

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ



ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΛΕΦΚΟΤΗΕΑ
ΑΠΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΒΟΞΥ-
ΤΕΛΙΚΟΥ ΑΚΡΟΥ



ΝΤΟΥΤΣΟΥΛΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ,
Επιβλέπον Καθηγητής
Σταμάτης Ρήγας
ΑΘΗΝΑ 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΛΕΦΚΟΤΗΕΑ
ΑΠΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΒΟΞΥ-
ΤΕΛΙΚΟΥ ΑΚΡΟΥ

ΝΤΟΥΤΣΟΥΛΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ,
Επιβλέπον Καθηγήτριας
Σταμάτης Ρήγας
ΑΘΗΝΑ 2018

Η ανάθεση της παρούσας πτυχιακής μελέτης έγινε με ΓΣ του τμήματος Βιοτεχνολογίας στις 27/11/2017, κατά την οποία εγκρίθηκε το θέμα και η Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική επιτροπή της μελέτης

Τύπος εργασίας: Μεταπτυχιακή διατριβή

**Τίτλος εργασίας: Λειτουργία της πρωτεΐνης LEFKOTHEA
απουσία του καρβόξυ-τελικού άκρου**

Ονοματεπώνυμο φοιτήτριας: Αικατερίνη Ντούτσουλη

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Σταμάτης Ρήγας, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής (Μέλος)

Άννα Κούρτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Μέλος)

Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο που μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και τη βοήθεια ώστε αυτή να αξιοποιηθεί όσο το δυνατόν πιο ποιοτικά. Στην συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο μου, Επ. Καθ. Σταμάτη Ρήγα, για την αποδοχή μου στην ομάδα του και για τη διαρκή καθοδήγηση και εμπιστοσύνη του καθ' όλη αυτή πορεία. Επιπλέον θα ήθελα να αποδώσω ιδιαίτερες ευχαριστίες στους μεταδιδακτορικούς ερευνητές Τάσο Αλατζά και Γεράσιμο Δάρα για την πολύτιμη βοήθειά τους, τον εμπλουτισμό των γνώσεων μου και τις συμβουλές τους, που διαμόρφωσαν τον τρόπο σκέψης μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, το εργαστηριακό προσωπικό και τους καθηγητές για την βοήθεια και τις συμβουλές που μου προσέφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αγάπη, την φροντίδα και την στήριξη που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Μια από τις απαραίτητες διαδικασίες για την λειτουργία του κυττάρου είναι η σωστή κατανομή των πρωτεϊνών στα διάφορα οργανίδια. Για τον σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί εξειδικευμένοι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι διάφορες πρωτεΐνες, μετά την μετάφρασή τους, τοποθετούνται σε ένα ή περισσότερα οργανίδια στα οποία απαιτούνται. Μία τέτοια πρωτεΐνη είναι η LEFKOTHEA, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο At5g62990 του *Arabidopsis thaliana*. Η LEFKOTHEA τοποθετείται τόσο στον πυρήνα όσο και στον χλωροπλάστη και η λειτουργία της είναι απαραίτητη στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης. Η αμινοξική της ακολουθία περιλαμβάνει ένα πεπτίδιο συνθήματος για στόχευση στον χλωροπλάστη, σινιάλα εισόδου και εξόδου από τον πυρήνα καθώς και μία περιοχή πρόσδεσης στο RNA. Μία μετάλλαξη που οδηγεί σε υποκατάσταση της γλυκίνης στη θέση 373 από ασπαρτικό οξύ έχει ως αποτέλεσμα την διατάραξη της κατανομής της πρωτεΐνης στον πυρήνα και δίνει φυτά με χαρακτηριστικές λευκές κοτυλιδόνες. Ο φαινότυπος αυτός αποκαθίσταται με μετασχηματισμό των φυτών με γονιδιακή κατασκευή της LEFKOTHEA από την οποία απουσιάζει το πεπτίδιο συνθήματος για τον χλωροπλάστη. Ανοσοανίχνευση με το κατάλληλο αντίσωμα σε παροδικά μετασχηματισμένα φύλλα καπνού με την συγκεκριμένη γονιδιακή κατασκευή, έδειξε πως η πρωτεΐνη παρουσιάζει πολλαπλές ζώνες στο gel ηλεκτροφόρησης, το οποίο πιθανόν να οφείλεται με την ύπαρξη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Για τη διερεύνηση της πιθανής παρουσίας μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στην πρωτεΐνη LEFKOTHEA η έρευνα επικεντρώθηκε στο καρβοξυτελικό της άκρο, όπου με τη βοήθεια βιοπληροφορικής ανάλυσης βρέθηκε μία ομαδοποίηση σερινών που εμφανίζουν υψηλή πιθανότητα φωσφορυλίωσης. Δημιουργήθηκε μία γονιδιακή κατασκευή από την οποία απουσιάζει τόσο το πεπτίδιο στόχευσης στον χλωροπλάστη, όσο και ολόκληρο το καρβοξυτελικό άκρο. Ανοσοανίχνευση με το κατάλληλο αντίσωμα σε παροδικά μετασχηματισμένα φύλλα καπνού με την συγκεκριμένη γονιδιακή κατασκευή έδειξε πως όταν απουσιάζει το καρβοξυτελικό άκρο η πρωτεΐνη εμφανίζεται ως μία μόνο ζώνη, ενώ παρουσία του καρβοξυτελικού άκρου εμφανίζονται δύο επιπλέον ζώνες με ελαφρά αυξημένο μοριακό βάρος. Μικροσκοπία φθορισμού έδειξε πως απουσία του καρβοξυτελικού άκρου η πρωτεΐνη εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνισκο, ενώ κατά την παρουσία του εντοπίζεται σε στικτές περιοχές του πυρήνα. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως το καρβοξυτελικό άκρο παίζει ρόλο στην τοποθέτηση της πρωτεΐνης σε συγκεκριμένες περιοχές του πυρήνα.

Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της λειτουργίας της πρωτεΐνης LEFKOTHEA που δεν διαθέτει το καρβοξυτελικό άκρο. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε μόνιμος μετασχηματισμός σε μεταλλάγματα *lefko2* με την συγκεκριμένη γονιδιακή κατασκευή. Στην T3 γενεά των διαγονιδιακών φυτών πραγματοποιήθηκε συλλογή δυο καθαρών γονιδιακών σειρών #3-1 και #1-4. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των συγκεκριμένων σειρών με φυτά αγρίου τύπου, μεταλλάγματος *lefko2* και διαγονιδιακών φυτών 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνεται πως τα φυτά 35S::(Δ TP)lefko Δ C-FLAG παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο ανάπτυξης ως προς το μήκος της ρίζας και την περιεκτικότητα των φυτών σε φωτοσυνθετικές ουσίες, τόσο με το μετάλλαγμα *lefko2* όσο και με φυτά 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag και αγρίου τύπου.

Λέξεις κλειδιά: Καρβόξυ-τελικό άκρο, Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, LEFKOTHEA, Ενδοπυρηνική κατανομή πρωτεϊνών

Abstract

One of the important processes of cell function is the proper protein distribution in various organelles. For this reason, specific mechanisms have been developed via of which various proteins, after their translation, are placed in one or more organelles of which they are demanded. LEFKOTHEA is one of these proteins and is encoded by the At5g62990 gene of *Arabidopsis thaliana*. LEFKOTHEA is placed both in nucleus and chloroplast and its function is necessary in the first steps of embryogenesis. The amino acid sequence includes a peptide signal for targeting in chloroplast, signals for localization and export from nucleus and an RNA binding region. A mutation which causes the substitution of glycine 373 by aspartic acid has as consequence the disturbance of protein distribution in nucleus and the formation of white cotyledons in plants. This phenotype is restored in plants transformed with a gene structure of LEFKOTHEA missing the peptide signal for chloroplast. Immunodetection with the proper antibody in transient transformed tobacco's leaves with this gene structure has shown that the protein presents multiple bands in the electrophoretic gel, which are probably related to posttranslational modification. In order to investigate the presence of possible posttranslational modification in protein LEFKOTHEA the research was focused on the carboxyl- terminus end, where bioinformatics analysis that showed a group of serines with high possibility of phosphorylation. A gene structure has been created, missing both the peptide signal for chloroplast and the whole C-terminus. Immunodetection with the proper antibody in transient transformed tobacco's leaves with the certain gene structure has shown that in the absence of carboxyl- terminus end the protein shows one band, while in the presence of carboxyl- terminus end shows two more bands with a slightly higher molecular weight. Fluorescence microscopy in transient transformed tobacco's leaves with this gene structure has shown that in the absence of carboxyl- terminus end the protein is localized mostly in nucleolus, while in the presence of carboxyl- terminus end protein localized in spotted regions of nuclear. This results in conclusion that carboxyl- terminus end has a major role in the placement of the protein in specific regions of the nucleus. The aim of this work was the study the function of protein LEFKOTHEA which lack of carboxyl- terminus end. To accomplish this task, steady transformation in mutans *lefko2* with this gene structure was performed. At the T3 generation of these-transgenic plants, a selection of two pure genetic lines #3-1 και #1-4 was been accomplished. Afterward, the phenotype of these genetic lines was compared with wild type plants, mutans *lefko2* and transgenic plants with gene structure 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag. From the following results, it seems that the 35S::(Δ TP)lefko Δ C-Flag plants show different growth pattern in root

length and plant content in photosynthetic pigments, compared both to mutant *lefko2* and 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag and wild-type plants.

Keywords: Carboxyl-terminus, Posttranslational modifications, LEFKOTHEA, endonuclear allocation of proteins

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract	6
Εισαγωγή.....	10
1.1 Δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης LEFKOTHEA	11
1.2 Μεταλλάξεις του γονιδίου LEFKOTHEA.....	12
1.2.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του αλληλομόρφου <i>lefkothea1</i>	12
1.2.2 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του μεταλλάγματος <i>lefkothea2</i>	13
1.2 Στόχευση της πρωτεΐνης LEFKOTHEA στον πυρήνα και μεταβολή της κινητικότητάς της.....	15
1.3 Προσδιορισμός Μετα-Μεταφραστικών Τροποποιήσεων στην πρωτεΐνη LEFKOTHEA.....	17
1.4 Επίδραση του καρβοξυτελικού άκρου στην τοποθέτηση της πρωτεΐνης LEFKOTHEA.....	19
1.5 Σκοπός.....	22
2 Υλικά & Μέθοδοι	23
2.1 Φυτικό Υλικό	24
2.1.1 Συνθήκες ανάπτυξης φυτικού υλικού	24
2.2 Μετασχηματισμός <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.2.1 Μέθοδος διείσδυσης με εφαρμογή κενού σε φυτά <i>A. thaliana</i>	25
2.2.2 Επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών της T1 γενιάς.....	27
2.4 Μορφομετρική Ανάλυση - Προγράμματα Επεξεργασίας Εικόνας.....	28
2.4.1 Συνθήκες φωτογράφισης	28
2.4.2 Πρόγραμμα Image J	28
2.5 Προσδιορισμός φωτοσυνθετικών ουσιών.....	29
Αποτελέσματα	30
3.1 Μελέτη μόνιμα μετασχηματισμένων φυτών.....	31
3.1.1 Επιλογή μετασχηματισμένων φυτών T1 γενιάς.....	31
3.1.2 Συλλογή μετασχηματισμένων φυτών T2 γενιάς	31
3.1.3 Συλλογή μετασχηματισμένων φυτών T3 γενιάς	32

3.2. Φαινοτυπικές αναλύσεις.....	34
3.2.1 Προσδιορισμός της ανάπτυξης πρωτογενούς ρίζας	34
3.2.2 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας φωτοσυνθετικών ουσιών	36
4 Συζήτηση	39
4.1 Ομοιότητα της πρωτεΐνης LEFKOTHEA στον πυρηνικό χώρο.....	40
4.2 Συσχέτιση της ενδοπυρηνικής κατανομής της πρωτεΐνης και της ανάπτυξης των φυτών	41
5 Βιβλιογραφία.....	42

Εισαγωγή

1.1 Δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης LEFKOTHEA

Μία από τις απαραίτητες διαδικασίες για την λειτουργία του κυττάρου είναι η σωστή τοποθέτηση και κατανομή των πρωτεϊνών στο εσωτερικό τους. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα πολλές πρωτεΐνες που δρουν στα διάφορα οργανίδια, όπως είναι οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια, κωδικοποιούνται από γονίδια που υπάρχουν στον πυρήνα, μεταφράζονται στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια τοποθετούνται στα αντίστοιχα οργανίδια. Ένα τέτοιο παράδειγμα δυαδικής στόχευσης αποτελεί η πρωτεΐνη LEFKOTHEA, η οποία είναι απαραίτητη κατά την εμβρυογένεση στο φυτό *Arabidopsis thaliana*.



