσης. Αρχικά, έγινε ευθυγράμμιση της αμινοξικής περιοχής ΡΡΐάσης των αλληλουχιών με τη μέθοδο ClustalW και στη συνέχεια κατασκευάστηκε το δενδρόγραμμα (Εικόνα Γ.7) με τη μέθοδο Neighbor-Joining μέσω του πακέτου εφαρμογών MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

Από το δενδρόγραμμα προκύπτει ότι οι φυτικές παρβουλίνες κατανέμονται σε τρεις ξεχωριστούς κλάδους. Η *LjPar1* ανήκει στον κλάδο που βρίσκονται οι παρβουλίνες τύπου PIN από φυτά αλλά και ζώα. Η *LjPar2* ανήκει στον ίδιο κλάδο με την *hPar14* ενώ η *LjPar3* βρίσκεται σε έναν τρίτο κλάδο. Ο τελευταίος αυτός κλάδος είναι πιο απομακρυσμένος από τους υπόλοιπους, σχηματίζεται μόνο από παρβουλίνες που εντοπίζονται σε φυτικούς οργανισμούς.



Εικόνα Γ.7: Φυλογενετική σχέση των παρβουλινών του *L. jaronicus* με παρβουλίνες που έχουν μελετηθεί σε άλλους οργανισμούς ή έχουν χαρακτηριστεί *in silico*. Το δενδρόγραμμα κατασκευάστηκε με τη μέθοδο Neighbor-Joining χρησιμοποιώντας το πακέτο εφαρμογών MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011), μετά την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών με τη μέθοδο ClustalW. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν την επί της εκατό πιθανότητα διαχωρισμού των κλάδων όπως προέκυψε από τον έλεγχο πολλαπλών συνδυασμών Bootstrap. Χρησιμοποιήθηκαν οι περιοχές PPIάσης των πρωτεϊνών: LjPar1 (A7DX09), LjPar2 (A7DX10) και LjPar3 (A7DX11) του *L. jaronicus* AtPIN1 (Q9SL42), AtPIN2 (Q9FE18) και AtPIN3 (Q93WI0) του *Arabidopsis*· MdPIN1 (Q94G00) του *M. domestica*· DPar13 (Q9LEK8) του *D. lanata*· MtPar1 (Medtr8g076070), MtPar3.1 (Medtr5g096430) και MtPar3.2 (Medtr5g096440) του *M. truncatula*· BdPar3 (I1GQZ4) του *B. distachyon*· Sbpin1S (C5YBR7), Sbpin1L (C5Y9Y9), SbpPar2 (Sb02g024520) και SbpPar3 (Sb02g043490) του *S. bicolor*· OsPar1 (LOC_Os04g56800.1), OsPar2 (LOC_Os09g24540) και OsPar3.1 (LOC_Os07g48810) του *O. sativa*· CrPIN4 (A8J3E3) και CrPIN3 (A8IU62) του *C. reinhardtii*· hPIN1 (Q13526) και hPar14 (Q9Y237) του ανθρώπου· MmPar14 (Q9CWW16) του *Mus musculus*· AvPar10 (C1DLY0) του *Azotobacter vinelandii*· PsPar10 (A4VLL5) του *Pseudomonas stutzeri*· EcPar10 (POA9L5) του *E. coli*.

Γ.2. Μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας των παρβουλινών του *Lotus japonicus*.

Μετά τον εντοπισμό των παρβουλινών στο γονιδίωμα του *L. japonicus*, προχωρήσαμε στην μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας ΡΡΙΑσης. Αρχικά έγινε απομόνωση των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων των παρβουλινών ύστερα από έκφρασή τους σε *E. coli*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια έκφρασης pQ-LjPar1, pQ-LjPar2 και pQ-LjPar3 στα οποία έχει γίνει κλωνοποίηση των κωδικών περιοχών των παρβουλινών στο φορέα pQE30 (Qiagen). Ο καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων έγινε με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη αγαρόζης που φέρει ακινητοποιημένα μεταλλικά ιόντα νικελίου (Ni-NTA Agarose, QIAGEN). Η δραστηριότητα ΡΡΙΑσης των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων μελετήθηκε έναντι δύο συνθετικών τετραπεπτιδίων που στη θέση πριν την προλίνη βρίσκονται το αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ γλουταμινικό και το θετικά φορτισμένο αργινίνη.

Η μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας των παρβουλινών έναντι των συνθετικών τετραπεπτιδίων που περιέχουν προλίνη στηρίχθηκε στη μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Fischer *et al.*, 1984 και βασίζεται στην ιδιότητα της α-χυμοθρυψίνης να διασπά το τετραπεπτιδίδιο όταν ο δεσμός προλίνης βρίσκεται στην *trans* διαμόρφωση με αποτέλεσμα την απελευθέρωση χρωμοφόρου που βρίσκεται στο καρβόξυ άκρο του τετραπεπτιδίου. Καθώς η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας περιλαμβάνει τη χρήση της α-χυμοθρυψίνης ως βοηθητικό ένζυμο κρίθηκε απαραίτητη η εκτίμηση της σταθερότητας των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων έναντι της χυμοθρυψίνης. Για το σκοπό αυτό έγινε επώαση των πολυπεπτιδίων των παρβουλινών με την ποσότητα της χυμοθρυψίνης που χρησιμοποιείται στην πειραματική διαδικασία και για χρονικό διάστημα σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό που απαιτείται για την για τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών τους. Μετά από την επώαση ενός λεπτού δεν παρατηρήθηκε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας για καμία από τις τρεις παρβουλίνες ενώ μετά από επώαση δέκα λεπτών παρατηρήθηκε μείωση στη δραστηριότητα των LjPar2 και LjPar3 κατά 20% και 50% αντίστοιχα.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς εξειδίκευσης (k_{cat}/K_m) των ανασυνδυασμένων παρβουλινών του *L. japonicus* έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις υποστρώματος τέτοιες ώστε $[S] \ll K_m$ όπου οι τιμές απορρόφησης να ταιριάζουν σε αντίδραση πρώτης τάξης και η ταχύτητα της αντίδρασης να είναι ευθέως ανάλογη προς την συγκέντρωση υποστρώματος. Οι τιμές των σταθερών εξειδίκευσης υπολογίστηκαν σύμφωνα με την εξίσωση $k_{cat}/K_m = (k_{obs} - k_u) / [PPIase]$ όπου k_u η πρώτη τάξης κινητική σταθερά για την αυθόρμητη *cis* σε *trans* ισομερείωση, k_{obs} η ψεύδο-πρώτης τάξης σταθερά για την *cis* σε *trans* ισομερείωση παρουσία ΡΡΙΑσης και [PPIase] η συγκέντρωση του ενζύμου.

Στον Πίνακα Γ.1 παρουσιάζονται οι σταθερές εξειδίκευσης των ανασυνδυασμένων παρβουλινών του *L. japonicus* έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων που φέρουν γλουταμινικό οξύ είτε αργινίνη στη θέση πριν την προλίνη. Η επιλογή ενός αρνητικά φορτισμένου και ενός θετικά φορτισμένου αμινοξέος πριν από την προλίνη έγινε με σκοπό να αναδείξει την διαφορετική εξειδίκευση των τριών παρβουλινών έναντι διαφορετικών υποστρωμάτων. Ταυτόχρονα καταλήξαμε στο αμινοξύ γλουταμινικό που είναι αρνητικά φορτισμένο για να μιμηθούμε το αρνητικό φορτίο ενός φωσφορυλιωμένου υποστρώματος, καθώς με τη

μέθοδο που ακολουθήθηκε ήταν αδύνατη η μέτρηση *cis* ισομερούς σε τετραπεπτιδίο που έφερε σερίνη ή φωσφορυλιωμένη σερίνη πριν από τη προλίνη.

Πίνακας Γ.1: Οι σταθερές εξειδίκευσης των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων των παρβουλινών έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων.

Υπόστρωμα	k_{cat}/K_m ($M^{-1} sec^{-1}$)		
	<i>LjPar1</i>	<i>LjPar2</i>	<i>LjPar3</i>
suc-Ala- Glu -Pro-Phe-pNA	255.700 ± 11.400	N.D.	1.860±50
suc-Ala- Arg -Pro-Phe-pNA	N.D.	17.000±1.500	326.700±47.400

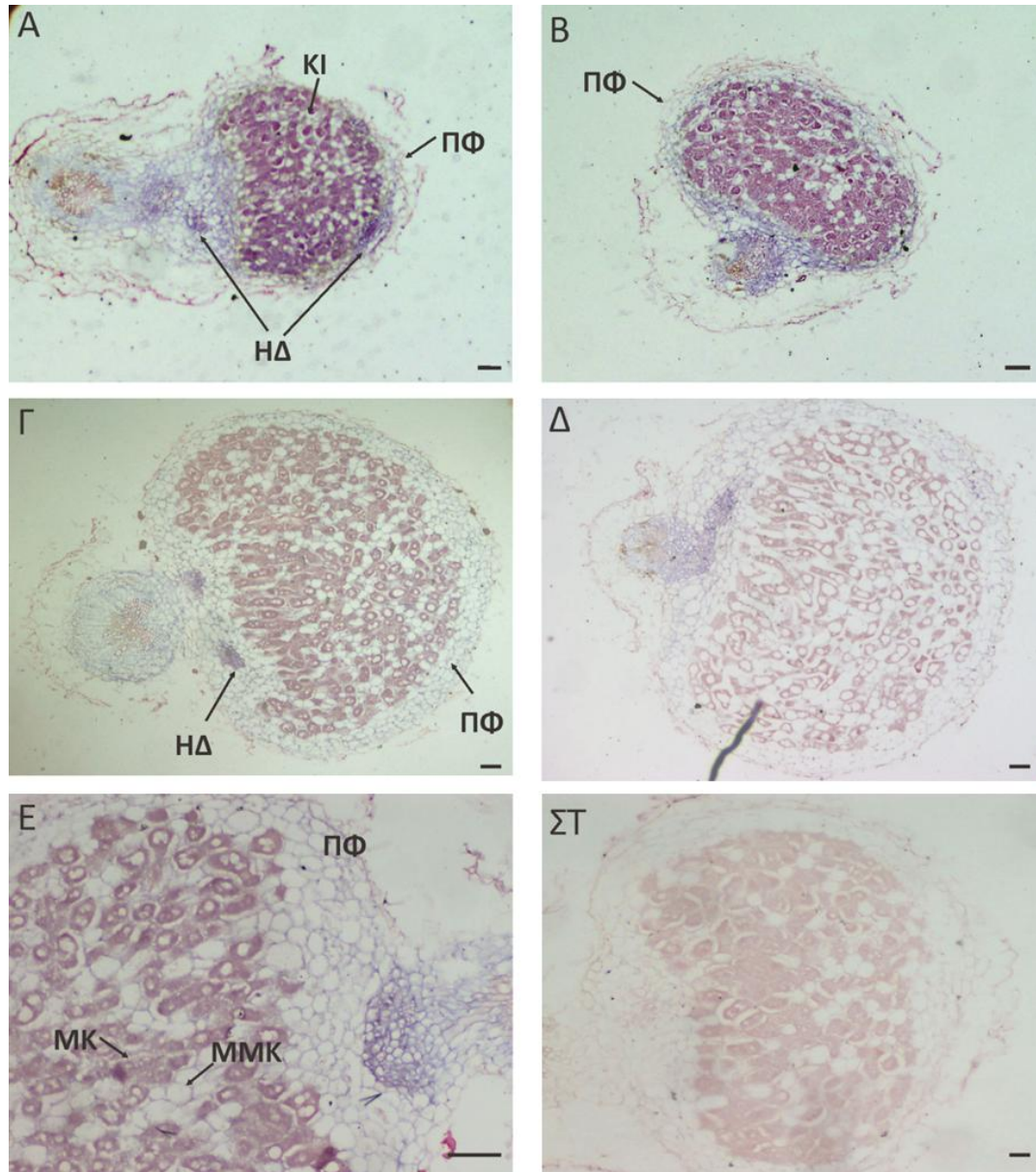
Οι τρεις ανασυνδυασμένες παρβουλίνες παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά έναντι των δύο πεπτιδίων. Η *LjPar3* ισομερειώνει και τα δύο τετραπεπτιδία αλλά με ισχυρή προτίμηση προς αυτό που περιέχει αργινίνη, καθώς η σταθερά εξειδίκευσης ως προς αυτό με το γλουταμινικό είναι περίπου 170 φορές μικρότερη. Η *LjPar2* παρουσίασε κάποια δραστηριότητα έναντι του υποστρώματος που έφερε αργινίνη ενώ δεν ήταν δυνατό να υπολογιστεί κάποια δραστηριότητα έναντι του τετραπεπτιδίου που φέρει γλουταμινικό. Τέλος, η *LjPar1* παρουσίασε αυξημένη σταθερά εξειδίκευσης έναντι του τετραπεπτιδίου που φέρει γλουταμινικό, ενώ δεν ήταν δυνατό να υπολογιστεί κάποια δραστηριότητα έναντι του υποστρώματος που έφερε αργινίνη.

Γ.3. *In situ* εντοπισμός των μεταγραφημάτων της *LjPar2* και *LjPar3* σε φυμάτια του *Lotus japonicus*.

Με σκοπό τη μελέτη του χρονικού και χωροταξικού εντοπισμού των μεταγραφημάτων των παρβουλινών *LjPar2* και *LjPar3* στα φυμάτια του *L. japonicus* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του RNA-RNA *in situ* υβριδισμού. Για το σκοπό αυτό, φυμάτια ηλικίας 10, 15, 21 και 28 ημερών, συλλέχθηκαν και εμβαπτίστηκαν με διάλυμα μονιμοποίησης. Στη συνέχεια οι ιστοί αφυδατώθηκαν, έγινε χρώση τους με σαφρανίνη, ακολούθησε εγκλεισμός τους σε παραφίνη και ελήφθησαν τομές πάχους 7 μm, οι οποίες και μεταφέρθηκαν σε κατάλληλα επεξεργασμένες αντικειμενοφόρους. Οι τομές υβριδοποιήθηκαν με σημασμένο αντιπληροφοριακό και πληροφοριακό RNA, τα οποία μεταγράφηκαν *in vitro* από τους cDNA κλώνους *LjPar2* και *LjPar3*. Η σήμανση του RNA έγινε με τη χρήση ουριδινο-τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων σημασμένων με διγοξigenίνη (DIG-11-rUTP). Η ανίχνευση του σήματος υβριδισμού έγινε ανοσολογικά, με τη χρήση αντι-DIG αντισωμάτων, τα οποία φέρουν συζευγμένο το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης. Η αλκαλική φωσφατάση, με τη σειρά της, καταλύει το σχηματισμό χρωμοφόρου ιζήματος, παρουσία του κατάλληλου υποστρώματος (NBT/BCIP). Το σήμα του υβριδισμού εμφανίζεται ως μπλε-μωβ ίζημα, το οποίο επικάθεται στις αντίστοιχες περιοχές κυττάρων των τομών. Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκαν τομές, οι οποίες υβριδίστηκαν με πληροφοριακό RNA, σημασμένο και σε αυτή την περίπτωση με DIG-11-rUTP.

Στα φυμάτια ηλικίας 10 ημερών, τα μεταγραφήματα της *LjPar2* εντοπίστηκαν σε όλους τους ιστούς του αναπτυσσόμενου φυματίου δηλαδή στον κεντρικό ιστό, στο παρέγχυμα και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικόνα Γ.8Α). Στα αμέσως μεγαλύτερα φυμάτια ηλικίας 14 ημερών το σήμα υβριδισμού ήταν ομοιόμορφα κατανομημένο στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων και μη κυττάρων του κεντρικού ιστού καθώς και στα

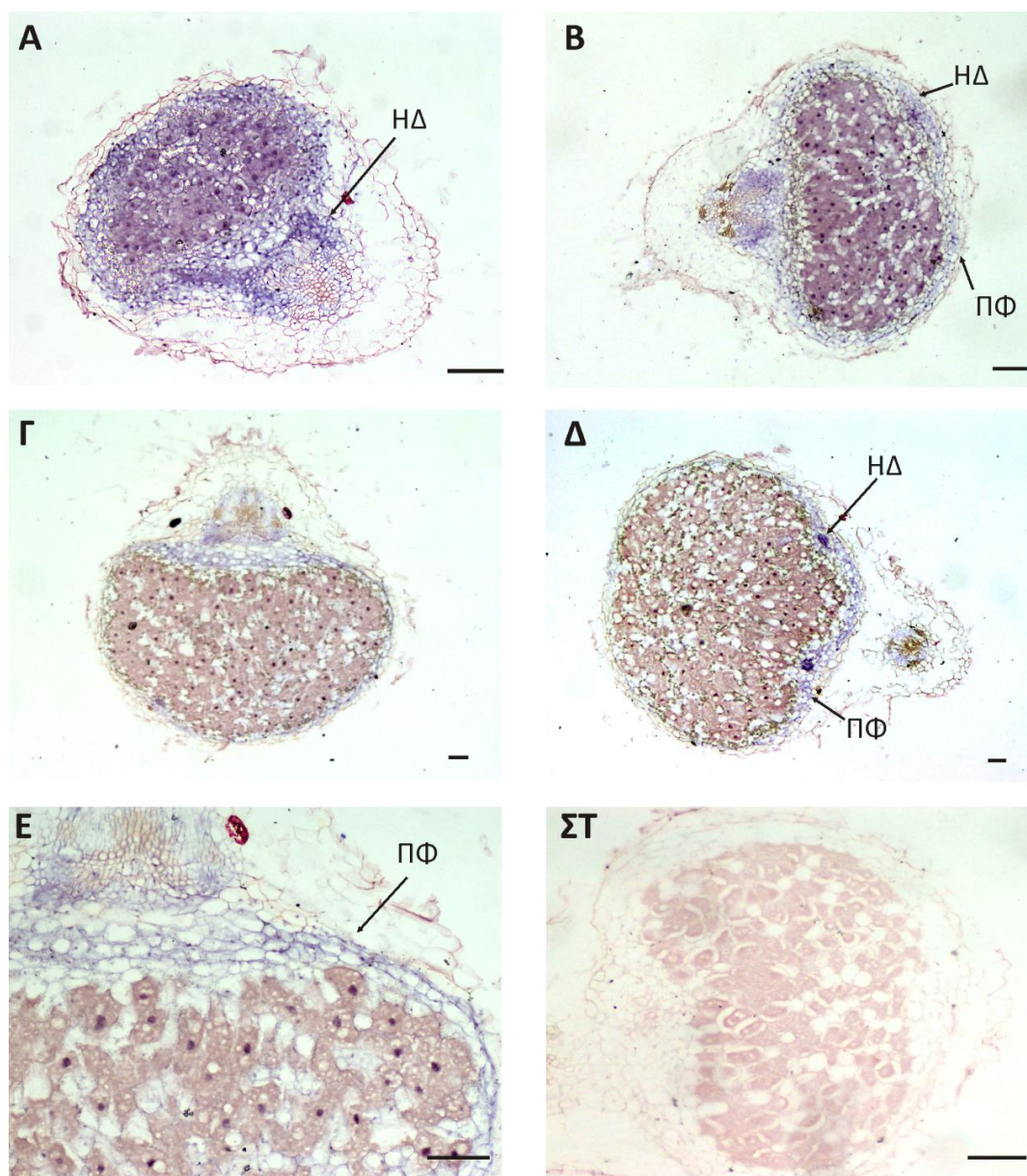
περιβάλλοντα κύτταρα του παρεγχύματος (Εικόνα Γ.8B). Στα πλήρως λειτουργικά φυμάτια ηλικίας 21 ημερών, το σήμα υβριδισμού κατανέμεται και πάλι ομοιόμορφα στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα Γ.8Γ). Στο τελευταίο αναπτυξιακό τους στάδιο το σήμα υβριδισμού των μεταγραφημάτων της *LjPar2* μόλις που ήταν ορατό κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στα εσωτερικά παρεγχυματικά κύτταρα (Εικόνα Γ.8Δ).



Εικόνα Γ.8: *In situ* χώρο-χρονικός εντοπισμός των μεταγραφημάτων της *LjPar2*. **Α.** Φυμάτιο 10 ηλικίας 10 ημερών **Β.** Φυμάτιο ηλικίας 14 ημερών. **Γ.** Φυμάτιο ηλικίας 21 ημερών. **Δ.** Φυμάτιο ηλικίας 28 ημερών. **Ε.** Περιοχή φυματίου ηλικίας 21 ημερών για πιο λεπτομερή παρατήρηση. **ΣΤ.** Φυμάτιο στο οποίο έγινε υβριδισμός με πληροφοριακό RNA. ΚΙ: Κεντρικός ιστός φυματίου. ΠΦ: Παρέγχυμα του φυματίου. ΗΔ: ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. ΜΚ: Μολυσμένα κύτταρα. ΜΜΚ: Μη μολυσμένα κύτταρα. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 100 μm .

Αντίστοιχα, στα φυμάτια ηλικίας 10 ημερών τα μεταγραφήματα της *LjPar3* εντοπίστηκαν στον κεντρικό ιστό στα εσωτερικά παρεγχυματικά κύτταρα και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, επιπλέον το σήμα υβριδισμού ήταν ιδιαίτερα έντονο γύρω από τον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων και των κυττάρων του παρεγχύματος (Εικόνα Γ.9Α).

Στα φυμάτια ηλικίας 14 ημερών το σήμα υβριδισμού εντοπίστηκε σε μολυσμένα και μη κύτταρα του κεντρικού ιστού, στο εσωτερικό του παρεγχύματος και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, με το σήμα να είναι πιο έντονο περιφερειακά του πυρήνα των κυττάρων (Εικόνα Γ.9B).



Εικόνα Γ.9: *In situ* χώρο-χρονικός εντοπισμός των μεταγραφημάτων της *LjPar3*. **Α.** Φυμάτιο 10 ηλικίας 10 ημερών **Β.** Φυμάτιο ηλικίας 14 ημερών. **Γ.** Φυμάτιο ηλικίας 21 ημερών. **Δ.** Φυμάτιο ηλικίας 28 ημερών. **Ε.** Περιοχή φυματίου ηλικίας 21 ημερών για πιο λεπτομερή παρατήρηση. **ΣΤ.** Φυμάτιο στο οποίο έγινε υβριδισμός με πληροφοριακό RNA. ΠΦ: Παρέγχυμα του φυματίου. ΗΔ: ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 100 μm .

Όπως στα φυμάτια 14 ημερών έτσι και στα ώριμα φυμάτια ηλικίας 21 ημερών, το σήμα υβριδισμού για την *LjPar3* ήταν ομοιόμορφα κατανεμημένο στο κυτταρόπλασμα με τα μεταγραφήματα να εμφανίζονται σαφώς συσσωρευμένα γύρω από τον πυρήνα των κυττάρων (Εικόνα Γ.9Γ και Γ.9Ε). Τέλος, στα φυμάτια 30 ημερών το σήμα υβριδισμού των μεταγραφημάτων της *LjPar3* παρατηρήθηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στα

παρεγχυματικά κύτταρα, ενώ στον κεντρικό ιστό τα μεταγραφήματα ήταν ιδιαίτερα συσσωρευμένα περιφερειακά του πυρήνα.

Σε όλους τους παραπάνω υβριδισμούς ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν επιμήκεις τομές φυματίων της ίδιας ηλικίας, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε πληροφοριακό RNA, που μεταγράφηκε από τους αντίστοιχους κλώνους (*LjPar2* είτε *LjPar3*) (Εικόνα Γ.8ΣΤ και Γ.9ΣΤ). Στην περίπτωση του πληροφοριακού RNA δεν εμφανίστηκε εξειδικευμένο σήμα σε καμία ομάδα κυττάρων, επιβεβαιώνοντας ότι το σήμα που εμφανίστηκε στις παραπάνω περιπτώσεις, οφείλεται μόνο στην ύπαρξη των mRNA των αντίστοιχων γονιδίων.

Γ.4. Υποκυτταρικός εντοπισμός των παρβουλινών του *Lotus japonicus*.

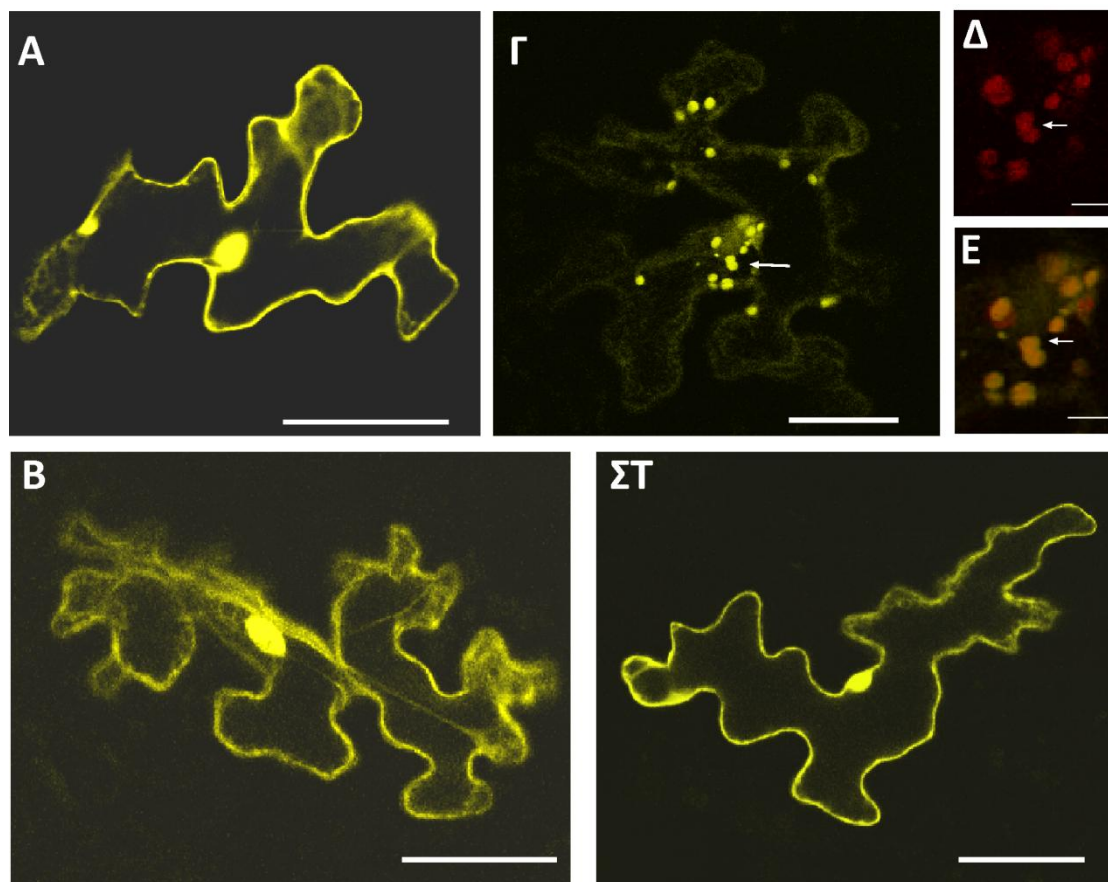
Σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τις πιθανές λειτουργίες μια πρωτεΐνης μπορούμε να αντλήσουμε από την υποκυτταρική της τοποθέτηση. Για το σκοπό αυτό προχωρήσαμε στον παροδικό μετασηματισμό επιδερμικών κυττάρων φύλλων *Arabidopsis* στα οποία εκφράζονται οι παρβουλίνες του *L. japonicus* ως χίμαιρα με την ενισχυμένη κίτρινη πρωτεΐνη φθορισμού (enhanced Yellow Fluorescence Protein, eYFP). Η επιλογή των φύλλων *Arabidopsis* βασίστηκε στο γεγονός η χρήση επίτοπων φθορισμού στο *L. japonicus* παρουσιάζει ιδιαίτερες δυσκολίες εξαιτίας των υψηλών επιπέδων αυτοφθορισμού στα διάφορα όργανά του και ιδιαίτερα στη ρίζα και στα φυμάτια (Simon-Rosin *et al.*, 2003), παράλληλα τα φύλλα του *L. japonicus* είναι μικρά σε μέγεθος και με αυξημένο πάχος γεγονός που δεν μας επέτρεπε να παρατηρήσουμε τα μετασηματισμένα κύτταρα διεξοδικά στο μικροσκόπιο.

Για την παροδική έκφραση των παρβουλινών σε φυτικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pAVA554, ο οποίος κάτω από τον έλεγχο του διπλού συστατικού προαγωγέα 35S του ιού CaMV οδηγεί στην έκφραση των γονιδίων τα οποία έχουν κλωνοποιηθεί σε σύντηξη με την eYFP. Έτσι, για κάθε μια από τις *LjPar1* και *LjPar2* δημιουργήθηκαν δύο πλασμιδιακές κατασκευές με σκοπό τη σύντηξη της eYFP είτε στο άμινο τελικό (eYFP-*LjPar1* και eYFP-*LjPar2*) είτε στο καρβόξυ τελικό τους άκρο (*LjPar1*-eYFP και *LjPar2*-eYFP). Στην περίπτωση της *LjPar3* δημιουργήθηκε μόνο μια πλασμιδιακή κατασκευή με την eYFP να εκφράζεται στο καρβόξυ τελικό άκρο της παρβουλίνης (*LjPar3*-eYFP) καθώς *in silico* μελέτες προβλέπουν την παρουσία πεπτιδίου οδηγού για τον χλωροπλάστη στο άμινο τελικό άκρο της *LjPar3*. Όλες οι πλασμιδιακές κατασκευές ελέχθησαν με αλληλούχιση ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η κάθε μια παρβουλίνη και η eYFP βρίσκονται στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο.

Ο μετασηματισμός των επιδερμικών κυττάρων *Arabidopsis* έγινε με τη μέθοδο της βιοβαλιστικής. Συγκεκριμένα, πλασμιδιακό DNA που αντιστοιχεί στη κάθε κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη μικροσφαιριδίων χρυσού παρουσία χλωριούχου ασβεστίου και σπερμιδίνης. Τα επικαλυμμένα με DNA σφαιρίδια με τη βοήθεια της συσκευής Biolistic PDS-1000/He (Biorad) επιταχύνθηκαν και εισχώρησαν στα επιδερμικά κύτταρα της κάτω επιφάνειας φύλλων *Arabidopsis*. Τα μετασηματισμένα κύτταρα παρατηρήθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (confocal) μετά από περίπου 24 ώρες.

Από την παρατήρηση των μετασηματισμένων φύλλων με την κατασκευή για την *LjPar1*, η χιμαιρική πρωτεΐνη *LjPar1*-eYFP εντοπίστηκε τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα του μετασηματισμένου κυττάρου (Εικόνα Γ.10Α), το ίδιο αποτέλεσμα

παρατηρήθηκε και για την eYFP-*LjPar1*. Αντίστοιχα, όπως η *LjPar1* και η *LjPar2* εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των μετασχηματισμένων κυττάρων (Εικόνα Γ.10B).



Εικόνα Γ.10: Υποκυτταρικός εντοπισμός των παρβουλινών του *L. jaronicus* σε παροδικά μετασχηματισμένα επιδερμικά κύτταρα φύλλων *Arabidopsis*. **A, B.** Οι *LjPar1*-eYFP και *LjPar2*-eYFP αντίστοιχα εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των μετασχηματισμένων κυττάρων. **Γ.** Η *LjPar3*-eYFP εντοπίζεται κυρίως στα πλαστίδια των μετασχηματισμένων κυττάρων. **Δ, Ε.** Περιοχή της εικόνας Γ σε μεγέθυνση στην οποία παρουσιάζεται ο αυτοφθορισμός της χλωροφύλλης (Δ) και αλληλοεπικάλυψη του με τον φθορισμό από την *LjPar3*-eYFP (Ε). **ΣΤ.** Η eYFP εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των μετασχηματισμένων κυττάρων. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 40 μm.

Διαφορετική με αυτήν των *LjPar1* και *LjPar2* είναι η εικόνα των μετασχηματισμένων κυττάρων που εκφράζουν τη χμαιρική πρωτεΐνη *LjPar3*-eYFP. Στα κύτταρα αυτά ο φθορισμός της eYFP παρατηρήθηκε κυρίως στα πλαστίδια (Εικόνες Γ.10Γ, Δ και Ε). Για τον εντοπισμό της θέσης των πλαστιδίων στο κύτταρο χρησιμοποιήθηκε ο αυτοφθορισμός της χλωροφύλλης (Εικόνα Γ.10Δ).

Επιπλέον των μετασχηματισμών με τις κατασκευές για τις παρβουλίνες πραγματοποιήθηκε και ένας με τον μητρικό φορέα που οδηγεί στην έκφραση της eYFP χωρίς αυτή να είναι συνδεδεμένη με κάποια πρωτεΐνη. Σε αυτή τη περίπτωση η eYFP εντοπίστηκε στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα Γ.10ΣΤ), γεγονός σύμφωνο με την προϋπάρχουσα βιβλιογραφία που αφορά την eYFP.

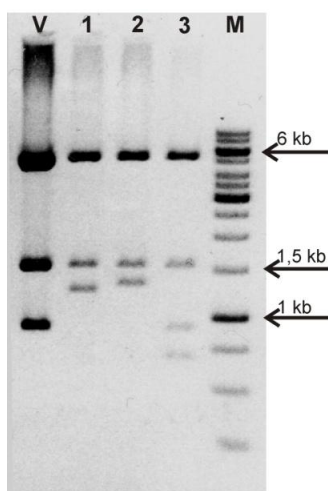
Γ.5. Εντοπισμός πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με τις παρβουλίνες του *Lotus japonicus*.

Σε μεγάλο βαθμό οι πολύπλοκες κυτταρικές λειτουργίες ενός οργανισμού βασίζονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών πρωτεϊνών. Η αναγνώριση και η μελέτη τέτοιων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων είναι βασικό βήμα στην κατανόηση και αποσαφήνιση του τρόπου λειτουργίας των βιολογικών συστημάτων. Για τη μελέτη της εύρεσης αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών έχουν αναπτυχθεί πολλές διαφορετικές τεχνικές ανάμεσα σε αυτές είναι και το σύστημα των δύο υβριδίων σε ζύμη (Yeast Two Hybrid, YTH). Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα και με χαμηλό κόστος να εντοπίσουμε πρωτεΐνες που δυνητικά αλληλεπιδρούν με μια πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στον παράγοντα μεταγραφής GAL4 του *Saccharomyces cerevisiae*, που αποτελείται από δύο ενότητες, την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain-BD) και δομική περιοχή ενεργοποίησης (DNA Activating Domain-AD) που είναι δομικά και λειτουργικά ανεξάρτητες μεταξύ τους. Για τον έλεγχο λοιπόν της αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο διαφορετικών πρωτεϊνών η μία εκφράζεται σε σύντηξη με την περιοχή BD και η δεύτερη με την περιοχή AD, όταν οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν οι δύο δομικές περιοχές του GAL4 πλησιάζουν μεταξύ τους και ενεργοποιείται η μεταγραφή γονιδίων επιλογής όπως τα *HIS3* και *ADE2* που βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο διαφορετικών περιοχών ενεργοποίησης του προαγωγέα, επιτρέποντας την ανάπτυξη των κυττάρων σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα.

Για τον εντοπισμό πρωτεϊνών που δυνητικά αλληλεπιδρούν με τις παρβουλίνες του *L. japonicus* μέσω του YTH πραγματοποιήθηκε σάρωση cDNA βιβλιοθήκης που προέρχεται από ρίζες και φυμάτια του φυτού (Poulsen and Podenphant, 2002). Οι παρβουλίνες εκφράστηκαν σε σύντηξη με την BD περιοχή του προαγωγέα και χρησιμοποιήθηκαν ως δόλωμα (bait), ενώ οι πρωτεΐνες της βιβλιοθήκης του *L. japonicus* εκφράζονται σε σύντηξη με την AD περιοχή και λειτούργησαν ως θήραμα (prey).

Γ.5.1. Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών για το σύστημα των δύο υβριδίων.

Για την κατασκευή των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ως δόλωμα για τη σάρωση της βιβλιοθήκης οι κωδικές περιοχές των τριών παρβουλινών κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pGBKT7. Στην περίπτωση των *LjPar1* και *LjPar2* χρησιμοποιήθηκε ολόκληρη η κωδική περιοχή ενώ στη περίπτωση της *LjPar3* δεν χρησιμοποιήθηκε η περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί για το πεπτιδίο οδηγό στο χλωροπλάστη. Έτσι δημιουργήθηκαν τρεις κατασκευές οι pGB-Par1, pGB-Par2 και pGB-Par3. Στην Εικόνα Γ.11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα πέψης των παραπάνω κατασκευών με το ένζυμο περιορισμού HindIII για επαλήθευση της επιτυχίας της ένθεσης εντός του φορέα pGBKT7. Οι ενθέσεις επιβεβαιώθηκαν και με αλληλούχιση των αντίστοιχων πλασμιδιακών κατασκευών.

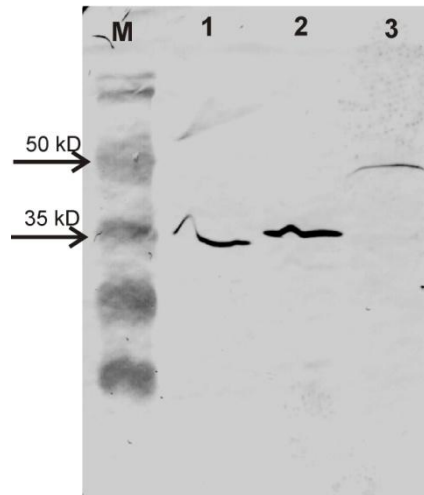


Εικόνα Γ.11: Ανάλυση σε πηκτή αραρόζης 1% (w/v) των προϊόντων της αντίδρασης περιορισμού για τον έλεγχο των κατασκευών pGB-Par1, pGB-Par2 και pGB-Par3 στήλες 1, 2 και 3 αντίστοιχα. Στήλη V: ο φορέας pGBKT7 χωρίς κάποια ένθεση. Στήλη M: μάρτυρας μοριακών βαρών DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas).

Γ.5.2. Έλεγχος της παραγωγής των υβριδίων BD-παρβουλίνης στα κύτταρα ζύμης.

Πριν από την εκτέλεση οποιουδήποτε περαιτέρω πειράματος πρέπει να ελεγχθεί η παραγωγή του υβριδίου από τα κύτταρα ζύμης καθώς πολλές φορές έχει αναφερθεί η αποτυχία παραγωγής του υβριδίου BD-πρωτεΐνης από τις ζύμες, ενώ σε κάποιες άλλες έχει αναφερθεί ότι το υβρίδιο είναι τοξικό για τα κύτταρα. Έτσι προχωρήσαμε στον μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης *S. cerevisiae* SG335 με τις αντίστοιχες κατασκευές. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης έγινε σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο δεν περιείχε το αμινοξύ τρυπτοφάνη (SC-W). Τα κύτταρα ζύμης που έφεραν τις κατασκευές των παρβουλινών αναπτύχθηκαν κανονικά, συνεπώς κανένα από τα υβρίδια BD-Par δεν είναι τοξικό για τη ζύμη.

Για τον εντοπισμό παραγωγής αλλά και της ακεραιότητας του υβριδίου στα μετασχηματισμένα κύτταρα ζύμης πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και στη συνέχεια έγινε μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ο εντοπισμός του υβριδίου BD-παρβουλίνης είναι δυνατός με τη χρήση αντισώματος έναντι του επιτόπιου c-Myc, καθώς μεταξύ της περιοχής που κωδικοποιεί για δομική περιοχή BD και της παρβουλίνης που εισάγαμε παρεμβάλλεται μια περιοχή που κωδικοποιεί για το πεπτίδιο c-Myc. Στην Εικόνα Γ.12 παρουσιάζεται ο εντοπισμός των υβριδίων παρβουλινών-BD. Τα αναμενόμενα μοριακά βάρη των υβριδίων είναι 34 kDa, 36 kDa και 46 kDa για τα υβρίδια BD-Par1, BD-Par2 και BD-Par3 αντίστοιχα.

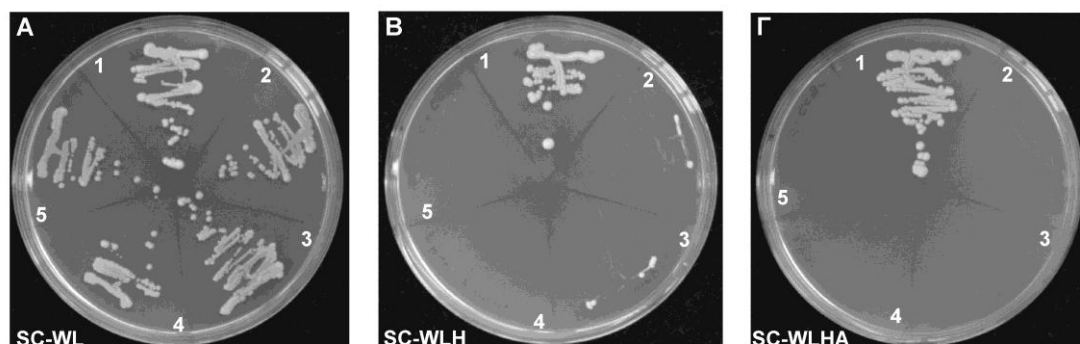


Εικόνα Γ.12: Ανοσοεντοπισμός των υβριδίων παρβουλίνης-BD σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Στήλες 1, 2 και 3 BD-Par1, BD-Par2 και BD-Par3 αντίστοιχα. Στήλη M: μάρτυρας μοριακών βαρών πρωτεϊνών (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas).

Από τα αποτελέσματα του ανοσοεντοπισμού προκύπτει ότι και τα τρία υβρίδια που παράγονται έχουν το αναμενόμενο μέγεθος και βρίσκονται σε ικανοποιητικές ποσότητες.

Γ.5.3. Έλεγχος αυτόνομης ενεργοποίησης των γονιδίων επιλογής από το υβρίδιο BD-παρβουλίνη.

Το επόμενο βήμα στη διαδικασία αυτή αφορά τον έλεγχο της αυτόνομης ενεργοποίησης γονιδίων επιλογής από τις υβριδικές πρωτεΐνες BD-Par. Για το σκοπό αυτό κύτταρα ζύμης που έφεραν το κάθε ένα από τα πλασμίδια pGB-Par1, pGB-Par2 και pGB-Par3 μετασχηματίστηκαν με άδειο το φορέα pAD-GAL4 που οδηγεί στην έκφραση της AD περιοχής. Τα κύτταρα ζύμης αναπτύχθηκαν σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα που δεν περιείχε τρυπτοφάνη, λευκίνη και ιστιδίνη (SC-WLH) αλλά και σε θρεπτικό που εκτός των τριών προηγούμενων αμινοξέων δεν περιείχε και αδενίνη (SC-WLHA). Στην Εικόνα Γ.13 παρουσιάζεται το πρότυπο ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης με τους διαφορετικούς συνδυασμούς πλασμιδίων και στα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα. Στη θέση 1 έχουν τοποθετηθεί ζύμες που περιέχουν τα πλασμίδια pGBKT7-53 και pGAD-T που οδηγούν στην έκφραση των πρωτεϊνών p53 και SV large T-antigene που έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρούν και χρησιμοποιούνται ως θετικός μάρτυρας αλληλεπίδρασης. Στη θέση 2 αναπτύχθηκαν ζύμες που έχουν μετασχηματιστεί με άδειους τους φορείς pGBKT7 και pAD-GAL4 και τέλος, στις θέσεις 3, 4 και 5 αναπτύχθηκαν ζύμες που έφεραν τον άδειο φορέα pAD-GAL4 και τα πλασμίδια pGB-Par3, pGB-Par2 και pGB-Par1 αντίστοιχα.



Εικόνα Γ.13: Ανάπτυξη ζυμών για έλεγχο ενεργοποίησης του συστήματος GAL4 από τα υβρίδια BD-παρβουλίνης. Στη θέση 1 ζύμες με τους φορείς pGBKT7-53 και pGAD-T, στη θέση 2 ζύμες με τους φορείς pGBKT7 και pAD-GAL4, στη θέση 3 ζύμες με τους φορείς pGB-Par3 και pAD-GAL4, στη θέση 4 ζύμες με τους φορείς pGB-Par2 και pAD-GAL4 και στη θέση 5 ζύμες με τους φορείς pGB-Par1 και pAD-GAL. **A.** Τρυβλίο με συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς τρυπτοφάνη και λευκίνη (SC-WL). **B.** Τρυβλίο με συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς τρυπτοφάνη, λευκίνη, και ιστιδίνη (SC-WLH). **Γ.** Τρυβλίο με συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς τρυπτοφάνη, λευκίνη, ιστιδίνη και αδενίνη (SC-WLHA).

Από την ανάπτυξη των κυττάρων στα διαφορετικά υποστρώματα προκύπτει ότι υβρίδια BD-Par1 και BD-Par2 δεν ενεργοποιούν τα γονίδια επιλογής *HIS3* και *ADE2* γεγονός που θα επέτρεπε την ανάπτυξή του σε θρεπτικό που δεν περιέχει ιστιδίνη ή ιστιδίνη και αδενίνη. Η παρατήρηση αυτή μας επιτρέπει για τη σάρωση της βιβλιοθήκης να χρησιμοποιήσουμε και τα δύο υποστρώματα (SC-WLH και SC-WLHA). Αντίθετα όμως τα κύτταρα που παρήγαγαν το υβρίδιο BD-Par3 παρουσίασαν κάποια μικρή ανάπτυξη στο θρεπτικό που δεν περιείχε ιστιδίνη ενώ απουσία και αδενίνης δεν αναπτύχθηκαν καθόλου. Συμπεραίνοντας, καθώς η Par3 φαίνεται έστω και σε μικρό βαθμό να προκαλεί την αυτόνομη ενεργοποίηση του γονιδίου επιλογής *HIS3*, για τη σάρωση της βιβλιοθήκης θα χρησιμοποιηθεί μόνο το υπόστρωμα SC-WLHA.

Γ.5.4. Εντοπισμός AD-κλώνων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που πιθανά αλληλεπιδρούν με τις παρβουλίνες του *L. jaronicus*.

Για τον εντοπισμό πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με κάθε μια από τις παρβουλίνες του *L. jaronicus* πραγματοποιήθηκε σάρωση cDNA βιβλιοθήκης που προέρχεται από ρίζες του φυτού 5 με 12 ημέρες μετά την μόλυνσή τους με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*. Η cDNA βιβλιοθήκη έχει κατασκευαστεί στον φορέα pAD-GAL4 και κατά συνέπεια οι πρωτεΐνες παράγονται σε σύντηξη με την AD περιοχή (Poulsen and Podenphant 2002). Συνοπτικά η διαδικασία της σάρωσης περιλαμβάνει το μετασχηματισμό σε μεγάλη κλίμακα κυττάρων ζύμης που φέρουν το πλασμίδιο pBD-Par με την cDNA βιβλιοθήκη. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα τοποθετούνται στα κατάλληλα υποστρώματα για τη κάθε παρβουλίνη και αφήνονται να αναπτυχθούν στους 30°C. Οι αποικίες που αναπτύσσονται ανακαλλιεργούνται και απομονώνονται για περαιτέρω μελέτη.

Για την LjPar1 η επιλογή των πιθανών αλληλεπιδράσεων έγινε αναπτύσσοντας τα μετασχηματισμένα κύτταρα ζύμης σε υπόστρωμα SC-WLH αλλά και σε SC-WLHA. Ύστερα από περίπου 5 ημέρες και για διάστημα τουλάχιστον δύο εβδομάδων άρχιζαν να αναπτύσσονται αποικίες και στα δύο υποστρώματα. Κατά τη σάρωση της βιβλιοθήκης ελέγχθηκαν περίπου $1,08 \cdot 10^6$ κλώνοι. Στο θρεπτικό SC-WLHA αναπτύχθηκαν μόλις 5

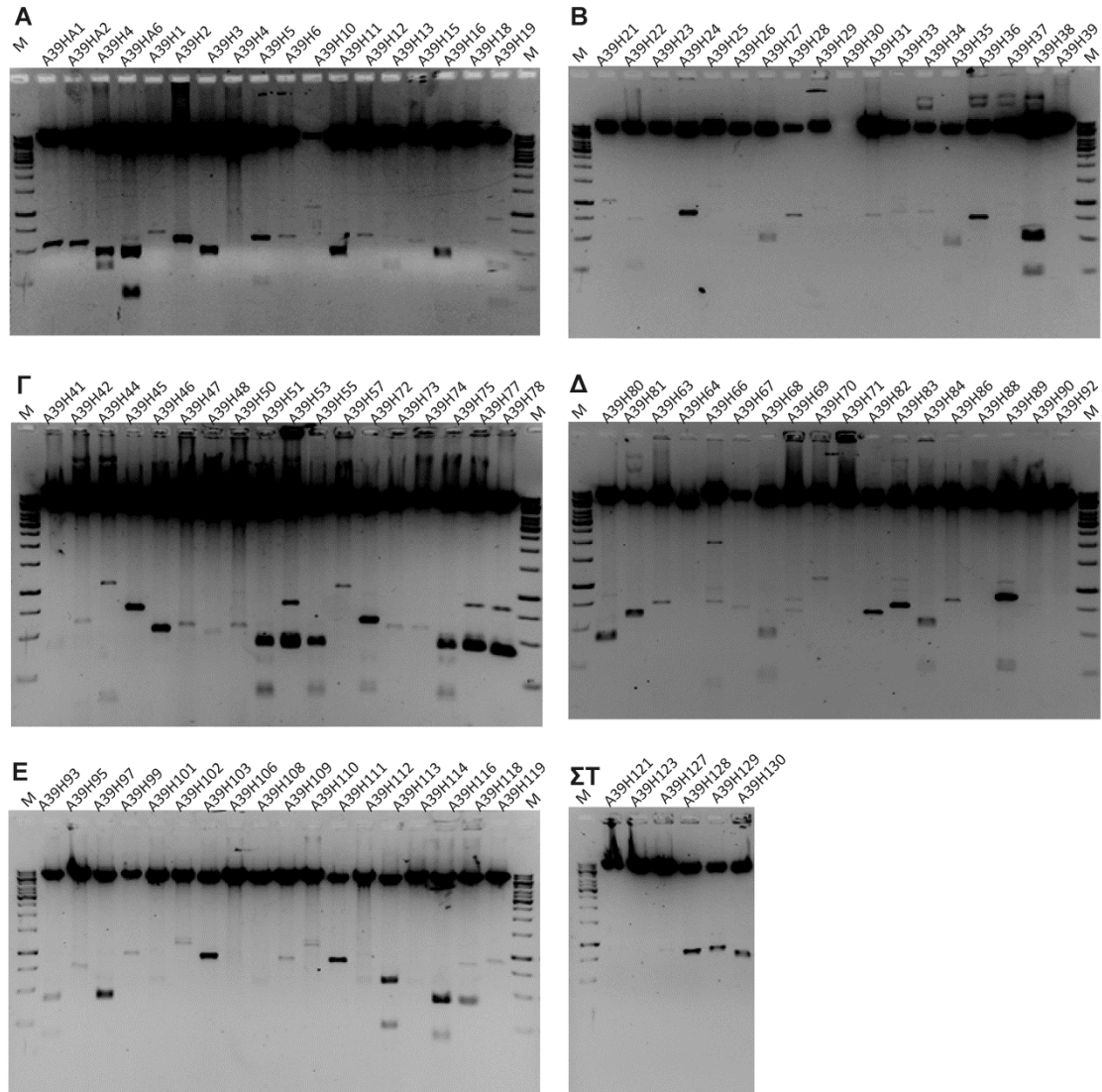
αποικίες οι οποίες καλλιεργήθηκαν για άλλη μια φορά σε SC-WLHA όπου και οι 5 μεγάλωσαν κανονικά. Όσον αφορά το θρεπτικό SC-WLH αναπτύχθηκαν 125 αποικίες από αυτές οι 94 αναπτύχθηκαν κανονικά όταν ανακαλλιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό. Όλες οι αποικίες που επανακαλλιεργήθηκαν, αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό SC-L με σκοπό την επιλογή των κυττάρων μόνο ως προς το πλασμίδιο που προέρχεται από τη βιβλιοθήκη. Έτσι για την *LjPar1* προέκυψαν 99 αποικίες από τις οποίες έγινε απομόνωση του AD πλασμιδίου. Καθώς η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA που προκύπτει από τα κύτταρα ζύμης είναι μικρή ακολούθησε πολλαπλασιασμός των κλώνων με μετασηματισμό κυττάρων *E. coli* και απομόνωση των αντίστοιχων πλασμιδίων για περεταίρω χειρισμούς.

Αντίστοιχα ήταν και τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την σάρωση των άλλων δύο φυτικών παρβουλινών. Έτσι και στην περίπτωση της *LjPar2*, η επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων ζύμης έγινε στα υποστρώματα SC-WLH και SC-WLHA. Συνολικά ελέγχθηκαν $2 \cdot 10^5$ κλώνοι. Στο θρεπτικό SC-WLHA δεν αναπτύχθηκε καμία αποικία, ενώ στο SC-WLH εμφανίστηκαν 12 και οι 8 από αυτές αναπτύχθηκαν όταν τοποθετήθηκαν στο θρεπτικό επιλογής για δεύτερη συνεχόμενη φορά. Από αυτές τις 8 έγινε απομόνωση πλασμιδίου όπως περιγράφηκε παραπάνω.

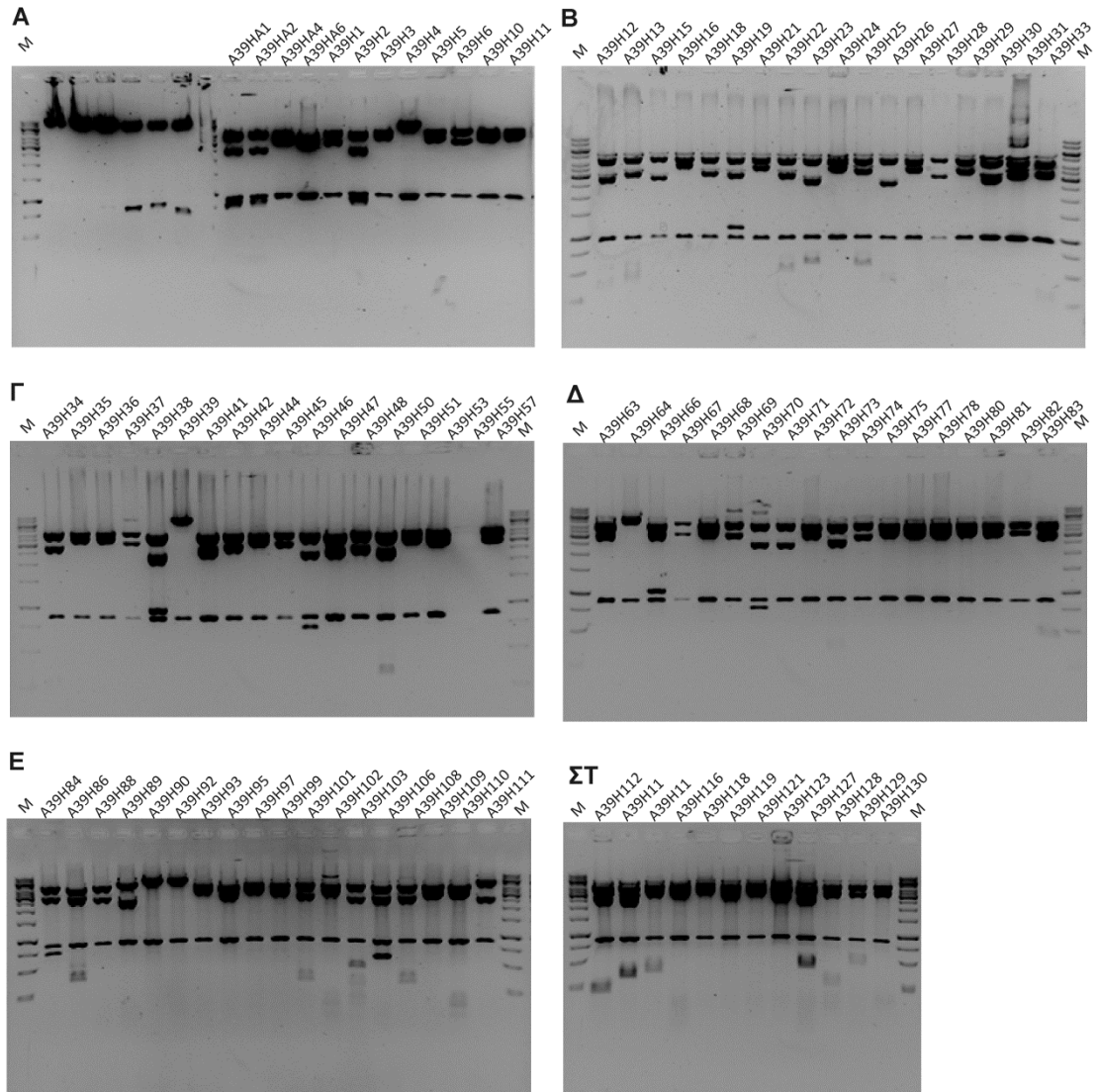
Τέλος, για τη σάρωση της *LjPar3* ελέγχθηκαν $3,5 \cdot 10^6$ κλώνοι. Η σάρωση έγινε μόνο στο θρεπτικό SC-WLHA όπου και αναπτύχθηκαν 75 αποικίες. Στον επανέλεγχο σε SC-WLHA, από τις 75 αποικίες οι 11 δεν μεγάλωσαν καθόλου και ενώ 32 αναπτύχθηκαν κανονικά οι υπόλοιπες 32 που δεν αναπτύχθηκαν ιδιαίτερα καλά σε SC-WLHA ανακαλλιεργήθηκαν SC-WLH όπου και αναπτύχθηκαν κανονικά. Έτσι, συνολικά για την *LjPar3* απομονώσαμε 64 κλώνους.

Γ.5.4.1. Ανάλυση των κλώνων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την *LjPar1*.

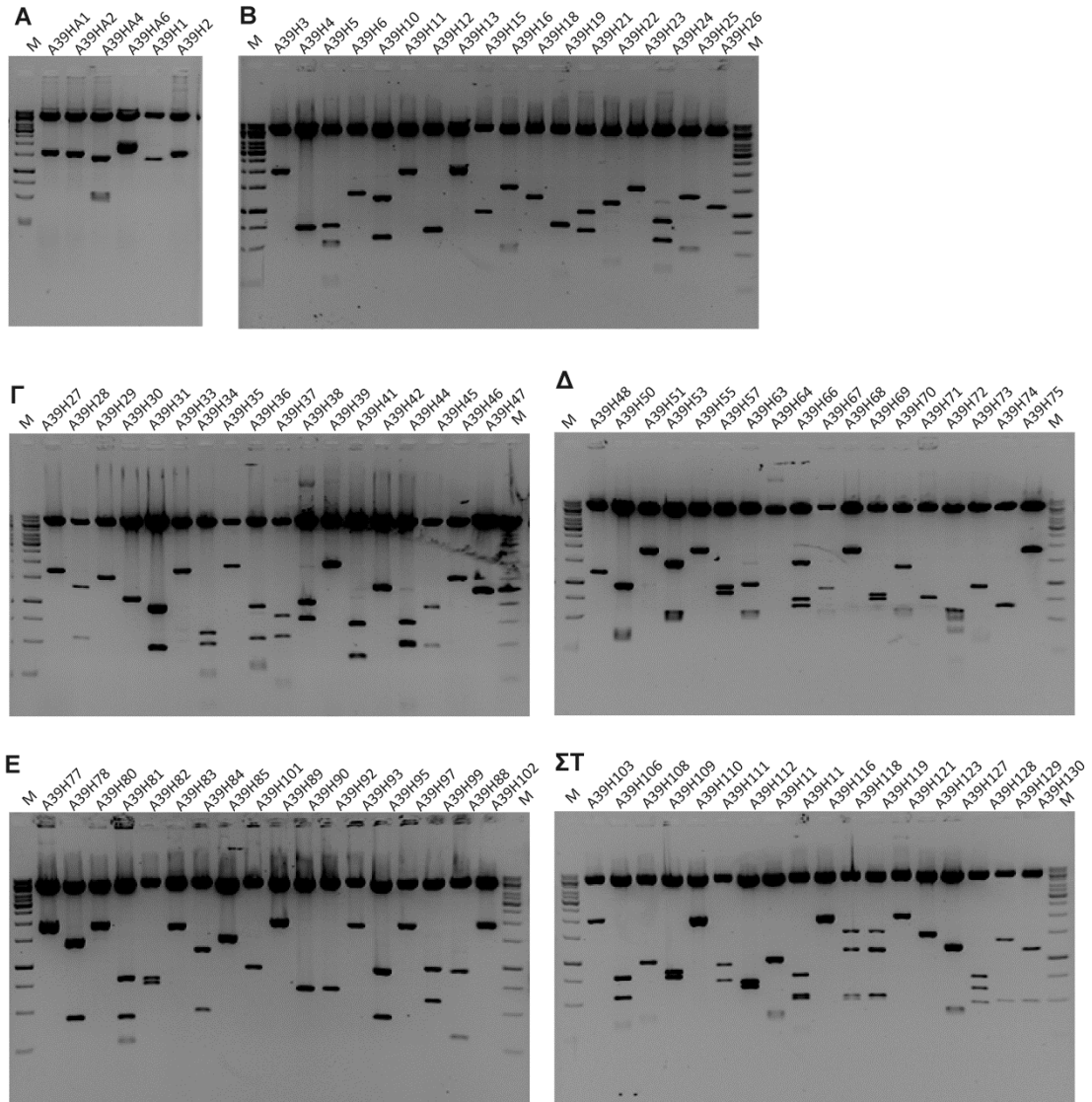
Από την σάρωση της βιβλιοθήκης για τον εντοπισμό πρωτεϊνών που δυνητικά αλληλεπιδρούν με την *LjPar1* προέκυψαν 99 κλώνοι και καθώς είναι συνηθισμένο φαινόμενο κατά τη διαδικασία της σάρωσης αρκετοί κλώνοι να εμφανίζονται περισσότερες από μια φορά προχωρήσαμε στην ομαδοποίηση τους μέσω τριών ομάδων πολλαπλών πέψεων. Για την ομαδοποίηση χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα περιορισμού που η αλληλουχία αναγνώρισής τους αποτελείται από έξι νουκλεοτίδια. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα που οι θέσεις αναγνώρισής τους βρίσκονται όχι μόνο στην περιοχή κλωνοποίησης γονιδίων αλλά σε απομακρυσμένα σημεία του φορέα pAD-GAL4. Στην ομάδα I χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα PstI, XhoI, XbaI και SstII, στην ομάδα II τα NcoI, NotI, EcoRI και BamHI ενώ στην ομάδα III τα SstI, HindIII και StuI. Για την πέψη χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο που απομονώθηκε από τα κύτταρα *E. coli*. Η ανάλυση των πέψεων με τα ένζυμα της ομάδας I, II και III σε πηκτή αγαρόζης παρουσιάζονται στις Εικόνες Γ.14, Γ.15 και Γ.16 αντίστοιχα.



Εικόνα Γ.14: Ανάλυση σε πηκτή αραρόζης 1% (w/v) των προϊόντων της αντίδρασης περιορισμού με τα ένζυμα PstI, XhoI, XbaI και SstII (Ομάδα I) για την ομαδοποίηση των κλώνων που προέκυψαν από τη σάρωση για την *LjPar1*. Στήλη M: μάρτυρας μοριακών βαρών DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas).



Εικόνα Γ.15: Ανάλυση σε πηκτή αραρόζης 1% (w/v) των προϊόντων της αντίδρασης περιορισμού με τα ένζυμα NcoI, NotI, EcoRI και BamHI (Ομάδα II) για την ομαδοποίηση των κλώνων που προέκυψαν από τη σάρωση για την *LjPar1*. Στήλη M: μάρτυρας μοριακών βαρών DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas).



Εικόνα Γ.16: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) των προϊόντων της αντίδρασης περιορισμού με τα ένζυμα *Sst*I, *Hind*III και *Sst*I (Ομάδα III) για την ομαδοποίηση των κλώνων που προέκυψαν από τη σάρωση για την *LjPar1*. Στήλη M: μάρτυρας μοριακών βαρών DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas).

Από την ανάλυση των πέψεων οι κλώνοι που πιθανά αλληλεπιδρούν με την *LjPar1* ταξινομήθηκαν σε 7 ομάδες στις οποίες ανήκουν μόλις 32 κλώνοι, ενώ οι υπόλοιπες 67 δεν άνηκαν σε κάποια ομάδα. Στον Πίνακα Γ.2 παρουσιάζεται το μέγεθος της κάθε ζώνης που εμφανίζεται στην κάθε ομάδα κλώνων. Από το πρότυπο της πέψης η ομάδα A39G3 αντιστοιχεί σε κλώνους με άδειο τον φορέα.

Πίνακας Γ.2: Πρότυπο πέψεων των ομάδων κλώνων της *LjPar1*.

Ομάδα	PstI, XhoI, XbaI, SstII	NcoI, NotI, EcoRI, BamHI	SstI, HindIII, StuI
A39G1	7900, 530	4250, 2610, 860, 740	6900, 1570
A39G2	7900, 400, 180	4250, 3450, 860	6900, 1240, 440
A39G3	7600	4250, 2500, 860	6900, 730
A39G4	7900, 400, 160	4250, 3450, 860	6900, 1680
A39G9	7900, 400	4250, 2700, 860	6900, 900
A39G12	7900	4250, 3400, 860	6900, 1100
A39G13	7900, 750	4250, 3600, 860	6900, 750, 500

Τα μέλη της κάθε ομάδας αναγράφονται στον Πίνακα Γ.3.

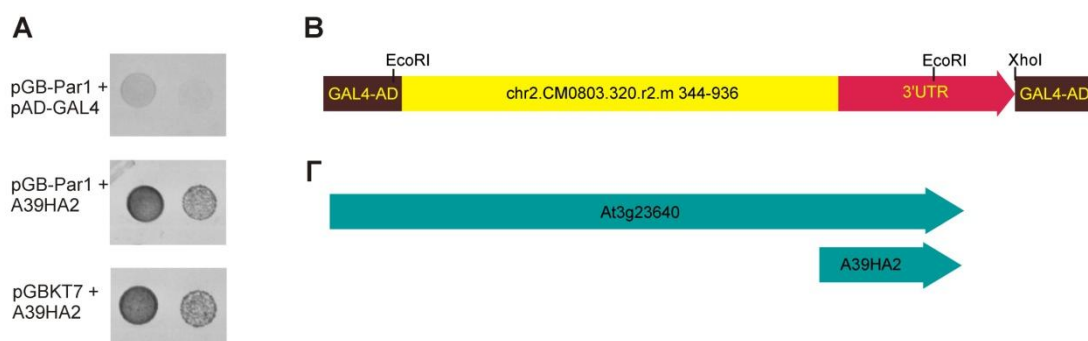
Πίνακας Γ.3: Ομάδες κλώνων που προέκυψαν από τη σάρωση με την *LjPar1*.

Ομάδα	Μέλη ομάδας
A39G1	A39HA1, A39HA2, A39HA3, A39H2, A39H46
A39G2	A39HA4, A39H3, A39H11, A39H16, A39H53, A39H78, A39H80, A39H97, A39H121
A39G3	A39H4, A39H71, A39H90, A39H92
A39G4	A39HA6, A39H35, A39H51, A39H55, A39H68, A39H75, A39H93, A39H116
A39G9	A39H15, A39H73
A39G12	A39H101, A39H108
A39G13	A39H63, A39H95
Μονές	A39H1, A39H5, A39H6, A39H10, A39H12, A39H13, A39H18, A39H19, A39H21, A39H22, A39H23, A39H24, A39H25, A39H26, A39H27, A39H28, A39H29, A39H30, A39H31, A39H33, A39H34, A39H36, A39H37, A39H38, A39H39, A39H41, A39H42, A39H44, A39H45, A39H47, A39H48, A39H50, A39H57, A39H64, A39H66, A39H67, A39H69, A39H70, A39H72, A39H74, A39H77, A39H81, A39H82, A39H83, A39H84, A39H86, A39H87, A39H88, A39H89, A39H99, A39H100, A39H102, A39H103, A39H106, A39H109, A39H110, A39H111, A39H112, A39H113, A39H114, A39H118, A39H119, A39H123, A39H127, A39H128, A39H129, A39H130

Στο επόμενο βήμα της διαδικασίας γίνεται επανέλεγχος της αλληλεπίδρασης των κλώνων-θηραμάτων με την *LjPar1*. Για να πραγματοποιηθεί αυτό κύτταρα ζύμης μετασχηματίζονται τις αντίστοιχες κατασκευές και γίνεται επιλογή τους σε θρεπτικό υπόστρωμα SC-WL. Ύστερα διαφορετικές αποικίες χρησιμοποιούνται για την παρασκευή εναιωρήματος κυττάρων συγκεκριμένης πυκνότητας. Μικρή ποσότητα από το εναιώρημα τοποθετείται για ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό υπόστρωμα SC-WLH και επανέλεγχος της αλληλεπίδρασης. Ακριβώς η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τον έλεγχο πιθανής αυτόνομης ενεργοποίησης των γονιδίων επιλογής από τον κλώνο θήραμα. Σε αυτή την περίπτωση ο μετασχηματισμός των κυττάρων ζύμης γίνεται με τον εκάστοτε AD κλώνο και τον φορέα pGBKT7 χωρίς κάποια ένθεση. Για κάθε κλώνο πραγματοποιήθηκαν περισσότεροι από έναν μετασχηματισμοί και ελέγχθηκαν διαφορετικές αποικίες. Τα αποτελέσματα για κάθε κλώνο παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω. Τέλος, οι κλώνοι στους οποίους δεν γίνεται αναφορά απέτυχαν κατά τη διαδικασία επανελέγχου της αλληλεπίδρασης να αναπτυχθούν στο θρεπτικό επιλογής.

Ομάδα A39G1 (A39HA1, A39HA2, A39HA3, A39H2, A39H46).

Για τον επανέλεγχο της αλληλεπίδρασης της *LjPar1* με τους κλώνους-θηράματα αυτής της ομάδας πραγματοποιήθηκαν μετασχηματισμοί κυττάρων ζύμης με τους εξής συνδυασμούς πλασμιδίων :α) pGB-Par1 και pAD-GAL4, β) pGB-Par1 και A39HA2 και γ) pGBKT7 και A39HA2. Στην Εικόνα Γ.17Α παρουσιάζονται δύο δεκαδικές αραιώσεις μετασχηματισμένων κυττάρων του κάθε συνδυασμού πλασμιδίων σε θρεπτικό SC-WLH. Τα κύτταρα που έφεραν τα πλασμίδια pGB-Par1 και pAD-GAL4 δεν αναπτύχθηκαν σχεδόν καθόλου. Αντίθετα, οι ζύμες που έφεραν τα pGB-Par1 και A39HA2 αναπτύχθηκαν με τον ίδιο τρόπο όπως αυτά που έφεραν τα pGBKT7 και A39HA2. Συνεπώς, η ικανότητα των μετασχηματισμένων κυττάρων να αναπτυχθούν στο θρεπτικό επιλογής είναι πιθανό να μην οφείλεται στην αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών αλλά στην ικανότητα του A39HA2 να ενεργοποιεί αυτόνομα το γονίδιο επιλογής *HIS3*. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε με όλες τις αποικίες που εξετάστηκαν καθώς αλλά και με άλλα μέλη της ίδιας ομάδας. Τέλος, επειδή η επιλογή μόνο με SC-WLH σε κάποιες περιπτώσεις είναι προβληματική και παρουσιάζει «διαρροές» η ίδια σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό SC-WLH παρουσία 10 και 15 mM 3'-AT αλλά και σε θρεπτικό SC-WLHA. Σε κανένα από αυτά τα θρεπτικά δεν αναπτύχθηκαν κύτταρα ζύμης από τους αντίστοιχους μετασχηματισμούς.

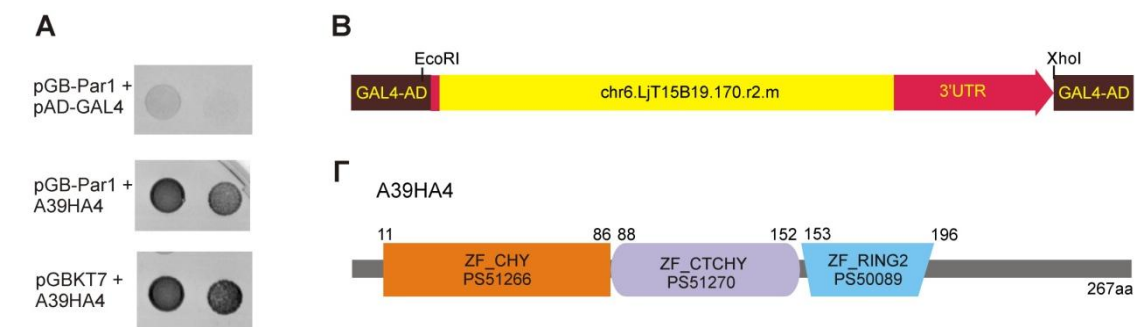


Εικόνα Γ.17: **A.** Δύο δεκαδικές αραιώσεις κυττάρων ζύμης σε θρεπτικό SC-WLH για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης μεταξύ υβριδίου BD-Par1 με τον κλώνο A39HA2 και της ικανότητας του A39HA2 να ενεργοποιεί αυτόνομα τα γονίδια επιλογής. **B.** Η ένθεση από τον κλώνο A39HA2 στον φορέα pGAL4-AD αντιστοιχεί σε περιοχή του γονιδίου chr2.CM0803.r2.m του *L. japonicus*. **Γ.** Το πολυπεπτίδιο που παράγεται σε σύντηξη με την περιοχή BD παρουσιάζει ομολογία με την περιοχή 794 με 987 του At3g23640 του *Arabidopsis*.

Αν και η ανάπτυξη των κυττάρων ζύμης πιθανά οφείλεται στην αυτόνομη ενεργοποίηση των γονιδίων επιλογής από τους κλώνους θηράματα, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση των κλώνων A39HA2 και A39H2. Οι δύο κλώνοι βρέθηκε ότι φέρουν το ίδιο ένθετο μήκους 834 bp που αντιστοιχεί στις βάσεις 344 έως το τέλος της κωδικής περιοχής του γονιδίου chr2.CM0803.r2.m του *L. japonicus* και στη συνέχεια 240 βάσεις της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής έως την ουρά πολυαδενυλίωσης (Εικόνα Γ.17B). Το τμήμα του γονιδίου που εντοπίστηκε στους κλώνους αυτούς είναι στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με τη περιοχή BD και οδηγεί στην παραγωγή ενός πολυπεπτιδίου μήκους 198 αμινοξέων. Το πολυπεπτίδιο αυτό παρουσιάζει 72% ομολογία με την περιοχή 794 με 987 της πρωτεΐνης AT3G23640.2 του *Arabidopsis* που πιθανά είναι μια α-γλουκοσιδάση (Εικόνα Γ.17Γ).

Ομάδα A39G2 (A39HA4, A39H3, A39H11, A39H16, A39H80, A39H97, A39H121)

Για την μελέτη των κλώνων της ομάδας αυτή ακολουθήθηκε η ίδια προσέγγιση όπως και στην περίπτωση της ομάδας A39G1. Στην Εικόνα Γ.18Α παρουσιάζεται η ανάπτυξη των μετασηματισμένων κυττάρων ζύμης με τους διαφορετικούς συνδυασμούς πλασμιδίων. Οι κλώνοι που εξετάστηκαν (A39HA4, A39H16, A39H97) προκαλούν την αυτόνομη ενεργοποίηση των γονιδίων επιλογής του συστήματος.