Εικόνα 1.1. Η δομή της πρωτεΐνης LEFKOTHEA. Η ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας της πρωτεΐνης LEFKOTHEA αποκάλυψε μία περιοχή PORR που προσδίδει ικανότητα πρόσδεσης στο RNA, ένα πεπτίδιο συνθήματος για στόχευση στον χλωροπλάστη (TP) και μοτίβα εισόδου στον πυρήνα (NLS) και εξόδου από τον πυρήνα (NES)

Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα βιοπληροφορικά μέσα και τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές, έδειξε πως η πρωτεΐνη LEFKOTHEA που εκφράζεται από το γονίδιο At5g62990 αποτελείται από τρία κύρια μέρη (Εικόνα 1.1):

- το αμινοτελικό άκρο (N-Domain), το οποίο εκτείνεται μέχρι και το εξηκοστό αμινοξύ και αποτελεί το πεπτίδιο συνθήματος (Transit Peptide - TP) για την τοποθέτηση της στον χλωροπλάστη
- το κεντρικό τμήμα της LEFKOTHEA (61-379aa), που αποτελεί την περιοχή PORR (Plant Organellar RNA Recognition). Αυτή η περιοχή, με τη παλαιότερη ονομασία Domain of Unknown Function 860 (DUF860), ταυτοποιήθηκε ως το τμήμα εκείνο της πρωτεΐνης που προσδένεται στο RNA. Οι πρωτεΐνες με δομή PORR αποτελούν μία μικρή οικογένεια, τα μέλη της οποίας έχει βρεθεί πως συμμετέχουν στο μάτισμα ιντρονίων τύπου II του χλωροπλάστη, όπως το WTF1 (Kroeger et al., 2009) και του μιτοχονδρίου, όπως το WTF9 (Francs-Small et al., 2012).

- το τρίτο και τελευταίο της τμήμα της πρωτεΐνης είναι το καρβοξυτελικό της άκρο, που περιλαμβάνει 114 αμινοξέα και η λειτουργία του οποίου δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό όμως της πρωτεΐνης LEFKOTHEA είναι ότι διαθέτει μοτίβα εισόδου στον πυρήνα (Nuclear Localization Sequence-NLS) και εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Signal-NES), γεγονός που υποδηλώνει τοποθέτηση και πιθανή λειτουργία και στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου.

1.2 Μεταλλάξεις του γονιδίου LEFKOTHEA

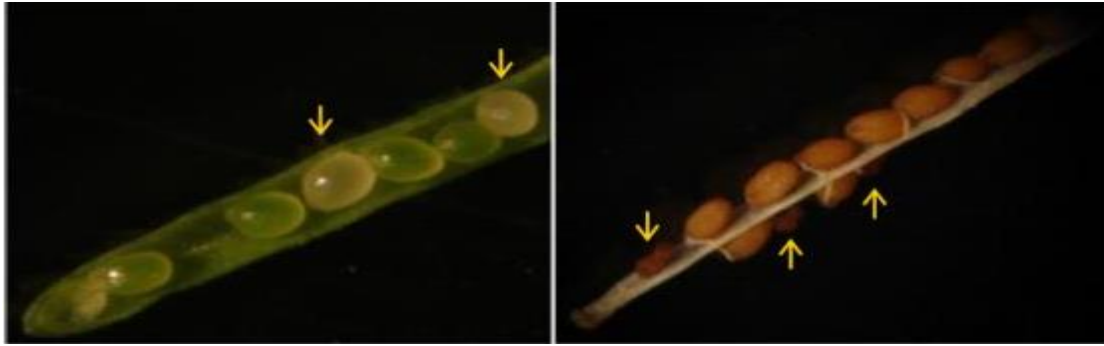
1.2.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του αλληλομόρφου *lefkothea1*

Βιοπληροφορική αναζήτηση οδήγησε στον εντοπισμό του αλληλόμορφου *lefkothea 1* (*lefkol*), που οφείλεται σε T-DNA ένθεση στο γονίδιο At5g62990, ανωφερικά 30bp του κωδικονίου έναρξης (Εικόνα 1.2). Αποτέλεσμα αυτής της ένθεσης είναι η παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης, γεγονός που οδηγεί σε θνησιμότητα στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης (embryo lethality).



Εικόνα 1.2. Απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης LEFKOTHEA και οι θέσεις των μεταλλάξεων που φέρει.

Έπειτα από εκτενή παρατήρηση των καρποταξιών του *lefkol*, επιβεβαιώθηκε Μενδελιανή διάχυση του θνησιγόνου σε κατάσταση ομοζυγωτίας. Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη των ομόζυγων για την ένθεση T-DNA εμβρύων σταματούσε στο καρδιάσχημο στάδιο, ενώ τα ετερόζυγα έμβρυα ολοκλήρωναν κανονικά την ανάπτυξή τους. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά εμβρύων ομόζυγων για τον αλληλόμορφο *lefkol* φαίνονται στην Εικόνα 1.3.



Εικόνα 1.3. Καρποταξίες διαφόρων σταδίων ετερόζυγων ως προς την ένθεση φυτών *lefko1*, όπου με βέλη σημειώνονται τα ομοζυγωτά ως προς την ένθεση σπέρματα (συρρικνωμένα).

1.2.2 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του μεταλλάγματος *lefkothea2*

Μια επιπλέον μετάλλαξη του γονιδίου αποτελεί το μετάλλαγμα *lefkothea2* (*lefko2*). Το μετάλλαγμα αυτό προήλθε από χημική μεταλλαξογένεση με EMS (Ethane Methane Sulfonate), η οποία προκάλεσε την αλλαγή της αζωτούχου βάσης G στη θέση 1188bp ανωφερικά του κωδικονίου έναρξης σε A, με αποτέλεσμα την αμινοξική υποκατάσταση της γλυκίνης (G) στην θέση 373 σε ασπαρτικό οξύ (D) (Εικόνα 1.2). Σε αντίθεση με τη μετάλλαξη με ένθεση T-DNA (*emb1692*) στο ίδιο γονίδιο, που είναι θνησιγενής στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης, το μετάλλαγμα *lefko2* δίνει σπέρματα, τα οποία μόλις βλαστήσουν παρουσιάζουν ανωμαλίες στα εμβρυακής προέλευσης όργανα.

Συγκεκριμένα, το μετάλλαγμα *lefko2* παρουσιάζει έναν ιδιαίτερο φαινότυπο ο οποίος χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση λευκών κοτυληδόνων και κοντής πρωτογενούς ρίζας (Εικόνα 1.4). Παρόλο που οι κοτυληδόνες του μεταλλάγματος έχουν λευκό χρώμα, τα φύλλα του φυτού που αναπτύσσονται στη συνέχεια εμφανίζουν φυσιολογικό, πράσινο χρώμα. Επίσης, παρατηρήθηκαν μορφολογικές αλλοιώσεις των χλωροπλαστών σε κύτταρα κοτυληδόνων φυτών *lefko2*, όπως ο μη φακοειδής σχηματισμός και η μη οργανωμένη δομή των θυλακοειδών. Οι παρατηρήσεις αυτές φανερώνουν πως η μετάλλαξη *lefko2* επηρεάζει άμεσα την μορφογένεση των ιστών εμβρυακής προέλευσης.

Βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε πως στη μετάλλαξη *lefko2*, όπου το αμινοξύ γλυκίνη στη θέση 373 έχει μετατραπεί σε ασπαρτικό οξύ (G₃₇₃->D), η τιμή της πιθανότητας για λειτουργικό σινιάλο εξαγωγής από τον πυρήνα NES

αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με την τιμή που προκύπτει όταν στη θέση βρίσκεται το αμινοξύ γλυκίνη. Συνεπώς, η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης LEFKOTHEA έχει μεγαλύτερη δυναμική να εξέρχεται από τον πυρήνα σε σχέση με την φυσιολογική πρωτεΐνη, πιθανόν χωρίς να έχει ολοκληρώσει τη λειτουργία της εκεί. Αυτό το γεγονός, ότι διαταράσσεται η ομοιόσταση της LEFKOTHEA στον πυρήνα, πιθανόν να οδηγεί στην εμφάνιση του φαινοτύπου του μεταλλάγματος *lefko2*.