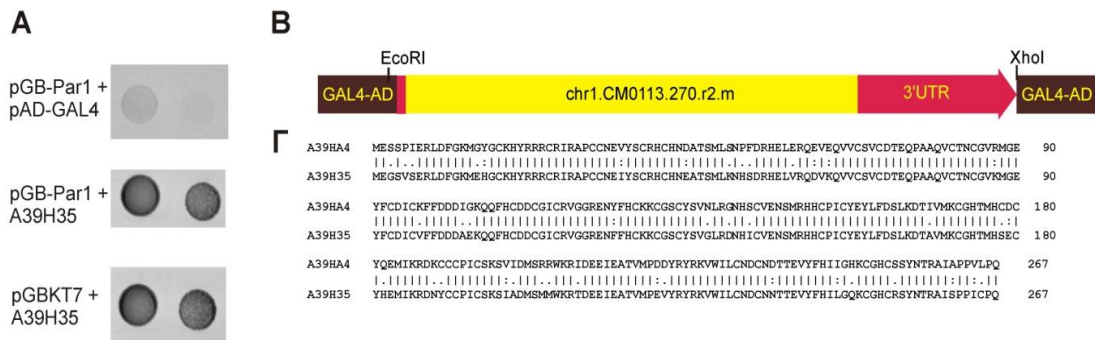


Εικόνα Γ.18: **A.** Δύο δεκαδικές αραιώσεις κυττάρων ζύμης σε θρεπτικό SC-WLH για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης μεταξύ υβριδίου BD-Par1 με τον κλώνο A39HA4 και της ικανότητας του A39HA4 να ενεργοποιεί αυτόνομα τα γονίδια επιλογής. **B.** Η ένθεση από τον κλώνο A39HA4 στον φορέα pGAL4-AD αντιστοιχεί σε ολόκληρη την κωδική περιοχή του γονιδίου chr6.LjT15B19.170.r2.m του *L. jaronicus*. **Γ.** Μοτίβα που εντοπίστηκαν στην αμινοξική ακολουθία της ένθεσης του κλώνου A39HA4.

Στη συνέχεια οι κλώνοι A39HA4, A39H16, A39H53, A39H80, A39H97 και A39H121 αλληλουχήθηκαν όπου και εντοπίστηκε το ίδιο τμήμα DNA με μικρές διαφορές στο τελικό μήκος του, που είναι γύρω στις 1170 bp. Το τμήμα αυτό ανήκει στο γονίδιο chr6.LjT15B19.170.r2.m του *L. jaronicus* και περιλαμβάνει ολόκληρη τη κωδική περιοχή καθώς και τη 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (Εικόνα Γ.18B). Το γονίδιο αυτό πιθανά κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που φέρει 3 πρότυπα περιοχής δακτύλου ψευδαργύρου και παρουσιάζει 78% ομολογία με την AT5G18650 από το *Arabidopsis*. Με τη βοήθεια του ScanProsite στην αμινοξική ακολουθία εντοπίστηκαν τρία διαφορετικά μοτίβα που ανήκουν στην οικογένεια των δακτύλων ψευδαργύρου (Εικόνα Γ.18Γ).

Ομάδα A39G4 (A39HA6, A39H35, A39H51, A39H55, A39H68, A39H75, A39H93, A39H116)

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία τα μέλη της ομάδας A39G4 (A39HA6, A39H35, A39H93) που ελέγχθηκαν βρέθηκε ότι είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τα γονίδια επιλογής του συστήματος (Εικόνα Γ.19Α). Στη συνέχεια ο κλώνος A39H35 αλληλουχήθηκε και εντοπίστηκε ένα τμήμα DNA μήκους 1220 bp που ανήκει στο γονίδιο chr1.CM0113.370.r2.m του *L. jaronicus* και περιλαμβάνει ολόκληρη τη κωδική περιοχή καθώς και μέρος της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής του γονιδίου (Εικόνα Γ.19B).

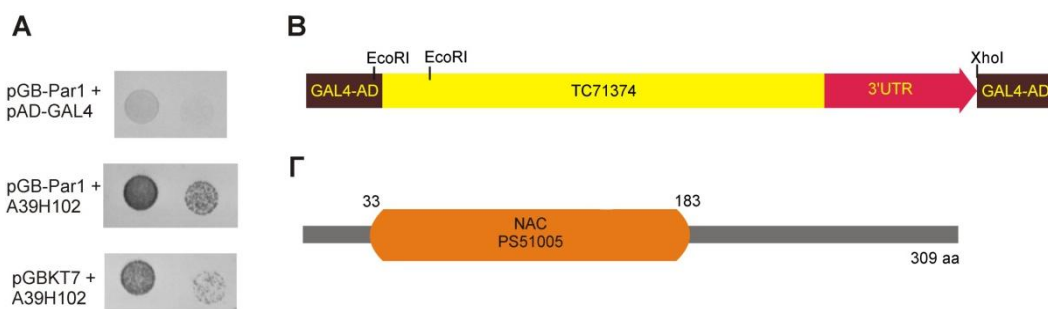


Εικόνα Γ.19: **A.** Δύο δεκαδικές αραιώσεις κυττάρων ζύμης σε θρεπτικό SC-WLH για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης μεταξύ υβριδίου BD-Par1 με τον κλώνο A39H35 και της ικανότητας του A39H35 να ενεργοποιεί αυτόνομα τα γονίδια επιλογής. **B.** Η ένθεση από τον κλώνο A39H35 στον φορέα pGAL4-AD αντιστοιχεί σε ολόκληρη την κωδική περιοχή του γονιδίου chr1.CM0113.370.r2.m του *L. jaronicus*. **Γ.** Ευθυγράμμιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών που προέρχονται από τους κλώνους A39HA4 και A39H35.

Η αλληλουχία που προέκυψε από την αλληλούχιση παρουσιάζει σημαντικό βαθμό ομολογίας με αυτήν της ομάδας A39G2, για παράδειγμα σε αμινοξικό επίπεδο οι δύο αλληλουχίες παρουσιάζουν 84,6% ομολογία (Εικόνα Γ.19Γ).

Κλώνος A39H102

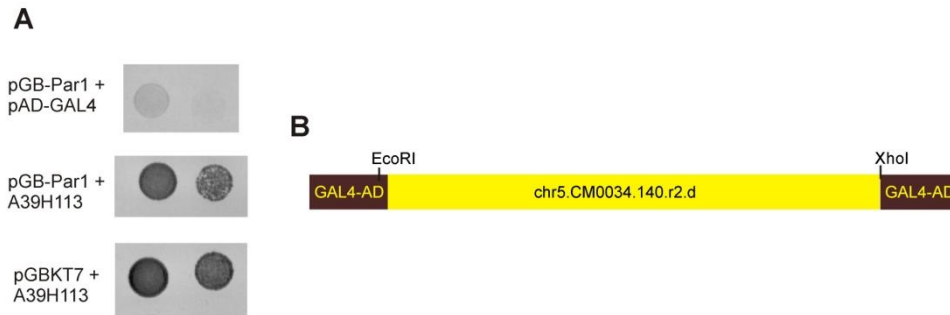
Κατά τη μελέτη επιβεβαίωσης αλληλεπίδρασης και ελέγχου αυτόνομης ενεργοποίησης των γονιδίων επιλογής από τον κλώνο A39H102 τα μετασηματισμένα κύτταρα ζύμης φαίνεται να αναπτύχθηκαν ελαφρώς καλύτερα παρουσία της *LjPar1* (Εικόνα Γ.20A). Κατά την αλληλούχιση εντοπίστηκε ένα ένθετο μήκους 1195 bp που μέρος του ανήκει στην αλληλουχία TC71374 στη βάση DFCI Gene Index για το *L. jaronicus* (Εικόνα Γ.20B). Από το ένθετο παράγεται ένα πολυπεπτίδιο μήκους 309 αμινοξέων που πιθανά ανήκει σε έναν παράγοντα μεταγραφής της οικογένειας NAC (πρωτεΐνες NAM: No Apical Meristem, IPR003441) (Εικόνα Γ.20Γ).



Εικόνα Γ.20: **A.** Δύο δεκαδικές αραιώσεις κυττάρων ζύμης σε θρεπτικό SC-WLH για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης μεταξύ υβριδίου BD-Par1 με τον κλώνο A39H102 και της ικανότητας του A39H102 να ενεργοποιεί αυτόνομα τα γονίδια επιλογής. **B.** Η ένθεση από τον κλώνο A39H102 στον φορέα pGAL4-AD αντιστοιχεί στο TC71374 του *L. jaronicus*. **Γ.** Στο παραγόμενο πολυπεπτίδιο ανιχνεύτηκε μια περιοχή που ανήκει στην οικογένεια των παραγόντων μεταγραφής NAC (No Apical Meristem).

Κλώνος A39H113

Για τον κλώνο A39H113 επίσης προέκυψε ότι είναι ικανός να προκαλέσει την αυτόνομη ενεργοποίηση του γονιδίου επιλογής (Εικόνα Γ.21Α). Στον κλώνο A39H113 εντοπίστηκε ένα ένθετο μήκους 521 bp που παρουσιάζει σημαντικό βαθμό ομοιότητας με το γονίδιο chr5.CM0034.140.r2.d από το *L. jaronicus* (Εικόνα Γ.21.Β) του οποίου η λειτουργία είναι άγνωστη.

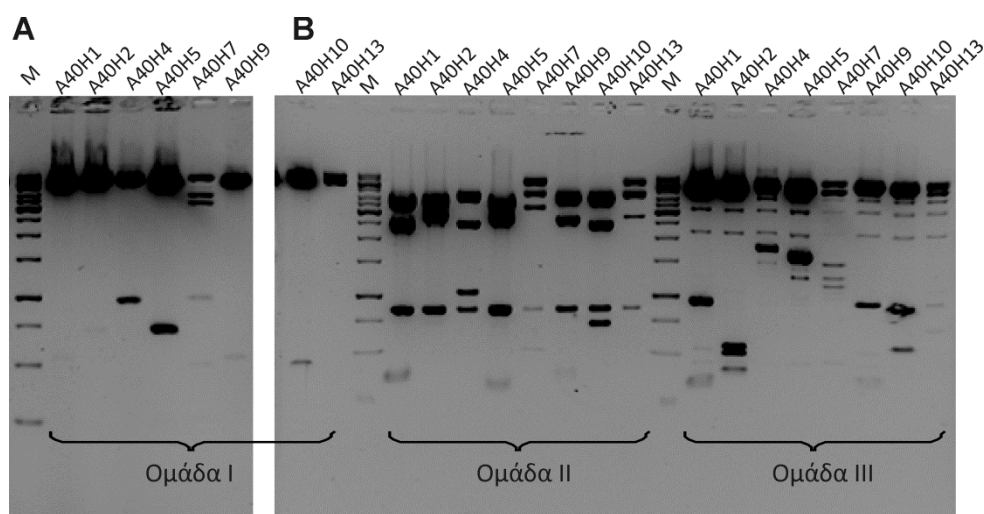


Εικόνα Γ.21: **A.** Κύτταρα ζύμης σε θρεπτικό SC-WLH για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης μεταξύ υβριδίου BD-Par1 με τον κλώνο A39H113 και της ικανότητας του A39H113 να ενεργοποιεί αυτόνομα τα γονίδια επιλογής. **B.** Η ένθεση από τον κλώνο A39H113 στον φορέα pGAL4-AD παρουσιάζει ομοιότητα με το γονίδιο chr5.CM0034.140.r2.d του *L. jaronicus*.

Το πολυπεπτίδιο που παράγεται από το γονίδιο chr5.CM0034.140.r2.d έχει μήκος 159 αμινοξέα και δεν παρουσιάζει ομοιότητα με καμιά πρωτεΐνη από αυτές που είναι κατατεθειμένες σε διεθνής βάσεις δεδομένων ενώ σε αυτό δεν εντοπίστηκε κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο με κανέναν από τους διακομιστές ScanProsite, InterPro και Pfam.

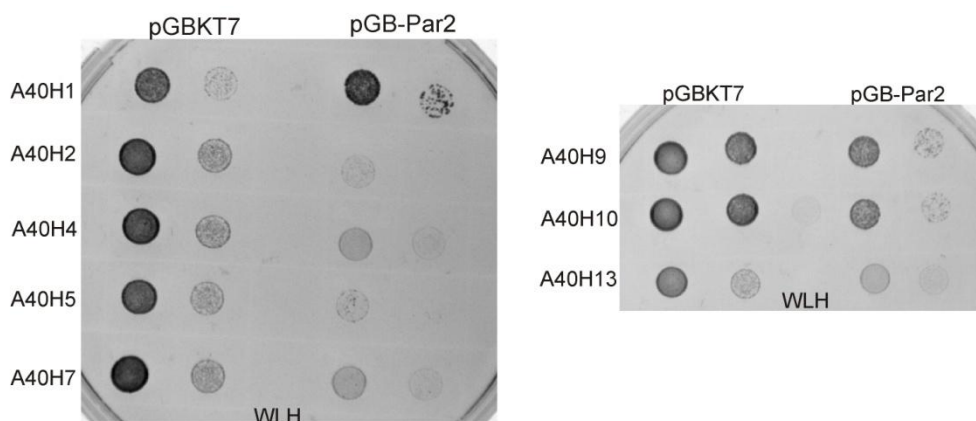
Γ.5.4.2. Ανάλυση των κλώνων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την *LjPar2*.

Στη περίπτωση της *LjPar2* μετά την ανάλυση των πέψεων οι 8 κλώνοι (A40H1, A40H2, A40H4, A40H5, A40H7, A40H9, A40H10 και A40H13) ήταν όλοι διαφορετικοί μεταξύ τους (Εικόνα Γ.22).



Εικόνα Γ.22: Ανάλυση σε πηκτή αραρόζης 1% (w/v) των προϊόντων της αντίδρασης περιορισμού με τις διαφορετικές ομάδες ενζύμων για την ομαδοποίηση των κλώνων που προέκυψαν από τη σάρωση για την *LjPar2*. Στήλη M: μάρτυρας μοριακών βαρών DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas).

Για κάθε έναν από τους κλώνους A40 πραγματοποιήθηκαν δύο μετασχηματισμοί σε κύτταρα ζύμης, ένας για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης με την *LjPar2* και ένας για τον έλεγχο αυτόματης ενεργοποίησης των γονιδίων επιλογής του συστήματος.

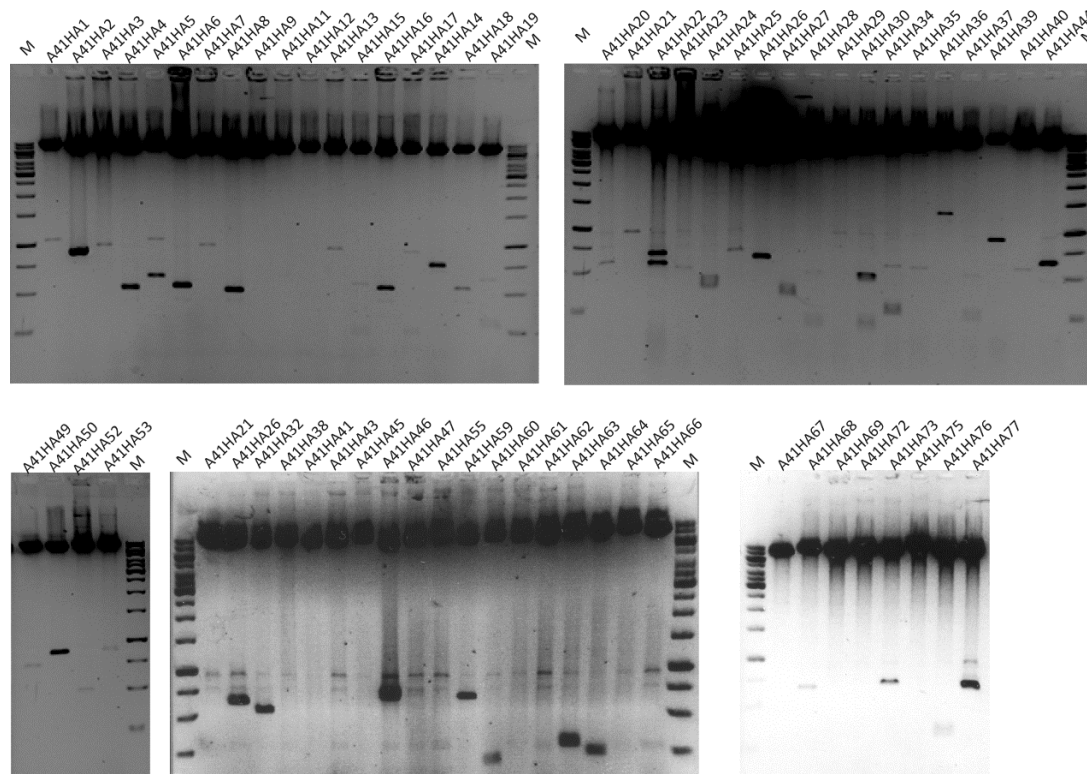


Εικόνα Γ.23: Έλεγχος αυτοενεργοποίησης του προαγωγέα και επανέλεγχος της αλληλεπίδρασης μεταξύ *LjPar2* και των κλώνων A40 που προέκυψαν μετά τη σάρωση σε δύο δεκαδικές αραιώσεις σε θρεπτικό SC-WLH.

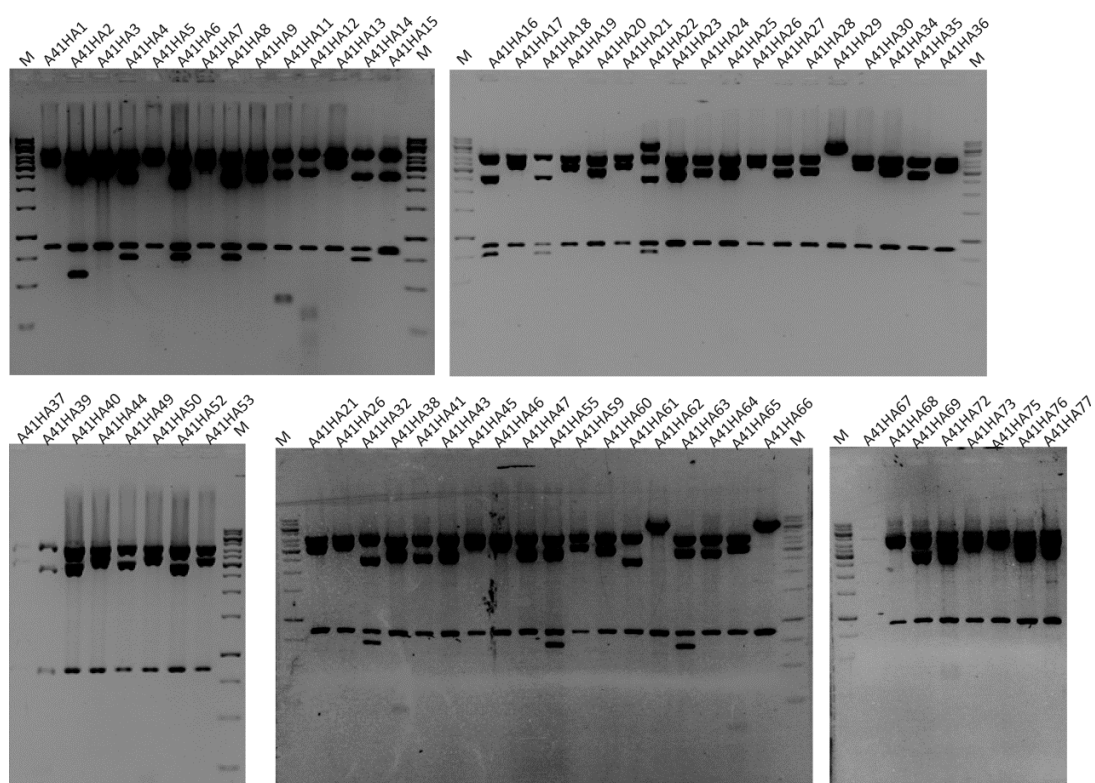
Από τα αποτελέσματα ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων στο θρεπτικό επιλογής SC-WLH (Εικόνα Γ.23), παρατηρούμε ότι όλοι οι κλώνοι που απομονώθηκαν ενεργοποιούν τον προαγωγέα αυτόνομα ενώ παρουσία της *LjPar2* τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε μικρότερο βαθμό.

Γ.5.4.3. Ανάλυση των κλώνων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την *LjPar3*.

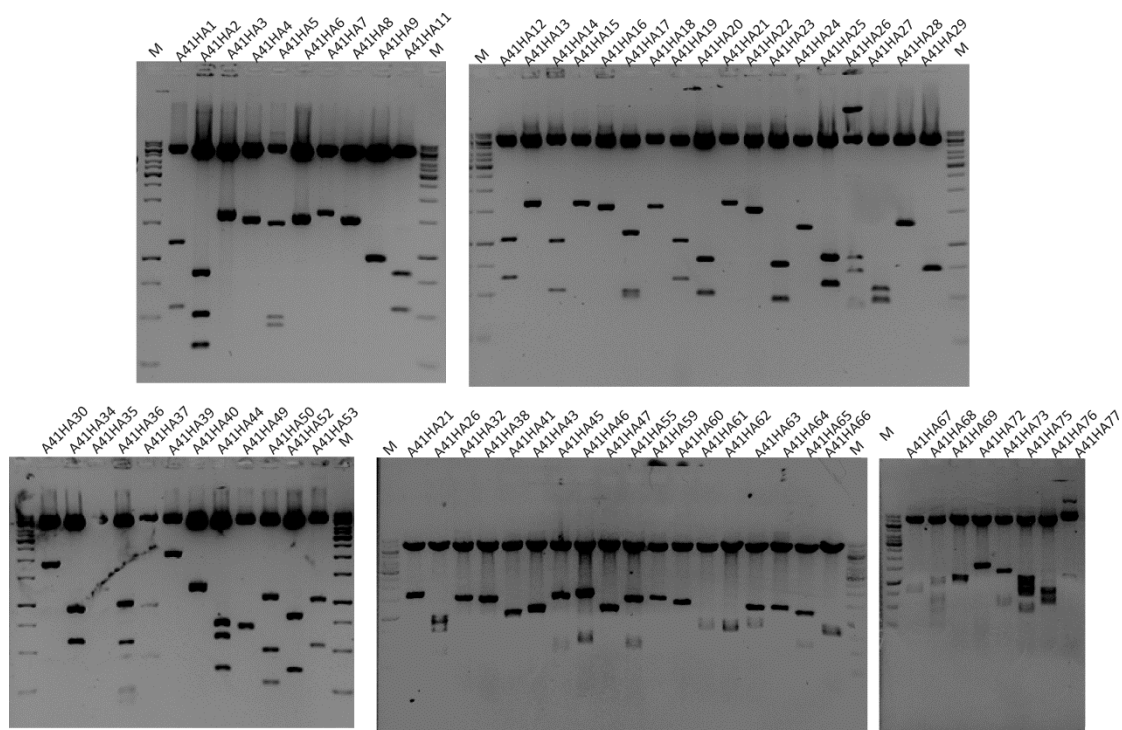
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως από τη σάρωση με την *LjPar3* προέκυψαν 64 κλώνοι. Για την ομαδοποίηση των κλώνων πραγματοποιήθηκε και πάλι η διαδικασία με τις πέψεις. Τα αποτελέσματα των πέψεων με τα ένζυμα περιορισμού της ομάδας I (*Pst*I, *Xho*I, *Xba*I, *Sst*II) αναλύονται στην Εικόνα Γ.24, με τα ένζυμα περιορισμού της ομάδας II (*Nco*I, *Not*I, *Eco*RI, *Bam*HI) στην Εικόνα Γ.25 και της ομάδας III (*Sst*I, *Hind*III, *Stu*I) στην Εικόνα Γ.26.



Εικόνα Γ.24: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) των προϊόντων της αντίδρασης περιορισμού με τα ένζυμα *Pst*I, *Xho*I, *Xba*I και *Sst*II (Ομάδα I) για την ομαδοποίηση των κλώνων που προέκυψαν από τη σάρωση για την *LjPar3*. Στήλη M: μάρτυρας μοριακών βαρών DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas).



Εικόνα Γ.25: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) των προϊόντων της αντίδρασης περιορισμού με τα ένζυμα NcoI, NotI, EcoRI και BamHI (Ομάδα II) για την ομαδοποίηση των κλώνων που προέκυψαν από τη σάρωση για την *LjPar3*. Στήλη M: μάρτυρας μοριακών βαρών DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas).



Εικόνα Γ.26: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) των προϊόντων της αντίδρασης περιορισμού με τα ένζυμα StuI, HindIII και SstI (Ομάδα III) για την ομαδοποίηση των κλώνων που προέκυψαν από τη σάρωση για την *LjPar3*. Στήλη M: μάρτυρας μοριακών βαρών DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas).

Από την ανάλυση των πέψων οι κλώνοι που πιθανά αλληλεπιδρούν με την *LjPar3* ταξινομήθηκαν σε 5 ομάδες στις οποίες ανήκουν μόλις 19 κλώνοι, ενώ οι υπόλοιπες 45 δεν άνηκαν σε κάποια ομάδα. Στον Πίνακα Γ.4 παρουσιάζεται το μέγεθος της κάθε ζώνης που εμφανίζεται στην κάθε ομάδα κλώνων. Από το πρότυπο της πέψης η ομάδα A41G5 αντιστοιχεί σε κλώνους με άδειο τον φορέα.

Πίνακας Γ.4: Πρότυπο πέψων των ομάδων των κλώνων της *LjPar3*

Ομάδα	PstI, XhoI, XbaI, SstII	NcoI, NotI, EcoRI, BamHI	SstI, HindIII, StuI
A41G1	8500	4250, 3450, 860	6900, 1670
A41G2	7900, 600	4250, 3000, 860, 750	6900, 1500
A41G3	7600, 750, 300	4250, 3000, 860	6900, 900, 600
A41G4	8100	4250, 2500, 860	6900, 1260
A41G5	7600	4250, 2500, 860	6900, 730

Οι ομάδες και τα μέλη τους αναγράφονται στον Πίνακα Γ.5.

Πίνακας Γ.5: Ομάδες κλώνων που προέκυψαν από τη σάρωση με την *LjPar3*.

Ομάδα	Μέλη ομάδας
A41G1	A41HA3, A41HA7, A41HA13, A41HA21
A41G2	A41HA4, A41HA6, A41HA8, A41HA16, A41HA18, A41HA32
A41G3	A41HA19, A41HA34
A41G4	A41HA24, A41HA40
A41G5	A41HA29, A41HA61, A41HA62, A41HA66, A41HA67
Μονές	A41HA1, A41HA2, A41HA5, A41HA9, A41HA11, A41HA12, A41HA14, A41HA15, A41HA17, A41HA20, A41HA22, A41HA23, A41HA25, A41HA26, A41HA27, A41HA28, A41HA30, A41HA35, A41HA36, A41HA37, A41HA38, A41HA39, A41HA41, A41HA43, A41HA44, A41HA45, A41HA46, A41HA47, A41HA49, A41HA50, A41HA52, A41HA53, A41HA55, A41HA59, A41HA60, A41HA63, A41HA64, A41HA65, A41HA68, A41HA69, A41HA72, A41HA73, A41HA75, A41HA76, A41HA77

Ομάδα A41G1 (A41HA3, A41HA7, A41HA13, A41HA21)

Μέλη της ομάδας αυτής ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να επαληθεύουν την αλληλεπίδραση τους με την *LjPar3* αλλά και ως προς μια πιθανή αυτόνομη ενεργοποίηση των γονιδίων επιλογής. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης με τα πλασμίδια pGB-Par3 και A41HA13 για επαλήθευση της αλληλεπίδρασης, καθώς και οι αντίστοιχοι συνδυασμοί πλασμιδίων για έλεγχο της αυτόνομης ενεργοποίησης των γονιδίων επιλογής. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν και τα πλασμίδια pGBKT7-Lam pGBKT7-p53 για αρνητικό και για θετικό μάρτυρα της αλληλεπίδρασης. Στην Εικόνα Γ.27.A παρουσιάζονται τρεις δεκαδικές αραιώσεις μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης με τους διαφορετικούς συνδυασμούς πλασμιδίων σε θρεπτικό επιλογής SC-WLHA. Παρατηρούμε ότι το πολυπεπτίδιο που παράγεται από τον κλώνο A41HA13 αλληλεπιδρά *LjPar3* ενώ χωρίς την παρουσία της *LjPar3* δεν ενεργοποιούνται τα γονίδια επιλογής του συστήματος. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και όταν χρησιμοποιήθηκαν και άλλοι κλώνοι, μέλη της ίδιας ομάδας.

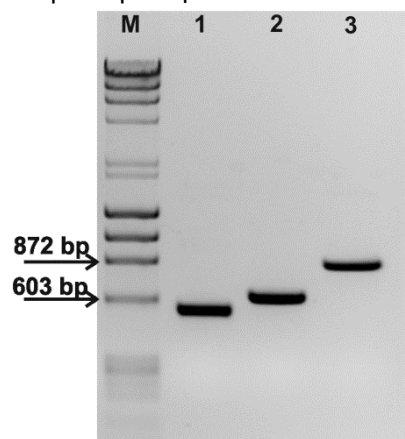
Γ.6. Σίγηση (αποσιώπηση) των παρβουλινών του *Lotus japonicus*.

Σημαντικές πληροφορίες για τη λειτουργία των γονιδίων μπορούμε να αντλήσουμε όταν διακόψουμε τη λειτουργία τους, ένας τρόπος για να γίνει αυτό είναι να μειώσουμε το επίπεδο έκφρασής τους στον οργανισμό από τον οποίο προέρχονται. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί εφαρμόζοντας την τεχνική της RNA παρεμβολής (RNA interference, RNAi) που είναι μια μέθοδος αντίστροφης γενετικής ανάλυσης, που οδηγεί στη σίγηση της έκφρασης γονιδίων μέσω ομόλογων τμημάτων RNA (sRNA: small RNA) μεγέθους 19–25 βάσεων.

Γ.6.1. Πλασμιδιακές κατασκευές.

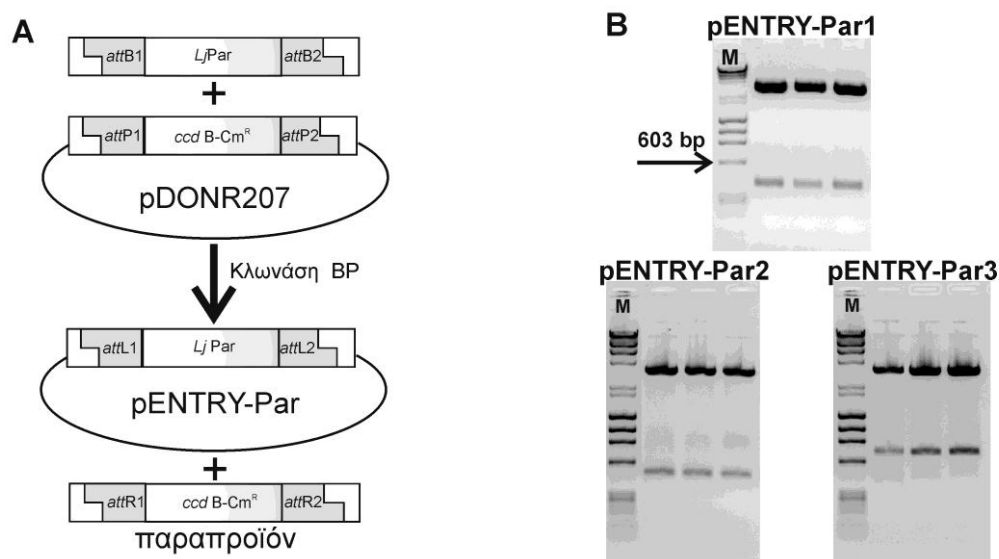
Για τη δημιουργία φυτών στα οποία θα γίνεται καταστολή της έκφρασης των παρβουλινών χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pH7GWIWG2(I) (Karimi *et al.*, 2002) που οδηγεί στην παραγωγή φουρκέτας RNA με σκοπό την ενεργοποίηση του μετά-μεταγραφικού μηχανισμού σίγησης γονιδίων (PTGS: Post-Transcriptional Gene Silencing). Η ένθεση των περιοχών των γονιδίων των παρβουλινών στον φορέα pH7GWIWG2(I) πραγματοποιήθηκε με την τεχνολογία GATEWAY (Invitrogen). Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στην ιδιότητα κλωνασών του λάμδα φάγου να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και προχωρούν στον ανασυνδυασμό τους.

Αρχικά οι κωδικές περιοχές των παρβουλινών, που βρίσκονταν στον φορέα pBluescript KS, ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος εκκινητών που υβριδίζουν εκατέρωθεν των ενθέσεων στο pBluescript KS και στα άκρα τους φέρουν τις περιοχές *attB1* και *attB2* που αναγνωρίζονται από την κλωνάση BP. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR παρουσιάζονται στην Εικόνα Γ.28, το αναμενόμενο μέγεθος για την *attB-Par1* είναι 548 bp, για την *attB-Par2* είναι 629 bp και για την *attB-Par3* είναι 860 bp.



Εικόνα Γ.28: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) των προϊόντων της αντίδρασης PCR για την ανάκτηση των τμημάτων *attB-Par1*, *attB-Par2* και *attB-Par3*, στήλες 1, 2 και 3 αντίστοιχα. Στήλη M: μάρτυρας μοριακών βαρών DNA (λDNA-HindIII/φ-HaeIII).

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR αφότου απομονώθηκαν από την πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν για την ένθεσή τους στον φορέα «δότη» pDONR207. Η κλωνοποίησή τους στον pDONR207 έγινε μέσω της αντίδρασης BP, όπου η κλωνάση BP αναγνωρίζει τα άκρα *attB* στα ένθετα και τις θέσεις *attP* στον φορέα δότη και σε μια αντίδραση ανασυνδυασμού τα ένθετα ενσωματώνονται στον pDONR207 (Εικόνα Γ.29A) με αποτέλεσμα την δημιουργία των πλασμιδίων εισόδου για κάθε μια από τις παρβουλίνες (Entry plasmid, pENTR-Par1, 2 και 3).



Εικόνα Γ.29: Α. Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής του πλασμιδίου εισόδου (Entry plasmid) σύμφωνα με την τεχνολογία GATEWAY και τη χρήση της κλωνάσης BP για κάθε μια από τις παρβουλίνες. Β. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) των προϊόντων της αντίδρασης περιορισμού για την επιβεβαίωση της αντίδρασης BP και τη δημιουργία των πλασμιδίων «εισόδου». Στήλη Μ: μάρτυρας μοριακών βαρών DNA (λDNA-HindIII/φ-HaeIII).

Το προϊόν της αντίδρασης BP χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5a και έγινε επιλογή με το αντιβιοτικό γενταμικίνη. Βακτηριακά κύτταρα που φέρουν το πλασμίδιο εισόδου με την ένθεση είναι τα μόνα που μπορούν να επιβιώσουν, έτσι μονές αποικίες αναπτύχθηκαν με σκοπό την απομόνωση πλασμιδιακού DNA και ελέγχου της ένθεσης. Ο έλεγχος έγινε χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού SacI και XhoI, τα αναμενόμενα μεγέθη για το pENTRY-Par1 είναι 407 bp και 3454 bp, για το pENTRY-Par2 είναι 476 bp και 3454 bp και για το pENTRY-Par3 είναι 713 bp και 3454 bp (Εικόνα Γ.29B). Στη συνέχεια, κάποιοι από τους κλώνους που έφεραν την ένθεση αλληλουχήθηκαν για επιβεβαίωση.

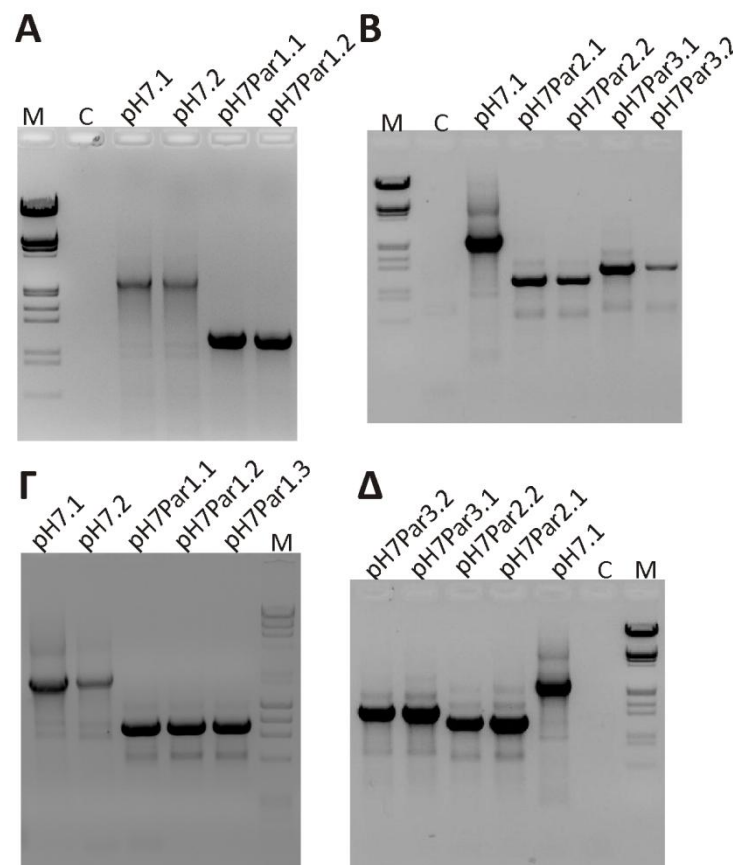
Το καθένα από τα πλασμίδια εισόδου pENTRY-Par χρησιμοποιήθηκε μέσω της αντίδρασης ανασυνδυασμού LR για την ένθεση της αντίστοιχης παρβουλίνης στον φορέα προορισμού pH7GWIWG2(I). Ο μηχανισμός της αντίδρασης LR είναι παρόμοιος με αυτήν της αντίδρασης BP, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται η κλωνάση LR που αναγνωρίζει τις θέσεις *attL1* και *attL2* στον φορέα εισόδου και πραγματοποιεί τον ανασυνδυασμό με τις θέσεις *attR1* και *attR2* στον τελικό φορέα. Στο φορέα pH7GWIWG2(I) η ένθεση της κάθε μιας παρβουλίνης έγινε σε δύο θέσεις εκατέρωθεν του ιντρονίου που υπάρχει στον φορέα και με αντίθετες κατευθύνσεις (Εικόνα Γ.30). Το προϊόν της αντίδρασης LR χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5a και έγινε επιλογή με το αντιβιοτικό σπεκτινομυκίνη. Βακτηριακά κύτταρα που φέρουν το τελικό πλασμίδιο με τις δυο ενθέσεις είναι τα μόνα που μπορούν να επιβιώσουν, έτσι μονές αποικίες αναπτύχθηκαν με σκοπό την απομόνωση πλασμιδιακού DNA και ελέγχου των ενθέσεων. Το τελικό πλασμίδιο ελέγχθηκε με αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδίζουν σε περιοχές του φορέα που περικλείουν και τις δύο ενθέσεις, το πρώτο ζεύγος είναι οι CaMV35Sf και RNAi-intronFnew ενώ το δεύτερο οι RNAi-intronRnew και OCS-termRnew.