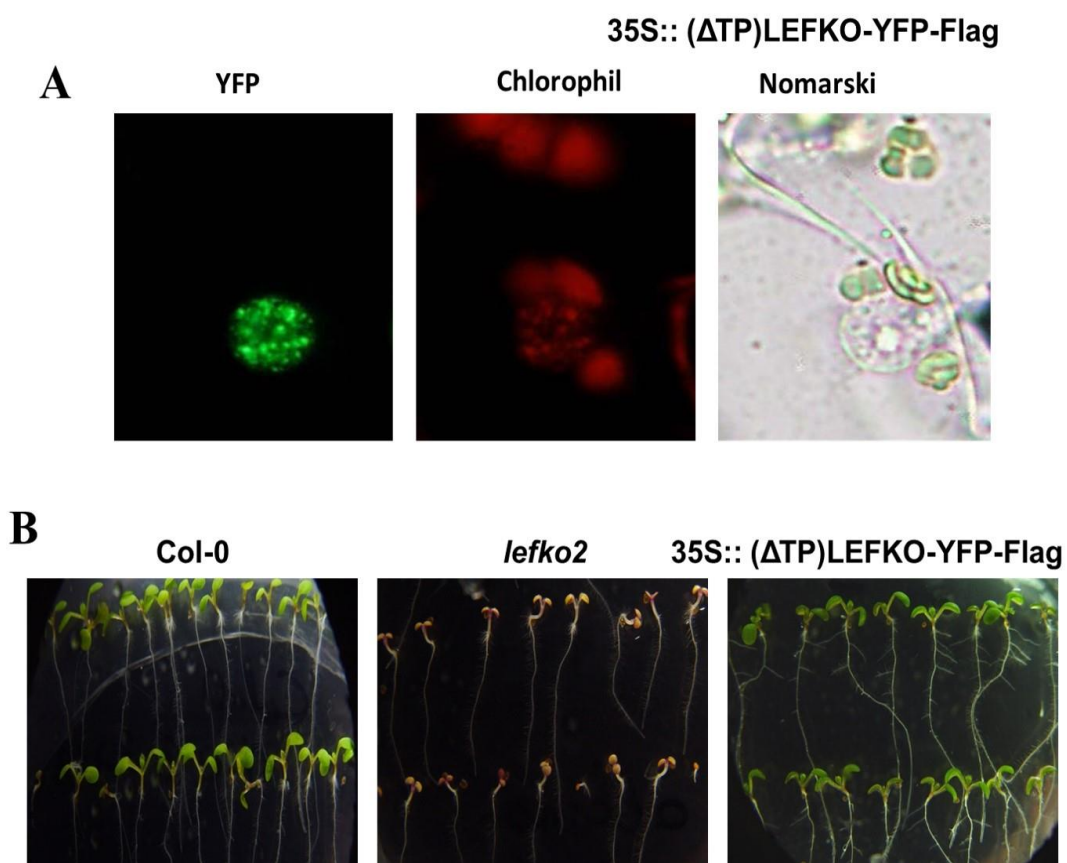
Col-0 ***lefko2***

Εικόνα 1.4. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του μεταλλάγματος *lefko2* σε σύγκριση με φυτό αγρίου τύπου (σπορόφυτα ηλικίας 5 ημερών)

1.2 Στόχευση της πρωτεΐνης LEFKOTHEA στον πυρήνα και μεταβολή της κινητικότητάς της

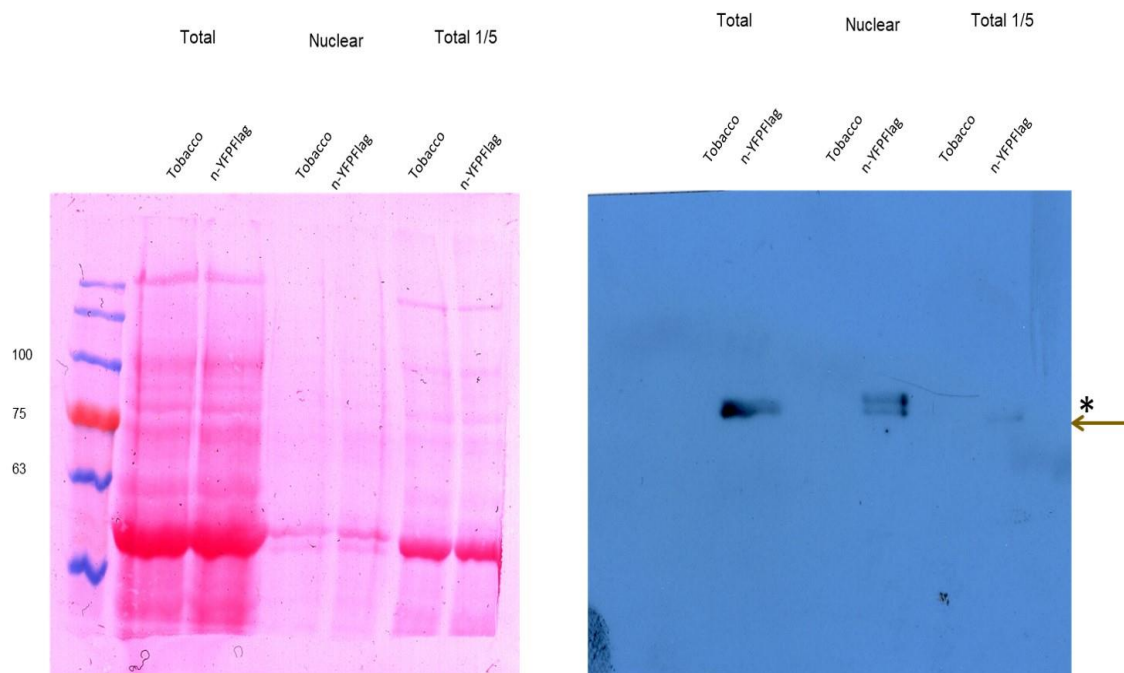
Παρόλο που η πρωτεΐνη LEFKOTHEA διαθέτει λειτουργικά μοτίβα NLS και NES, ο εντοπισμός της στον πυρήνα του κυττάρου δεν κατέστη δυνατός ούτε σε σταθερά μετασχηματισμένα φυτά *Arabidopsis*, αλλά ούτε και σε παροδικά μετασχηματισμένα φύλλα καπνού (παρά μόνο με τη χρήση λεπτομυκίνης B, μίας ουσίας που αναστέλλει την έξοδο πρωτεϊνών από τον πυρήνα, σε πρωτοπλάστες από παροδικά μετασχηματισμένα φύλλα καπνού).

Αντίθετα, έπειτα από παροδικό μετασχηματισμό φύλλων καπνού με την γονιδιακή κατασκευή 35S::(Δ TP)Lefko-YFP-Flag, από την οποία απουσιάζει του πεπτίδιο συνθήματος για την στόχευση στον χλωροπλάστη, το σήμα της πρωτεΐνης εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα, και ειδικότερα σε στικτές περιοχές του πυρήνα (Εικόνα 1.5A). Έπειτα από μόνιμο μετασχηματισμό φυτών του μεταλλάγματος *lefko2* με την ίδια κατασκευή παρατηρήθηκε σχεδόν ολική επαναφορά του φαινοτύπου των φυτών αγρίου τύπου (Εικόνα 1.5B).



Εικόνα 1.5. Υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης LEFKOTHEA στο πυρήνα. Α. Παροδικός μετασχηματισμός *N. benthamiana* με την κατασκευή 35S::(Δ TP)lefkoy-YFP-Flag Β. Μόνιμος μετασχηματισμός φυτών του μεταλλάγματος *lefko2* με την κατασκευή 35S::(Δ TP)lefkoy-YFP-Flag

Ανοσοανίχνευση κατά Western που πραγματοποιήθηκε σε πυρηνικό κλάσμα από παροδικά μετασχηματισμένα φύλλα καπνού με την γονιδιακή κατασκευή 35S::(Δ TTP)lefko-YFP-Flag (Εικόνα 1.6) έδειξε πως η πρωτεΐνη εμφανίζει πολλαπλές ζώνες. Αυτή η μεταβολή στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα της πρωτεΐνης πιθανόν να σχετίζεται με την ύπαρξη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Post-Translational Modifications).

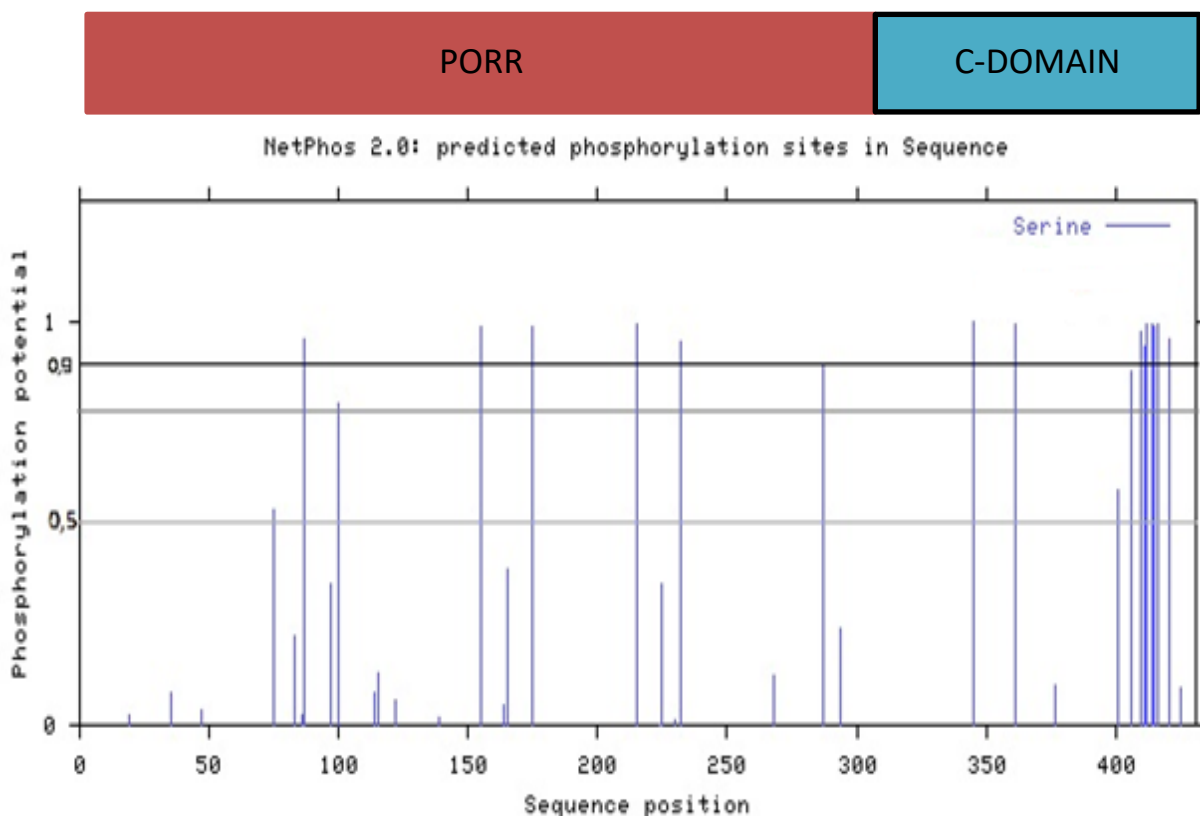


Εικόνα 1.6. Ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης (Δ TTP)lefko-YFP-Flag σε κλάσμα ολικής πρωτεΐνης και σε πυρηνικό κλάσμα παροδικά μετασχηματισμένων φύλλων καπνού. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε SDS-PAGE 8% και η ανίχνευση έγινε με το αντίσωμα anti-GFP. Αριστερά, η εικόνα της μεμβράνης PVDF έπειτα από χρώση Ponceau.

1.3 Προσδιορισμός Μετα-Μεταφραστικών Τροποποιήσεων στην πρωτεΐνη LEFKOTHEA

Προκειμένου να ελεγχθεί αν η πρωτεΐνη LEFKOTHEA διαθέτει πιθανές θέσεις μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση. Η πλέον κοινή μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών είναι η φωσφορυλίωση, η οποία αποτελεί μια απαραίτητη, γρήγορη και αναστρέψιμη αντίδραση που μπορεί και μεταβάλλει λειτουργικά μια πρωτεΐνη για όσο χρονικό διάστημα χρειάζεται και να την καταστήσει ενεργή.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της πρωτεΐνης LEFKOTHEA με τη βοήθεια του προγράμματος netPhos 2.0 έδειξαν πως, παρόλο που υπάρχει μια διάσπαρτη κατανομή σερινών σε όλο το μήκος της, ειδικότερα στο καρβοξυτελικό της άκρο παρατηρείται μια ομαδοποίηση σερινών με υψηλή πιθανότητα φωσφορυλίωσης (Εικόνα 1.7 και Πίνακας 1.1).



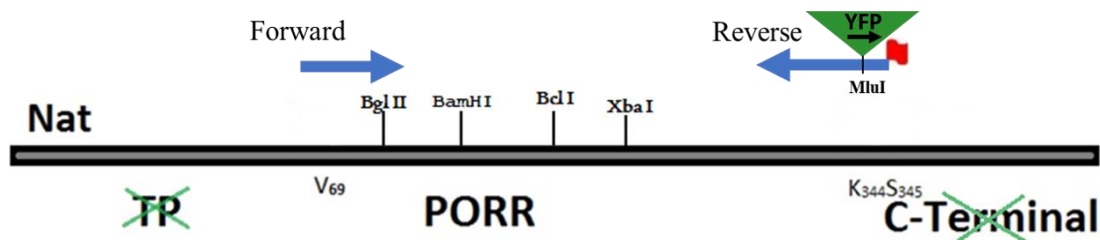
Εικόνα 1.7. Σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της πρόβλεψης μετα-μεταφραστικής φωσφορυλίωσης σε σερίνες της πρωτεΐνης LEFKOTHEA με τη βοήθεια του προγράμματος netPhos 2.0. Στο οριζόντιο άξονα εμφανίζεται η σειρά όλων των αμινοξέων πάνω στην πρωτεΐνη, ενώ στον κατακόρυφο άξονα εμφανίζεται η πιθανότητα με την οποία κάθε σερίνη μπορεί να φωσφορυλιωθεί.

Name	Pos	Context v	Score	Pred	Name	Pos	Context v	Score	Pred
Sequence	19	TLLLSKPKH	0.026	.	Sequence	287	LFYVSIKGM	0.892	*S*
Sequence	35	YKCRSYLCI	0.079	.	Sequence	294	GMRDSVFLV	0.237	.
Sequence	47	LAILSMIRR	0.039	.	Sequence	345	IGDKSVEEK	0.998	*S*
Sequence	75	TKPLSQLCV	0.536	*S*	Sequence	361	DDYSDLDD	0.996	*S*
Sequence	83	VRLTSAASS	0.223	.	Sequence	377	NLFDSEDLG	0.101	.
Sequence	86	TSAASSLAM	0.022	.	Sequence	401	VNGESVEYW	0.580	*S*
Sequence	87	SAASSLAMQ	0.957	*S*	Sequence	406	VEYWSRKLK	0.875	*S*
Sequence	97	LNLKSEISD	0.347	.	Sequence	410	SRKLSSSGS	0.972	*S*
Sequence	100	KSEISDKLA	0.799	*S*	Sequence	411	RKLSSSGSS	0.938	*S*
Sequence	114	LLMLSSHRR	0.078	.	Sequence	412	KLSSSGSSS	0.994	*S*
Sequence	115	LMLSSHRR	0.126	.	Sequence	414	SSSGSSSDE	0.992	*S*
Sequence	122	RLLLSKLVH	0.061	.	Sequence	415	SSSGSSDEA	0.986	*S*
Sequence	139	PNFRSRLCN	0.020	.	Sequence	416	SGSSSDEAN	0.993	*S*
Sequence	155	TVDTSYGRA	0.988	*S*	Sequence	421	DEANSAVES	0.958	*S*
Sequence	164	LELVSSDPE	0.046	.	Sequence	425	SAVESW---	0.093	.
Sequence	165	ELVSSDPEL	0.385	.					
Sequence	175	NQMPSPDVD	0.990	*S*					
Sequence	215	KFRESPEVC	0.993	*S*					
Sequence	224	PYKMSSDYL	0.003	.					
Sequence	225	YKMSSDYLA	0.352	.					
Sequence	230	DYLASESIE	0.012	.					
Sequence	232	LASESIEAE	0.949	*S*					
Sequence	268	RKEFSLPNK	0.121	.					

Πίνακας 1.1: Αναλυτικά τα αποτελέσματα της πρόβλεψης φωσφορυλίωσης των αμινοξέων σερίνης στην πρωτεϊνικής κατασκευής (ΔTP)lefkο με τη βοήθεια του προγράμματος netPhos 2.0.

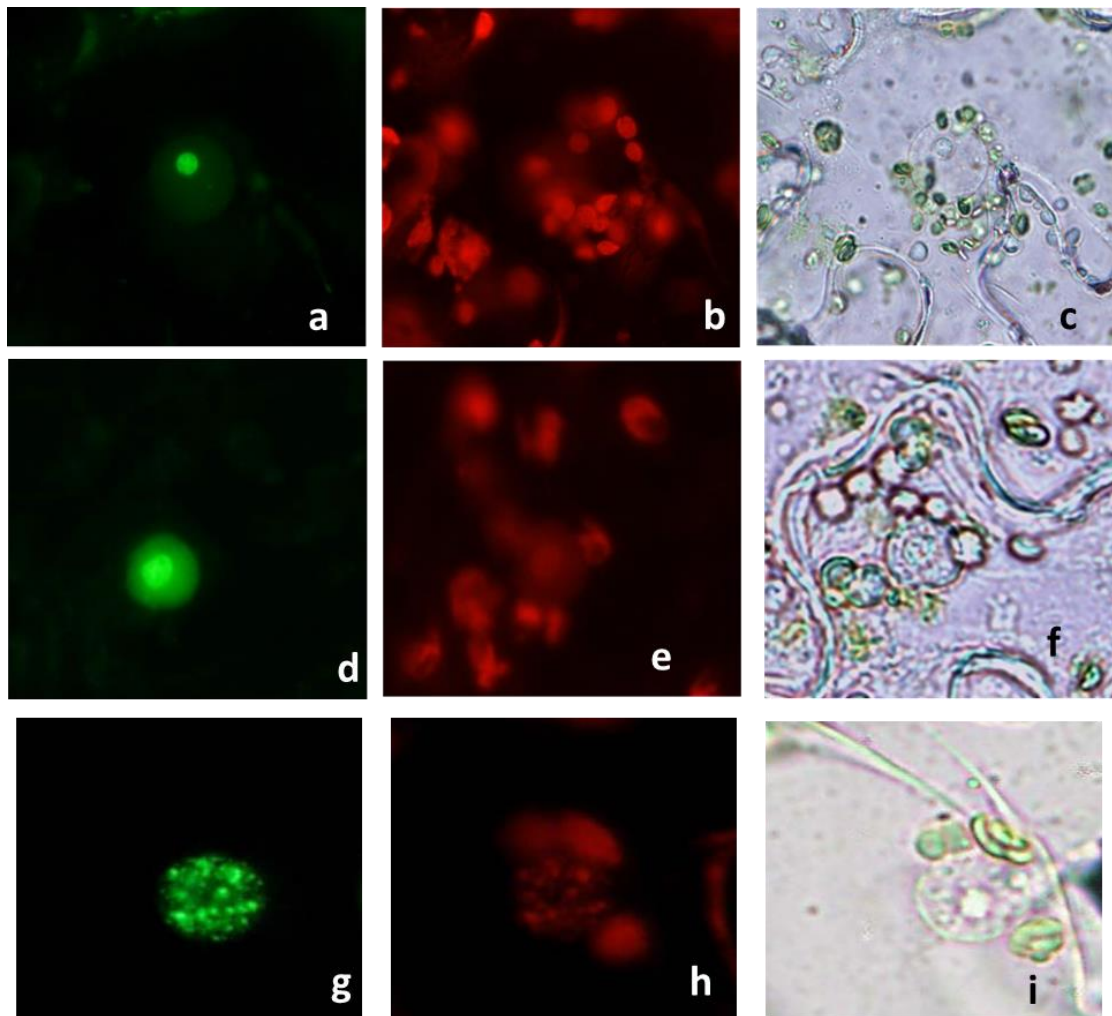
1.4 Επίδραση του καρβοξυτελικού άκρου στην τοποθέτηση της πρωτεΐνης LEFKOTHEA

Για τη διευκρίνιση του ρόλου των σερινών, που υπάρχουν στο καρβοξυτελικό άκρο και εμφανίζουν υψηλή πιθανότητα φωσφορυλίωσης, στην τοποθέτηση και στη λειτουργία της πρωτεΐνης, με χρήση της τεχνικής PCR και της κλωνοποίησης, οι γονιδιακές κατασκευές 35S::ΔΤΡΔC-YFP-Flag και 35S::ΔΤΡΔC-Flag. Από την κατασκευή αυτή απουσιάζει τόσο το πεπτίδιο συνθήματος για την στόχευση στον χλωροπλάστη, όσο και το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, ενώ περιλαμβάνεται το γονίδιο που κωδικοποιεί για την φθορίζουσα πρωτεΐνη-μάρτυρα YFP καθώς και ο επίτοπος FLAG (Εικόνα 1.8).



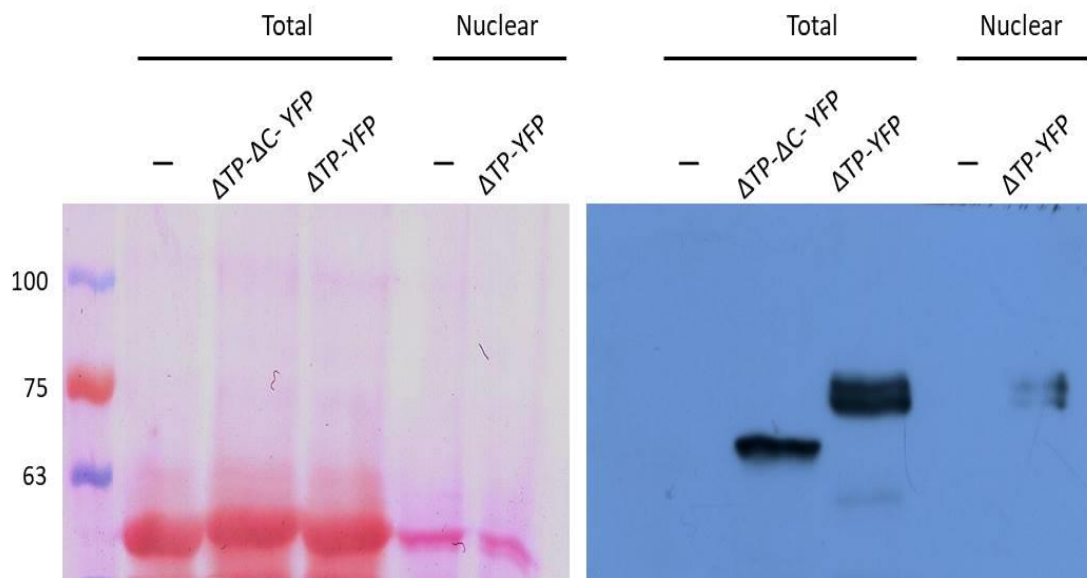
Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση των Αλυσιδωτών Αντιδράσεων Πολυμεράσης (PCR) που πραγματοποιηθούν προκειμένου να ενισχυθεί η περιοχή από την βαλίνη 69 έως και την σερίνη 345. Ο Forward εκκινητής σχεδιάστηκε για να αντικαταστήσει την βαλίνη 69 με μεθειονίνη, ενώ ο Reverse εκκινητής σχεδιάστηκε για αντικαταστήσει την σερίνη 345 με αλανίνη και να περιλαμβάνει μια θέση περιορισμού MluI για την κλωνοποίηση της φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP και το επίτοπο FLAG

Με μικροσκοπία φθορισμού, κατά την τρίτη μέρα μετά τον παροδικό μετασχηματισμό σε φύλλα *Nicotiana benthamiana*, το σήμα YFP της πρωτεΐνης που δεν διαθέτει το καρβοξυτελικό άκρο εντοπίστηκε κυρίως στον πυρηνίσκο, σε αντίθεση με την κατασκευή που περιείχε το καρβοξυτελικό άκρο, όπου το σήμα εντοπιζόταν σε διάσπαρτες περιοχές του πυρήνα. Επιπλέον, παρατήρηση κατά την τέταρτη μέρα έδειξε πως το σήμα της YFP εκτός από τον πυρηνίσκο, πλέον διαχεόταν και στον υπόλοιπο πυρήνα (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9. Παροδικός μετασχηματισμός *N.benthamiana* με των κατασκευή αναφοράς 35S::(Δ TP)lefko Δ C-YFP-Flag και παρατήρηση την τρίτη (εικόνες a-c) και τέταρτη μέρα (εικόνες d-f) μετά τον μετασχηματισμό και παροδικός μετασχηματισμός με την κατασκευή 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag και παρατήρηση τους κατά την τρίτη μέρα (εικόνες g-i). (στις εικόνες a,d, g απεικονίζεται το φίλτρο GFP, στις εικόνες b, e, h το φίλτρο ροδαμίνης που καταγράφει τον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης και στις εικόνες c, f, i ο φακός οπτικού τύπου Nomarski).