Εικόνα Γ.30: Διαγραμματική απεικόνιση δομήσεων ανάμεσα στο αριστερό (LB) και δεξιό (RB) συνοριακό του T-DNA που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό του *L. japonicus*. Τα βέλη υποδηλώνουν τις θέσεις των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση της ακεραιότητας των κατασκευών.

Γ.6.2. Μετασχηματισμός *Agrobacterium*

Οι πλασμιδιακές κατασκευές rH7-Par1, rH7-Par2 και rH7-Par3, που αντιστοιχούν σε κάθε μία από τις τρεις παρβουλίνες, και ο άδειος φορέας rH7 χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *A. tumefaciens* AGL1 με ηλεκτροπόρωση. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε με ανάπτυξή του σε θρεπτικό μέσο που περιείχε τα αντιβιοτικά ριφαμπικίνη, αμπικιλίνη και σπεκτινομικίνη. Από αποικίες των αγροβακτηρίων που αναπτύχθηκαν απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA για τον έλεγχο της παρουσίας και ακεραιότητας των πλασμιδίων με δύο αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινήτων όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα Γ.30.

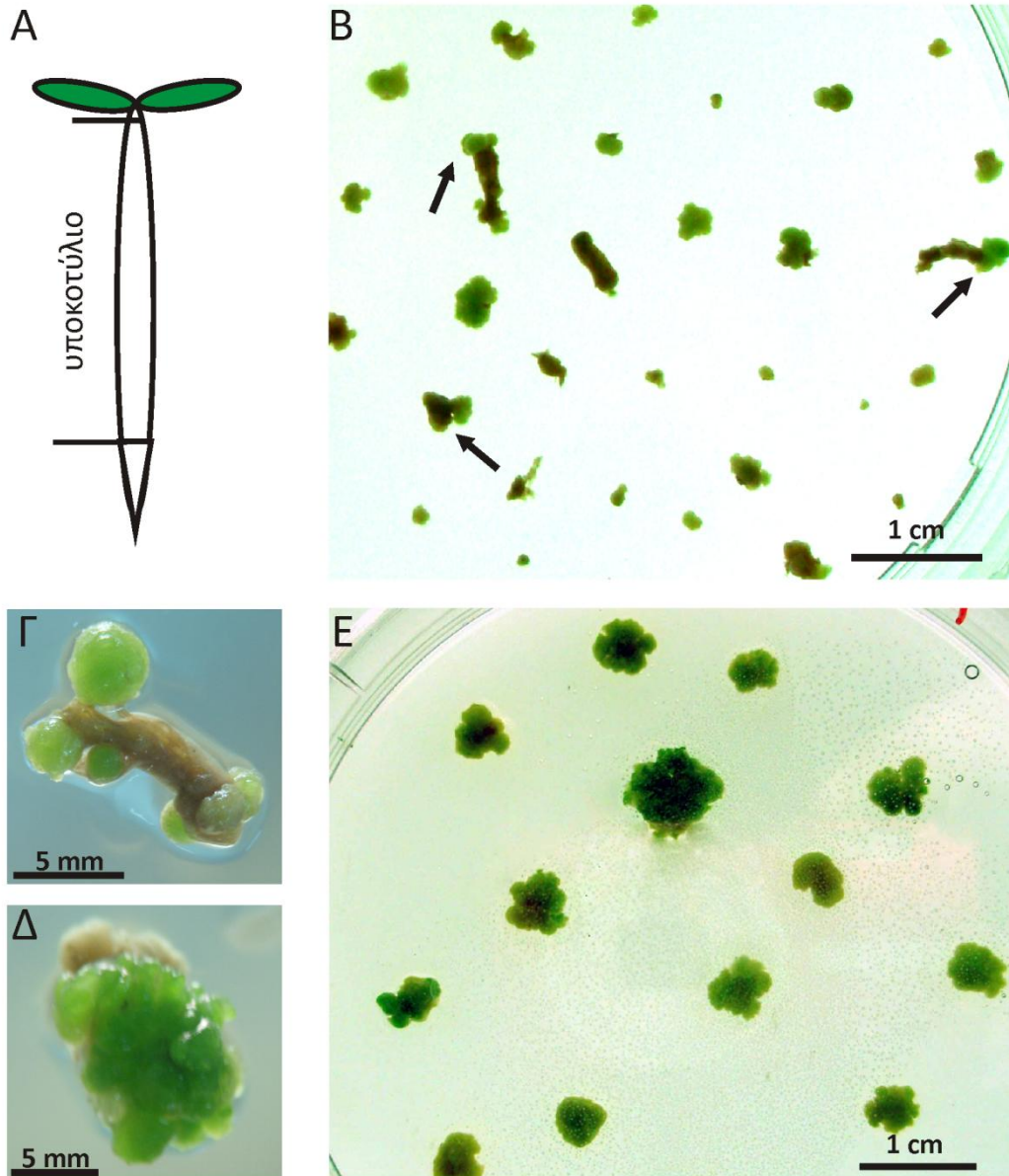


Εικόνα Γ.31: Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% (w/v) των προϊόντων της αντίδρασης PCR για τον έλεγχο της ακεραιότητας των πλασμιδίων rH7, rH7Par1, rH7Par2 και rH7Par3 μετά τον μετασχηματισμό *Agrobacterium*. **A. B.** Ανάλυση των προϊόντων PCR με εκκινήτες τους CaMV35Sf και RNAi-intronFnew **Γ. Δ.** Ανάλυση των προϊόντων PCR με εκκινήτες τους RNAi-intronRnew και OCS-termRnew. Στήλη M: μάρτυρας μοριακών βαρών DNA (λDNA/EcoRI+HindIII, Fermentas). Στήλη C: Αντιδράσεις PCR χωρίς την προσθήκη μήτρας.

Από τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR προκύπτει ότι ο μετασχηματισμός των αγροβακτηρίων ήταν επιτυχής και η κασέτα των πλασμιδίων παρέμεινε ακέραιη. Τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες καλλιέργειες των μετασχηματισμένων αγροβακτηρίων με τις αντίστοιχες κατασκευές φυλάχθηκαν στους -80°C ώστε να χρησιμοποιηθούν αργότερα για τον μετασχηματισμό του *L. jaronicus*.

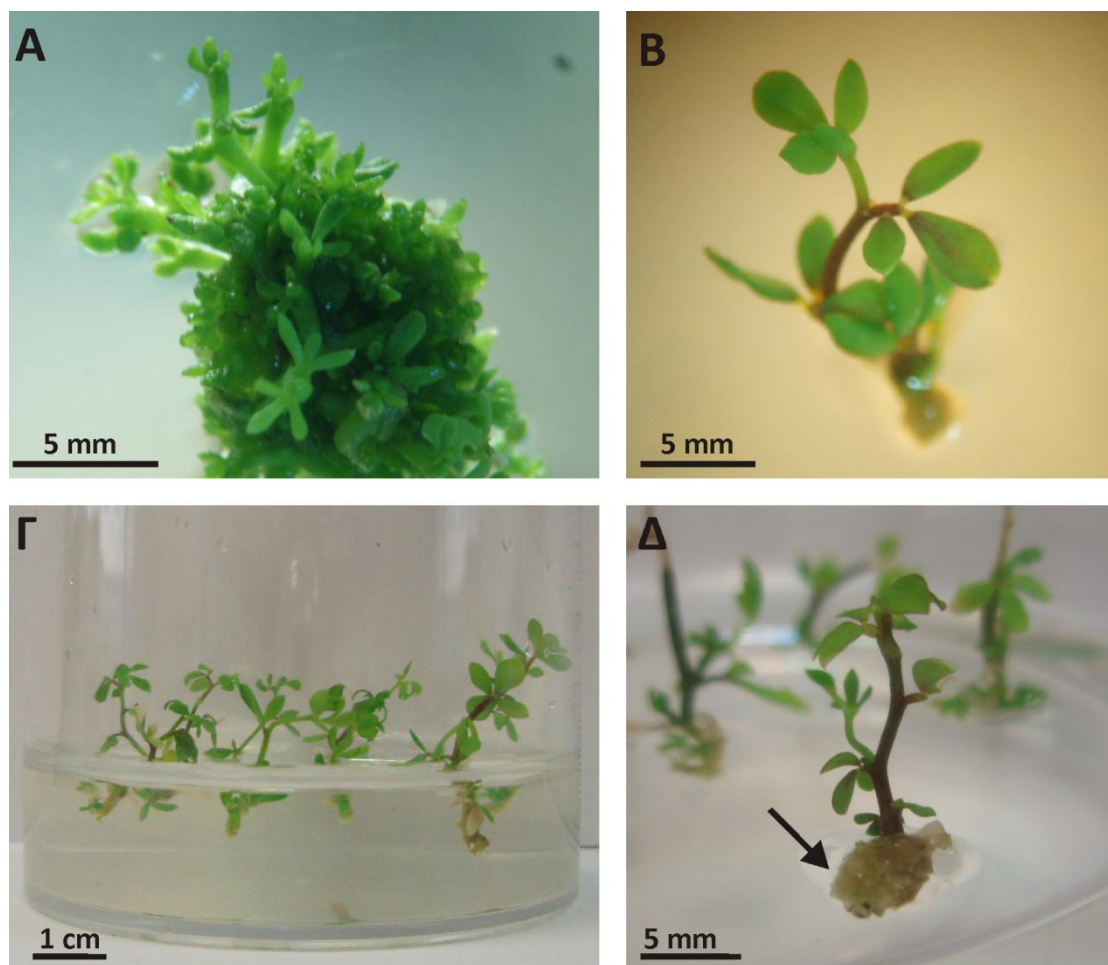
Γ.6.3. Μετασχηματισμός υποκοτυλίων *Lotus jaronicus* και ανάπτυξη μετασχηματισμένων φυτών.

Για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών *L. jaronicus* στα οποία πραγματοποιείται σίγηση των παρβουλινών χρησιμοποιήθηκαν τα υποκοτύλια από βλαστώντα σπέρματα *L. jaronicus* (Εικόνα Γ.32) τα οποία μολύνθηκαν με μετασχηματισμένα αγροβακτήρια. Τα μολυσμένα υποκοτύλια τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο B5 (Gamborg) 1/10 που επιπλέον περιείχε τις ορμόνες 6-βενζυλοαμινοπουρίνη (BA) και 1-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) και ακολούθησε συγκαλλιέργεια με τα αγροβακτήρια για περίπου 5 ημέρες. Στη συνέχεια τα υποκοτύλια μεταφέρθηκαν σε πλήρες θρεπτικό B5 που περιέχει σουκρόζη για πηγή άνθρακα, τις ορμόνες κυτοκίνη (BA) και αυξίνη (NAA) με σκοπό την επαγωγή κάλλου, υγρομικίνη για την επιλογή των μετασχηματισμένων κάλων και κεφοταξίμη για την απομάκρυνση των αγροβακτηρίων καθώς και την αποφυγή άλλων βακτηριακών μολύνσεων. Οι πρώτοι κάλλοι άρχισαν να είναι ορατοί με γυμνό μάτι σε περίπου 4 εβδομάδες μετά από τον μετασχηματισμό (Εικόνες Γ.32B και Γ.32Γ). Κατά το διάστημα σχηματισμού κάλλου και ως ότου αποκτήσουν διάμετρο μεγαλύτερη των 5 mm μεταφέρονται κάθε εβδομάδα σε νέο υπόστρωμα επαγωγής κάλλου και απομακρύνονται τυχόν νεκροί ιστοί. Όταν οι κάλλοι αποκτήσουν το κατάλληλο μέγεθος, μεταφέρονται σε θρεπτικό υλικό επαγωγής βλαστού (Εικόνες Γ.32Δ και Γ.32Ε). Σε αυτό το στάδιο στο θρεπτικό δεν προστίθεται αυξίνη αλλά κυτοκίνη και αμμωνιακά ιόντα για την περαιτέρω προώθηση του σχηματισμού βλαστού, επιπλέον και σε αυτό το στάδιο είναι απαραίτητη η παρουσία των αντιβιοτικών υγρομικίνη και κεφοταξίμη καθώς και η μεταφορά των κάλων σε νέο υπόστρωμα κάθε εβδομάδα. Για κάθε μετασχηματισμό περισσότεροι από 700 κάλλοι μεταφέρθηκαν από το θρεπτικό επαγωγής κάλλου σε θρεπτικό επαγωγής βλαστού.



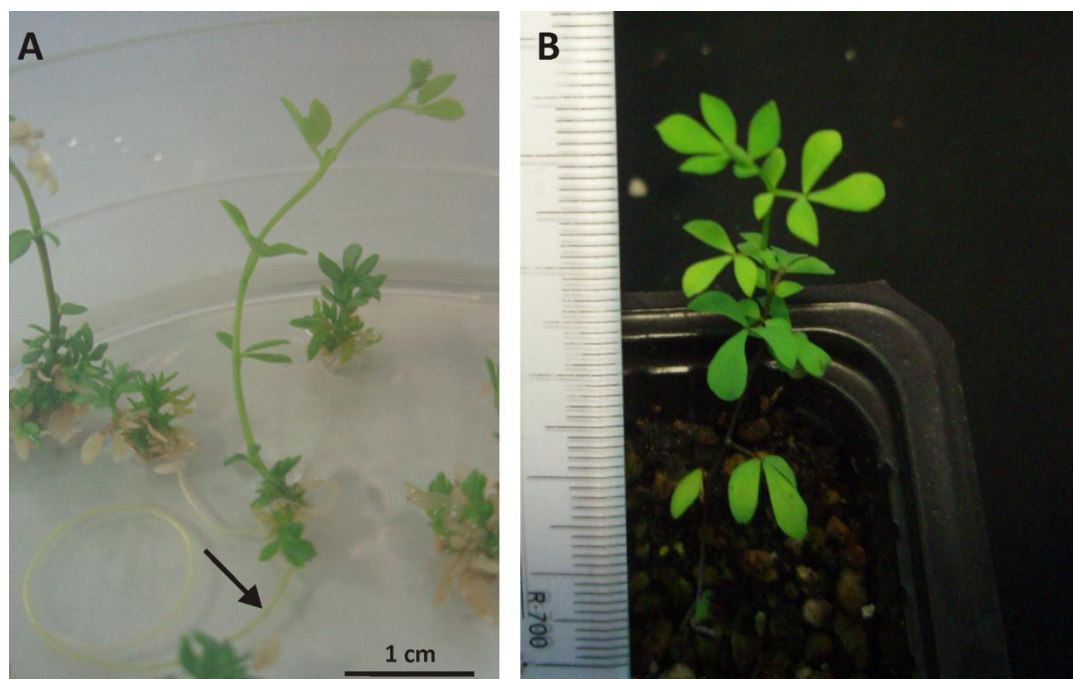
Εικόνα Γ.32: **A.** Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής του υποκοτυλίου φυταρίων *L. jaronicus* που χρησιμοποιήθηκαν κατά το μετασχηματισμό. **B.** Σχηματισμός κάλλων από τα υποκοτύλια (βέλη) και ανάπτυξή τους σε θρεπτικό μέσο επαγωγής κάλων που περιέχει αυξίνη, κυτοκινίνη και τα κατάλληλα αντιβιοτικά. **Γ, Δ.** Οι κάλλοι σχηματίζονται κυρίως στην άκρη των υποκοτυλίων και ο μη μετασχηματισμένος ιστός εξαιτίας της παρουσίας υγρομικίνης νεκρώνεται. **Ε.** Όταν οι κάλλοι αναπτυχθούν αρκετά (>5mm) μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστού που περιέχει κυτοκινίνη, αμμωνιακά ιόντα και τα κατάλληλα αντιβιοτικά.

Μετά από μερικές εβδομάδες (4-6) στο θρεπτικό επαγωγής βλαστού οι κάλλοι αρχίζουν να διαφοροποιούνται και να σχηματίζουν βλαστούς (Εικόνα Γ.33Α), τότε οι κάλλοι με τους βλαστούς μεταφέρονται σε θρεπτικό ανάπτυξης βλαστών που περιέχει κυτοκινίνη και τα αντιβιοτικά υγρομικίνη και κεφοταξίμη. Όταν σχηματιστεί βλαστός αυτός απομακρύνεται από τον κάλλο (Εικόνα Γ.33Β) και μεταφέρεται σε θρεπτικό επιμήκυνσης βλαστού (Εικόνα Γ.33Γ). Το θρεπτικό επιμήκυνσης αποτελείται μόνο από το θρεπτικό μέσο B5 (Gamborg), χωρίς αντιβιοτικά.



Εικόνα 7.33: **A.** Στο θρεπτικό επαγωγής βλαστού ο κάλλος διαφοροποιείται και σχηματίζει βλαστούς και μεταφέρεται σε θρεπτικό ανάπτυξης βλαστού. **B, Γ.** Καλοσχηματισμένοι βλαστοί απομακρύνονται από τον κάλο και μεταφέρονται σε θρεπτικό επιμήκυνσης. **Δ.** Όταν ο βλαστός αναπτυχθεί αρκετά μεταφέρεται σε θρεπτικό επαγωγής ρίζας, στην άκρη του βλαστού σχηματίζεται κάλλος (βέλος) από όπου εκφύεται η ρίζα.

Όταν ο βλαστός αναπτυχθεί αρκετά (>2 cm) μεταφέρεται σε θρεπτικό μέσο ½ B5 (Gamborg) στο οποίο προστίθεται αυξίνη για την επαγωγή δημιουργίας ρίζας. Στο στάδιο επαγωγής ρίζας στη βάση του βλαστού σχηματίζεται μικρός λευκός κάλλος από όπου και εκφύεται η ρίζα (Εικόνα 7.33Δ). Όταν εμφανιστεί ρίζα τα νεαρά φυτά μεταφέρονται σε θρεπτικό επιμήκυνσης ρίζας (Εικόνα 7.34A) για περίπου 3 – 5 εβδομάδες πριν τοποθετηθούν σε γλαστράκι (Εικόνα 7.34B) και μεταφερθούν σε θάλαμο μέχρι την ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου και την παραλαβή σπόρων.



Εικόνα Γ.34: **A.** Για την αύξηση της ρίζας το φυτό μεταφέρεται σε θρεπτικό επιμήκυνσης ρίζας πριν μεταφερθεί σε γλαστράκι (**B**) για να ολοκληρώσει το βιολογικό του κύκλο.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 4 μετασηματισμοί ένας για κάθε μια παρβουλίνη και ένας που αφορούσε τον άδειο φορέα. Κατά τη διάρκεια του μετασηματισμού δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά ανάμεσα στους διαφορετικούς μετασηματισμούς σε κανένα στάδιο τις ιστοκαλλιέργειας.

Τα μετασηματισμένα φυτά αφότου τοποθετήθηκαν σε γλαστράκι με τύρφη και περλίτη μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης για την παραγωγή σπόρων. Αρκετά από τα φυτά που τοποθετήθηκαν στο θάλαμο δεν ολοκλήρωσαν το βιολογικό τους κύκλο και δεν παρήγαγαν σπόρους. Αναλυτικά στον Πίνακα Γ.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για κάθε μετασηματισμό.

Πίνακας Γ.6: Αριθμός φυτών που μεταφέρθηκαν στο θάλαμο, επιβίωσαν και παρήγαγαν σπόρους.

Μετασηματισμός	Φυτά που μεταφέρθηκαν στο θάλαμο	Φυτά που επέζησαν για μεγάλο διάστημα	Φυτά που ολοκλήρωσαν το βιολογικό τους κύκλο
H7	110	57 (51%)	20 (35%)
H7P1	107	42 (39%)	33 (78%)
H7P2	66	40 (60%)	15 (37%)
H7P3	55	23 (41%)	13 (56 %)

Παρόλο που δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές φαινοτυπικές διαφορές στα φυτά που προέκυψαν από τους διαφορετικούς μετασηματισμούς τα ποσοστά βιωσιμότητας των φυτών μετά τη μεταφορά τους στο θάλαμο ήταν διαφορετικά και κυμαίνονται από 39% (για τα φυτά H7P1) έως και 60% (για τα φυτά H7P2). Η διαφορά στον αριθμό των φυτών που μεταφέρθηκαν αρχικά στο θάλαμο κυρίως οφείλεται σε τυχαίους παράγοντες όπως για παράδειγμα κάποιες μολύνσεις που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας είχαν ως αποτέλεσμα την υποχρεωτική μείωση του αριθμού των κάλων και βλαστών που μπορούσαν να συνεχίσουν στο επόμενο στάδιο. Όσον αφορά τα φυτά που

επιβίωσαν για μεγάλο διάστημα μόνο ένα ποσοστό κατάφερε να ολοκληρώσει το βιολογικό του κύκλο και να καρποφορήσει, το ποσοστό αυτό κυμαίνεται μεταξύ 35% (για τα φυτά H7) και 78% (για τα φυτά H7P1). Η πλειοψηφία των φυτών που επέζησαν για μεγάλο διάστημα και δεν έδωσαν σπόρους αφορά φυτά που δεν αναπτύσσονταν ιδιαίτερα μετά την μεταφορά τους στο θάλαμο καθώς και φυτά που ενώ παρουσίαζαν κανονική ανάπτυξη μετά από κάποιο διάστημα παρουσίαζαν συμπτώματα όπως χλώρωση και απώλεια φύλλων, καθώς και ξήρανση κορυφών και βλαστών. Τα συμπτώματα αυτά παρουσιάστηκαν και στους τέσσερις διαφορετικούς μετασχηματισμούς.

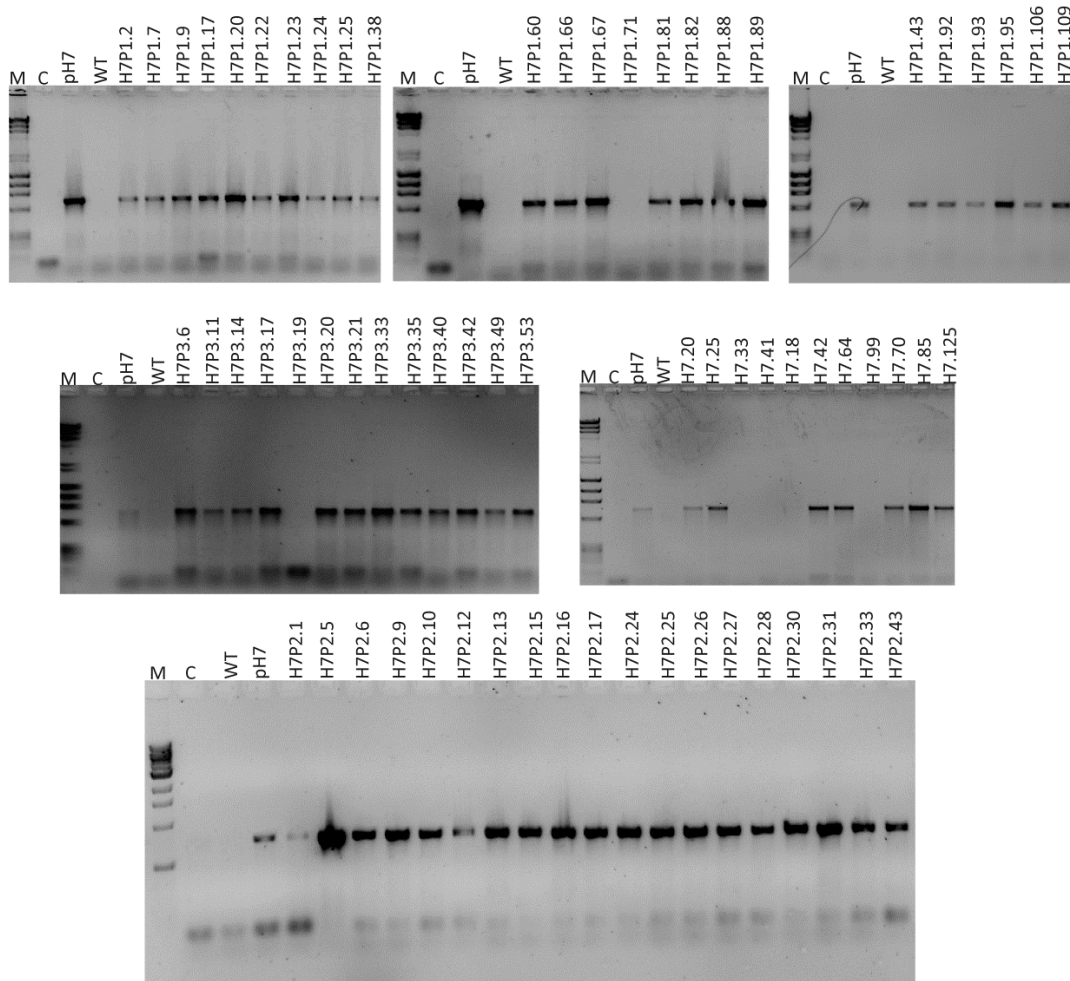
Γ.6.4. Έλεγχος επιτυχίας μετασχηματισμού.

Κατά της διάρκεια ανάπτυξης των φυτών πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωματικού DNA με σκοπό τον έλεγχο της εισαγωγής του T-DNA στο γονιδίωμα των αναγεννημένων φυτών. Ο εντοπισμός του T-DNA στα μετασχηματισμένα φυτά πραγματοποιήθηκε με μια αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος εκκινητών που έχει σχεδιαστεί στο γονίδιο της υδρομικίνης. Στον Πίνακα Γ.7 αναγράφονται πόσα φυτά αναλύθηκαν από κάθε μετασχηματισμό και πόσα από αυτά έφεραν το γονίδιο επιλογής. Σε κάθε αντίδραση ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε γενωματικό DNA από φυτά αγρίου τύπου, ενώ σαν θετικός DNA από το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε για τον κάθε μετασχηματισμό.

Πίνακας Γ.7: Φυτά που μελετήθηκαν για την επιτυχία του μετασχηματισμού.

Μετασχηματισμός	Φυτά που μελετήθηκαν	Φυτά θετικά στο μετασχηματισμό (HYG ^r)
H7	11	7
H7P1	24	23
H7P2	19	19
H7P3	13	12

Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων PCR παρουσιάζονται στην Εικόνα Γ.35. Το αναμενόμενο μέγεθος για της περιοχής της υδρομικίνης που ενισχύθηκε είναι στις 700 βάσεις.



Εικόνα Γ.35: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% (w/v) των προϊόντων της αντίδρασης PCR για τον εντοπισμό του γονιδίου της υγραμκίνης στα μετασχηματισμένα φυτά. Στήλη M: μάρτυρας μοριακών βαρών DNA (λDNA-HindIII/φ-HaeIII). Στήλη C: Αρνητικός έλεγχος της αντίδρασης PCR χωρίς την προσθήκη μήτρας DNA. Στήλη pH7: Θετικός έλεγχος της αντίδρασης χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον φορέα pH7GWIWG2(I). Στήλη WT: γενωματικό DNA από *L. jaronicus* αγρίου τύπου.

Γ.6.5. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των παρβουλινών στα μετασχηματισμένα φυτά.

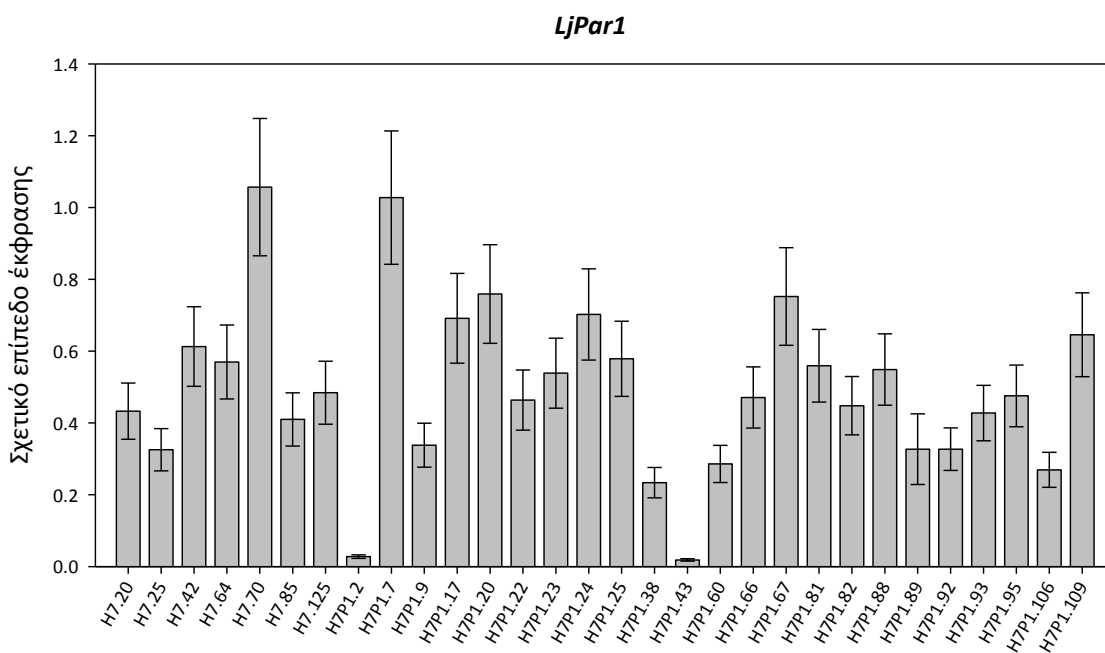
Αφότου ελέγχθηκε η επιτυχία του μετασχηματισμού στη συνέχεια προχωρήσαμε στον υπολογισμό των επιπέδων έκφρασης των μεταγραφημάτων των παρβουλινών στα μετασχηματισμένα φυτά. Για τον υπολογισμό τους πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από τα φύλλα των υπό μελέτη φυτών. Καθώς τα επίπεδα των γονιδίων που μελετάμε μπορεί να διαφέρουν από το αναπτυξιακό στάδιο και την ηλικία των φύλλων, έγινε προσπάθεια να έχουν την ίδια ηλικία και να βρίσκονται στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο, για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν τα δύο πιο πρόσφατα πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα από βλαστούς περίπου ίδιου μήκους.

Την απομόνωση ολικού RNA ακολούθησε χειρισμός με DNAάση για την απομάκρυνση του γενωματικού DNA. Η επιτυχία του χειρισμού DNAάσης ελέγχθηκε με μια αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για την ουβικουιτίνη. Στη συνέχεια με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης 500 ng καθαρού RNA χρησιμοποιήθηκαν για την

δημιουργία cDNA. Τα cDNA κανονικοποιήθηκαν ως προς το γονίδιο αναφοράς UBQ με την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου.

Γ.6.5.1. Μετασηματισμός H7P1.

Για την μελέτη των επιπέδων μεταγραφημάτων του γονιδίου *LjPar1* στο μετασηματισμό H7P1 ελέγχθηκαν συνολικά 23 φυτά. Ο υπολογισμός των επιπέδων μεταγραφημάτων του *LjPar1* στα μετασηματισμένα φυτά έγινε με τη μέθοδο ΔΔCt σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου. Στο Διάγραμμα Γ.1 παρουσιάζονται τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων του γονιδίου *LjPar1* στα φυτά που προέκυψαν από τους μετασηματισμούς H7P1 και H7. Αντίστοιχα, στον Πίνακα Γ.6 παρουσιάζονται τα επίπεδα μεταγραφημάτων του *LjPar1* ως ποσοστό σε σχέση με τα επίπεδα μεταγραφημάτων στα φυτά αγρίου τύπου.



Διάγραμμα Γ.1: Σχετικό επίπεδο μεταγραφημάτων του γονιδίου *LjPar1* στα μετασηματισμένα φυτά σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου. Ο υπολογισμός έγινε με τη μέθοδο ΔΔCt.

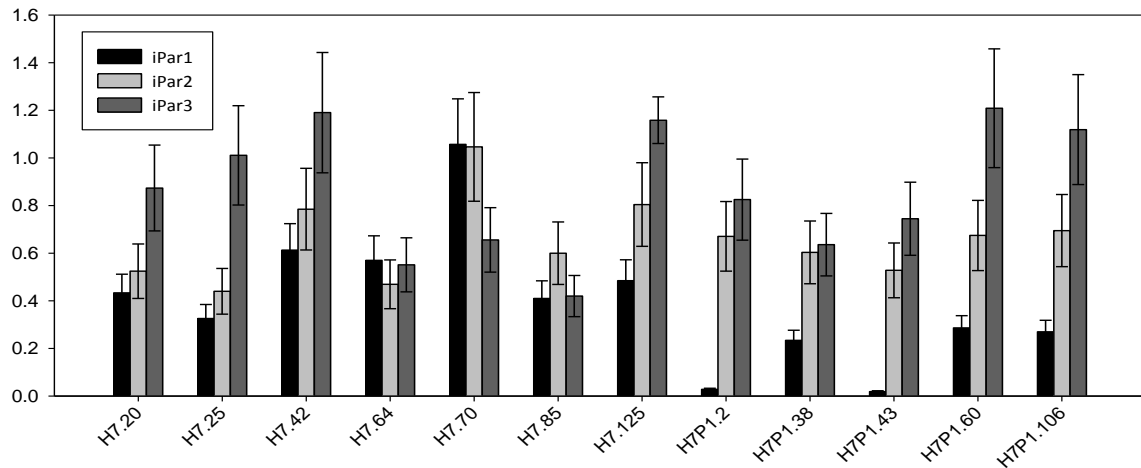
Πίνακας Γ.8: Ποσοστό των μεταγραφημάτων του γονιδίου *LjPar1* στα μετασηματισμένα φυτά σε σχέση με το επίπεδο μεταγραφημάτων σε φυτά αγρίου τύπου.

Φυτό	%	Φυτό	%	Φυτό	%	Φυτό	%
H7.20	43.3	H7P1.2	2.8	H7P1.25	57.9	H7P1.88	54.9
H7.25	32.5	H7P1.7	102.8	<u>H7P1.38</u>	<u>23.4</u>	H7P1.89	54.4
H7.42	61.3	H7P1.9	33.8	H7P1.43	1.85	H7P1.92	32.7
H7.64	57.0	H7P1.17	69.2	<u>H7P1.60</u>	<u>28.6</u>	H7P1.93	42.3
H7.70	105.7	H7P1.20	75.9	H7P1.66	47.1	H7P1.95	47.5
H7.85	41.0	H7P1.22	46.4	H7P1.67	75.2	<u>H7P1.106</u>	<u>26.9</u>
H7.125	48.4	H7P1.23	53.9	H7P1.81	55.9	H7P1.109	64.5
		H7P1.24	70.2	H7P1.82	44.8		

Από τα 23 φυτά στα οποία μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της *LjPar1* μόνο σε δύο από αυτά παρατηρήθηκε δραματική μείωση των μεταγραφημάτων της. Παράλληλα κάπως μειωμένα εμφανίζονται και επίπεδα της *LjPar1* στα φυτά H7P1.38,

H7P1.60 και H7P1.106. Επίσης θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα επίπεδα της *LjPar1* στα φυτά H.7 παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση αφού τα ποσοστά του κυμαίνονται μεταξύ 33% και 106% σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου.

Κατά τη σίγηση της μιας παρβουλίνης είναι δυνατόν να επηρεαστούν τα επίπεδα και των άλλων δύο έτσι σε μερικά από τα μετασχηματισμένα φυτά H7P1 μελετήθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης των παρβουλινών *LjPar2* και *LjPar3*.

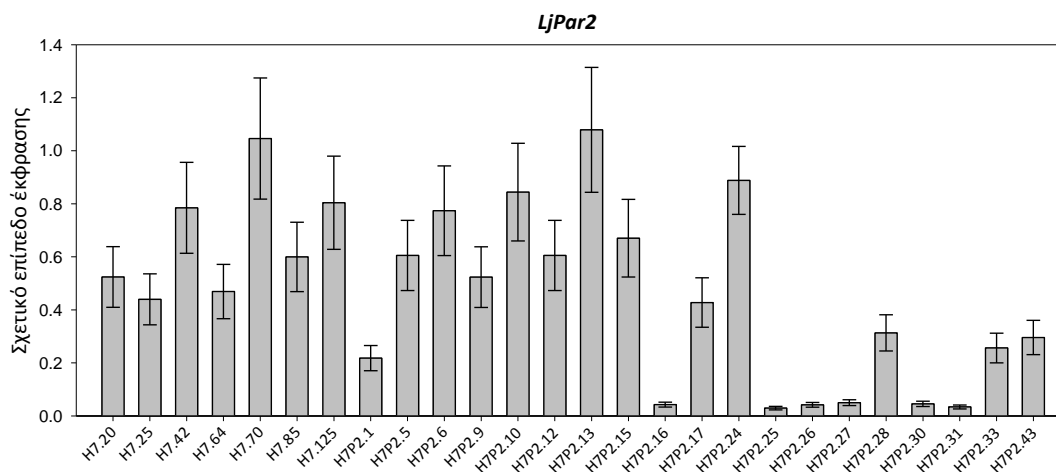


Διάγραμμα Γ.2: Σχετικό επίπεδο μεταγραφμάτων του γονιδίου *LjPar2* στα μετασχηματισμένα φυτά H7P1 σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου. Ο υπολογισμός έγινε με τη μέθοδο ΔΔCt.

Από το Διάγραμμα Γ.2 παρατηρούμε ότι κανένα από τα γονίδια *LjPar2* και *LjPar3* δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή των επιπέδων του στα φυτά H7P1 σε σχέση με επίπεδα έκφρασης στα φυτά H7. Συνεπώς με το μετασχηματισμό αυτό είχαμε καταστολή μόνο του επιθυμητού γονιδίου αλλά και παράλληλά δεν φαίνεται να υπάρχει και αύξηση των επιπέδων τους γεγονός που θα υποδήλωνε μια αλληλοεπικάλυψη των λειτουργιών τους.

Γ.6.5.2. Μετασχηματισμός H7P2

Όσον αφορά το μετασχηματισμό H7P2 μελετήθηκαν 19 φυτά. Στο Διάγραμμα Γ.3 παρουσιάζονται τα σχετικά επίπεδα μεταγραφμάτων του *LjPar2*. Αντίστοιχα, στον Πίνακα Γ.9 παρουσιάζονται τα επίπεδα μεταγραφμάτων του *LjPar2* ως ποσοστό σε σχέση με τα επίπεδα μεταγραφμάτων του αντίστοιχου γονιδίου στα φυτά αγρίου τύπου.



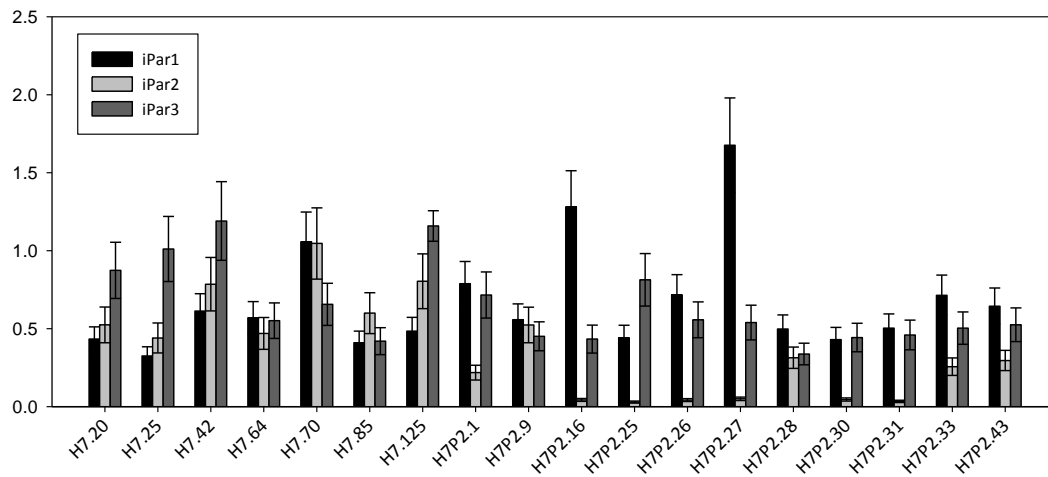
Διάγραμμα Γ.3: Σχετικό επίπεδο μεταγραφημάτων του γονιδίου *LjPar2* στα μετασηματισμένα φυτά σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου. Ο υπολογισμός έγινε με τη μέθοδο ΔΔCt.

Πίνακας Γ.9: Ποσοστό των μεταγραφημάτων του γονιδίου *LjPar2* στα μετασηματισμένα φυτά σε σχέση με το επίπεδο μεταγραφημάτων σε φυτά αγρίου τύπου.

Φυτό	%	Φυτό	%	Φυτό	%	Φυτό	%
H7.20	52.4	<u>H7P2.1</u>	<u>21.8</u>	H7P2.15	67	<u>H7P2.28</u>	<u>31.3</u>
H7.25	44	H7P2.5	60.5	H7P2.16	4.3	H7P2.30	4.5
H7.42	78.5	H7P2.6	77.4	H7P2.17	42.8	H7P2.31	3.4
H7.64	46.9	H7P2.9	52.3	H7P2.24	58.7	<u>H7P2.33</u>	<u>25.6</u>
H7.70	104.6	H7P2.10	84.4	H7P2.25	2.9	<u>H7P2.43</u>	<u>29.6</u>
H7.85	60	H7P2.12	60.5	H7P2.26	4.2		
H7.125	80.4	H7P2.13	107.9	H7P2.27	5.0		

Σύμφωνα με τα παραπάνω παρατηρούμε ότι όσον αφορά τα φυτά H7 υπάρχει μια διακύμανση στα επίπεδα των μεταγραφημάτων του γονιδίου *LjPar2* που κυμαίνονται μεταξύ 44% και 104% σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Όσον αφορά τα φυτά H7P2 παρατηρούμε δραματική μείωση των επιπέδων της έκφρασης του γονιδίου *LjPar2* που ξεπερνά το 95% σε 6 από τα 19 φυτά που μελετήθηκαν (H7P2.16, H7P2.25, H7P2.26, H7P2.27, H7P2.30 και H7P2.31). Παράλληλα μικρότερη πτώση των επιπέδων του *LjPar2* παρατηρούμε στα φυτά H7P2.1, H7P2.28, H7P2.33 και H7P2.43.

Στη συνέχεια στα περισσότερα από τα μετασηματισμένα φυτά H7P2 μελετήθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης των παρβουλινών *LjPar1* και *LjPar3* (Διάγραμμα Γ.4).

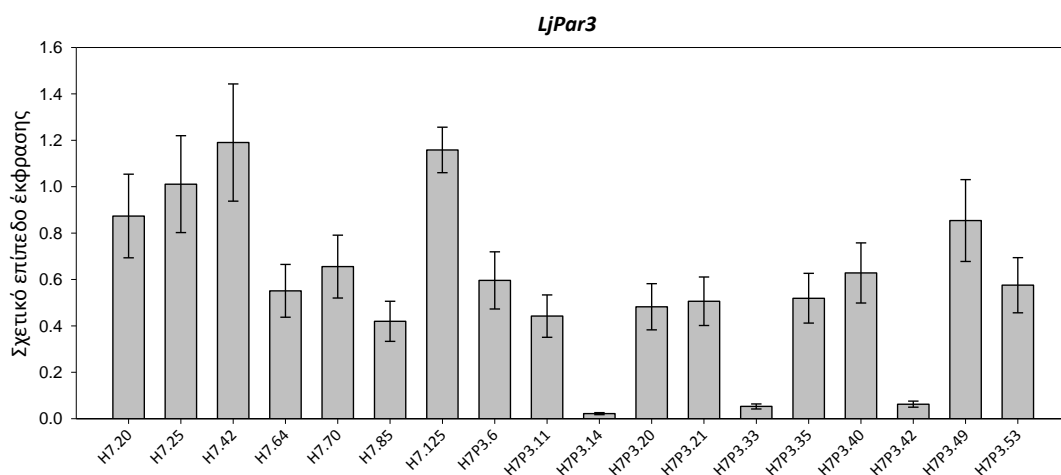


Διάγραμμα Γ.4: Σχετικό επίπεδο μεταγραφημάτων των γονιδίων *LjPar1*, 2 και 3 στα μετασχηματισμένα φυτά H7P2 σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου. Ο υπολογισμός έγινε με τη μέθοδο ΔΔCt.

Από το Διάγραμμα Γ.4 προκύπτει ότι τα επίπεδα των μεταγραφημάτων της *LjPar3* παραμένουν σταθερά ανεξάρτητα των επιπέδων της *LjPar2*, αντίθετα όμως τα επίπεδα της *LjPar1* εμφανίζονται αυξημένα σε 2 από τα 6 φυτά που το επίπεδα σίγησης της *LjPar2* είναι μεγαλύτερα του 90%.

Γ.6.5.3. Μετασχηματισμός H7P3.

Στο μετασχηματισμό H7P3 μελετήθηκαν 10 φυτά. Στο Διάγραμμα Γ.5 παρουσιάζονται τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων του *LjPar3*. Αντίστοιχα, στον Πίνακα Γ.10 παρουσιάζονται τα επίπεδα μεταγραφημάτων του *LjPar3* ως ποσοστό σε σχέση με τα επίπεδα μεταγραφημάτων του αντίστοιχου γονιδίου στα φυτά αγρίου τύπου.



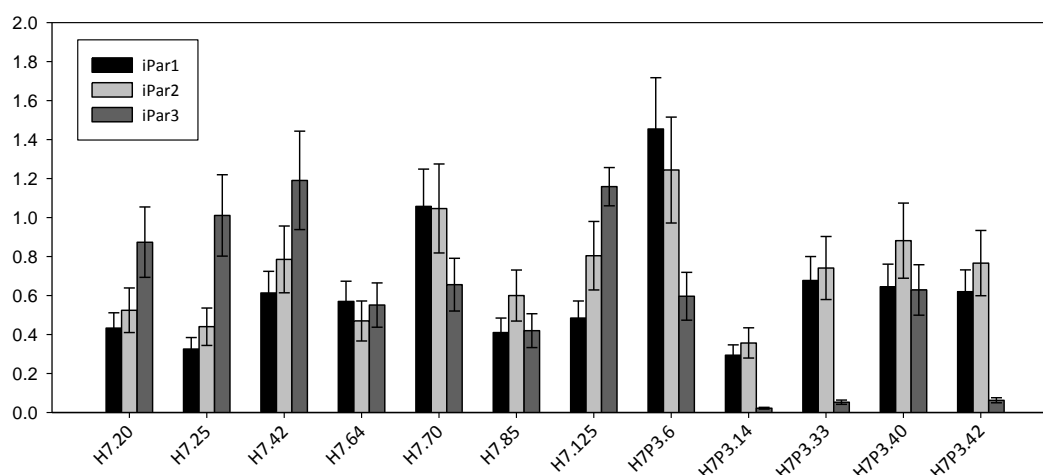
Διάγραμμα Γ.5: Σχετικό επίπεδο μεταγραφημάτων του γονιδίου *LjPar3* στα μετασχηματισμένα φυτά σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου. Ο υπολογισμός έγινε με τη μέθοδο ΔΔCt.

Πίνακας Γ.10: Ποσοστό των μεταγραφημάτων του γονιδίου *LjPar3* στα μετασηματισμένα φυτά σε σχέση με το επίπεδο μεταγραφημάτων σε φυτά αγρίου τύπου.

Φυτό	%	Φυτό	%	Φυτό	%
H7.20	87.4	H7P3.6	59.6	H7P3.40	62.8
H7.25	101	H7P3.11	44.2	H7P3.42	6.2
H7.42	122	H7P3.14	2.2	H7P3.49	85.4
H7.64	55.1	H7P3.20	48.2	H7P3.53	57.5
H7.70	65.6	H7P3.21	50.6		
H7.85	42	H7P3.33	5.3		
H7.125	47.5	H7P3.35	51.9		

Αρχικά παρατηρούμε ότι και σε αυτόν τον μετασηματισμό στα φυτά H7 υπάρχει μια διακύμανση στα επίπεδα των μεταγραφημάτων του γονιδίου *LjPar3* που κυμαίνονται μεταξύ 42% και 122% σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Όσον αφορά τα φυτά H7P3 παρατηρούμε δραματική μείωση των επιπέδων του *LjPar3* που ξεπερνά το 94%, στα φυτά H7P3.14, H7P3.20, και H7P3.42.

Τέλος, και για κάποια από τα φυτά του μετασηματισμού H7P3 μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των παρβουλινών *LjPar1* και *LjPar2* (Διάγραμμα Γ.6).

**Διάγραμμα Γ.6:** Σχετικό επίπεδο μεταγραφημάτων των γονιδίων *LjPar1*, 2 και 3 στα μετασηματισμένα φυτά H7P3 σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου. Ο υπολογισμός έγινε με τη μέθοδο ΔΔCt.

Από το διάγραμμα προκύπτει ότι τα επίπεδα των μεταγραφημάτων των *LjPar1* και *LjPar2* δεν παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις στα φυτά που τα επίπεδα των μεταγραφημάτων της *LjPar3* είναι χαμηλά.

Γ.7. Οι παρβουλίνες του *Mesorhizobium loti*.

Το *Mesorhizobium loti* είναι ένα Gram⁻ βακτήριο της ριζόσφαιρας του εδάφους που μπορεί και αποικίζει στις ρίζες του *L. jaronicus* σχηματίζοντας φυμάτια μέσω των οποίων γίνεται η αζωτοδέσμευση. Σε κάποιους διαζωτροφικούς οργανισμούς, όπως στη *K. pneumoniae* και στο *A. vinelandii*, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη NifM που συμμετέχει στο μηχανισμό συναρμολόγησης και στη σταθερότητα της Fe-πρωτεΐνης του συμπλόκου της νιτρογενάσης, φέρει μια δομική ενότητα παρβουλίνης (Howard *et al.*, 1986; Gavini *et al.*, 2006). Σε μια προσπάθεια κατανόησης των λειτουργιών των παρβουλινών προχωρήσαμε στον εντοπισμό πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με μια παρβουλίνη του *M. loti*.

Στο γονιδίωμα του *M. loti*, με οδηγό τις αλληλουχίες των παρβουλινών του *E. coli* (Par10, SurA και PpiD) αλλά και της NifM του *A. vinelandii* μέσω της εφαρμογής αναζήτησης τοπικών ομολογιών BLAST εντοπίστηκαν τρία γονίδια τα *mlr0613*, *mlr9159* και *mll3467* που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που φέρουν μια δομική περιοχή παρβουλίνης. Τα γονίδια των *mlr0613* και *mll3467* εδράζονται στο χρωμόσωμα ενώ το *mlr9159* εντοπίζεται στο πλασμίδιο pMla. Κανένα από αυτά τα γονίδια δεν βρίσκεται κοντά στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη λειτουργία της νιτρογενάσης.

Το γονίδιο *mlr0613* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μήκους 630 αμινοξέων, φέρει μια περιοχή PPIάσης (IPR000297) μεταξύ των καταλοίπων 249 με 369 και παρουσιάζει 42,2% ομολογία (similarity) με την PpiD του *E. coli*. Το γονίδιο *mlr9159* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μήκους 360 αμινοξέων, που έχει ονομαστεί MIPar2, φέρει μια περιοχή PPIάσης (IPR000297) μεταξύ των καταλοίπων 158 με 242 και παρουσιάζει σχετικά χαμηλά ποσοστά ομολογίας με τις παρβουλίνες του *E. coli*. Τέλος, το γονίδιο *mll3467* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μήκους 303 αμινοξέων που έχει ονομαστεί MIPar1. Η MIPar1 φέρει μια περιοχή PPIάσης (IPR000297) μεταξύ των καταλοίπων 156 με 247, η περιοχή αυτή παρουσιάζει 63 % ομολογία (similarity) με την EcPar10 του *E. coli*. Το ποσοστό ομολογίας ανάμεσα στην MIPar2 και την MIPar1 είναι 35,3 % (similarity). Στην Εικόνα Γ.36 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της πολλαπλής ευθυγράμμισης των δομικών περιοχών των παρβουλινών MIPar2 και MIPar1 με τις αντίστοιχες περιοχές PPIάσεων που έχουν μελετηθεί σε διάφορους μικροοργανισμούς.



Εικόνα Γ.36: Πολλαπλή ευθυγράμμιση των δομικών περιοχών παρβουλινών προκαρυωτικών οργανισμών. Χρησιμοποιήθηκαν οι δομικές περιοχές των: EcPar10 από το *E. coli* (P0A9L5), AvNifM από το *A. vinelandii* (C1DH25), HP0175 από το *H. pylori* (P56112), Par27 από το *Bordetella pertussis* (P40415), PpiC K pne από το *Klebsiella pneumoniae* (B5XPF9), PpiC P aer από το *Pseudomonas aeruginosa* (Q9HXD5).

Η περιοχή παρβουλίνης στις διαφορετικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζεται συντηρημένη. Αντίστοιχα, οι περιοχές που εντοπίζονται εκατέρωθεν της δομικής περιοχής ΡΡ1άσης παρουσιάζουν μικρό βαθμό συντήρησης οπότε και δεν συμπεριελήφθησαν στην πολλαπλή ευθυγράμμιση.

Γ.7.1. Η πρωτεΐνη MIPar1.

Από τις παρβουλίνες που έχουν εντοπιστεί στο *M. loti* έχουν μόνο μία, η MIPar1 έχει απομονωθεί και έχει μελετηθεί η ενζυμική της δραστηριότητα *in vitro* (Λαμπίρη, 2008). Η MIPar1 απομονώθηκε σε ετερόλογο σύστημα, μελετήθηκε η δράση της έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων και βρέθηκε ότι προκαλεί την ισομερείωση τετραπεπτιδίων που φέρουν τα αμινοξέα αλανίνη, λευκίνη ή αργινίνη πριν από την προλίνη. Η μεγαλύτερη σταθερά εξειδίκευσης παρατηρήθηκε έναντι της λευκίνης, ενώ δεν μετρήθηκε κάποια ενζυμική δραστηριότητα έναντι του γλουταμινικού (Λαμπίρη, 2008).

Παράλληλα, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση της αλληλουχίας με τη εφαρμογή SignalP4.1 (Petersen *et al.*, 2011) στο άμινο τελικό άκρο της MIPar1 εντοπίζεται ένα πεπτίδιο οδηγός μήκους 29 αμινοξέων. Επιπλέον, πρόβλεψη της υποκυτταρικής τοποθέτησης της μέσω της εφαρμογής PSORTb (Yu *et al.*, 2010), τοποθετεί την MIPar1 στην εξωτερική μεμβράνη.

Γ.7.2. Εντοπισμός πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με την MIPar1.

Ο εντοπισμός των δικτύων αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών ενός οργανισμού μπορεί να μας δώσει σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο των επιμέρους πρωτεϊνών σε ένα κυτταρικό σύστημα. Η MIPar1 είναι η μοναδική παρβουλίνη του *M. loti* για την οποία υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την ενζυμική της δραστηριότητα ενώ δεν είναι γνωστός ο ρόλος της εντός του κυττάρου. Συνεπώς, σε μια προσπάθεια διερεύνησης του ρόλου της προχωρήσαμε στον προσδιορισμό υποψήφιων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την MIPar1 μέσω της μεθόδου της συγκαθίζησης.

Στο πρώτο στάδιο της διαδικασίας πραγματοποιείται ετερόλογη έκφραση της MIPar1 σε κύτταρα *E. coli*. Η αλληλουχία του γονιδίου της MIPar1, χωρίς την περιοχή που κωδικοποιεί για τα πρώτα 29 κατάλοιπα που αποτελούν το πεπτίδιο οδηγό της πρωτεΐνης, βρίσκεται κλωνοποιημένη στον φορέα pGEX-2T με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός υβριδίου με την GST να βρίσκεται στο άμινο τελικό του άκρο. Το ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο απομονώνεται από τα κύτταρα *E. coli* σε στήλη ρητίνης με ακινητοποιημένη γλουταθειόνη.

Παράλληλα από καλλιέργεια κυττάρων *M. loti* γίνεται απομόνωση ολικών διαλυτών πρωτεϊνών. Η στήλη ρητίνης με την προσροφημένη GST-MIPar1 αναμειγνύεται με κλάσμα από τις πρωτεΐνες του *M. loti*. Η επώαση των πρωτεϊνών του *M. loti* με την GST-MIPar1 πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας διαφορετικά διαλύματα αλληλεπίδρασης που διαφέρουν στην ιοντική ισχύ και στην παρουσία ή όχι ATP. Ταυτόχρονα ακριβώς η ίδια διαδικασία ακολουθείται και με στήλες ρητίνης στις οποίες είχε απομονωθεί μόνο GST με σκοπό τον εντοπισμό και διαχωρισμό των μη εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων. Μετά την επώαση ακολουθεί έκλυση των πρωτεϊνών από τις στήλες ρητίνης και ανάλυση των κλασμάτων τους με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (LC-MS-MS) που πραγματοποιήθηκε τον τομέα Βιοτεχνολογίας του κέντρου βασικής έρευνας II, του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Οι διαφοροποιήσεις που υπήρξαν ανάμεσα στις πρωτεΐνες που προέκυψαν από τις διαφορετικές συνθήκες (ιοντική ισχύς, παρουσία ATP) δεν ήταν σημαντικές και για αυτό τα τελικά αποτελέσματα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες η μια ομάδα αφορά τις πρωτεΐνες που προέκυψαν από τις στήλες με τη GST-*MIPar1* και η δεύτερη αυτές που προέκυψαν από τις στήλες της GST. Οι πρωτεΐνες που αναγράφονται στον Πίνακα Γ.11 αφορούν αυτές που η ποσότητά τους ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στη πρώτη ομάδα, ενώ ταυτόχρονα τα πεπτίδια που αναλύθηκαν καλύπτουν την πρωτεΐνη από την οποία προκύπτουν σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90%.

Πίνακας Γ.11: Πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν με LC-MS-MS στις εκλούσεις των στηλών GST-*MIPar1*.

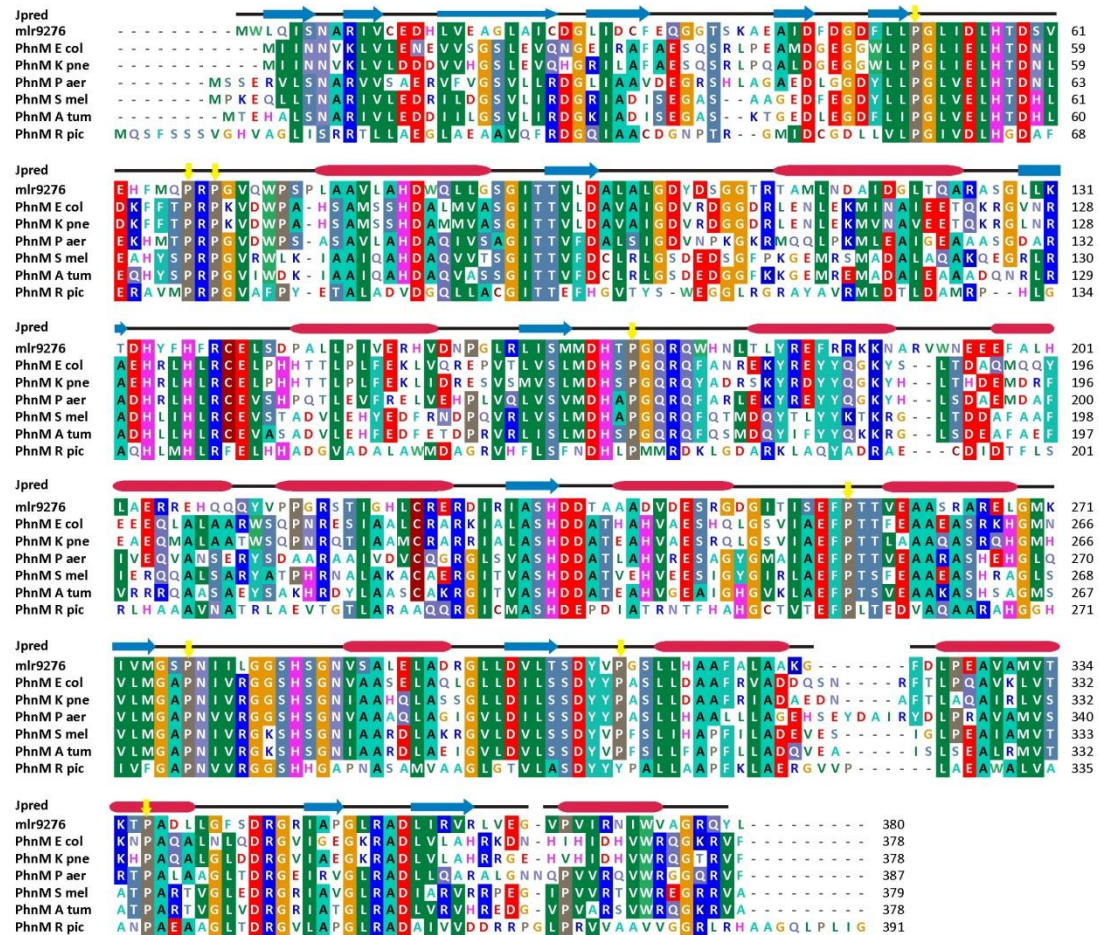
Πρωτεΐνη	Περιγραφή
mIrr9276	phosphonate metabolism protein; PhnM
mIrr6538	AsmA protein, assembly of outer membrane proteins
mIrr3769	transmembrane transport protein
mIrr5087	two-component sensor histidine kinase
mIrr0295	50S ribosomal protein L2
mIrr0858	probable tetracycline 6-hydroxylase
mIrr2088	hypothetical protein
mIrr3844	transcriptional regulator (araC-family)
mIrr4219	putative phage tail protein
mIrr9374	unknown protein

Στη συνέχεια γίνεται μια μικρή περιγραφή των πρωτεϊνών που εντοπίστηκαν με στόχο τη διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασής τους με την *MIPar1*.

Γ.7.2.1. Η πρωτεΐνη mIrr9276.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mIrr9276*, αποτελείται από 380 αμινοξέα, στην αλληλουχία της εντοπίζεται μια περιοχή που ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μεταβολισμό φωσφονικών ενώσεων (IPR012696). Η *mIrr9276* παρουσιάζει 61% ομολογία με την α -D-ριβόζη-1-μεθυλφωσφονικό-5-τριφωσφορική διφωσφατάση (α -D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate diphosphatase, EC: 3.6.1.63) του *E. coli* που κωδικοποιείται από το γονίδιο *phnM*. Το γονίδιο *phnM* είναι μέλος του οπερονίου *phnCDEFGHIJKLMNOP* που είναι υπεύθυνο για την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον καταβολισμό οργανοφωσφονικών ενώσεων (Kamat *et al.*, 2011).

Στην αμινοξική αλληλουχία της *mIrr9276* εντοπίζονται 18 κατάλοιπα προλίνης και μέσω πολλαπλής ευθυγράμμισης με αλληλουχίες PhnMs από διαφορετικούς οργανισμούς τα 8 από αυτά είναι παρουσιάζονται συντηρημένα (Εικόνα Γ.37). Παράλληλα έγινε πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της μέσω της εφαρμογής Jpred3 (Cole *et al.*, 2008) η οποία αποτυπώνεται στην πρώτη σειρά της πολλαπλής ευθυγράμμισης.

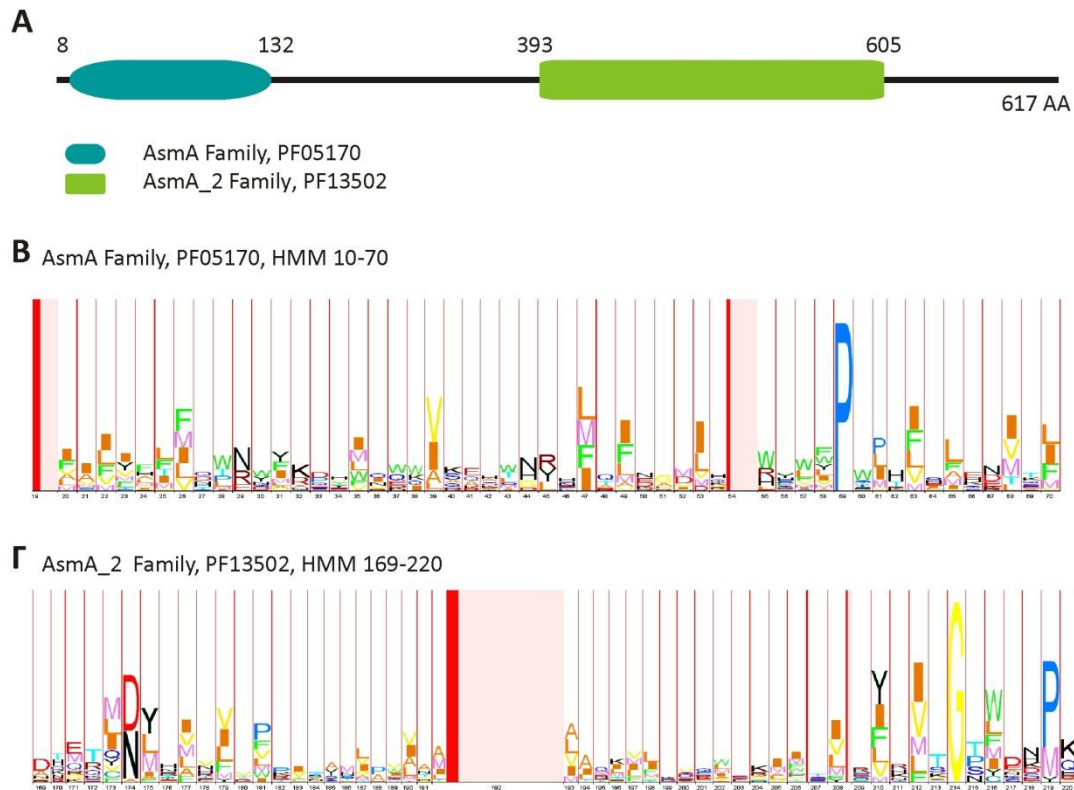


Εικόνα Γ.37: Πολλαπλή ευθυγράμμιση της miR9276 με πρωτεΐνες PhnM από διάφορους μικροοργανισμούς. Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν είναι η PhnM από το *E. coli* (P16689), η PhnM K pne από το *Klebsiella pneumoniae* (B5XXR8), PhnM P aer από το *Pseudomonas aeruginosa* (Q9HYM7), PhnM S mel από το *Sinorhizobium meliloti* (Q92V74), PhnM A tum από το *Agrobacterium tumefaciens* (A9CKM4) και PhnM R pic από το *Ralstonia pickettii* (B2UGH5). Τα κίτρινα βέλη επισημαίνουν τις συντηρημένες προλίνες των αλληλουχιών. Τα μπλε βέλη αντιστοιχούν σε β-πτυχωτές επιφάνειες ενώ οι κύλινδροι σε α-έλικες.

Η λειτουργία της miR9276 του *M. loti* δεν έχει μελετηθεί έως τώρα, ενώ οι πληροφορίες που υπάρχουν από ορθόλογες πρωτεΐνες αφορούν μόνο τη συμμετοχή τους στο μεταβολικό μονοπάτι των φωσφονικών, οπότε σε πρώτο στάδιο είναι δύσκολη η αξιολόγηση της πιθανής της αλληλεπίδρασης της με την MIPar1. Ταυτόχρονα, οι προβλέψεις του υποκυτταρικού εντοπισμού των δύο πρωτεϊνών διαφέρουν, με την miR9276 να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ενώ η MIPar1 να εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη. Συνεπώς, η διερεύνηση αυτής της αλληλεπίδρασης απαιτεί περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες με διαφορετικές προσεγγίσεις.

Γ.7.2.2. Η πρωτεΐνη mlI6538.

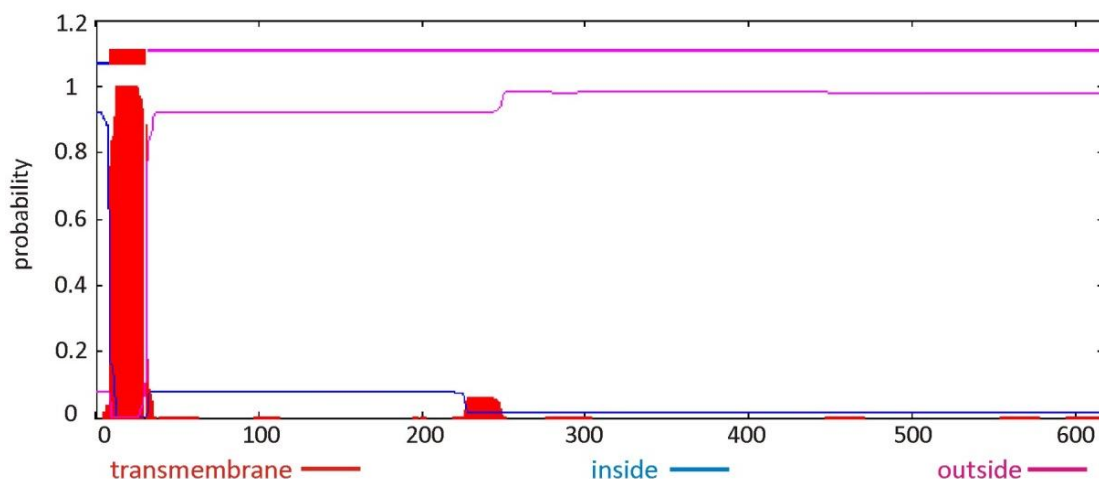
Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mlI6538*, αποτελείται από 617 αμινοξέα. Μέσω αναζήτησης στη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών οικογενειών Pfam (Punta *et al.*, 2012) βρέθηκε ότι στην αλληλουχία της mlI6538 εντοπίζονται δύο δομικές περιοχές οι AstA και η AstA_2 (Εικόνα Γ.38.A). Οι περιοχές αυτές ανήκουν σε μια κατηγορία περιπλασματικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με το δίπλωμα πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης.



Εικόνα Γ.38: **A.** Πρόβλεψη των δομικών περιοχών που εντοπίζονται στην αλληλουχία της mll6538 σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). **B.** Σχηματική αναπαράσταση των HMM για την AsmA. **Γ.** Σχηματική αναπαράσταση των HMM για την AsmA_2.

Αναπαράσταση των HMM (Hidden Markov Models) τμημάτων των δομικών περιοχών που εντοπίστηκαν μας δίνουν πληροφορίες σχετικά με την πιθανότητα παρουσίας ενός καταλοίπου σε συγκεκριμένη θέση όπως προκύπτει μετά από ανάλυση όλων των πρωτεϊνών που έχουν αυτές τις δομικές περιοχές. Στην περίπτωση της AsmA στη θέση 59 (Εικόνα Γ.38.B) φαίνεται να υπάρχει σχεδόν αποκλειστικά προλίνη, το κατάλοιπο αυτό είναι συντηρημένο στην mll6538 και αντιστοιχεί στην Pro64. Όσον αφορά την AsmA_2 εντοπίζεται μια συντηρημένη προλίνη στη θέση 219 του HMM μοντέλου, που αντιστοιχεί στην Pro605 της αλληλουχίας μας. Η ύπαρξη των δύο συντηρημένων προλινών συνηγορεί υπέρ της αλληλεπίδρασής της με την *MIPar1*.

Με σκοπό τον εντοπισμό των δομικών χαρακτηριστικών της mll6538 έγινε πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής, έτσι προέκυψε ότι αποτελείται κυρίως από βρόχους (48,8 %) και β-πτυχωτές επιφάνειες (39,5 %) και σε μικρότερο βαθμό από α-έλικες (11,7 %). Η πρόβλεψη πραγματοποιήθηκε μέσω της εφαρμογής Jpred3 (Cole *et al.*, 2008). Στη συνέχεια μέσω της εφαρμογής PSORTb (Yu *et al.*, 2010) έγινε πρόβλεψη της τοπολογίας της πρωτεΐνης και βρέθηκε ότι εδράζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ταυτόχρονα έγινε πρόβλεψη τυχόν διαμεμβρανικών περιοχών στην αλληλουχία της μέσω της εφαρμογής TMHMM (Sonnhammer *et al.*, 1998) το αποτέλεσμα της οποίας παρουσιάζεται στην Εικόνα Γ.39.



Εικόνα Γ.39: Πρόβλεψη τοπολογίας της *mll6538* μέσω του αλγορίθμου TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>). Στον κάθετο άξονα αποδίδεται η στατιστική πιθανότητα πρόβλεψης διαμεμβρανικού τμήματος ενώ ο οριζόντιος άξονας αφορά την κάθε περιοχή της αλληλουχίας με τους αντίστοιχους αριθμούς καταλοίπων αμινοξέων.

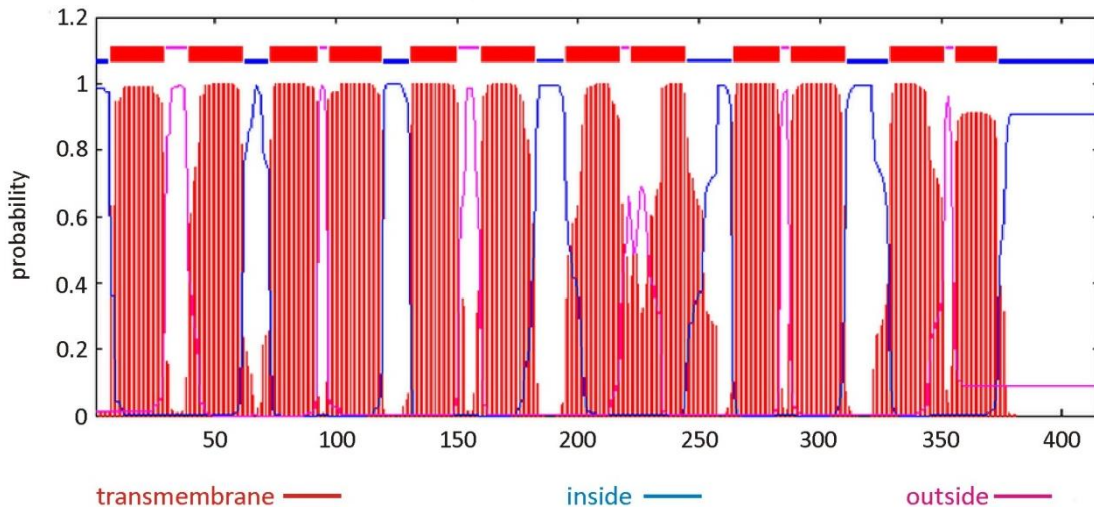
Από την παραπάνω ανάλυση προκύπτει ότι η *mll6538* στο άμινο τελικό της άκρο έχει μια διαμεμβρανική έλικα που πιθανά αποτελείται από τα κατάλοιπα 9 με 31 ενώ το κύριο σώμα της πρωτεΐνης βρίσκεται στον περιπλαστικό χώρο.