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα ανοσοανίχνευσης κατά Western έδειξαν πως η πρωτεΐνη που διαθέτει το καρβοξυτελικό άκρο εμφανίζει τρεις ζώνες, σε αντίθεση με την πρωτεΐνη από την οποία απουσιάζει το καρβοξυτελικό άκρο η οποία εμφανίζει μόνο μία ζώνη (Εικόνα 1.10). Τα παραπάνω δεδομένα παρέχουν ισχυρότερες ενδείξεις για την πιθανότητα ύπαρξης μετα-μεταφραστικών τροποίσεων στην πρωτεΐνη LEFKOTHEA.



Εικόνα 1.10. Ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών (ΔTP)lefko-YFP-Flag και (ΔTP)lefkoΔC-YFP-Flag με το πρωτογενές αντίσωμα anti-GFP. Αριστερά, η εικόνα της μεμβράνης PVDF έπειτα από χρώση Ponceau

1.5 Σκοπός

Όπως έδειξαν τα παραπάνω πειράματα ανοσοανίχνευσης και η βιοπληροφορική ανάλυση για την πρωτεΐνη LEFKOTHEA, το καρβοξυτελικό της άκρο περιέχει αμινοξέα σερίνης που εμφανίζουν υψηλή πιθανότητα φωσφορυλίωσης. Επιπλέον τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μικροσκοπία φθορισμού, έδειξαν πως το καρβοξυτελικό άκρο επηρεάζει την τοποθέτηση και την κατανομή της πρωτεΐνης στον πυρηνικό χώρο. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της λειτουργίας της πρωτεΐνης LEFKOTHEA που δεν διαθέτει το καρβοξυτελικό άκρο σε μόνιμα μετασηματισμένα φυτά του μεταλλάγματος *lefko2* και ο φαινοτυπικός τους χαρακτηρισμός, μέσω σύγκρισης του προτύπου ανάπτυξης και της περιεκτικότητας σε φωτοσυνθετικές ουσίες των φυτών με την συγκεκριμένη γονιδιακή κατασκευή με φυτά αγρίου τύπου και φυτά του μεταλλάγματος.

2 Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Φυτικό Υλικό

Ως βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Arabidopsis thaliana* της οικογένειας *Brassicaceae*, οικότυπου *Columbia (Col-0 N1093)* (αγρίου τύπου) καθώς και το μετάλλαγμα *lefko2*.

2.1.1 Συνθήκες ανάπτυξης φυτικού υλικού

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

- Τα σπόρια απολυμαίνονται σε διάλυμα 20% χλωρίνη - 0,01% Triton X-100, 2 φορές επί 3 λεπτά (maximum).
- Ακολουθούν 5 ξεπλύματα με αποστειρωμένο ddH₂O, ώστε να αραιωθεί και να απομακρυνθεί σταδιακά πλήρως η χλωρίνη.
- Τα σπόρια τοποθετούνται σε σειρά στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υλικού MS με χρήση πιπέτας Gilson, διατηρώντας κατάλληλες αποστάσεις που να επιτρέπουν τη σωστή ανάπτυξη των φυτών.
- Τα τρυβλία ασφαλίζονται με parafilm και τοποθετούνται κάθετα σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως/ 8 ώρες σκοτάδι και σχετική υγρασία ~50%).

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

Το Murashige & Skoog, ένα μίγμα μακροστοιχείων, ιχνοστοιχείων και βιταμινών, αποτελεί το κυριότερο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης φυτών. Η σύνθεσή του για 100ml είναι 0.22g MS (with vitamins), 0.05g MES-monohydrate, 1g D-Sucrose και 0.33g phytagel. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με 1N KOH στο 5.7, ενώ συμπληρώνεται με ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 100ml. Το θρεπτικό αποστειρώνεται και διανέμεται σε τρυβλία petri. Η τελευταία διαδικασία γίνεται αυστηρά υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής. Έπειτα, ακολουθεί η διαδικασία της επίστρωσης σπερμάτων η οποία περιγράφηκε παραπάνω.

2.2 Μετασχηματισμός *Arabidopsis thaliana*

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

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

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

Αναπτύσσεται μια καλλιέργεια με το κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium* (που φέρει την επιθυμητή κατασκευή του δυαδικού φορέα) σε 5ml θρεπτικό μέσο LB για 48 ώρες στους 28°C.

Τα 5ml της καλλιέργειας μεταφέρονται σε 500 ml θρεπτικό μέσο LB και αναπτύσσονται στους 28°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα φτάσει περίπου $OD_{600}=1.0$. Τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 15 min στις 5000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 600 ml διαλύματος διείσδυσης (IM). Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί για άλλες 2 ώρες.

Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε ένα δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 250ml και όλο το δοχείο τοποθετείται σε έναν κάδο κενού. Ένα γλαστράκι που περιέχει 2-3 ανεπτυγμένα φυτά αναποδογυρίζεται και τα φυτά εμβαπτίζονται μέσα στην καλλιέργεια του *Agrobacterium*. Προσέχουμε τα φυτά να είναι βυθισμένα ολόκληρα μέσα στην καλλιέργεια, συμπεριλαμβανομένης της ροζέτας και των δευτερογενών βλαστών που αρχίζουν να εμφανίζονται στη βάση της ροζέτας. Συνίσταται το χρώμα να ενυδατώνεται καλά πριν τη

διείσδυση, ώστε να απορροφά όσο το δυνατό λιγότερη καλλιέργεια *Agrobacterium*. Σε αντίθετη περίπτωση το μολυσμένο χώμα παρεμποδίζει την ανάπτυξη των φυτών. Ο κάδος κενού κλείνεται αεροστεγώς και με τη βοήθεια μιας αντλίας λαδιού εφαρμόζεται κενό 400 mm Hg, για 5-10 λεπτά.

Μεταφορά των φυτών σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασίας 22°C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/ 8 ώρες σκοτάδι), μέχρι να κλείσουν τον κύκλο ζωής τους, οπότε γίνεται και η συγκομιδή των σπερμάτων τους.

Διαλύματα μετασχηματισμού φυτών

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

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

§ BAP : 5mg/ml σε DMSO. Αποθήκευση στους -20°C.

2.2.2 Επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών της T1 γενιάς

Τα σπέρματα της T1 γενιάς απολυμαίνονται και επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο MS. Το θρεπτικό μέσο είναι εμπλουτισμένο με κατάλληλα αντιβιοτικά που θα βοηθήσουν την ορθή επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά Υγρομυκίνη (30μg/ml), Σεφοταξίνη (50μg/ml).

Τα τρυβλία μεταφέρονται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι) και επωάζονται σε αυτές τις συνθήκες για περίπου 14 ημέρες.

Μετά από 5-7 ημέρες τα μετασχηματισμένα σπέρματα αναπτύσσονται σε σκούρα πράσινα φυτά και έχουν φυσιολογικό φαινότυπο. Η ρίζα τους είναι κοντή αλλά φυσιολογική. Τα μη μετασχηματισμένα σπέρματα αναπτύσσουν πολύ κοντό ριζικό σύστημα και έχουν ανοιχτές πράσινες ή υποκίτρινες κοτυληδόνες. Μετά τη δέκατη ημέρα ο διαχωρισμός των μετασχηματισμένων φυτών είναι πλέον εμφανής. Τα μετασχηματισμένα φυτά αναπτύσσουν σχεδόν φυσιολογική ρίζα και δεύτερο ζευγάρι φύλλων, ενώ η ανάπτυξη των μη μετασχηματισμένων επιβραδύνεται και τελικά νεκρώνονται. Μετά την επιλογή, τα μετασχηματισμένα φυτά μεταφέρονται σε άλλα τρυβλία με θρεπτικό μέσο MS και στη συνέχεια μεταφέρονται στο χώμα, όπου και παραμένουν μέχρι να κλείσουν τον κύκλο ζωής τους.

2.4 Μορφομετρική Ανάλυση - Προγράμματα Επεξεργασίας Εικόνας

2.4.1 Συνθήκες φωτογράφισης

Ο φαινότυπος των φυτών αποτυπώθηκε με τη χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής Sony DSC-F707. Οι συνθήκες λήψης των φωτογραφιών κρατήθηκαν σταθερές καθ' όλη τη διεξαγωγή του πειράματος.

2.4.2 Πρόγραμμα Image J

Η βιομετρία που αφορά στο μήκος της ρίζας των αναπτυσσόμενων φυτών του πειράματος πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος Image J. Πρόκειται για ένα πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας, το οποίο παρέχει τη δυνατότητα στο χρήστη να ορίσει κλίμακα που να αντιστοιχεί τα pixels της φωτογραφίας σε cm. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε χαρτί μιλιμετρέ το οποίο φωτογραφήθηκε μέσα σε τρυβλίο petri, ώστε να βρίσκεται στην ίδια απόσταση με τα υπό φωτογράφιση φυτά και τηρήθηκαν οι ίδιες συνθήκες φωτογράφισης. Στη συνέχεια, με το εργαλείο σχεδίασης γραμμής, τραβήχτηκε πάνω στη φωτογραφία του μιλιμετρέ μια γραμμή μήκους 1cm και ορίστηκε η κλίμακα που αντιστοιχεί στα συγκεκριμένα pixels. Το μήκος της ρίζας των φυτών μετρήθηκε σε όλες τις δοκιμές με την ίδια κλίμακα, ώστε να αποφευχθούν τυχόν διαφορές στις μετρήσεις .

2.5 Προσδιορισμός φωτοσυνθετικών ουσιών

Η εκχύλιση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των φωτοσυνθετικών χρωστικών έγινε με βάση την μέθοδο των Arnon et al. (1949), Hiscox and Israelstam (1979) και Ying Liang et. al. (2017).