Γ.7.2.3. Η πρωτεΐνη *mlr3769*.

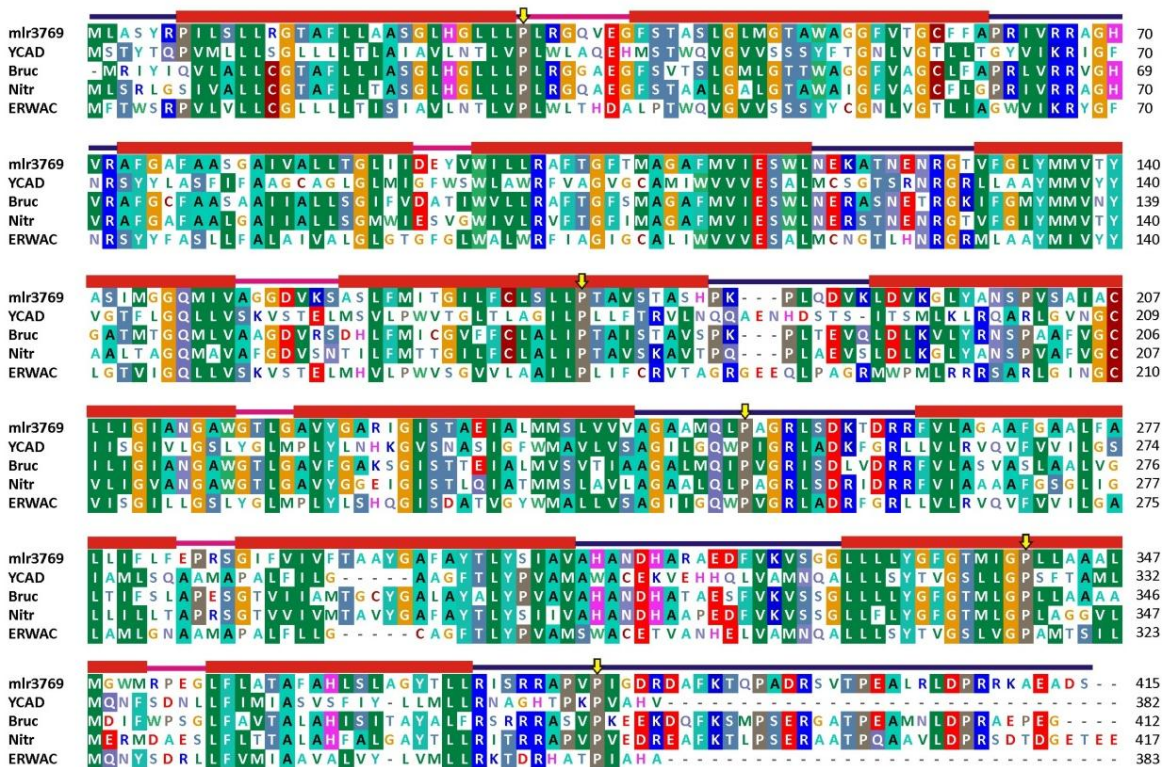
Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mlr3769*, αποτελείται από 415 αμινοξέα και παρουσιάζει 40,3 % ομολογία με την *YcaD* από το *E. coli* (P21503). Στα κατάλοιπα 5-387 εντοπίζεται μια δομική περιοχή που την κατατάσσει στην οικογένεια των πρωτεϊνικών μεταφορέων (IPR016196). Σύμφωνα με το διεθνές σύστημα φυλογενετικής-λειτουργικής ταξινόμησης και ονοματολογίας πρωτεϊνικών μεταφορέων (Transport Commission, TC system, <http://www.tcdb.org>) η *mlr3769* ανήκει στη Μείζονα Υπεροικογένεια Διευκολυνόμενης Μεταφοράς (Major Facilitator Superfamily, MFS, TC 2.A.1). Η οικογένεια των MFS αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες μεταφορέων που είναι συντηρημένες από τα βακτήρια έως τον άνθρωπο. Οι MFS μεταφέρουν εκλεκτικά ευρύ φάσμα ενώσεων ενώ διαδραματίζουν καίριο ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες. Μερικά από τα υποστρώματα που μεταφέρονται μέσω MFS είναι ιόντα, υδατάνθρακες, λιπίδια, νουκλεοσίδια, αμινοξέα, πεπτίδια και άλλα μόρια. Οι MFS χωρίζονται σε 76 υποοικογένειες βάση φυλογενετικής ανάλυσης, εκλεκτικότητας υποστρώματος και μηχανισμού λειτουργίας παράλληλα για τις μισές σχεδόν υποοικογένειες δεν είναι γνωστή κάποια λειτουργία (Yan, 2013). Η *mlr3769* ανήκει στην υποκατηγορία TC 2.A.1.26 (The unknown major facilitator-2, UMF2 family) για την οποία δεν έχουν μελετηθεί τα υποστρώματα που μπορεί να μεταφέρει, όμως με υπολογιστικές μεθόδους έχει προταθεί ότι μπορεί να συμμετέχει στο σύστημα σύνθεσης, πρόσληψης ή αποδόμησης του ακέτυλο-CoA (Reddy *et al.*, 2012).

Μέσω της εφαρμογής PSORTb η *mlr3769* τοποθετείται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ενώ χρησιμοποιώντας την εφαρμογή TMHMM (Sonnhammer *et al.*, 1998) έγινε πρόβλεψη της οργάνωσης και της εναλλαγής των διαμεμβρανικών και υδρόφιλων περιοχών της (Εικόνα Γ.40). Σύμφωνα με τον αλγόριθμο προβλέπονται 12 διαμεμβρανικές έλικες με

σαφή εναλλαγή διαμεμβρανικών τμημάτων και υδρόφιλων περιοχών. Στο τμήμα μεταξύ των πιθανών διαμεμβρανικών περιοχών 7 και 8 (αλληλουχία 218-221) παρουσιάζεται ασάφεια σχετικά με την τοπολογία, καθώς η εξωκυτταρική περιοχή παρουσιάζει λίγο μεγαλύτερη πιθανότητα από τη διαμεμβρανική περιοχή.



Εικόνα Γ.40: Πρόβλεψη τοπολογίας της *mlf3769* μέσω του αλγορίθμου TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>). Στον κάθετο άξονα αποδίδεται η στατιστική πιθανότητα πρόβλεψης διαμεμβρανικού τμήματος ενώ ο οριζόντιος άξονας αφορά την κάθε περιοχή της αλληλουχίας με τους αντίστοιχους αριθμούς καταλοίπων αμινοξέων.

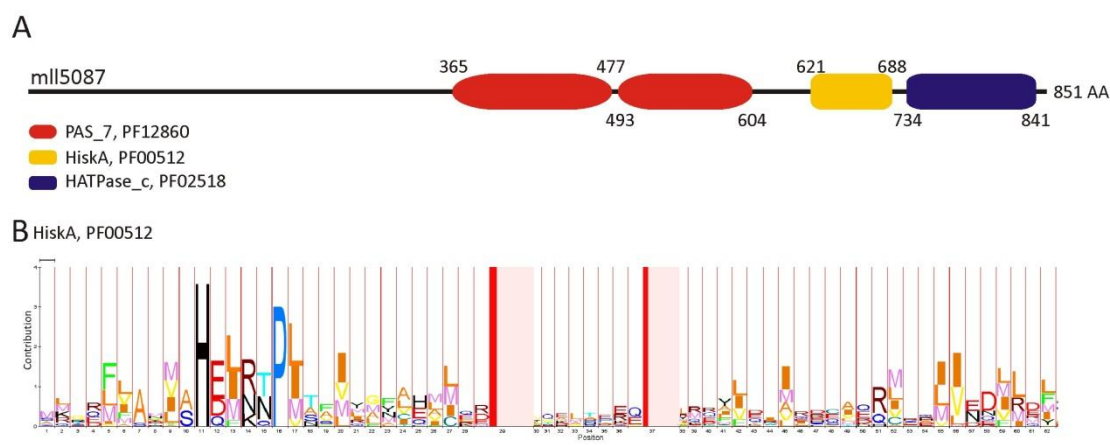


Εικόνα Γ.41: Πολλαπλή ευθυγράμμιση της *mlf3769* με πρωτεΐνες της κατηγορίας UMF2 από διάφορους μικροοργανισμούς. Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν είναι η YCAD από το *E. coli* (P21503), Bruc μεταφορέας από το *Brucella suis* (Q8FYW7), Nitr μεταφορέας από το *Nitratireductor pacificus* (K2LLT7), ERWC μεταφορέας από το *Erwinia amylovora* (D4I082). Με μπλε γραμμή επισημάνονται οι ενδοκυττάρειες, με κόκκινη οι διαμεμβρανικές και με φούξια οι εξωκυττάρειες περιοχές της *mlf3769*. Τα κίτρινα βέλη επισημάνουν τις συντηρημένες προλίνες των αλληλουχιών.

Για τον εντοπισμό συντηρημένων προλινών στην αλληλουχία της *mItr3769* πραγματοποιήθηκε πολλαπλή ευθυγράμμιση με μεταφορείς της κατηγορίας UMF2 από διάφορους μικροοργανισμούς. Από 16 προλίνες που εντοπίζονται στην *mItr3769*, οι 5 εμφανίζονται συντηρημένες σε όλες της αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για την πολλαπλή ευθυγράμμιση. Οι προλίνες αυτές εντοπίζονται σε περιπλασμικές, κυτταροπλασματικές και διαμεμβρανικές περιοχές.

Γ.7.2.4. Η πρωτεΐνη *mItr5087*.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mItr5087*, αποτελείται από 851 αμινοξέα. Χρησιμοποιώντας την εφαρμογή εύρεσης μοτίβων της βάσης δεδομένων πρωτεϊνικών οικογενειών Pfam εντοπίστηκαν δομικές περιοχές που συσχετίζονται με τα δυαδικά συστήματα μεταγωγής σημάτων (Εικόνα Γ.42). Συνοπτικά στην αλληλουχία εντοπίστηκαν δύο δομικές περιοχές PAS_7 (PF12860), μια περιοχή κινάσης ιστιδίνης (PF00512) στο κέντρο, ενώ στο καρβόξυ τελικό άκρο βρίσκεται μια περιοχή ΑΤΡάσης (PF02518).



Εικόνα Γ.42: Α. Πρόβλεψη των δομικών περιοχών που εντοπίζονται στην αλληλουχία της *mItr5087* σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). **Β.** Σχηματική αναπαράσταση των HMM για την περιοχή κινάσης της ιστιδίνης.

Παράλληλα, αναπαράσταση των HMM μοντέλων για καθεμία από τις περιοχές που εντοπίστηκαν στην *mItr5087* έδειξε ότι μια ισχυρά συντηρημένη προλίνη βρίσκεται στην περιοχή HiskA στη θέση 16 της που αντιστοιχεί στην προλίνη 635 της *mItr5087* (Εικόνα Γ.42.Β).

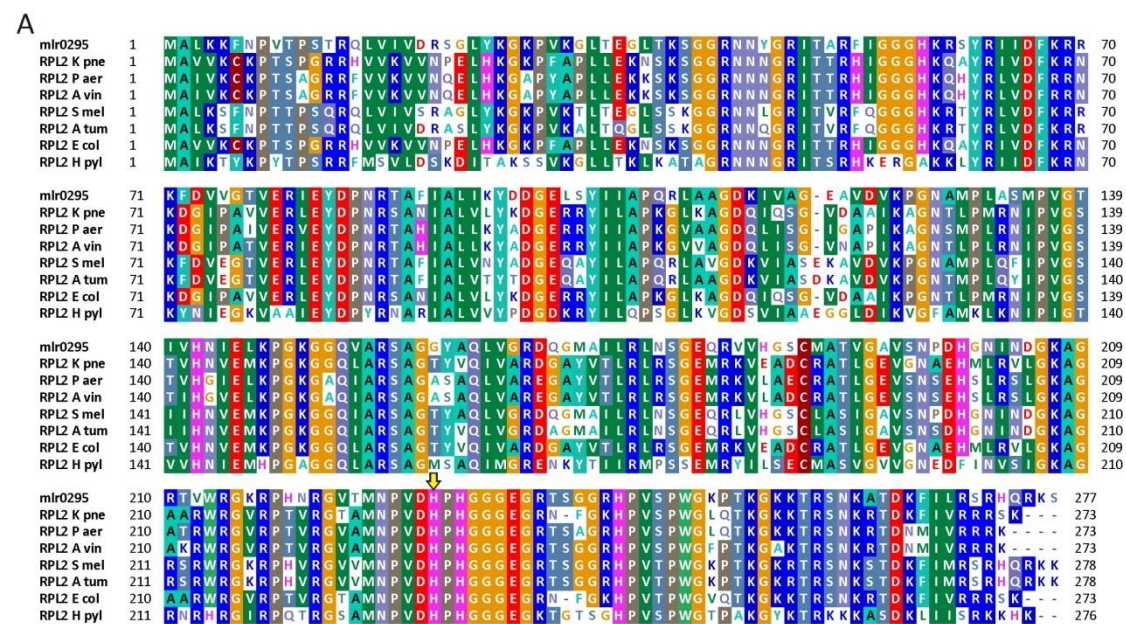
Οι περιοχές PAS εντοπίζονται κυρίως σε πρωτεΐνες που άμεσα ή έμμεσα συμμετέχουν στη μετάδοση σημάτων. Ενώ τέτοιες περιοχές βρίσκονται σε όλα τα βασιλεια, στα βακτήρια και στα αρχαιοβακτήρια εντοπίζονται κυρίως σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε συστήματα μετάδοσης σήματος δύο συστατικών (Two Component Regulatory Systems) (Taylor and Zhulin, 1999). Ο ρόλος των περιοχών PAS σε τέτοια συστήματα έχει να κάνει κυρίως με τη σύλληψη του σήματος. Η δεύτερη περιοχή που εντοπίζεται στην αλληλουχία της *mItr5087* έχει χαρακτηριστικά κινάσης ιστιδίνης. Οι κινάσες ιστιδίνης, με τη σύλληψη του σήματος, καταλύουν την αυτοφωσφορυλίωσή τους σε μια συντηρημένη ιστιδίνη. Για τη μετάδοση του σήματος η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται σε ένα κατάλοιπο ασπαρτικού στον ρυθμιστή απόκρισης (Response Regulator, RR), που ενεργοποιείται και οδηγεί στην έκφραση ή καταστολή των κατάλληλων γονιδίων.

Παρόλο που η ml15087 παρουσιάζει τα βασικά χαρακτηριστικά που την εντάσσουν στην ευρύτερη οικογένεια των συστημάτων μετάδοσης σήματος δύο συστατικών το ακριβές σύστημα στο οποίο μπορεί να συμμετέχει δεν έχει μελετηθεί.

Επιπλέον, πρόβλεψη της υποκυτταρικής τοποθέτησης της μέσω της εφαρμογής PSORTb (Yu N. Y. *et al.*, 2010), τοποθετεί την ml15087 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όμως μέσω της εφαρμογής TMHMM (Sonnhammer *et al.*, 1998) δεν εντοπίζεται κάποια διαμεμβρανική περιοχή και η πρωτεΐνη βρίσκεται εκτός του κυτταροπλάσματος.

Γ.7.2.5. Η πρωτεΐνη mlr0295.

Η επόμενη πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε κωδικοποιείται από το γονίδιο *mlr0295* και πρόκειται για την πρωτεΐνη L2 που συμμετέχει στο σχηματισμό της μεγάλης υπομονάδας 50S του ριβοσώματος. Η L2 είναι από τις πιο συντηρημένες πρωτεΐνες ανάμεσα σε αυτές που βρίσκονται στην μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος (Muller and Wittmann-Liebold, 1997), γεγονός που επιβεβαιώνεται και στην Εικόνα Γ.43Α όπου παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της πολλαπλής ευθυγράμμισης της mlr0295 με πρωτεΐνες L2 από διάφορους οργανισμούς. Το ποσοστά ομοιότητας μεταξύ των διαφόρων L2 πρωτεϊνών κυμαίνεται από 64 (mlr0295 με RPL2 H pyl) έως 91% (mlr0295 με RPL2 S mel).



Β PF03947, Ribosomal_L2_C



Εικόνα Γ.43: Α. Πολλαπλή ευθυγράμμιση της mlr0295 με πρωτεΐνες L2 από διάφορους μικρο-οργανισμούς. Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν είναι η RPL2 από το *E. coli* (P60422), η RPL2 K pne από το *K. pneumoniae* (B5XN97), RPL2 P aer από το *P.aeruginosa* (Q9HWD8), RPL2 S mel από το *S. meliloti* (Q92QG7), RPL2 A tum από το *A. tumefaciens* (Q8UE21) και RPL2 H pyl από το *Helicobacter pylori* (P56030). Το κίτρινος βέλος επισημαίνει την υψηλά συντηρημένη His229. **Β.** Σχηματική αναπαράσταση των HMM για την L2.

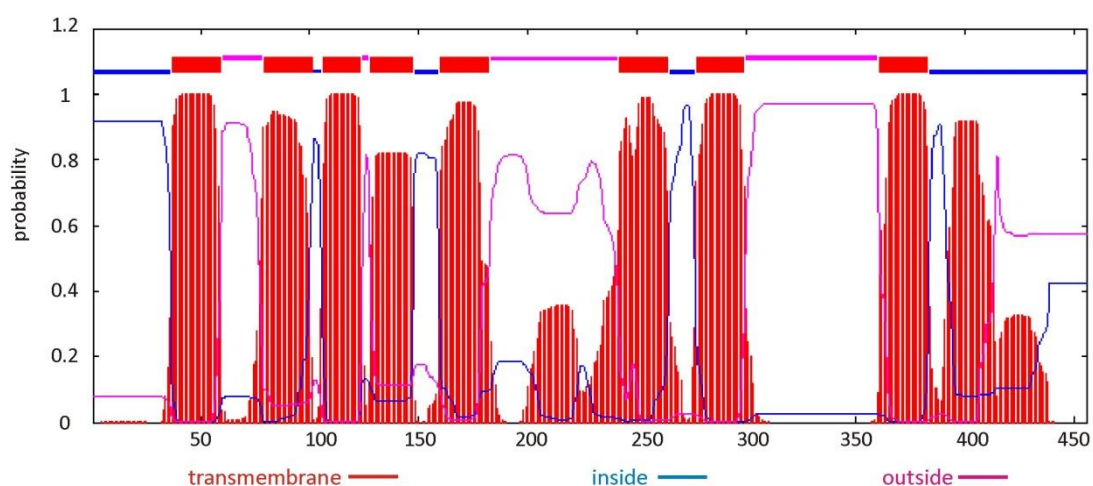
Όσον αφορά το ρόλο της L2 έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη τη σύνδεση των δύο υπομονάδων του ριβοσώματος όπως και για την πρόσδεση του tRNA ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι εμπλεκεται στη μετακίνηση των tRNA μεταξύ των θέσεων A και E (Diedrich *et al.*, 2000). Ταυτόχρονα, έχει προταθεί ότι η L2 έχει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του πετιδικού δεσμού καθώς η μεταλλαγή His229Ala είναι θνησιγενής χωρίς όμως να επηρεάζεται η ικανότητα σχηματισμού του ριβοσώματος από τις δύο υπομονάδες (Diedrich *et al.*, 2000). Η περιοχή που βρίσκεται η His229 είναι συντηρημένη και όπως φαίνεται από την αναπαράσταση HMM (Εικόνα Γ.Χ.Β) ανάμεσα στα κατάλοιπα αυτά είναι και μια προλίνη.

Γ.7.2.6. Η πρωτεΐνη mlI0858.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mlI0858*, αποτελείται από 516 αμινοξέα, στην περιοχή 32 με 359 εντοπίζεται μια περιοχή πρόσδεσης FAD (FAD_binding_3, PF01494). Η mlI0858 παρουσιάζει 40% ομοιότητα με την 3-(3-υδροξυλ-φαινυλ) προπιονική υδροξυλάση, ένα ένζυμο που καταλύει την αντίδραση μεταφοράς ενός ατόμου οξυγόνου από το O₂ στη θέση 2 ενός φαινολικού δακτυλίου. Παράλληλα, το ένζυμο αυτό πιθανά συμμετέχει στο μονοπάτι μεταβολισμού της φαινυλαλανίνης.

Γ.7.2.7. Η πρωτεΐνη mlI2088.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mlI2088*, αποτελείται από 456 αμινοξέα και δεν παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα με καμία γνωστή πρωτεΐνη ενώ δεν ήταν δυνατός ο εντοπισμός κάποιας συγκεκριμένης δομικής περιοχής. Όμως πρόβλεψη της τοπολογίας της mlI2088 μέσω της εφαρμογής PSORTb (Yu *et al.*, 2010) βρέθηκε ότι εδράζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Επιπλέον ανάλυσή της μέσω του αλγόριθμου TMHMM έδειξε ότι αυτή πιθανά αποτελείται από τουλάχιστον 8 διαμεμβρανικές περιοχές.

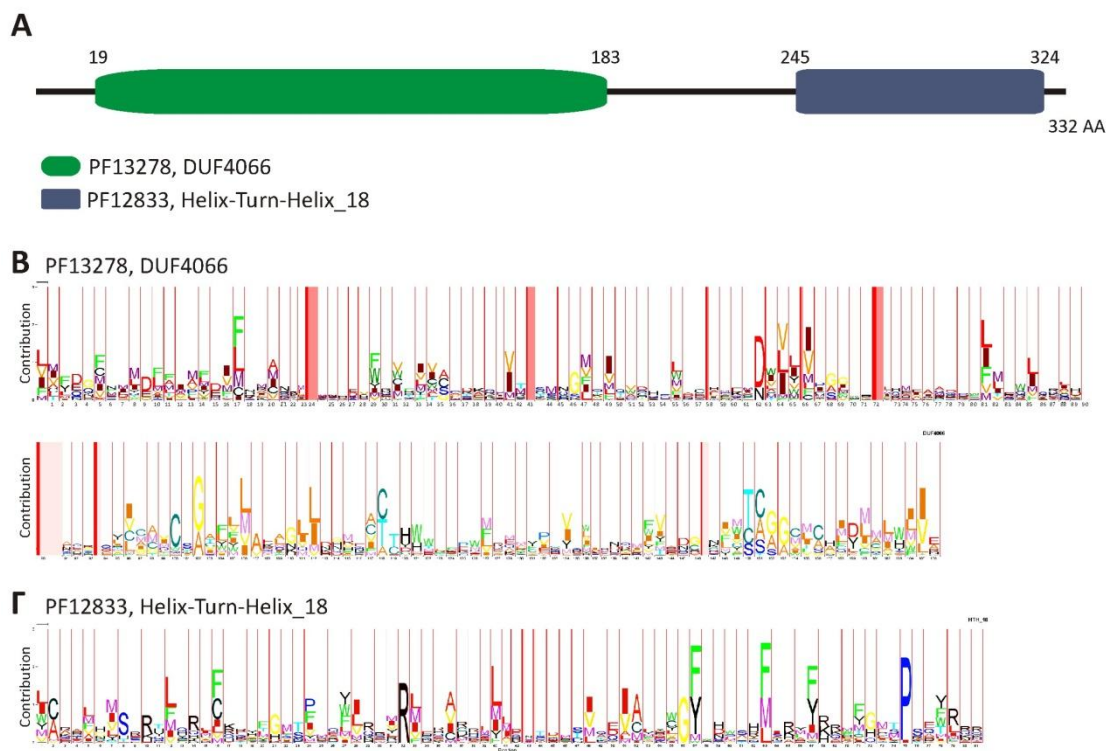


Εικόνα Γ.44: Πρόβλεψη τοπολογίας της mlI2088 μέσω του αλγόριθμου TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>). Στον κάθετο άξονα αποδίδεται η στατιστική πιθανότητα πρόβλεψης διαμεμβρανικού τμήματος ενώ ο οριζόντιος άξονας αφορά την κάθε περιοχή της αλληλουχίας με τους αντίστοιχους αριθμούς καταλοίπων αμινοξέων.

Γ.7.2.8. Η πρωτεΐνη mlI3844.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mlI3844*, αποτελείται από 332 αμινοξέα. Μέσω της βάσης δεδομένων πρωτεϊνικών οικογενειών Pfam στην αλληλουχία της εντοπίστηκαν δύο δομικές περιοχές (Εικόνα Γ.45Α). Η πρώτη περιοχή, είναι η DUF4066 και καταλαμβάνει τα κατάλοιπα 19 έως 183 και αφορά μια δομική ενότητα με άγνωστη λειτουργία (PF13278). Στο καρβόξυ τελικό άκρο της πρωτεΐνης εντοπίζεται το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα (Helix-Turn-Helix₁₈, PF12833) που απαντάται κυρίως σε πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με DNA. Οι περιοχές HTH είναι παρούσες στους περισσότερους κοινούς παράγοντες μεταγραφής όλων των προκαρυωτικών και μερικών ευκαρυωτικών κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν και σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών πέραν της ρύθμισης της μεταγραφής, μερικές από αυτές είναι επιδιόρθωση και αντιγραφή DNA, μεταβολισμός RNA και αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών σε διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος (Aravind *et al.*, 2005). Πολύ συχνά οι περιοχές HTH συνδυάζονται και με διάφορες δομικές περιοχές στην ίδια πρωτεΐνη.

Στις Εικόνες Γ.45B και Γ.45Γ αναπαρίστανται τα HMM μοντέλα των αμινοξικών αλληλουχιών των περιοχών DUF4066 και HTH₁₈ αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι στη δεύτερη περιοχή υπάρχει μια ισχυρά συντηρημένη προλίνη που αντιστοιχεί στην Pro318 της *mlI3844*.



Εικόνα Γ.45: **A.** Πρόβλεψη των δομικών περιοχών που εντοπίζονται στην αλληλουχία της *mlI3844* σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). **B.** Αναπαράσταση του HMM μοντέλου για τη δομική ενότητα DUF4066. **Γ.** Αναπαράσταση του HMM μοντέλου για τη δομική ενότητα έλικα-στροφή-έλικα₁₈.

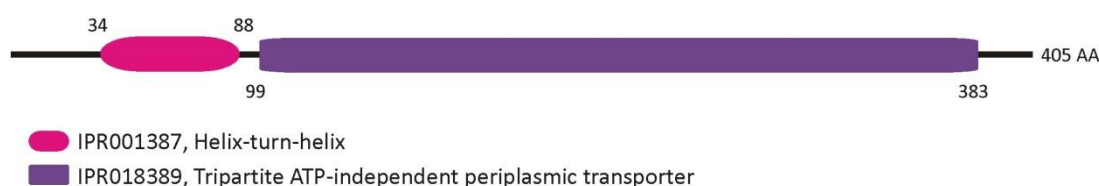
Τέλος, μέσω διαφορετικών αλγόριθμων πρόβλεψης δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί η πιθανή τοπολογία της *mlI3844*.

Γ.7.2.9. Η πρωτεΐνη mll4219.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mll4219*, αποτελείται από 484 αμινοξέα και δεν παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα με καμία γνωστή πρωτεΐνη. Επίσης στην αμινοξική της αλληλουχία εντοπίζεται μια περιοχή (76–165) που με χαμηλό βαθμό αξιοπιστίας παρουσιάζει ομοιότητα με τη δομική περιοχή PDGLE (IPR025937) η οποία δεν έχει μελετηθεί.

Γ.7.2.10. Η πρωτεΐνη mll9374.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mll9374*, αποτελείται από 405 αμινοξέα. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών οικογενειών InterPro (Hunter *et al.*, 2012) στην αλληλουχία της mll9374 εντοπίζονται δύο περιοχές που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες πρωτεϊνών (Εικόνα Γ.46).



Εικόνα Γ.46: Πρόβλεψη των δομικών περιοχών που εντοπίζονται στην αλληλουχία της mll9374 σύμφωνα με τη βάση δεδομένων InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Στο καρβόξυ τελικό της άκρο βρίσκεται μια περιοχή που εντοπίζεται σε τριμερής μη εξαρτώμενους από ATP περιπλασμικούς μεταφορείς οργανικών οξέων (Tripartite ATP-independent Periplasmic Transporter, TRAP, IPR018389). Οι μεταφορείς TRAP αποτελούνται από τρεις πρωτεΐνες, μία που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του υποστρώματος (Substrate Binding Protein, SBP) και δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Mulligan *et al.*, 2011). Η περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 99 έως 383 παρουσιάζει ομοιότητα με πρωτεΐνες SBP που έχουν μελετηθεί σε άλλους οργανισμούς.

Η mll9374 παρουσιάζει δύο σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα συστήματα TRAP που έχουν μελετηθεί έως σήμερα. Η πρώτη διαφορά εντοπίζεται σε γονιδιακό επίπεδο καθώς τα γονίδια που πιθανά κωδικοποιούν για τα τρία μέλη του μεταφορέα TRAP πιθανά δεν ανήκουν στο ίδιο οπερόνιο αφού απέχουν σημαντικά το ένα από το άλλο. Η δεύτερη, αφορά την δομική περιοχή ΗΜΗ που υπάρχει στο άμινο τελικό άκρο της πρωτεΐνης, μέχρι στιγμής η μοναδική πρωτεΐνη εντοπίζεται στις διεθνείς βάσεις και αποτελείται από τις δύο αυτές περιοχές είναι η mll9374.

Δ. Συζήτηση

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η οικογένεια των παρβουλινών στο ψυχανθές *Lotus jaronicus* αλλά και στον συμβιωτή του *Mesorhizobium loti*. Οι παρβουλίνες είναι μια οικογένεια cis/trans ισομερασών που παρόλο περιλαμβάνει μικρό αριθμό πρωτεϊνών, μέλη της διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών. Στους φυτικούς οργανισμούς ενώ έχουν μελετηθεί οι άλλες οικογένειες ΡΡΙΑσών οι πληροφορίες που έχουμε σχετικά με τις παρβουλίνες είναι περιορισμένες. Στο πλαίσιο αυτό πέραν της ολοκλήρωσης των ενζυμικών χαρακτηριστικών των τριών παρβουλινών του *L. jaronicus* και του εντοπισμού τους σε φυμάτια διαφορετικής ηλικίας προχωρήσαμε στην ανάπτυξη των κατάλληλων εργαλείων με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου τους στα φυτά. Αρχικά καθορίστηκε ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός. Στη συνέχεια για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τις φυτικές παρβουλίνες έγινε σάρωση cDNA βιβλιοθήκης. Ενώ παράλληλα, για την ανάλυση της λειτουργίας των γονιδίων των παρβουλινών δημιουργήθηκαν διαγονιδιακές σειρές φυτών *L. jaronicus* στα οποία πραγματοποιείται αποσιώπηση των γονιδίων αυτών. Τέλος, καθώς και ο ρόλος της *MIPar1* του *M. loti* είναι άγνωστος προχωρήσαμε στον εντοπισμό πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν μαζί της με τη μέθοδο της συγκαθίζησης.

Δ.1. Τρεις παρβουλίνες εντοπίζονται στο *Lotus jaronicus*.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη μιας οικογένειας ΡΡΙΑσών, των παρβουλινών, στο *L. jaronicus*, ένα φυτό που χρησιμοποιείται ως μοντέλο στη μελέτη των ψυχανθών. Με τα έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα σε φυτικούς οργανισμούς έχουν μελετηθεί μόνο παρβουλίνες ομόλογες της *hPIN1* από τον άνθρωπο, αυτές είναι η *AtPIN1*, η *MdPin1* και η *DIPar13* που προέρχονται από τα *Arabidopsis* (Landrieu *et al.*, 2000), *M. domestica* (Yao *et al.*, 2001) και *D. lanata* (Metzner *et al.*, 2001) αντίστοιχα. Στο *L. jaronicus* εντοπίστηκαν και μελετήθηκαν τρεις παρβουλίνες οι *LjPar1*, *LjPar2* και *LjPar3*, που η κάθε μια παρουσιάζει διαφορετικά χαρακτηριστικά.

Η *LjPar1* είναι μια πρωτεΐνη με σχετικά μικρό μέγεθος, παρουσιάζει υψηλό βαθμό ομολογίας με τις παρβουλίνες τύπου PIN, δηλαδή με παρβουλίνες που παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερά εξειδίκευσης έναντι φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων πριν από την προλίνη και αποτελείται μόνο από τη δομική περιοχή ΡΡΙΑσης (InterPro no. IPR000297). Σε καμία από τις φυτικές παρβουλίνες τύπου PIN που έχουν μελετηθεί έως σήμερα δεν έχει εντοπιστεί περιοχή αντίστοιχη της WW δομικής περιοχής που συνοδεύει την περιοχή ΡΡΙΑσης σε ομόλογες παρβουλίνες τύπου PIN από μύκητες και ζώα. Η απουσία της WW δομικής περιοχής στις φυτικές παρβουλίνες δεν επηρεάζει την ικανότητά τους να αναπληρώνουν τη λειτουργία της *Ess1* στο μη βιώσιμο μετάλλαγμα *ess1⁻* της ζύμης (Metzner *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2001). Στην *hPIN1* η WW δομική περιοχή έχει επιφορτιστεί με το ρόλο της ταχείας αναγνώρισης του κατάλληλου υποστρώματος ενώ η περιοχή ΡΡΙΑσης αναλαμβάνει την ισομερείωση του πεπτιδικού δεσμού που είναι και τελικός σκοπός της αλληλεπίδρασης (Lu *et al.*, 1999a; Zhou *et al.*, 2000). Ενδέχεται λοιπόν οι φυτικές παρβουλίνες τύπου PIN να έχουν διαφορετικό μηχανισμό εντοπισμού των πρωτεϊνών στόχων τους από αυτόν της *hPIN1*.

Η δεύτερη παρβουλίνη που μελετήθηκε είναι η *LjPar2*. Αντιπροσωπεύει μια κατηγορία φυτικών παρβουλινών που παρουσιάζουν σημαντικό βαθμό ομολογίας με την *hPar14* από τον άνθρωπο. Η *LjPar2* αποτελείται, όπως και η *LjPar1*, μόνο από την δομική

περιοχή ΡΡιάσης, όμως στο άμινο-τελικό της άκρο έχει μια προέκταση πλούσια σε βασικά αμινοξέα η οποία δεν παρουσιάζει κάποια συγκεκριμένη δομή. Μια παρόμοια προέκταση έχει και η *hPar14* η οποία είναι απαραίτητη για τη μεταφορά της στον πυρήνα αλλά και για την σύνδεσή της με το DNA (Reimer *et al.*, 2003).

Τέλος, για πρώτη φορά μελετήθηκε μια νέα κατηγορία παρβουλινών που εκτός από μια κεντρική περιοχή ΡΡιάσης στο καρβόξυ τελικό τους άκρο φέρουν μια λειτουργική περιοχή ροδανάσης (InterPro no. IPR001763) ενώ στο άμινο-τελικό της άκρο βρίσκεται ένα πεπτιδίο οδηγός για το χλωροπλάστη. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η *LjPar3*. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι *in silico* μελέτες έδειξαν ότι αυτού του τύπου παρβουλίνες συναντώνται μόνο στους φυτικούς οργανισμούς. Εξαιρεση στον κανόνα αυτό ίσως αποτελεί η αλληλουχία ενός γονιδίου (ADI17902.1) που προέρχεται από το μη καλλιεργούμενο *Desulfobacteriales bacterium* HF0200_07G10. Το γονίδιο αυτό εντοπίστηκε κατά την αλληλούχιση των γονιδιωμάτων του μικροβιακού πικοπλακτόν από παράκτιες περιοχές (Rich *et al.*, 2011) και πιθανά κωδικοποιεί για μια προκαρυωτική παρβουλίνη που φέρει ταυτόχρονα τις δομικές περιοχές παρβουλίνης και ροδανάσης.

Δ.2. Οι τρεις παρβουλίνες του *Lotus japonicus* είναι ενεργές ΡΡιάσες.

Οι τρεις παρβουλίνες που εντοπίστηκαν στο *L. japonicus* απομονώθηκαν και μελετήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα ΡΡιάσης που παρουσιάζουν έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τετραπεπτίδια με τα αμινοξέα αργινίνη και γλουταμινικό πριν από την προλίνη του δεσμού που πρόκειται να ισομερειωθεί ενώ σε παλιότερη μελέτη έχουν χρησιμοποιηθεί τετραπεπτίδια με τα αμινοξέα αλανίνη και λευκίνη πριν από την προλίνη (Κουρή, 2006). Οι τρεις παρβουλίνες του *L. japonicus* είναι ενεργές ΡΡιάσες παρουσιάζοντας όμως διαφορετικές σταθερές εξειδίκευσης έναντι των διαφορετικών τετραπεπτιδίων. Οι διαφορές στην προτίμηση υποστρώματος που παρουσιάζουν μπορούν μερικώς να αιτιολογηθούν, χρησιμοποιώντας τα μοριακά μοντέλα των δομών τους.

Από την πρόβλεψη της δομής της *LjPar1*, φαίνεται ότι το ενεργό της κέντρο σχηματίζεται από δύο διακριτές περιοχές. Η πρώτη περιοχή βρίσκεται στο βρόγχο β1/α1 όπου οι πλευρικές ομάδες των θετικά φορτισμένων καταλοίπων Arg23 και Arg24 «ελέγχουν» την είσοδο του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Η δεύτερη περιοχή αφορά την κοιλότητα που σχηματίζεται από υδρόφοβα κατάλοιπα και σε αυτήν πιθανά προσδέεται η προλίνη του υποστρώματος (Εικόνα Γ.2). Λαμβάνοντας υπόψη τα συντηρημένα κατάλοιπα στις αλληλουχίες τύπου PIN (Εικόνα Γ.1), την ομοιότητα της δομής της *LjPar1* με αυτή των *hPIN1* (Ranganathan *et al.*, 1997) και *AtPIN1* (Landrieu *et al.*, 2002) μπορεί να αιτιολογηθεί η προτίμηση της *LjPar1* στο τετραπεπτιδίο με αρνητικό φορτίο στη θέση πριν την προλίνη, καθώς και η αδυναμία μέτρησης ενζυμικής δραστηριότητας έναντι του τετραπεπτιδίου με το θετικά φορτισμένο αμινοξύ αργινίνη (Πίνακας Γ.1). Η παρουσία των θετικά φορτισμένων καταλοίπων στο βρόγχο β1/α1 εμποδίζει την είσοδο θετικά φορτισμένων υποστρωμάτων, χωρίς όμως να αποκλείει την ισομερείωση υποστρωμάτων με λευκίνη ή αλανίνη πριν από την προλίνη. Η σταθερά εξειδίκευσης έναντι του πεπτιδίου με το γλουταμινικό είναι 200 φορές μεγαλύτερη της αντίστοιχης έναντι του πεπτιδίου με την λευκίνη και 60 φορές μεγαλύτερη αυτής του πεπτιδίου με την αλανίνη. Οι σταθερές εξειδίκευσης με τα πεπτίδια αυτά είναι $1,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ και $4,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ αντίστοιχα.

Τα κατάλοιπα Arg23 και Arg24 της *LjPar1* είναι τα αντίστοιχα των Arg21 και Arg22 της *AtPIN1* (Landrieu *et al.*, 2002) και Arg68 και Arg69 της *hPIN1* (Ranganathan *et al.*, 1997) για τα οποία έχει αποδειχθεί ότι έχουν σημαντικό ρόλο στη εξειδίκευση υποστρώματος των παρβουλινών τύπου PIN. Πράγματι, στην *hPIN1* αντικατάσταση των Arg68 και Arg69 με Ala μειώνει τη σταθερά εξειδίκευσης προς το φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα στα ίδια επίπεδα με αυτά της αγρίου τύπου στο μη φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα (Yaffe *et al.*, 1997). Τα κατάλοιπα Phe84, Met89 και Phe93 που είναι συντηρημένα στην *hPIN1* και την *AtPIN1* σχηματίζουν μια υδρόφοβη κοιλότητα που καταλαμβάνεται από τον πυρρολιδινικό δακτύλιο της προλίνης του υποστρώματος. Επίσης κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκονται τα κατάλοιπα Ser113 και His14 που πιθανά συμμετέχουν στο σχηματισμό της υδρόφοβης κοιλότητας ή/και στην κατάλυση. Η συμμετοχή της His14 στη λειτουργία του ενζύμου ενισχύεται από το γεγονός ότι η μετάλλαξη His59Leu στην *hPIN1* δεν αναπληρώνουν την *Ess1* στο μη βιώσιμο μετάλλαγμα *ess1⁻* της ζύμης (Behrsin *et al.*, 2007).

Η *LjPar2* παρουσιάζει μια μικρή προτίμηση στο τετραπεπίδιο με το υδρόφοβο αμινοξύ λευκίνη έναντι της αλανίνης πριν από την προλίνη με σταθερές εξειδίκευσης $4,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ και $2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ αντίστοιχα (Κουρή, 2006). Παράλληλα, ελαφρώς χαμηλότερη είναι η σταθερά εξειδίκευσης ($1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$) έναντι του θετικά φορτισμένου αμινοξέος αργινίνη ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια ενζυμική δραστηριότητα έναντι του αρνητικά φορτισμένου γλουταμινικού. Τόσο από τα στοιχεία που προκύπτουν πολλαπλή ευθυγράμμιση όσο και από την πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της *LjPar2* δεν εντοπίζονται κατάλοιπα αντίστοιχα των Arg23 και Arg24 της *LjPar1* που είναι καθοριστικά στην εξειδίκευση υποστρώματος. Επίσης, ο βρόγχος $\beta 1/\alpha 1$ στον οποίο εντοπίζονται τα δύο αυτά κατάλοιπα στην *LjPar2* είναι πολύ μικρότερος σε μήκος από αυτόν της *LjPar1* ενώ τη θέση τους δεν φαίνεται να υπάρχει κάποιο άλλο θετικό φορτίο, αντίθετα η πλευρική ομάδα της Glu54 φαίνεται συνεισφέρει στην δημιουργία αρνητικού φορτίου στην περιοχή αυτή αποτρέποντας την είσοδο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αρνητικά φορτισμένου υποστρώματος. Αν και οι δύο παρβουλίνες *LjPar1* και *LjPar2* παρουσιάζουν προτίμηση σε υποστρώματα με διαφορετικές ιδιότητες η θέση πρόσδεσης της προλίνης στο ενεργό κέντρο της *LjPar2* είναι συντηρημένη καθώς δημιουργείται από τα υδρόφοβα κατάλοιπα Met109, Ala110 και Phe113 τα οποία εκτός από την αλανίνη είναι συντηρημένα και σε άλλες παρβουλίνες όπως οι *hPar14*, *hPin1* και *EcPar10*.

Η τρίτη παρβουλίνη που μελετήθηκε, η *LjPar3*, είναι και αυτή ενεργή ισομεράση παρουσιάζοντας αυξημένη προτίμηση στα αλειφατικά αμινοξέα λευκίνη και αλανίνη. Παράλληλα, καταλύει την ισομερείωση των πεπτιδίων που έχουν αργινίνη και γλουταμινικό, με τη χαμηλότερη σταθερά εξειδίκευσης να την παρουσιάζει έναντι του πεπτιδίου με το γλουταμινικό. Σε δομικό επίπεδο στην *LjPar3*, παρόμοια με την *LjPar2*, ο βρόγχος $\beta 1/\alpha 1$ είναι μικρός σε μήκος και απουσιάζουν από αυτόν τα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα που υπάρχουν στις παρβουλίνες τύπου PIN ή κάποιο άλλο ισχυρά φορτισμένο κατάλοιπο που πιθανά θα έλεγχε την είσοδο του ενεργού κέντρου. Αντίστοιχα, η περιοχή πρόσδεσης της προλίνης έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με τις άλλες παρβουλίνες.

Ενώ και οι τρεις παρβουλίνες του *L. jaronicus* είναι ενεργές ισομεράσες παρουσιάζουν διαφορετική προτίμηση όσον αφορά τις ιδιότητες του αμινοξέος που βρίσκεται πριν από την προλίνη. Η επιλεκτικότητα αυτή των υποστρωμάτων είναι δυνατό να αντικατατροπίζει το γεγονός ότι μέσα στο φυτικό κύτταρο οι τρεις παρβουλίνες έχουν διακριτούς ρόλους με ή χωρίς αλληλοεπικάλυψη.

Δ.3. Η *LjPar3* είναι μια παρβουλίνη με δύο διαφορετικές λειτουργικές δομικές περιοχές.

Η *LjPar3* αποτελεί το πρώτο μέλος που έχει μελετηθεί μιας ιδιαίτερης ομάδας παρβουλινών που συναντώνται κυρίως σε φυτικούς οργανισμούς. Η νέα αυτή ομάδα παρβουλινών φέρει ένα πεπτίδιο οδηγό για τον χλωροπλάστη ενώ στο καρβόξυ τελικό άκρο τους υπάρχει μια δομική ενότητα θειομεταφοράς/ροδανάσης (InterPro no. IPR001763). Στην περίπτωση της *LjPar3* η δομική αυτή περιοχή είναι λειτουργική καθώς καταλύει τη μεταφορά ενός ατόμου θείου από το θειοθειικό και από το 3-μερκαπτοπυρροσταφυλικό σε κυανίδιο (Κουρή, 2006). Η *LjPar3* ανάμεσα στα δύο αυτά υποστρώματα παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση όσον αφορά το θειοθειικό.

Οι θειομεταφορές/ροδανάσεις, είναι πρωτεΐνες μεταφοράς θείου (ST: Sulfurtransferases, E.C. 2.8.1.1) και είναι ένζυμα καθολικής διάδοσης. Οι δομικές ενότητες ροδανάσης εντοπίζονται σε πρωτεΐνες που μπορεί να αποτελούνται μόνο από την δομική ενότητα της ροδανάσης, σε πρωτεΐνες που φέρουν επαναλαμβανόμενες περιοχές ροδανάσης στις οποίες μόνο η καρβόξυ τελική περιοχή είναι ενεργή είτε σε πρωτεΐνες που φέρουν και άλλες δομικές ενότητες που πολλές φορές δεν σχετίζονται με την καταλυτική δράση τους ως θειομεταφορές (Parenbrock *et al.*, 2011). Ένα κοινό χαρακτηριστικό των θειομεταφορών είναι η παρουσία μιας ενεργής κυστεΐνης που βρίσκεται στο μοτίβο CXXGX[R/T] που σχηματίζεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Cirollone *et al.*, 2007). Στην *LjPar3* η περιοχή αυτή είναι η CHHGVR (Εικόνα Γ.6B) και η κυστεΐνη που πιθανά συμμετέχει στο ενεργό κέντρο είναι η Cys247. Επίσης η παρουσία των δύο ιστιδινών σε αυτή την περιοχή είναι σύμφωνη με την παρατήρηση ότι στο ενεργό κέντρο ενεργών μεταφορών θειοθειικού εντοπίζονται θετικά φορτισμένα κατάλοιπα ενώ στις μεταφορές 3-μερκαπτοπυρροσταφυλικού εντοπίζονται μη φορτισμένα αμινοξέα (Bordo and Bork, 2002). Τα *in vivo* υποστρώματα στα οποία δρουν οι πρωτεΐνες αυτού του τύπου είναι άγνωστα ενώ για την δράση των ροδανασών έχει προταθεί ότι συμμετέχουν στην διάσπαση του κυανίου (Sorbo, 1957), βοηθούν στον σχηματισμό προσθετικών ομάδων σίδηρο-θειο-πρωτεϊνών (Pagani *et al.*, 1984), συμμετέχουν στον μεταβολισμό του σεληνίου (Ogasawara *et al.*, 2001) και στην βιοσύνθεση της θειαμίνης (Palenchar *et al.*, 2000).

Στο *Arabidopsis* έχουν εντοπιστεί 20 θειομεταφορές που έχουν μία ή δύο περιοχές ροδανάσης και βάση της αμινοξικής τους ομολογίας χωρίζονται σε 6 ομάδες (Bartels *et al.*, 2007). Ομόλογη της *LjPar3* από το *Arabidopsis* είναι *AtPIN3* ή *AtSTR12* (*At5g19370*) που ανήκει στην ομάδα V μαζί με την *AtStr13* (*At5g55130*), η *AtStr13* πιθανά εμπλέκεται στη βιοσύνθεση συμπαραγόντων μολυβδενίου (Parenbrock *et al.*, 2011).

Η *LjPar3* δεν είναι η μοναδική PPIάση που έχει επιπλέον λειτουργικές δομικές περιοχές καθώς μέλη των κυκλοφιλινών και των FKBP's φέρουν επιπρόσθετες περιοχές. Οι περιοχές αυτές έχουν επιφορτιστεί κυρίως με το ρόλο της στόχευσης του κατάλληλου υποστρώματος. Για παράδειγμα οι επαναλήψεις TPR (Tetratricopeptide Repeats) είναι περιοχές που συναντώνται σε κυκλοφιλίνες και FKBP's, έχει προταθεί ότι δρουν ως στοιχεία για την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών. Άλλες περιοχές που συναντώνται στις ανοσοφιλίνες είναι επαναλήψεις WD40, περιοχές αναγνώρισης RNA, δάκτυλοι ψευδαργύρου και περιοχές πρόσδεσης της καλμοντουλίνης (He *et al.*, 2004).

Δ.4. Τα μεταγραφήματα των παρβουλινών εντοπίζονται στα φυμάτια του *Lotus japonicus*.

Με τη μέθοδο του RNA-RNA *in situ* υβριδισμού έγινε ο χώρο-χρονικός εντοπισμός των μεταγραφημάτων των *LjPar2* και *LjPar3* σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των φυματίων του *L. japonicus*. Επίσης σε προηγούμενη μελέτη έχει γίνει και ο εντοπισμός των μεταγραφημάτων του γονιδίου *LjPar1*. Τα μεταγραφήματα των γονιδίων των παρβουλινών εντοπίστηκαν και στα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια του φυματίων που μελετήθηκαν. Το σήμα υβριδισμού εντοπίστηκε στον κυρίως ιστό του φυματίου, στο παρέγχυμα αλλά και στις ηθμαγγειώδης δεσμίδες. Ιδιαίτερα για τις *LjPar1* και *LjPar2* η έκφρασή τους σε αυτά με μέρη του φυματίου επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη των μεταγραφημάτων συγκεκριμένων περιοχών του φυματίου που πάρθηκαν με μικροτομές μέσω λέιζερ (Takanashi *et al.*, 2012). Επιπλέον, τα μεταγραφήματα των *LjPar1* και *LjPar3* στα φυμάτια ηλικίας δεκατεσσάρων ημερών και πάνω παρατηρήθηκε ότι συσσωρεύονται στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων και γύρω από αυτόν.

Δ.5. Οι *LjPar1* και *LjPar2* εντοπίζονται σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα ενώ η *LjPar3* εντοπίζεται στον χλωροπλάστη.

Η διαμερισματοποίηση των διαφορετικών συστατικών του κυττάρου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση αλλά και την επικοινωνία των κυτταρικών λειτουργιών, συνεπώς η υποκυτταρική τοποθέτηση μιας πρωτεΐνης μπορεί να βοηθήσει στη διαλεύκανση της λειτουργίας της. Για το σκοπό αυτό προχωρήσαμε στην κατασκευή υβριδίων των παρβουλινών με την φθορίζουσα πρωτεΐνη eYFP. Από τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού των τριών παρβουλινών βρέθηκε ότι η *LjPar1* και η *LjPar2* εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που τοποθετούν την *DIPar13* στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα προεμβρυογενικών μαζών κυττάρων (PEMs) του *D. lanata* (Metzner *et al.*, 2001). Αντίστοιχα και η *hPar14*, ομόλογη της *LjPar2*, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα (Surmacz *et al.*, 2002). Στην *hPar14* υπεύθυνη για τη μεταφορά της στον πυρήνα είναι η άμινο τελικής της προέκταση που είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα, μια παρόμοια προέκταση εντοπίζεται και στην *LjPar2* και πιθανά να συμμετέχει στην υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης. Η υποκυτταρική τοποθέτηση της *hPar14* σε συνδυασμό με την ομοιότητα που παρουσιάζει με την οικογένεια πρωτεϊνών HMGB/HMGN έχει προταθεί ότι ίσως εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ή τη ρύθμιση έκφρασης γονιδίων (Surmacz *et al.*, 2002). Επιπλέον, ο εντοπισμός της *hPar14* σε προ-ριβωσωμικά σύμπλοκα νουκλεοπρωτεϊνών υποδηλώνει τη συμμετοχή της στο σχηματισμό ριβωσωμάτων (Fujiyama-Nakamura *et al.*, 2009; Fujiyama *et al.*, 2002). Η συμμετοχή της *LjPar2* σε παρόμοιες κυτταρικές λειτουργίες στα φυτά θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Η *LjPar3* εντοπίστηκε στα πλαστίδια των μετασχηματισμένων επιδερμικών κυττάρων, όπως υποδήλωνε και η παρουσία του άμινο-τελικού πεπτιδίου οδηγού για το χλωροπλάστη. Η τοπολογία της *LjPar3* στο χλωροπλάστη επιβεβαιώνεται και με το γεγονός ότι κατά την ταυτοποίηση του πρωτεώματος χλωροπλαστών του *Arabidopsis* στο στρώμα των χλωροπλαστών έχει εντοπιστεί η At5g19370 που είναι ομόλογη της *LjPar3* (Ferro *et al.*, 2010). Εκτός αυτής της παρβουλίνης στους χλωροπλάστες του *Arabidopsis* εντοπίζονται και

άλλες ΡΡΙΑσες (έξι κυκλοφιλίνες και δώδεκα FKBP). Οι χλωροπλαστικές ΡΡΙΑσες εμπλέκονται σε διεργασίες όπως η συναρμολόγηση και η διατήρηση του φωτοσυστήματος II (Fu *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2006) η σύνδεση της μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά τη φωτοσύνθεση και τη ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού με τη βιοσύνθεση της κυστεΐνης (Dominguez-Solis *et al.*, 2008), σύνδεση με την αφυδρογονάση NAD(P)H του φωτοσυστήματος I (Sirpio *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2009), ωρίμανση των φωτοσυνθετικών μεμβρανών (Gollan *et al.*, 2011). Παρόλο την αφθονία των ανοσοφιλινών στους χλωροπλάστες έχει προταθεί ότι ο ρόλος τους είναι πιθανό να μην εξαρτάται από την καθαυτή δραστηριότητα ισομεράσης καθώς φυτά με ταυτόχρονα μη λειτουργικά τα γονίδια *AtFKBP13* και *AtCYP20-2* που κωδικοποιούν για τις μόνες ενεργές ανοσοφιλίνες του lumen του χλωροπλάστη δεν παρουσίασαν προβλήματα στη λειτουργία των χλωροπλαστών (Ingelsson *et al.*, 2009).

Δ.6. Εντοπισμός πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με τις παρβουλίνες του *Lotus japonicus*.

Η αναγνώριση και η ταυτοποίηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μπορεί να μας δώσει σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο μιας πρωτεΐνης αλλά και να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση των πολύπλοκων κυτταρικών διεργασιών. Οι παρβουλίνες εξ αιτίας της φύσης της λειτουργίας που επιτελούν, που είναι η ισομερείωση ενός πεπτιδικού δεσμού, είναι ιδιαίτερα πιθανό να αλληλεπιδρούν με πληθώρα πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε μια προσπάθεια εντοπισμού αλληλεπιδράσεων μέσω του συστήματος δύο των υβριδίων σε κύτταρα ζύμης.

Κατά τη σάρωση που πραγματοποιήθηκε για την *LjPar1* παρουσιάστηκε έντονα το φαινόμενο της αυτόνομης ενεργοποίησης των γονιδίων επιλογής από τους κλώνους «θηράματα» που απομονώθηκαν. Ο εντοπισμός τέτοιων κλώνων κατά τη σάρωση βιβλιοθηκών αναφέρεται στη υπάρχουσα βιβλιογραφία. Το ενδιαφέρον με τη σάρωση της *LjPar1* είναι ότι τέτοιοι κλώνοι εμφανίστηκαν σε μεγάλο αριθμό, ενώ στις σαρώσεις για τις *LjPar2* και *LjPar3* παρόλο που χρησιμοποιήθηκε η ακριβώς ίδια βιβλιοθήκη και κάτω από παρόμοιες συνθήκες σάρωσης το φαινόμενο αυτό δεν ήταν το ίδιο έντονο. Πιθανά, η *LjPar1* να διαδραμάτισε κάποιο ρόλο στην «επιλογή» τέτοιων κλώνων χωρίς να αποκλείεται και η αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Ανάμεσα στους κλώνους που απομονώθηκαν για την *LjPar1* βρίσκεται και ένας παράγοντας μεταγραφής τύπου NAC με τον οποίο πιθανά αλληλεπιδρά παρβουλίνη αυτή. Ο έλεγχος αυτής της αλληλεπίδρασης θα πρέπει να γίνει και με κάποια άλλη τεχνική ώστε να είναι ασφαλές το συμπέρασμά μας. Αξιοσημείωτο πάντως είναι το γεγονός ότι μια άλλη ΡΡΙΑση, η *AtFKBP72* αλληλεπιδρά με έναν παράγοντα μεταγραφής της οικογένειας NAC, τον FAN (FKBP-associated NAC) ρυθμίζοντας την λειτουργία του ελέγχοντας τη μεταφορά του στον πυρήνα κατά την κυτταρική διαίρεση (Smyczynski *et al.*, 2006).

Στην περίπτωση της *LjPar2* δεν απομονώθηκε κάποια πρωτεΐνη που πιθανά αλληλεπιδρά μαζί της καθώς κανένας από τους κλώνους που απομονώθηκαν από το πρώτο στάδιο της σάρωσης δεν ήταν σε θέση να επιβεβαιώσει την αλληλεπίδραση κατά τον επανέλεγχο.

Από τη σάρωση με τη *LjPar3* εντοπίστηκε, μια ομάδα κλώνων η A41G1, που κωδικοποιούν για μια πρωτεΐνη της οποίας η λειτουργία είναι άγνωστη και πιθανά αλληλεπιδρά με την *LjPar3*. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελείται από μια δομική περιοχή DUF296

(Domain of Unknown Function, IPR005175). Στις διεθνείς βάσεις δεδομένων υπάρχουν κατατιθέμενες 1934 πρωτεΐνες που περιέχουν αυτή τη δομική ενότητα. Από αυτές οι 1230 εντοπίζονται σε βακτήρια, ενώ από τις 613 που εντοπίζονται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι 596 βρίσκονται σε φυτικούς οργανισμούς. Επιπλέον ένδειξη για μια πιθανή αλληλεπίδραση ανάμεσα στην DUF296 και την *LjPar3* αποτελεί και η πρόβλεψη της υποκυτταρικής τοποθέτησης της DUF296 στον χλωροπλάστη μέσω της εφαρμογής Plant-PLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/>). Για να εξακριβωθεί η αλληλεπίδραση αυτών των δύο πρωτεϊνών θα πρέπει να ακολουθηθεί και μια διαφορετική προσέγγιση για παράδειγμα ανοσοκαθίζηση ή μέσω φθορίζουσας συμπληρωματικότητας (Bimolecular Fluorescence Complementation) ή κάποιας άλλης τεχνικής.

Η αδυναμία εντοπισμού περισσότερων υποψήφια θηραμάτων είναι συχνό φαινόμενο κατά τη σάρωση βιβλιοθηκών με το σύστημα των δύο υβριδίων σε ζύμες. Παράγοντες που μπορεί να συμβάλουν σε ένα τέτοιο αποτέλεσμα είναι η αδυναμία πραγματοποίησης μετα-μεταγραφικών μετατροπών που συχνά είναι απαραίτητες για τη δημιουργία των περιοχών πρόσδεσης μεταξύ των πρωτεϊνών. Επίσης σημαντικός αριθμός ρυθμιστικών πρωτεϊνών αλλά και περιοχών μεταγωγής σήματος δεν αντιπροσωπεύονται ανάλογα στη ζύμη όπως στον οργανισμό που μελετάται. Τέλος, συχνά η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πρωτεϊνών γίνεται σε σύμπλοκα στα οποία συμμετέχουν περισσότερες από δύο πρωτεΐνες (Fashena *et al.*, 2000).

Δ.7. Σίγηση των παρβουλινών σε φυτά *Lotus japonicus*.

Η καταστολή της έκφρασης γονιδίων είναι ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο στην προσπάθεια διαλεύκανσης του βιολογικού τους ρόλου. Κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής προχωρήσαμε στη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών στα οποία πραγματοποιείται καταστολή της έκφρασης των γονιδίων των παρβουλινών του *L. japonicus*. Η προσπάθεια σίγησης των τριών παρβουλινών του *L. japonicus* ήταν επιτυχής έτσι για την *LjPar1* προέκυψαν δύο φυτά, για την *LjPar2* έξι και για την *LjPar3* τρία φυτά. Κανένα από τα φυτά αυτά δεν παρουσίασε εμφανείς διαφορές είτε με τα φυτά που μετασχηματίστηκαν με τον άδειο φορέα είτε με φυτά αγρίου τύπου.

Τα φυτά στα οποία επιτεύχθηκε σίγηση μπορούν να αποτελέσουν ιδιαίτερα σημαντικό υλικό για την μελέτη των φυτικών παρβουλινών αλλά και των ΡΡΙΑσών. Πιο συγκεκριμένα τα φυτά στα οποία έχει γίνει σίγηση για την *LjPar1* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της άνθησης στο *L. japonicus*. Στο *Arabidopsis* έχει βρεθεί ότι *AtPIN1* αλληλεπιδρά με τους παράγοντες μεταγραφής *AGL24* και *SOC1* ρυθμίζοντας έτσι το χρόνο άνθησης του φυτού (Wang *et al.*, 2010).

Παράλληλα, τα φυτά που έχει γίνει σίγηση της *LjPar3*, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της λειτουργίας των ΡΡΙΑσών γενικότερα στο χλωροπλάστη. Ο ρόλος των διάφορων ΡΡΙΑσών στο οργανίδιο αυτό φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς μεγάλος αριθμός τους εντοπίζεται σ' αυτό.

Δ.8. Εντοπισμός πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με τις παρβουλίνες του *Mesorhizobium loti*.

Το *M. loti* μπορεί και αποικίζει τις ρίζες του *L. japonicus* σχηματίζοντας φυμάτια μέσω των οποίων ανάγει το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αφομοιώσιμη μορφή για το φυτό. Στο βακτήριο αυτό έχουν εντοπιστεί τρία γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των παρβουλινών. Το ένα από αυτά το *mll3467* κωδικοποιεί για την *MIPar1* που έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει δραστηριότητα ΡΡ1άσης, χωρίς όμως να είναι γνωστή η λειτουργία της εντός του κυττάρου. Με στόχο τη διερεύνηση του ρόλου της *MIPar1* πραγματοποιήθηκε συγκαθίζηση της *MIPar1* με ολικές πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από το *M. loti*. Το κλάσμα των πρωτεϊνών που προέκυψε αναλύθηκε με LC-MSMS.

Οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν μετά την ανάλυση και ενδέχεται να αλληλεπιδρούν με την *MIPar1* εμπλέκονται σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες ενώ για μερικές από αυτές οι πληροφορίες που μπορούμε να συλλέξουμε είναι περιορισμένες. Από την *in silico* μελέτη των πρωτεϊνών αυτών βρέθηκε ότι αρκετές εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και μπορεί να σχετίζονται είτε με μεταφορά ενώσεων (*mll3769*, *mll2088* και *mll9374*), είτε με μεταγωγή σημάτων (*mll5087*), είτε με δίπλωμα πρωτεϊνών (*mll6538*). Παράλληλα έχουν εντοπιστεί πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και πιθανά σχετίζονται με μεταβολικά μονοπάτια (*mll9276* και *mll2088*) ενώ επίσης βρέθηκε μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στο σχηματισμό του ριβοσώματος (*mll0295*) και μια που φέρει αλληλουχίες που εντοπίζονται σε παράγοντες μεταγραφής (*mll3844*). Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία καμιά από αυτές τις πρωτεΐνες δεν έχει μελετηθεί στο *M. loti* ενώ για τη λειτουργία μερικών από αυτές υπάρχουν πληροφορίες από μελέτες τους σε άλλους οργανισμούς.

Εξετάζοντας την κάθε πρωτεΐνη χωριστά δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο αλληλεπίδρασής της με την *MIPar1* κυρίως από τη φύση της ενζυμικής δραστηριότητας των ΡΡ1ακών καθώς συμμετέχουν τους σε πλήθος διεργασιών με διαφορετικό ρόλο κάθε φορά. Για παράδειγμα, το προϊόν του γονιδίου *asmA* από το *E. coli* έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στη συναρμολόγηση πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (Misra and Miao, 1995), αντίστοιχα και η *SurA* εμπλέκεται στη συναρμολόγηση πορινών όπως οι *OmpA*, *OmpB* και *LamB* που εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη (Lazar and Kolter, 1996). Συνεπώς η δραστηριότητα των δύο αυτών πρωτεϊνών είναι πιθανό να συνδυάζεται στον γενικότερο μηχανισμό διπλώματος πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης. Με την ίδια λογική θα μπορούσε να εξεταστεί και η αλληλεπίδραση της *MIPar1* και με τις άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν.

Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν είναι και μια που ανήκει στο ριβόσωμα (L2, της 50S του ριβοσώματος). Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη συμμετοχή ΡΡ1ακών στο σύμπλοκο του ριβοσώματος, αυτές είναι η FKBP trigger factor που λειτουργεί ως μοριακός συνοδός και προστατεύει τις νεοσυντιθέμενες αλληλουχίες καθώς αυτές εξέρχονται από το ριβόσωμα (Ferbitz *et al.*, 2004). Παράλληλα και η *hPar14* από τον άνθρωπο πρώτη φορά εντοπίστηκε ως πρωτεΐνη που σχετίζεται με προ-ριβοσωμικά σύμπλοκα που απαρτίζονται από προ-rRNAs, από ριβοσωμικές πρωτεΐνες και από παράγοντες που συμμετέχουν στα πρώτα στάδια σχηματισμού του ριβοσώματος (Fujiyama *et al.*, 2002).

Ε. Βιβλιογραφία

- Ahn JC, Kim DW, You YN, Seok MS, Park JM, Hwang H, Kim BG, Luan S, Park HS, Cho HS.** 2010. Classification of rice (*Oryza sativa* L. Japonica nipponbare) immunophilins (FKBPs, CYPs) and expression patterns under water stress. *BMC Plant Biol* 10: 253.
- Anderson P.** 2005. Pin1: a proline isomerase that makes you wheeze? *Nat Immunol* 6: 1211-1212.
- Andreeva L, Heads R, Green CJ.** 1999. Cyclophilins and their possible role in the stress response. *Int J Exp Pathol* 80: 305-315.
- Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Iyer LM.** 2005. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* 29: 231-262.
- Atchison FW, Means AR.** 2004. A role for Pin1 in mammalian germ cell development and spermatogenesis. *Front Biosci* 9: 3248-3256.
- Bao L, Kimzey A, Sauter G, Sowadski JM, Lu KP, Wang DG.** 2004. Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. *Am J Pathol* 164: 1727-1737.
- Barik S.** 2006. Immunophilins: for the love of proteins. *Cell Mol Life Sci* 63: 2889-2900.
- Bartels A, Mock HP, Papenbrock J.** 2007. Differential expression of Arabidopsis sulfurtransferases under various growth conditions. *Plant Physiol Biochem* 45: 178-87.
- Behrens-Kneip S.** 2010. The role of SurA factor in outer membrane protein transport and virulence. *Int J Med Microbiol* 300: 421-428.
- Behrens S, Maier R, de Cock H, Schmid FX, Gross CA.** 2001. The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *EMBO J* 20: 285-294.
- Behrsin CD, Bailey ML, Bateman KS, Hamilton KS, Wahl LM, Brandl CJ, Shilton BH, Litchfield DW.** 2007. Functionally important residues in the peptidyl-prolyl isomerase Pin1 revealed by unigenic evolution. *J Mol Biol* 365:1143-62.
- Berardini TZ, Bollman K, Sun H, Poethig RS.** 2001. Regulation of vegetative phase change in Arabidopsis thaliana by cyclophilin 40. *Science* 291: 2405-2407.
- Bernis C, Vigneron S, Burgess A, Labbe JC, Fesquet D, Castro A, Lorca T.** 2007. Pin1 stabilizes Emi1 during G2 phase by preventing its association with SCF(beta-trcp). *EMBO Rep* 8: 91-98.
- Bissoli G, Ninoles R, Fresquet S, Palombieri S, Bueso E, Rubio L, Garcia-Sanchez MJ, Fernandez JA, Mulet JM, Serrano R.** 2012. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ROF2 modulates intracellular pH homeostasis in Arabidopsis. *Plant J* 70: 704-716.
- Bordo D, Bork P.** 2002. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep* 3:741-6.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Butterfield DA, Abdul HM, Opii W, Newman SF, Joshi G, Ansari MA, Sultana R.** 2006. Pin1 in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 98: 1697-1706.

Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9578-9582.

Cipollone R, Ascenzi P, Visca P. 2007. Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB Life* 59: 51-9.

Cohen SN, Chang AC, Hsu L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 2110-2114.

Cole C, Barber JD, Barton GJ. 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* 36: W197-201.

Colebatch G, Kloska S, Trevaskis B, Freund S, Altmann T, Udvardi MK. 2002. Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 411-420.

Dartigalongue C, Raina S. 1998. A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J* 17: 3968-3980.

Devasahayam G, Chaturvedi V, Hanes SD. 2002. The *Ess1* prolyl isomerase is required for growth and morphogenetic switching in *Candida albicans*. *Genetics* 160: 37-48.

Diedrich G, Spahn CM, Stelzl U, Schafer MA, Wooten T, Bochkariov DE, Cooperman BS, Traut RR, Nierhaus KH. 2000. Ribosomal protein L2 is involved in the association of the ribosomal subunits, tRNA binding to A and P sites and peptidyl transfer. *EMBO J* 19: 5241-5250.

Dixon RA, Sumner LW. 2003. Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiol* 131: 878-885.

Dolinski K, Muir S, Cardenas M, Heitman J. 1997. All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13093-13098.

Dominguez-Solis JR, He Z, Lima A, Ting J, Buchanan BB, Luan S. 2008. A cyclophilin links redox and light signals to cysteine biosynthesis and stress responses in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16386-16391.

Duina AA, Chang HC, Marsh JA, Lindquist S, Gaber RF. 1996. A cyclophilin function in Hsp90-dependent signal transduction. *Science* 274: 1713-1715.

Durocher D, Jackson SP. 2002. The FHA domain. *FEBS Lett* 513: 58-66.

Earley KW, Poethig RS. 2011. Binding of the cyclophilin 40 ortholog SQUINT to Hsp90 protein is required for SQUINT function in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 286: 38184-38189.

Eckert B, Martin A, Balbach J, Schmid FX. 2005. Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation stabilizes Pin1 by inhibiting its ubiquitination in human cells. *J Biol Chem* 280: 36575-36583.

Edvardsson A, Eshaghi S, Vener AV, Andersson B. 2003. The major peptidyl-prolyl isomerase activity in thylakoid lumen of plant chloroplasts belongs to a novel cyclophilin TLP20. *FEBS Lett* 542: 137-141.

- Edvardsson A, Shapiguzov A, Petersson UA, Schroder WP, Vener AV.** 2007. Immunophilin AtFKBP13 sustains all peptidyl-prolyl isomerase activity in the thylakoid lumen from *Arabidopsis thaliana* deficient in AtCYP20-2. *Biochemistry* 46: 9432-9442.
- Erster S, Moll UM.** 2004. Stress-induced p53 runs a direct mitochondrial death program: its role in physiologic and pathophysiologic stress responses in vivo. *Cell Cycle* 3: 1492-1495.
- Fashena SJ, Serebriiskii I, Golemis EA.** 2000. The continued evolution of two-hybrid screening approaches in yeast: how to outwit different preys with different baits. *Gene* 30: 1-14.
- Faure JD, Gingerich D, Howell SH.** 1998. An *Arabidopsis* immunophilin, AtFKBP12, binds to AtFIP37 (FKBP interacting protein) in an interaction that is disrupted by FK506. *Plant J* 15: 783-789.
- Ferbitz L, Maier T, Patzelt H, Bukau B, Deuerling E, Ban N.** 2004. Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature* 431: 590-596.
- Ferro M, Brugière S, Salvi D, Seigneurin-Berny D, Court M, Moyet L, Ramus C, Miras S, Mellal M, Le Gall S, Kieffer-Jaquinod S, Bruley C, Garin J, Joyard J, Masselon C, Rolland N.** 2010. AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol Cell Proteomics* 9: 1063-84.
- Fischer G, Bang H, Mech C.** 1984. [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomed Biochim Acta* 43: 1101-1111.
- Flemetakis E, Kavroulakis N, Quaedvlieg NEM, Spaik HP, Dimou M, Roussis A, Katinakis P.** 2000. *Lotus japonicus* contains two distinct ENOD40 genes that are expressed in symbiotic, nonsymbiotic, and embryonic tissues. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 987-994.
- Freeman BC, Toft DO, Morimoto RI.** 1996. Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science* 274: 1718-1720.
- Fu A, He Z, Cho HS, Lima A, Buchanan BB, Luan S.** 2007. A chloroplast cyclophilin functions in the assembly and maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15947-15952.
- Fujimori F, Takahashi K, Uchida C, Uchida T.** 1999. Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 658-663.
- Fujiyama-Nakamura S, Yoshikawa H, Homma K, Hayano T, Tsujimura-Takahashi T, Izumikawa K, Ishikawa H, Miyazawa N, Yanagida M, Miura Y, Shinkawa T, Yamauchi Y, Isobe T, Takahashi N.** 2009. Parvulin (Par14), a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, is a novel rRNA processing factor that evolved in the metazoan lineage. *Mol Cell Proteomics* 8: 1552-1565.
- Fujiyama S, Yanagida M, Hayano T, Miura Y, Isobe T, Fujimori F, Uchida T, Takahashi N.** 2002. Isolation and proteomic characterization of human Parvulin-associating preribosomal ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem* 277: 23773-23780.