- Το δείγμα φυτικού ιστού που πρόκειται να εκχυλιστεί, ζυγίζεται και καταγράφεται το ακριβές νωπό του βάρος.
- Ο φυτικός ιστός τοποθετείται σε erpendorf και προστίθεται 1ml DMSO ώστε να καλύπτεται ο ιστός.
- Τα erpendorf τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 65°C για 15-30 λεπτά, ώσπου ο ιστός να καταστεί διαφανής.
- Το εκχύλισμα μεταφέρεται σε πλαστική κυβέττα 1 cm και φωτομετρείται στα 470, 645 και 663 nm.
- Καταγράφονται οι απορροφήσεις και υπολογίζεται η συγκέντρωση των χλωροφυλλών και των ολικών καροτινοειδών στο διάλυμα, εκφραζόμενες σε mg/L, σύμφωνα με τους τύπους :

$$\text{Chla} = 12.21 * \text{A663} - 2.81 * \text{A645}$$

$$\text{Chlb} = 20.13 * \text{A645} - 5.03 \text{ A663}$$

$$\text{Chl total} = 20.2 * \text{A645} + 8.02 * \text{A663}$$

$$\text{Ccar} = (1000 * \text{A470} - 3.27 * \text{Chla} - 104 * \text{Chlb}) / 229$$

- Υπολογίζεται η συγκέντρωση της χλωροφύλλης και των ολικών καροτινοειδών του δείγματος ανά φυτό. Στην συνέχεια γίνεται κανονικοποίηση των τιμών σε mg νωπού βάρους ή ανά mm² μέσης φιλικής επιφάνειας των φυτών.

Αποτελέσματα

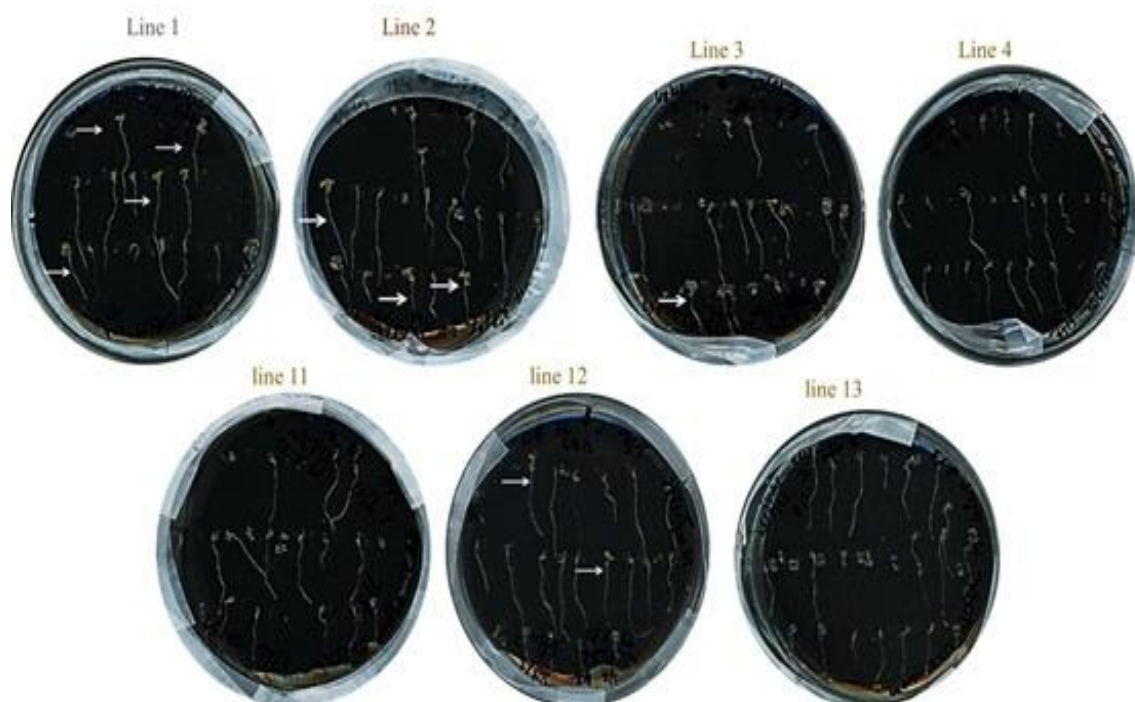
3.1 Μελέτη μόνιμα μετασχηματισμένων φυτών

3.1.1 Επιλογή μετασχηματισμένων φυτών T1 γενεάς

Φυτά που μετασχηματίστηκαν με την γονιδιακή κατασκευή 35S::(Δ TP)lefko Δ C-Flag, μετά την επιλογή των ανθεκτικών φυτών T1 στο αντιβιοτικό Υγρομυκίνη, μεταφέρθηκαν και αναπτύχθηκαν στο χώμα.

3.1.2 Συλλογή μετασχηματισμένων φυτών T2 γενεάς

Από τους απογόνους της T1 γενεάς, οι γονιδιακές σειρές #1, #2, #3, #4, #11, #12, #13 στρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS και 1% σουκρόζη. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε συλλογή ατόμων κάθε γονιδιακής σειράς που εμφάνιζαν φαινότυπο διαφορετικό από αυτόν του μεταλλάγματος *lefko2* (Εικόνα 3.1 και Πίνακας 3.1)



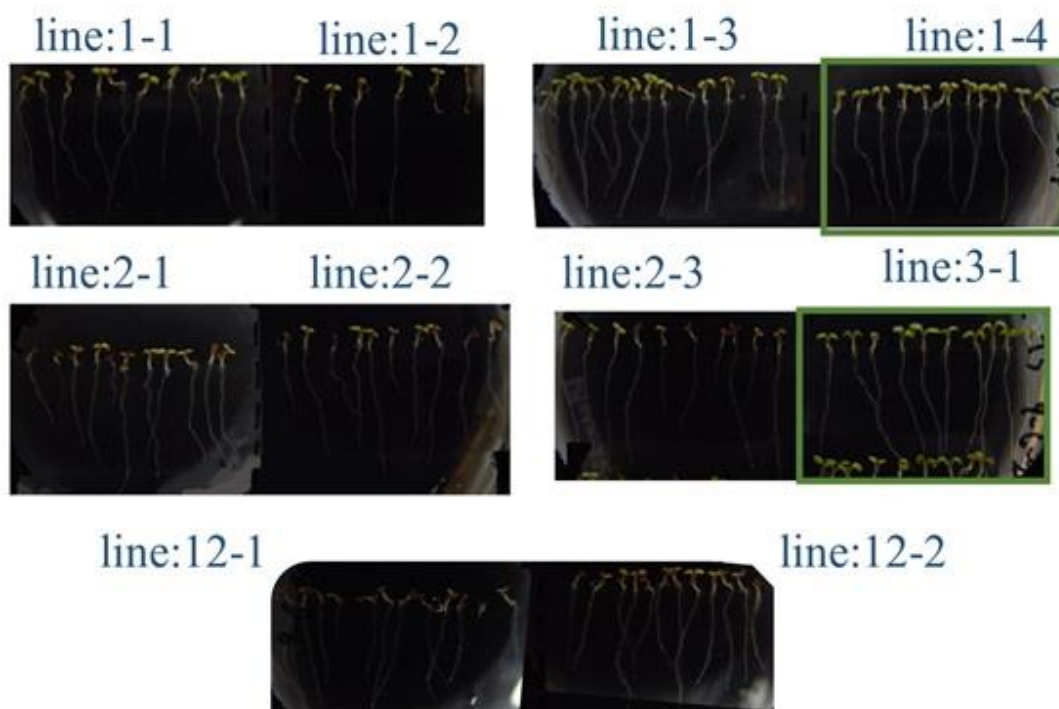
Εικόνα 3.1. Διαγονιδιακές σειρές T2 γενεάς μετασχηματισμένων φυτών του μεταλλάγματος *lefko2* με την κατασκευή 35S::(Δ TP)lefko Δ C-FLAG

<i>[lefko2]</i> 35S::(Δ TP)Lefko Δ CFLAG T2 γενεά	Φυτά που παρουσιάζουν φαινότυπο διαφορετικό του <i>lefko2</i>
line #1	4 στα 16 φυτά
line #2	3 στα 23 φυτά
line #3	1 στα 26 φυτά
line #4	0 στα 27 φυτά
line #11	0 στα 23 φυτά
line #12	2 στα 20 φυτά
line #13	0 στα 23 φυτά

Πίνακας 3.1. Συλλογή ατόμων T2 γενεάς μετασηματισμένων φυτών

3.1.3 Συλλογή μετασηματισμένων φυτών T3 γενεάς

Κατά την συλλογή των καθαρών γονιδιακών σειρών, έγινε σύγκριση των φαινοτύπων των ατόμων της T3 γενεάς. Συγκεκριμένα, στρώθηκαν ανά δύο γονιδιακές σειρές σε κάθε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα MS (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2. Διαγονιδιακές σειρές T3 γενεάς μετασηματισμένων φυτών με την κατασκευή 35S::(Δ TP)lefko Δ C-Flag

Έγινε συλλογή των γονιδιακών σειρών #1-4 και #3-1 , καθώς όλα τα άτομα από τις συγκεκριμένες σειρές εμφανίζουν φαινότυπο διαφορετικό από αυτόν του μεταλλάγματος *lefko2* (πίνακας 3.2).

[<i>lefko2</i>] 35S:ΔΤΡΔCFLAG T3 γενεά	Φυτά που παρουσιάζουν φαινότυπο διαφορετικό του <i>lefko2</i>
line #1-1	18 στα 21 φυτά
line #1-2	11 στα 20 φυτά
line #1-3	21 στα 27 φυτά
line #1-4	28 στα 28 φυτά
line #2-1	18 στα 23 φυτά
line #2-2	11 στα 24 φυτά
line #2-3	13 στα 23 φυτά
line #3-1	21 στα 21 φυτά
line #12-1	13 στα 25 φυτά
line #12-2	16 στα 23 φυτά

Πίνακας 3.2. Συλλογή των καθαρά γονιδιακών σειρών T3 γενεάς μετασηματισμένων φυτών

3.2. Φαινοτυπικές αναλύσεις

Τα φυτά των διαγονιδιακών σειρών 35S::(Δ TP)lefko Δ C-Flag (lines #1-4 και #3-1) και 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag, καθώς και φυτά του μεταλλάγματος *lefko2* και του αγρίου τύπου αναπτύχθηκαν για 7 μέρες σε τρυβλία (κάθετα) κάτω από συνθήκες έντασης ακτινοβολίας 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, θερμοκρασίας 22°C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι.