- Fukai E, Soyano T, Umehara Y, Nakayama S, Hirakawa H, Tabata S, Sato S, Hayashi M.** 2012. Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous retrotransposon LORE1. *Plant J* 69: 720-730.
- Fulgosi H, Vener AV, Altschmied L, Herrmann RG, Andersson B.** 1998. A novel multi-functional chloroplast protein: identification of a 40 kDa immunophilin-like protein located in the thylakoid lumen. *EMBO J* 17: 1577-1587.
- Galat A.** 2003. Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions. *Curr Top Med Chem* 3: 1315-1347.
- Gavini N, Tungtur S, Pulakat L.** 2006. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase-independent functional NifH mutant of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 188: 6020-6025.
- Geisler M, Girin M, Brandt S, Vincenzetti V, Plaza S, Paris N, Kobae Y, Maeshima M, Billion K, Kolukisaoglu UH, Schulz B, Martinoia E.** 2004. Arabidopsis immunophilin-like TWD1 functionally interacts with vacuolar ABC transporters. *Mol Biol Cell* 15: 3393-3405.
- Geisler M, Kolukisaoglu HU, Bouchard R, Billion K, Berger J, Saal B, Frangne N, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Dudler R, Blakeslee JJ, Murphy AS, Martinoia E, Schulz B.** 2003. TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with Arabidopsis multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19. *Mol Biol Cell* 14: 4238-4249.
- Gietz RD.** 2006. Yeast two-hybrid system screening. *Methods Mol Biol* 313: 345-371.
- Gollan PJ, Bhawe M.** 2010. Genome-wide analysis of genes encoding FK506-binding proteins in rice. *Plant Mol Biol* 72: 1-16.
- Gollan PJ, Ziemann M, Bhawe M.** 2011. PPlase activities and interaction partners of FK506-binding proteins in the wheat thylakoid. *Physiol Plant* 143: 385-395.
- Gollan PJ, Bhawe M, Aro EM.** 2012. The FKBP families of higher plants: Exploring the structures and functions of protein interaction specialists. *FEBS Lett* 586: 3539-3547.
- Graham PH, Vance CP.** 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131: 872-877.
- Gullerova M, Barta A, Lorkovic ZJ.** 2006. AtCyp59 is a multidomain cyclophilin from *Arabidopsis thaliana* that interacts with SR proteins and the C-terminal domain of the RNA polymerase II. *RNA* 12: 631-643.
- Gupta R, Mould RM, He Z, Luan S.** 2002. A chloroplast FKBP interacts with and affects the accumulation of Rieske subunit of cytochrome bf complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15806-15811.
- Hamdane M, Dourlen P, Bretteville A, Sambo AV, Ferreira S, Ando K, Kerdraon O, Begard S, Geay L, Lippens G, Sergeant N, Delacourte A, Maurage CA, Galas MC, Buee L.** 2006. Pin1 allows for differential Tau dephosphorylation in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 32: 155-160.
- Handberg K, Stougaard J.** 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular-genetics. *The Plant Journal* 2: 487-496.

- Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW.** 1984. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226: 544-547.
- Hanes SD, Shank PR, Bostian KA.** 1989. Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 5: 55-72.
- Hani J, Stumpf G, Domdey H.** 1995. PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases. *FEBS Lett* 365: 198-202.
- Hani J, Schelbert B, Bernhardt A, Domdey H, Fischer G, Wiebauer K, Rahfeld JU.** 1999. Mutations in a peptidylprolyl-cis/trans-isomerase gene lead to a defect in 3'-end formation of a pre-mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 108-116.
- Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL.** 1989. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341: 758-760.
- Harrar Y, Bellec Y, Bellini C, Faure JD.** 2003. Hormonal control of cell proliferation requires PASTICCINO genes. *Plant Physiol* 132: 1217-1227.
- He Z, Li L, Luan S.** 2004. Immunophilins and parvulins. Superfamily of peptidyl prolyl isomerases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134: 1248-1267.
- Hennig L, Christner C, Kipping M, Schelbert B, Rucknagel KP, Grabley S, Kullertz G, Fischer G.** 1998. Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone. *Biochemistry* 37: 5953-5960.
- Holmes DS, Quigley M.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-197.
- Horowitz DS, Lee EJ, Mabon SA, Misteli T.** 2002. A cyclophilin functions in pre-mRNA splicing. *EMBO J* 21: 470-480.
- Howard KS, McLean PA, Hansen FB, Lemley PV, Koblan KS, Orme-Johnson WH.** 1986. *Klebsiella pneumoniae* nifM gene product is required for stabilization and activation of nitrogenase iron protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 261: 772-778.
- Huang HK, Forsburg SL, John UP, O'Connell MJ, Hunter T.** 2001. Isolation and characterization of the Pin1/Ess1p homologue in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 114: 3779-3788.
- Hunter S, Jones P, Mitchell A, Apweiler R, Attwood TK, Bateman A, Bernard T, Binns D, Bork P, Burge S, de Castro E, Coghill P, Corbett M, Das U, Daugherty L, Duquenne L, Finn RD, Fraser M, Gough J, Haft D, Hulo N, Kahn D, Kelly E, Letunic I, Lonsdale D, Lopez R, Madera M, Maslen J, McAnulla C, McDowall J, McMenamin C, Mi H, Mutowo-Mueller P, Mulder N, Natale D, Orengo C, Pesseat S, Punta M, Quinn AF, Rivoire C, Sangrador-Vegas A, Selengut JD, Sigrist CJ, Scheremetjew M, Tate J, Thimmajananthan M, Thomas PD, Wu CH, Yeats C, Yong SY.** 2012. InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res* 40: D306-312.
- Iki T, Yoshikawa M, Meshi T, Ishikawa M.** 2012. Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. *EMBO J* 31: 267-278.

Ingelsson B, Shapiguzov A, Kieselbach T, Vener AV. 2009. Peptidyl-prolyl isomerase activity in chloroplast thylakoid lumen is a dispensable function of immunophilins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 50: 1801-1814.

Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.

Jordens J, Janssens V, Longin S, Stevens I, Martens E, Bultynck G, Engelborghs Y, Lescrinier E, Waelkens E, Goris J, Van Hoof C. 2006. The protein phosphatase 2A phosphatase activator is a novel peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J Biol Chem* 281: 6349-6357.

Joseph JD, Daigle SN, Means AR. 2004. PINA is essential for growth and positively influences NIMA function in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* 279: 32373-32384.

Kalantidis K, Schumacher HT, Alexiadis T, Helm JM. 2008. RNA silencing movement in plants. *Biol Cell* 100: 13-26.

Kamat SS, Williams HJ, Raushel FM. 2011. Intermediates in the transformation of phosphonates to phosphate by bacteria. *Nature* 480: 570-573.

Kamphausen T, Fanghanel J, Neumann D, Schulz B, Rahfeld JU. 2002. Characterization of *Arabidopsis thaliana* AtFKBP42 that is membrane-bound and interacts with Hsp90. *Plant J* 32: 263-276.

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* 7: 331-338.

Karimi M, Inze D, Depicker A. 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7: 193-195.

Karin M, Gallagher E. 2005. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life* 57: 283-295.

Kelley LA, Sternberg MJ. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4: 363-371.

Kessler D, Papatheodorou P, Stratmann T, Dian EA, Hartmann-Fatu C, Rassow J, Bayer P, Mueller JW. 2007. The DNA binding parvulin Par17 is targeted to the mitochondrial matrix by a recently evolved prepeptide uniquely present in Hominidae. *BMC Biol* 5: 37.

Kofron JL, Kuzmic P, Kishore V, Colon-Bonilla E, Rich DH. 1991. Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry* 30: 6127-6134.

Kouchi H, Hata S. 1993. Isolation and Characterization of Novel Nodulin Cdnas Representing Genes Expressed at Early Stages of Soybean Nodule Development. *Molecular & General Genetics* 238: 106-119.

- Kuhlewein A, Voll G, Hernandez Alvarez B, Kessler H, Fischer G, Rahfeld JU, Gemmecker G.** 2004. Solution structure of Escherichia coli Par10: The prototypic member of the Parvulin family of peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. *Protein Sci* 13: 2378-2387.
- Kumari S, Roy S, Singh P, Singla-Pareek SL, Pareek A.** 2012. Cyclophilins: Proteins in search of function. *Plant Signal Behav* 8: e22734.
- Landrieu I, Wieruszkeski JM, Wintjens R, Inze D, Lippens G.** 2002. Solution structure of the single-domain prolyl cis/trans isomerase PIN1At from Arabidopsis thaliana. *J Mol Biol* 320: 321-332.
- Landrieu I, De Veylder L, Fruchart JS, Odaert B, Casteels P, Portetelle D, Van Montagu M, Inze D, Lippens G.** 2000. The Arabidopsis thaliana PIN1At gene encodes a single-domain phosphorylation-dependent peptidyl prolyl cis/trans isomerase. *J Biol Chem* 275: 10577-10581.
- Lazar SW, Kolter R.** 1996. SurA assists the folding of Escherichia coli outer membrane proteins. *J Bacteriol* 178: 1770-1773.
- Lederer C, Heider D, van den Boom J, Hoffmann D, Mueller JW, Bayer P.** 2011. Single-domain parvulins constitute a specific marker for recently proposed deep-branching archaeal subgroups. *Evol Bioinform Online* 7: 135-148.
- Lee TH, Chen CH, Suizu F, Huang P, Schiene-Fischer C, Daum S, Zhang YJ, Goate A, Chen RH, Zhou XZ, Lu KP.** 2011. Death-associated protein kinase 1 phosphorylates Pin1 and inhibits its prolyl isomerase activity and cellular function. *Mol Cell* 42: 147-159.
- Li H, Luan S.** 2010. AtFKBP53 is a histone chaperone required for repression of ribosomal RNA gene expression in Arabidopsis. *Cell Res* 20: 357-366.
- Li H, He Z, Lu G, Lee SC, Alonso J, Ecker JR, Luan S.** 2007a. A WD40 domain cyclophilin interacts with histone H3 and functions in gene repression and organogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 2403-2416.
- Li QM, Tep C, Yune TY, Zhou XZ, Uchida T, Lu KP, Yoon SO.** 2007b. Opposite regulation of oligodendrocyte apoptosis by JNK3 and Pin1 after spinal cord injury. *J Neurosci* 27: 8395-8404.
- Lim J, Balastik M, Lee TH, Nakamura K, Liou YC, Sun A, Finn G, Pastorino L, Lee VM, Lu KP.** 2008. Pin1 has opposite effects on wild-type and P301L tau stability and tauopathy. *J Clin Invest* 118: 1877-1889.
- Lima A, Lima S, Wong JH, Phillips RS, Buchanan BB, Luan S.** 2006. A redox-active FKBP-type immunophilin functions in accumulation of the photosystem II supercomplex in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12631-12636.
- Liou YC, Zhou XZ, Lu KP.** 2011. Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends Biochem Sci* 36: 501-514.
- Lippuner V, Chou IT, Scott SV, Ettinger WF, Theg SM, Gasser CS.** 1994. Cloning and characterization of chloroplast and cytosolic forms of cyclophilin from Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* 269: 7863-7868.

Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-815.

Lohar DP, Schuller K, Buzas DM, Gresshoff PM, Stiller J. 2001. Transformation of *Lotus japonicus* using the herbicide resistance bar gene as a selectable marker. *J Exp Bot* 52: 1697-1702.

Lombardi P, Ercolano E, El Alaoui H, Chiurazzi M. 2003. A new transformation-regeneration procedure in the model legume *Lotus japonicus*: root explants as a source of large numbers of cells susceptible to *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 21: 771-777.

Lu KP, Zhou XZ. 2007. The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 904-916.

Lu KP, Hanes SD, Hunter T. 1996. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* 380: 544-547.

Lu KP, Liou YC, Vincent I. 2003. Proline-directed phosphorylation and isomerization in mitotic regulation and in Alzheimer's Disease. *Bioessays* 25: 174-181.

Lu KP, Finn G, Lee TH, Nicholson LK. 2007. Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol* 3: 619-629.

Lu PJ, Zhou XZ, Shen M, Lu KP. 1999a. Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* 283: 1325-1328.

Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP. 1999b. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399: 784-788.

Lu PJ, Zhou XZ, Liou YC, Noel JP, Lu KP. 2002. Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function. *J Biol Chem* 277: 2381-2384.

Malesević M, Poehlmann A, Hernandez Alvarez B, Diessner A, Träger M, Rahfeld JU, Jahreis G, Liebscher S, Bordusa F, Fischer G, Lücke C. 2010. The protein-free IANUS peptide array uncovers interaction sites between *Escherichia coli* parvulin 10 and alkyl hydroperoxide reductase. *Biochemistry* 49: 8626-8635.

Maruyama T, Furutani M. 2000. Archaeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPIases). *Front Biosci* 5: D821-836.

Matern Y, Barion B, Behrens-Kneip S. 2010. PpiD is a player in the network of periplasmic chaperones in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* 10: 251.

Meiri D, Breiman A. 2009. Arabidopsis ROF1 (FKBP62) modulates thermotolerance by interacting with HSP90.1 and affecting the accumulation of HsfA2-regulated sHSPs. *Plant J* 59: 387-399.

Meiri D, Tazat K, Cohen-Peer R, Farchi-Pisanty O, Aviezer-Hagai K, Avni A, Breiman A. 2010. Involvement of Arabidopsis ROF2 (FKBP65) in thermotolerance. *Plant Mol Biol* 72: 191-203.

Metzner M, Stoller G, Rucknagel KP, Lu KP, Fischer G, Luckner M, Kullertz G. 2001. Functional replacement of the essential ESS1 in yeast by the plant parvulin DIPar13. *J Biol Chem* 276: 13524-13529.

- Michaels SD, Ditta G, Gustafson-Brown C, Pelaz S, Yanofsky M, Amasino RM.** 2003. AGL24 acts as a promoter of flowering in Arabidopsis and is positively regulated by vernalization. *Plant J* 33: 867-874.
- Misra R, Miao Y.** 1995. Molecular analysis of *asmA*, a locus identified as the suppressor of *OmpF* assembly mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 16: 779-88.
- Motohashi K, Koyama F, Nakanishi Y, Ueoka-Nakanishi H, Hisabori T.** 2003. Chloroplast cyclophilin is a target protein of thioredoxin. Thiol modulation of the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *J Biol Chem* 278: 31848-31852.
- Mueller JW, Bayer P.** 2008. Small family with key contacts: par14 and par17 parvulin proteins, relatives of pin1, now emerge in biomedical research. *Perspect Medicin Chem* 2: 11-20.
- Mueller JW, Kessler D, Neumann D, Stratmann T, Papatheodorou P, Hartmann-Fatu C, Bayer P.** 2006. Characterization of novel elongated Parvulin isoforms that are ubiquitously expressed in human tissues and originate from alternative transcription initiation. *BMC Mol Biol* 7: 9.
- Muller EC, Wittmann-Liebold B.** 1997. Phylogenetic relationship of organisms obtained by ribosomal protein comparison. *Cell Mol Life Sci* 53: 34-50.
- Mulligan C, Fischer M, Thomas GH.** 2011. Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* 35: 68-86.
- Myers JK, Morris DP, Greenleaf AL, Oas TG.** 2001. Phosphorylation of RNA polymerase II CTD fragments results in tight binding to the WW domain from the yeast prolyl isomerase *Ess1*. *Biochemistry* 40: 8479-8486.
- Ogasawara Y, Lacourciere G, Stadtman TC.** 2001. Formation of a selenium- substituted Rhodanese by reaction with selenite and glutathione: possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9494-9498.
- Oh K, Ivanchenko MG, White TJ, Lomax TL.** 2006. The *diageotropica* gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. *Planta* 224: 133-144.
- Okamoto K, Sagata N.** 2007. Mechanism for inactivation of the mitotic inhibitory kinase *Wee1* at M phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3753-3758.
- Pagani S, Bonomi F, Cerletti P.** 1984. Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin. *Eur J Biochem* 142: 361-366.
- Pal D, Chakrabarti P.** 1999. Cis peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations. *J Mol Biol* 294: 271-288.
- Palenchar P, Buck CJ, Cheng H, Larson TJ, Mueller EG.** 2000. Evidence that *Thil*, an enzyme shared between thiamin and 4-thiouridine biosynthesis, may be a sulfurtransferase that proceeds through a persulfide intermediate. *J Biol Chem* 275: 8283-8286.
- Papenbrock J, Guretzki S, Henne M.** 2011. Latest news about the sulfurtransferase protein family of higher plants. *Amino Acids* 41: 43-57.

Pastorino L, Sun A, Lu PJ, Zhou XZ, Balastik M, Finn G, Wulf G, Lim J, Li SH, Li X, Xia W, Nicholson LK, Lu KP. 2006. The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production. *Nature* 440: 528-534.

Pawson T, Scott JD. 2005. Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci* 30: 286-290.

Peltier JB, Emanuelsson O, Kalume DE, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles DA, Söderberg L, Roepstorff P, von Heijne G, van Wijk KJ. 2002. Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of Arabidopsis determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* 14: 211-236.

Peng L, Fukao Y, Fujiwara M, Takami T, Shikanai T. 2009. Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in Arabidopsis. *Plant Cell* 21: 3623-3640.

Perry JA, Wang TL, Welham TJ, Gardner S, Pike JM, Yoshida S, Parniske M. 2003. A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 131: 866-871.

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8: 785-786.

Pinton P, Rimessi A, Marchi S, Orsini F, Migliaccio E, Giorgio M, Contursi C, Minucci S, Mantovani F, Wieckowski MR, Del Sal G, Pelicci PG, Rizzuto R. 2007. Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc. *Science* 315: 659-663.

Polhill R, Raven P, Stirton C. 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae. Pages 1–26 in Polhill R, Raven P, eds. *Advances in Legume Systematics* vol. Part 1. Kew UK: Royal Botanic Gardens.

Poulsen C, Podenphant L. 2002. Expressed sequence tags from roots and nodule primordia of *Lotus japonicus* infected with *Mesorhizobium loti*. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 376-379.

Price ER, Jin M, Lim D, Pati S, Walsh CT, McKeon FD. 1994. Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3931-3935.

Punta M, Coghill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer EL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD. 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 40: D290-301.

Rahfeld JU, Schierhorn A, Mann K, Fischer G. 1994a. A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 343: 65-69.

Rahfeld JU, Rucknagel KP, Schelbert B, Ludwig B, Hacker J, Mann K, Fischer G. 1994b. Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Lett* 352: 180-184.

Raja K, Pulakat L, Gavini N. 2006. Genetic Complementation Studies of Human Pin1 in *Azotobacter vinelandii* Revealed that it Requires Amino Terminus of the NifM to Deliver

PPIase Effect to the Fe-protein of Nitrogenase. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2: 25-32.

Ranganathan R, Lu KP, Hunter T, Noel JP. 1997. Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* 89: 875-886.

Reddy VS, Shlykov MA, Castillo R, Sun EI, Saier MH, Jr. 2012. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS J* 279: 2022-2035.

Reimer T, Weiwad M, Schierhorn A, Ruecknagel PK, Rahfeld JU, Bayer P, Fischer G. 2003. Phosphorylation of the N-terminal domain regulates subcellular localization and DNA binding properties of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase hPar14. *J Mol Biol* 330: 955-966.

Rempola B, Kaniak A, Migdalski A, Rytka J, Slonimski PP, di Rago JP. 2000. Functional analysis of RRD1 (YIL153w) and RRD2 (YPL152w), which encode two putative activators of the phosphotyrosyl phosphatase activity of PP2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 262: 1081-1092.

Rich VI, Pham VD, Eppley J, Shi Y, DeLong EF. 2011. Time-series analyses of Monterey Bay coastal microbial picoplankton using a 'genome proxy' microarray. *Environ Microbiol* 13: 116-134.

Rokka A, Aro EM, Herrmann RG, Andersson B, Vener AV. 2000. Dephosphorylation of photosystem II reaction center proteins in plant photosynthetic membranes as an immediate response to abrupt elevation of temperature. *Plant Physiol* 123: 1525-1536.

Romano P, Gray J, Horton P, Luan S. 2005. Plant immunophilins: functional versatility beyond protein maturation. *New Phytol* 166: 753-769.

Romano PG, Horton P, Gray JE. 2004a. The Arabidopsis cyclophilin gene family. *Plant Physiol* 134: 1268-1282.

Romano PG, Edvardsson A, Ruban AV, Andersson B, Vener AV, Gray JE, Horton P. 2004b. Arabidopsis AtCYP20-2 is a light-regulated cyclophilin-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase associated with the photosynthetic membranes. *Plant Physiol* 134: 1244-1247.

Roudier F, Gissot L, Beaudoin F, Haslam R, Michaelson L, Marion J, Molino D, Lima A, Bach L, Morin H, Tellier F, Palauqui JC, Bellec Y, Renne C, Miquel M, Dacosta M, Vignard J, Rochat C, Markham JE, Moreau P, Napier J, Faure JD. 2010. Very-long-chain fatty acids are involved in polar auxin transport and developmental patterning in Arabidopsis. *Plant Cell* 22: 364-375.

Roux PP, Blenis J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 320-344.

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37: e45.

Rulten S, Thorpe J, Kay J. 1999. Identification of eukaryotic parvulin homologues: a new subfamily of peptidylprolyl cis-trans isomerases. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 557-562.

Ryo A, Nakamura M, Wulf G, Liou YC, Lu KP. 2001. Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat Cell Biol* 3: 793-801.

Ryo A, Liou YC, Wulf G, Nakamura M, Lee SW, Lu KP. 2002. PIN1 is an E2F target gene essential for Neu/Ras-induced transformation of mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* 22: 5281-5295.

Ryo A, Togo T, Nakai T, Hirai A, Nishi M, Yamaguchi A, Suzuki K, Hirayasu Y, Kobayashi H, Perrem K, Liou YC, Aoki I. 2006. Prolyl-isomerase Pin1 accumulates in lewy bodies of parkinson disease and facilitates formation of alpha-synuclein inclusions. *J Biol Chem* 281: 4117-4125.

Saito T, Niwa Y, Ashida H, Tanaka K, Kawamukai M, Matsuda H, Nakagawa T. 1999. Expression of a gene for cyclophilin which contains an amino-terminal endoplasmic reticulum-targeting signal. *Plant Cell Physiol* 40: 77-87.

Sandal N, Petersen TR, Murray J, Umehara Y, Karas B, Yano K, Kumagai H, Yoshikawa M, Saito K, Hayashi M, Murakami Y, Wang X, Hakoyama T, Imaizumi-Anraku H, Sato S, Kato T, Chen W, Hossain MS, Shibata S, Wang TL, Yokota K, Larsen K, Kanamori N, Madsen E, Radutoiu S, Madsen LH, Radu TG, Krusell L, Ooki Y, Banba M, Betti M, Rispail N, Skøt L, Tuck E, Perry J, Yoshida S, Vickers K, Pike J, Mulder L, Charpentier M, Müller J, Ohtomo R, Kojima T, Ando S, Marquez AJ, Gresshoff PM, Harada K, Webb J, Hata S, Suganuma N, Kouchi H, Kawasaki S, Tabata S, Hayashi M, Parniske M, Szczyglowski K, Kawaguchi M, Stougaard J. 2006. Genetics of symbiosis in *Lotus japonicus*: recombinant inbred lines, comparative genetic maps, and map position of 35 symbiotic loci. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 80-91.

Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Kato T, Nakao M, Sasamoto S, Watanabe A, Ono A, Kawashima K, Fujishiro T, Katoh M, Kohara M, Kishida Y, Minami C, Nakayama S, Nakazaki N, Shimizu Y, Shinpo S, Takahashi C, Wada T, Yamada M, Ohmido N, Hayashi M, Fukui K, Baba T, Nakamichi T, Mori H, Tabata S. 2008. Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res* 15: 227-239.

Schmid FX. 1993. Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22: 123-142.

Scholz C, Rahfeld J, Fischer G, Schmid FX. 1997. Catalysis of protein folding by parvulin. *J Mol Biol* 273: 752-762.

Schreiber SL. 1991. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251: 283-287.

Schubert M, Petersson UA, Haas BJ, Funk C, Schroder WP, Kieselbach T. 2002. Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277: 8354-8365.

Sekerina E, Rahfeld JU, Muller J, Fanghanel J, Rascher C, Fischer G, Bayer P. 2000. NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl cis/trans isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein. *J Mol Biol* 301: 1003-1017.

Shapiguzov A, Edvardsson A, Vener AV. 2006. Profound redox sensitivity of peptidyl-prolyl isomerase activity in *Arabidopsis* thylakoid lumen. *FEBS Lett* 580: 3671-3676.

- Siepe D, Jentsch S.** 2009. Prolyl isomerase Pin1 acts as a switch to control the degree of substrate ubiquitylation. *Nat Cell Biol* 11: 967-972.
- Simon-Rosin U, Wood C, Udvardi MK.** 2003. Molecular and cellular characterisation of LjAMT2;1, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Mol Biol* 51: 99-108.
- Singh N, Ma Z, Gemmill T, Wu X, Defiglio H, Rossetini A, Rabeler C, Beane O, Morse RH, Palumbo MJ, Hanes SD.** 2009. The Ess1 prolyl isomerase is required for transcription termination of small noncoding RNAs via the Nrd1 pathway. *Mol Cell* 36: 255-266.
- Sirpio S, Holmstrom M, Battchikova N, Aro EM.** 2009. AtCYP20-2 is an auxiliary protein of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *FEBS Lett* 583: 2355-2358.
- Smil V.** 1999. Nitrogen in crop production: An account of global flows. *GLOBAL BIOGEOCHEMICAL CYCLES* 13: 647-662.
- Smith MR, Willmann MR, Wu G, Berardini TZ, Moller B, Weijers D, Poethig RS.** 2009. Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5424-5429.
- Smyczynski C, Roudier F, Gissot L, Vaillant E, Grandjean O, Morin H, Masson T, Bellec Y, Geelen D, Faure JD.** 2006. The C terminus of the immunophilin PASTICCINO1 is required for plant development and for interaction with a NAC-like transcription factor. *J Biol Chem* 281: 25475-25484.
- Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A.** 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 6: 175-182.
- Sorbo BH.** 1957. Enzymic transfer of sulfur from mercaptopyruvate to sulfite or sulfinates. *Biochem Biophys Acta* 24: 324-329.
- Sorrentino G, Mioni M, Giorgi C, Ruggeri N, Pinton P, Moll U, Mantovani F, Del Sal G.** 2013. The prolyl-isomerase Pin1 activates the mitochondrial death program of p53. *Cell Death Differ* 20:198-208.
- Stougaard J.** 1996. *Agrobacterium rhizogenes* as a Vector for Transforming Higher Plants. Pages 49-61 in Jones H, ed. *Plant Gene Transfer and Expression Protocols*, vol. 49. New York: Springer.
- Stymest KH, Klappa P.** 2008. The periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases PpiD and SurA have partially overlapping substrate specificities. *FEBS J* 275: 3470-3479.
- Sudol M.** 1996. Structure and function of the WW domain. *Prog Biophys Mol Biol* 65: 113-132.
- Suizu F, Ryo A, Wulf G, Lim J, Lu KP.** 2006. Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis. *Mol Cell Biol* 26: 1463-1479.
- Sullivan JT, Ronson CW.** 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5145-5149.

- Surmacz TA, Bayer E, Rahfeld JU, Fischer G, Bayer P.** 2002. The N-terminal basic domain of human parvulin hPar14 is responsible for the entry to the nucleus and high-affinity DNA-binding. *J Mol Biol* 321: 235-247.
- Sydenham M, Douce G, Bowe F, Ahmed S, Chatfield S, Dougan G.** 2000. Salmonella enterica serovar typhimurium surA mutants are attenuated and effective live oral vaccines. *Infect Immun* 68: 1109-1115.
- Szep S, Park S, Boder ET, Van Duyne GD, Saven JG.** 2009. Structural coupling between FKBP12 and buried water. *Proteins* 74: 603-611.
- Takanashi K, Takahashi H, Sakurai N, Sugiyama A, Suzuki H, Shibata D, Nakazono M, Yazaki K.** 2012. Tissue-specific transcriptome analysis in nodules of Lotus japonicus. *Mol Plant Microbe Interact* 25: 869-76.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
- Taylor BL, Zhulin IB.** 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 479-506.
- Terada T, Shirouzu M, Fukumori Y, Fujimori F, Ito Y, Kigawa T, Yokoyama S, Uchida T.** 2001. Solution structure of the human parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase, hPar14. *J Mol Biol* 305: 917-926.
- Thiele A, Krentzlin K, Erdmann F, Rauh D, Hause G, Zerweck J, Kilka S, Pösel S, Fischer G, Schutkowski M, Weiwad M.** 2011. Parvulin 17 promotes microtubule assembly by its peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity. *J Mol Biol* 411: 896-909.
- Tormo A, Almiron M, Kolter R.** 1990. surA, an Escherichia coli gene essential for survival in stationary phase. *J Bacteriol* 172: 4339-4347.
- Trupkin SA, Mora-Garcia S, Casal JJ.** 2012. The cyclophilin ROC1 links phytochrome and cryptochrome to brassinosteroid sensitivity. *Plant J* 71: 712-723.
- Uchida T, Fujimori F, Tradler T, Fischer G, Rahfeld JU.** 1999. Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase. *FEBS Lett* 446: 278-282.
- Uchida T, Takamiya M, Takahashi M, Miyashita H, Ikeda H, Terada T, Matsuo Y, Shirouzu M, Yokoyama S, Fujimori F, Hunter T.** 2003. Pin1 and Par14 peptidyl prolyl isomerase inhibitors block cell proliferation. *Chem Biol* 10: 15-24.
- Udvardi MK, Day DA.** 1997. Metabolite Transport across Symbiotic Membranes of Legume Nodules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 493-523.
- Urbanski DF, Malolepszy A, Stougaard J, Andersen SU.** 2012. Genome-wide LORE1 retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in Lotus japonicus. *Plant J* 69: 731-741.

- van Drogen F, Sangfelt O, Malyukova A, Matskova L, Yeh E, Means AR, Reed SI.** 2006. Ubiquitylation of cyclin E requires the sequential function of SCF complexes containing distinct hCdc4 isoforms. *Mol Cell* 23: 37-48.
- Vandewiel C, Scheres B, Franssen H, Vanlierop MJ, Vanlammeren A, Vankammen A, Bisseling T.** 1990. The Early Nodulin Transcript Enod2 Is Located in the Nodule Parenchyma (Inner Cortex) of Pea and Soybean Root-Nodules. *Embo Journal* 9: 1-7.
- Vaseva AV, Moll UM.** 2009. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta* 1787: 414-420.
- Vittorioso P, Cowling R, Faure JD, Caboche M, Bellini C.** 1998. Mutation in the Arabidopsis PASTICCINO1 gene, which encodes a new FK506-binding protein-like protein, has a dramatic effect on plant development. *Mol Cell Biol* 18: 3034-3043.
- Wang P, Heitman J.** 2005. The cyclophilins. *Genome Biol* 6: 226.
- Wang Y, Liu C, Yang D, Yu H, Liou YC.** 2010. Pin1At encoding a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase regulates flowering time in Arabidopsis. *Mol Cell* 37: 112-122.
- Weininger U, Jakob RP, Kovermann M, Balbach J, Schmid FX.** 2010. The prolyl isomerase domain of PpiD from Escherichia coli shows a parvulin fold but is devoid of catalytic activity. *Protein Sci* 19: 6-18.
- Weisman R, Creanor J, Fantes P.** 1996. A multicopy suppressor of a cell cycle defect in *S. pombe* encodes a heat shock-inducible 40 kDa cyclophilin-like protein. *EMBO J* 15: 447-456.
- Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, Lee SW, Niu T, Petkova V, Lu KP.** 2001. Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO J* 20: 3459-3472.
- Xu X, Wang S, Hu YX, McKay DB.** 2007a. The periplasmic bacterial molecular chaperone SurA adapts its structure to bind peptides in different conformations to assert a sequence preference for aromatic residues. *J Mol Biol* 373: 367-381.
- Xu YX, Manley JL.** 2007b. The prolyl isomerase Pin1 functions in mitotic chromosome condensation. *Mol Cell* 26: 287-300.
- Yaffe MB, Schutkowski M, Shen M, Zhou XZ, Stukenberg PT, Rahfeld JU, Xu J, Kuang J, Kirschner MW, Fischer G, Cantley LC, Lu KP.** 1997. Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* 278: 1957-1960.
- Yan N.** 2013. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem Sci* 38: 151-159.
- Yao JL, Kops O, Lu PJ, Lu KP.** 2001. Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants. *J Biol Chem* 276: 13517-13523.
- Yeh E, Cunningham M, Arnold H, Chasse D, Monteith T, Ivaldi G, Hahn WC, Stukenberg PT, Shenolikar S, Uchida T, Counter CM, Nevins JR, Means AR, Sears R.** 2004. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol* 6: 308-318.

- Yeh ES, Means AR.** 2007. PIN1, the cell cycle and cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 381-388.
- Yu H, Xu Y, Tan EL, Kumar PP.** 2002. AGAMOUS-LIKE 24, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16336-16341.
- Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M, Foster LJ, Brinkman FS.** 2010. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26: 1608-1615.
- Yu Y, Zhang H, Li W, Mu C, Zhang F, Wang L, Meng Z.** 2012. Genome-wide analysis and environmental response profiling of the FK506-binding protein gene family in maize (*Zea mays* L.). *Gene* 498: 212-222.
- Yu Y, Li Y, Huang G, Meng Z, Zhang D, Wei J, Yan K, Zheng C, Zhang L.** 2011. PwHAP5, a CCAAT-binding transcription factor, interacts with PwFKBP12 and plays a role in pollen tube growth orientation in *Picea wilsonii*. *J Exp Bot* 62: 4805-4817.
- Zacchi P, Gostissa M, Uchida T, Salvagno C, Avolio F, Volinia S, Ronai Z, Blandino G, Schneider C, Del Sal G.** 2002. The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* 419: 853-857.
- Zhao Y, Ke H.** 1996. Mechanistic implication of crystal structures of the cyclophilin-dipeptide complexes. *Biochemistry* 35: 7362-7368.
- Zheng H, You H, Zhou XZ, Murray SA, Uchida T, Wulf G, Gu L, Tang X, Lu KP, Xiao ZX.** 2002. The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* 419: 849-853.
- Zhou XZ, Kops O, Werner A, Lu PJ, Shen M, Stoller G, Kullertz G, Stark M, Fischer G, Lu KP.** 2000. Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* 6: 873-883.
- Zita MM, Marchionni I, Bottos E, Righi M, Del Sal G, Cherubini E, Zacchi P.** 2007. Post-phosphorylation prolyl isomerisation of gephyrin represents a mechanism to modulate glycine receptors function. *EMBO J* 26: 1761-1771.
- Zobel RW.** 1973. Some Physiological Characteristics of the Ethylene-requiring Tomato Mutant Diageotropica. *Plant Physiol* 52: 385-389.
- Κουρή ΕΔ. 2006.** Μοριακός και Βιοχημικός Χαρακτηρισμός των Παρβουλινών του *Lotus japonicus*. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Λαμπίρη Β. 2008.** Βιοχημικός και Μοριακός Χαρακτηρισμός των Πέπτιδυλ Προλυλ cis/trans ισομερασών του *Mesorhizobium loti*. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΣΤ. Παράρτημα

ΣΤ.1. Γονότυποι μικροοργανισμών.

Οι γονότυποι των στελεχών *E. coli* είναι οι:

XL1 Blue: endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK⁻ mK⁺)

DH5α: F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d^{lacZ}ΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK⁻ mK⁺), λ⁻

DB3.1: F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δleu mtl1

M15[ρREP4]: nals, str^s, rifs, thi⁻, lac⁻, ara⁺, gal⁺, mtlⁱ, F⁻, recA⁺, uvr⁺, lon⁺.

Ο γονότυπος του στελέχους *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 που χρησιμοποιήθηκε για το μετασηματισμό του *L. japonicus* είναι: EHA101 ρTiBo542(delta)T-region Mor⁺ recA::bla ρTiBo542(delta)T Mor⁺ CbR.

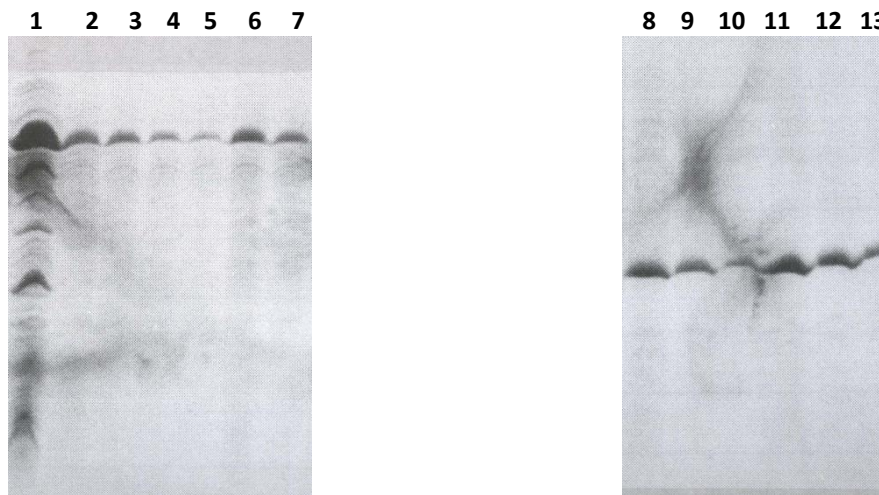
Οι γονότυποι των στελεχών *S. cerevisiae* είναι οι:

AH109: MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 : : GAL1UAS-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2UAS-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 : : MEL1UAS-MEL1_{TATA}-lacZ

SG335: MATa trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ

ΣΤ.2. Ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμίδης της ανασυνδυασμένης *MIPar1* με σκοπό των εντοπισμό πρωτεϊνών με τις οποίες πιθανά αλληλεπιδρά.

Πριν την ανάλυση των εκλούσεων με με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (LC-MS-MS) οι χειρισμοί για τον εντοπισμό πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με την *MIPar1* του *M. loti* αναλύθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).



Εικόνα ΣΤ.1: Ανάλυση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%(w/v) της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *MIPar1* και των διαλυτών πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με αυτήν από το ριζόβιο *M. loti* σε συγκέντρωση NaCl 50 mM . Στήλη 1: ολικές διαλυτές πρωτεΐνες από κύτταρα *M. loti*. Στήλες 2, 3: κλάσμα έκλουσης GST-*MIPar1* 50 mM NaCl απουσία και παρουσία ATP αντίστοιχα. Στήλες 4, 5: κλάσμα έκλουσης GST-*MIPar1* 100 mM NaCl απουσία και παρουσία ATP αντίστοιχα. Στήλες 6, 7: κλάσμα έκλουσης GST-*MIPar1* 200 mM NaCl απουσία και παρουσία ATP αντίστοιχα. Στήλες 8, 9: κλάσμα έκλουσης GST 50 mM NaCl απουσία και παρουσία ATP αντίστοιχα. Στήλες 10, 11: κλάσμα έκλουσης GST 100 mM NaCl απουσία και παρουσία ATP αντίστοιχα. Στήλες 12, 13: κλάσμα έκλουσης GST 200 mM NaCl απουσία και παρουσία ATP αντίστοιχα.