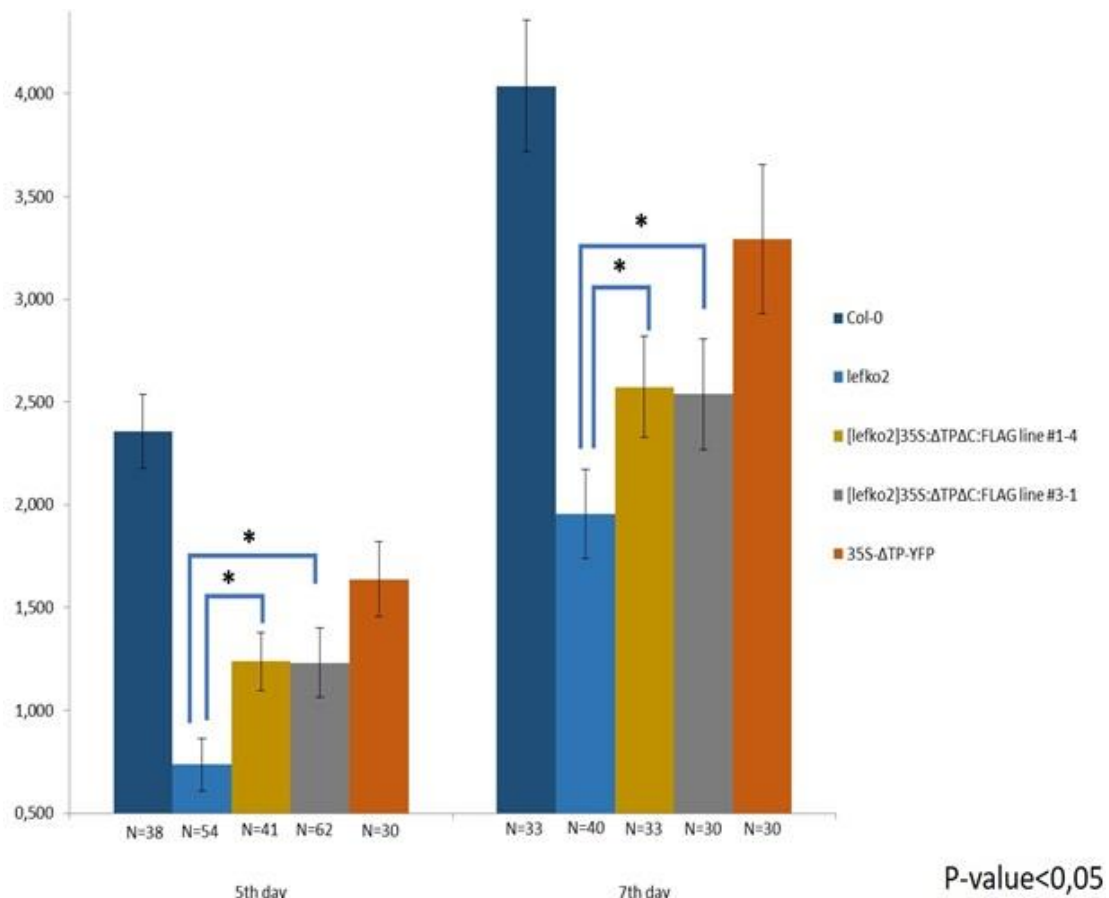
3.2.1 Προσδιορισμός της ανάπτυξης πρωτογενούς ρίζας

Κατά την 5^η και 7^η μέρα ανάπτυξης, τα παραπάνω φυτά φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις της πρωτογενούς ρίζας με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά σπορόφυτων των διαγονιδιακών φυτών 35S::(Δ TP)lefko Δ C-Flag, ηλικίας 5 και 7 ημερών σε σύγκριση με φυτά του μεταλλάγματος *lefko2*, φυτά αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag.

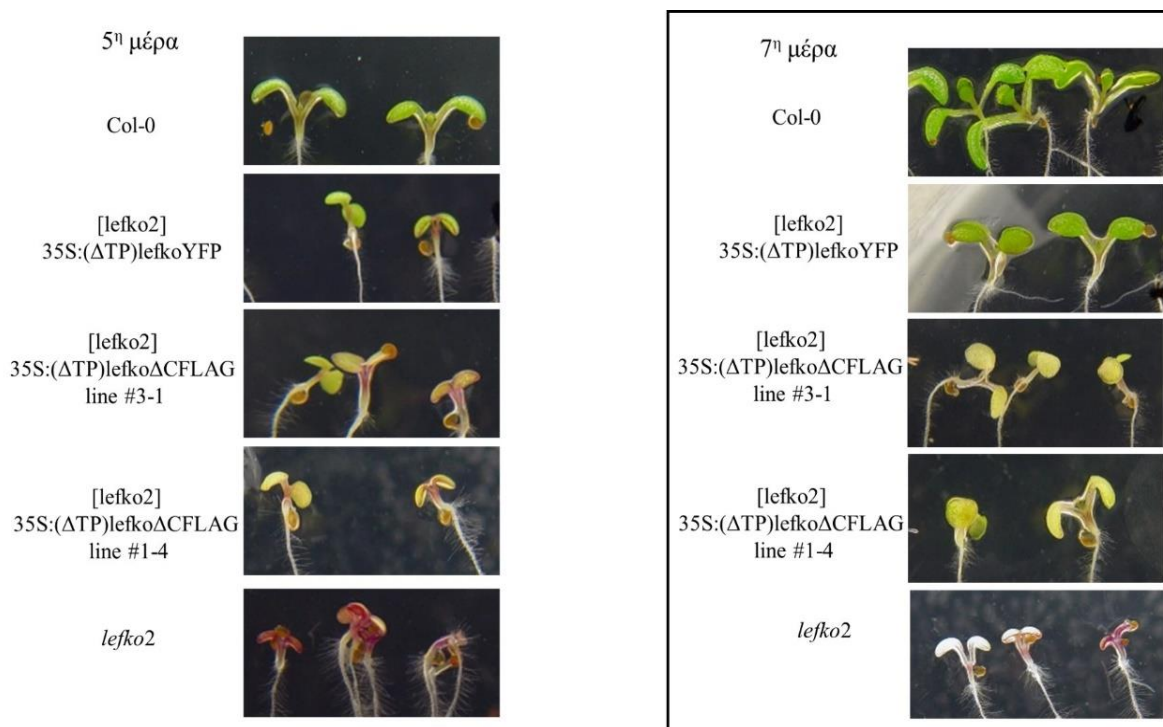
Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, παρατηρείται πως η πρωτογενής ρίζα των διαγονιδιακών σειρών #3-1 και #1-4 των φυτών 35S::(Δ TP)lefko Δ C-Flag παρουσιάζει μεγαλύτερο (και στατιστικώς σημαντικό με p -value<0,05) μήκος από ότι η πρωτογενής ρίζα του μεταλλάγματος *lefko2*. Αντίθετα, παρουσιάζουν μικρότερη ανάπτυξη της πρωτογενούς ρίζας σε σχέση με την αντίστοιχη του αγρίου τύπου και των διαγονιδιακών φυτών που περιέχουν την κατασκευή 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag (Εικόνα 3.4)



Εικόνα 3.4. Διαγραμματική απεικόνιση της ανάπτυξης πρωτογενούς ρίζας φυτών ηλικίας 5 και 7 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα εμφανίζεται ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε κατηγορία φυτών, δηλαδή από φυτά αγρίου τύπου, μεταλλάγματα *lefko2*, διαγονιδιακών σειρών #3-1 και #1-4 και διαγονιδιακά φυτά 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag, κατά την μέτρηση της πρωτογενής ρίζας.

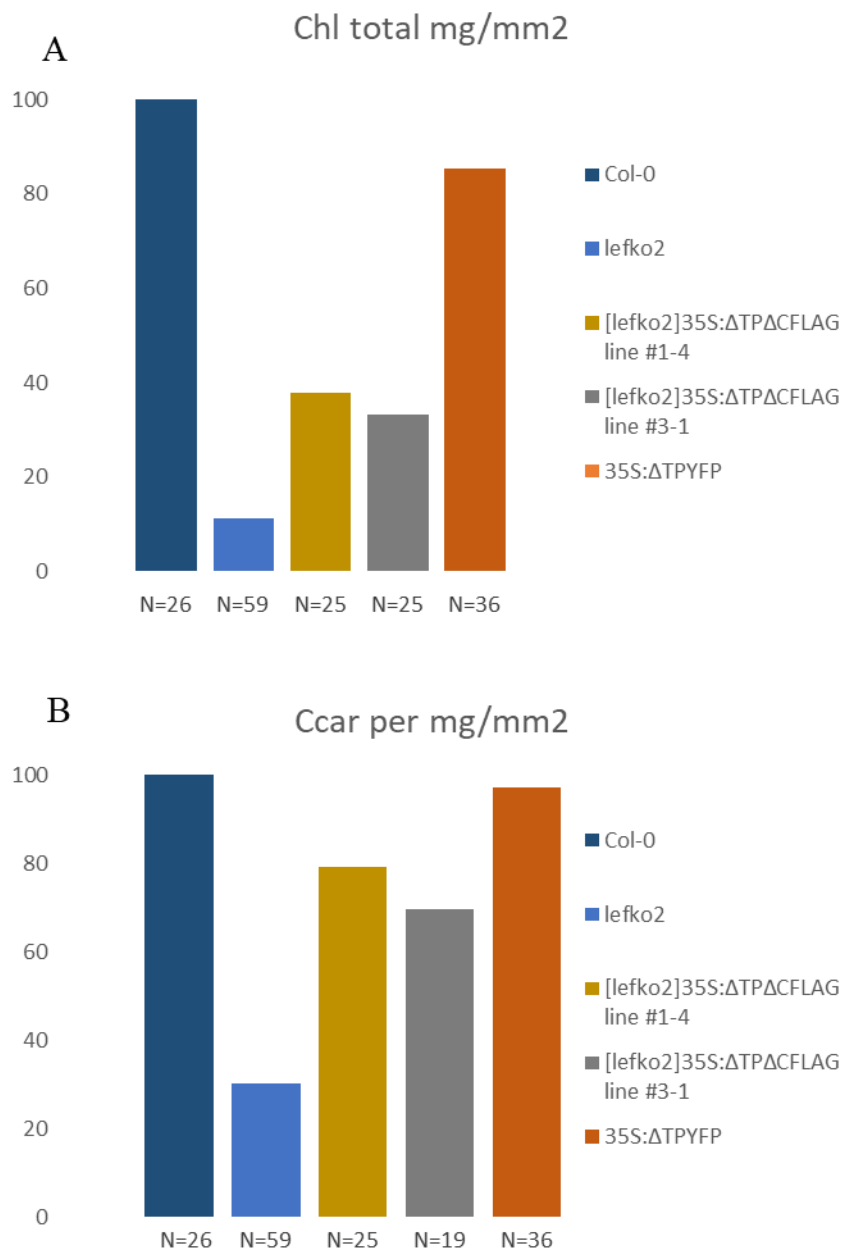
3.2.2 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας φωτοσυνθετικών ουσιών

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση φωτοσυνθετικών ουσιών κατά την 7^η μέρα ανάπτυξης φυτών των διαγονιδιακών σειρών 35S::(Δ TP)lefko Δ C-Flag (lines #1-4 και #3-1) και 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag καθώς και φυτών του μεταλλάγματος *lefko2* και φυτών αγρίου τύπου (Εικόνα 3.5)

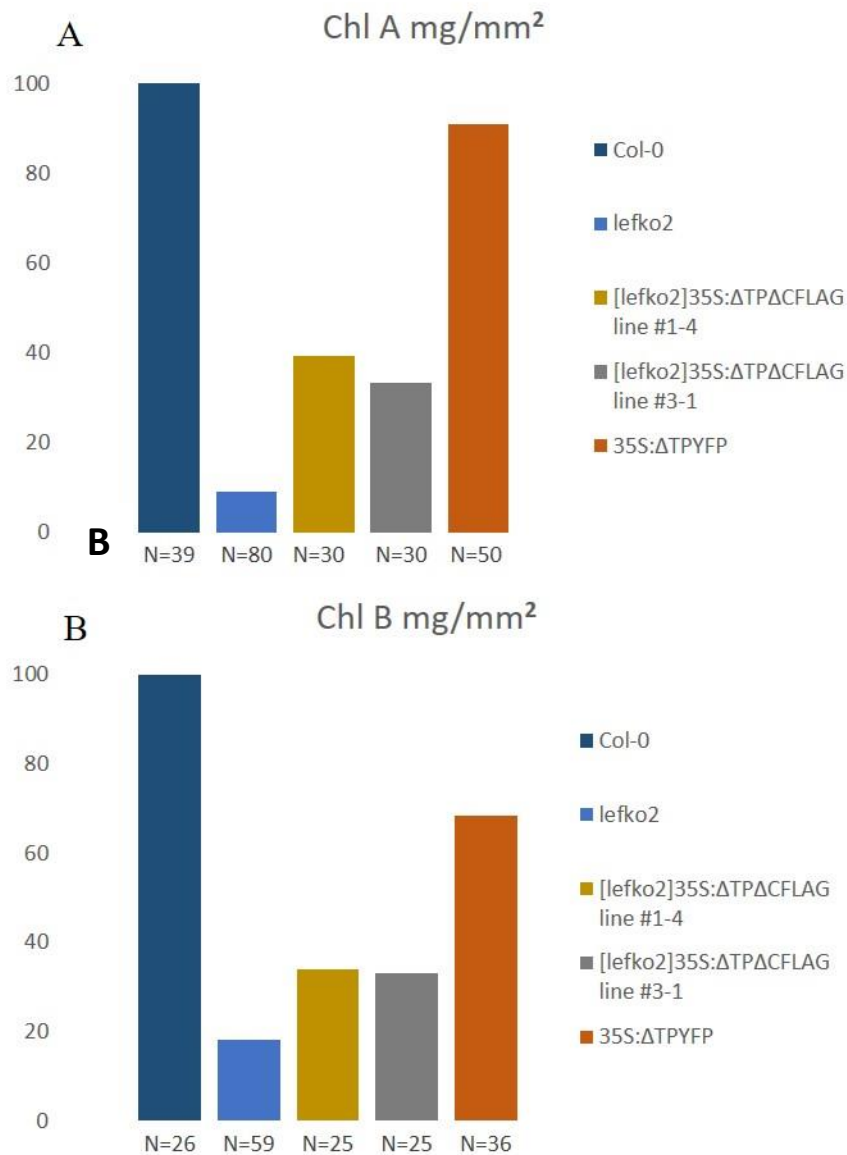


Εικόνα 3.5. Κοτυλιδόνες σποροφύτων ηλικίας 5 και 7 ημερών των διαγονιδιακών φυτών 35S::(Δ TP)lefko Δ C-Flag, σε σύγκριση με φυτά του μεταλλάγματος *lefko2*, φυτά αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνεται πως οι διαγονιδιακές σειρές #1-4 και #3-1 των φυτών 35S::(Δ TP)lefko Δ C-Flag παρουσιάζουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φωτοσυνθετικές χρωστικές σε σχέση με την αντίστοιχη περιεκτικότητα του μεταλλάγματος *lefko2* και μικρότερη σε σχέση με την περιεκτικότητα των φυτών άγριου τύπου και των διαγονιδιακών φυτών που φέρουν την κατασκευή 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag (Εικόνα 3.6 και Εικόνα 3.7)



Εικόνα 3.6. Διαγραμματική απεικόνιση της περιεκτικότητας των φυτών σε Α) ολική χλωροφύλλη και Β) ολικά καροτενοειδή. Στον οριζόντιο άξονα εμφανίζεται ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν από φυτά αγρίου τύπου, μεταλλάγματα lefko2, διαγονιδιακών σειρών #3-1 και #1-4 και διαγονιδιακά φυτά 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag, κατά την απομόνωση των φωτοσυνθετικών ουσιών.



Εικόνα 3.7. Διαγραμματική απεικόνιση της περιεκτικότητας των φυτών σε Α) χλωροφύλλη Α και Β) χλωροφύλλη Β. Στον οριζόντιο άξονα εμφανίζεται ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε κατηγορία φυτών κατά την μέτρηση της απομόνωση των φωτοσυνθετικών ουσιών.

4 Συζήτηση

4.1 Ομοιότητα της πρωτεΐνης LEFKOTHEA στον πυρηνικό χώρο

Κατά την προηγούμενη μελέτη, για τη διερεύνηση της παρουσίας μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στην πρωτεΐνη LEFKOTHEA, η έρευνα επικεντρώθηκε στο καρβοξυτελικό της άκρο όπου βάσει της βιοπληροφορικής ανάλυσης που έγινε, βρέθηκε μία ομαδοποίηση σερινών που εμφανίζουν υψηλή πιθανότητα φωσφορυλίωσης, της πλέον σημαντικής και καλά χαρακτηρισμένης τροποποίησης των πρωτεϊνών (Hunter, 1995, Pawson, 2002, Ghosh et al., 2011). Δημιουργήθηκε μία γονιδιακή κατασκευή από την οποία απουσιάζει τόσο το πεπτίδιο στόχευσης στον χλωροπλάστη, όσο και ολόκληρο το καρβοξυτελικό άκρο και ακολούθησε παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού. Παρατήρηση με μικροσκοπία φθορισμού έδειξε πως απουσία του καρβοξυτελικού άκρου η πρωτεΐνη εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στον πυρηνίσκο, ενώ κατά την παρουσία του εντοπίζεται σε στικτές περιοχές του πυρήνα. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως το καρβοξυτελικό άκρο, και οι τροποποιήσεις που αυτό φέρει, παίζουν ρόλο στην τοποθέτηση της πρωτεΐνης σε συγκεκριμένες περιοχές του πυρήνα. Συνεπώς, είναι πιθανό η απουσία του να οδηγεί σε διατάραξη της κατανομής και ομοιότητας της πρωτεΐνης στο εσωτερικό του πυρήνα και με αυτό τον τρόπο, να επηρεάζει τη λειτουργία της.

Είναι γνωστό πως οι πρωτεΐνες που στοχεύουν στον πυρήνα, ύστερα από την σύνθεση τους στον κυτταρόπλασμα, εισέρχονται μέσω των μοτίβων εισόδου (μοτίβα NLS) και στη συνέχεια διασπείρονται σε όλο τον πυρήνα. Έχει βρεθεί από ανάλυση με την μέθοδο φωτολεύκανσης (photobleaching) για την ανίχνευση πρωτεϊνών, πως το περιβάλλον του πυρήνα επιτρέπει την ταχεία διάχυση των μορίων (Görisch et al. 2005; Misteli 2001; Seksek et al. 1997). Η συγκεκριμένη ιδιότητα επιτρέπει στις πρωτεΐνες την δυνατότητα εύρεσης και παροδικής αλληλεπίδρασης με μόρια-στόχους σε όλο το πυρηνόπλασμα. Επίσης έχει ιδιαίτερη σημασία στην ομοιότητα και την λειτουργία τους στον πυρήνα, καθώς λόγω της κινητικότητας και της αλληλεπίδρασής τους με τα συστατικά του, επιτρέπει την ενδοκυτταρική διακίνηση και εξαγωγή μορίων στο κυτταρόπλασμα. Ως αποτέλεσμα, διατηρείται η ομοιότητα των πρωτεϊνών στον πυρήνα ενώ αποφεύγεται η συσσώρευσή τους μέσα στα διάφορα διαμερίσματά του, όπως είναι για παράδειγμα ο πυρηνίσκος.

4.2 Συσχέτιση της ενδοπυρηνικής κατανομής της πρωτεΐνης και της ανάπτυξης των φυτών

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να μελετηθεί η λειτουργία της πρωτεΐνης LEFKOTHEA, όταν αυτή δεν διαθέτει το καρβοξυτελικό της άκρο, σε μόνιμα μετασχηματισμένα φυτά του μεταλλάγματος *lefko2*. Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των παραπάνω φυτών έδειξε πως η παρουσία του καρβοξυτελικού άκρου είναι απαραίτητη για την λειτουργία της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, φυτά του μεταλλάγματος *lefko2* που μετασχηματίστηκαν με την κατασκευή 35S::(Δ TP)lefko Δ C-Flag παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανάπτυξη πρωτογενούς ρίζας καθώς και υψηλότερη περιεκτικότητα φωτοσυνθετικών ουσιών σε σχέση με το μετάλλαγμα, χωρίς όμως να επανέρχονται πλήρως στον φαινότυπο του άγριου τύπου. Επιπλέον, σύγκριση των παραπάνω φυτών με σταθερά μετασχηματισμένα φυτά *lefko2* με την κατασκευή 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag, η οποία σχεδόν συμπληρώνει τον φαινότυπο αγρίου τύπου, έδειξε πως η απουσία του καρβοξυτελικού άκρου έχει ως αποτέλεσμα μικρότερο μήκος πρωτογενούς ρίζας και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φωτοσυνθετικές ουσίες.

Με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως η μεταβολή της ενδοπυρηνικής κατανομής της πρωτεΐνης, που οφείλεται στην ύπαρξη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στο καρβοξυτελικό της άκρο, επηρεάζει την λειτουργία της στον πυρήνα και κατά συνέπεια την ανάπτυξη του φυτού. Πιο συγκεκριμένα, η σχεδόν αποκλειστική τοποθέτησή της στον πυρηνίσκο οδηγεί σε έλλειψή της στις περιοχές όπου είναι απαραίτητη. Αντίθετα, παρουσία του καρβοξυτελικού άκρου, όπου εντοπίζεται σε στικτές περιοχές διάσπαρτες σε όλο τον χώρο του πυρήνα (όπως έδειξε η μικροσκοπία φθορισμού με την κατασκευή 35S::(Δ TP)lefko-YFP-Flag), μπορεί και επιτελεί πλήρως τον ρόλο της. Συνεπώς, μπορούμε να υποθέσουμε πως και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που πιθανόν να υφίσταται, είναι απαραίτητες για την τοποθέτησή της σε εκείνες τις θέσεις του πυρήνα όπου απαιτείται και κατ' επέκταση για τη σωστή λειτουργία της.

5 Βιβλιογραφία

- ❖ **Colas des Francs-Small CC, Kroeger T, Zmudjak M, Ostersetzer-Biran O, Rahimi N, Small I, Barkan A.** (2012). A PORR domain protein required for rpl2 and ccmF(C) intron splicing and for the biogenesis of c-type cytochromes in Arabidopsis mitochondria. *Plant J* 69(6): 996-1005.

- ❖ **G. Ghosh and J. A. Adams,** (2011). Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. *FEBS J* 278: 587–597.

- ❖ **Hiscox J. D. and Israelstam G.F.** (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can J Bot* 57: 1332-1334.

- ❖ **Krause K and Krupinska K.** (2009). Nuclear regulators with second home in organelles. *Trends Plant Sci* 14(11): 194-199

- ❖ **Kosugi et al.,** (2009). Six Classes of Nuclear Localization Signals Specific to Different Binding Grooves of Importin. *J Biol Chem* 284: 478-485.

- ❖ **T. Hunter.** (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225-236.

- ❖ **T. Misteli** (2008). Physiological importance of RNA and protein mobility in the cell nucleus. *Histochem Cell Biol* 129:5-11.

- ❖ **Ying Liang et. al.** (2017) A nondestructive method to estimate the chlorophyll content of Arabidopsis seedlings. *Plant Methods* 13:26