



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Οι πρωτεΐνες που φέρουν επαναλήψεις Arm και ο ρόλος τους στη συμβίωση ψυχανθών-ριζοβίων



Διπλωματική εργασία

Ψαρράκου Ιωάννα-Σοφία

Λάρισα 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επιβλέπουσα

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2. Καρούζας Δημήτριος, Μέλος

Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3. Τσίκου Δανιέλα, Μέλος

Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 Βιοτεχνολογίας Φυτών, Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Εικόνα εξωφύλλου: Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής των επαναλήψεων Arg1, στην πρωτεΐνη β-κατενίνη του ποντικού.

Ευχαριστίες...

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρο του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για τη βοήθειά της καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Καρπούζα Δημήτριο, μέλος της τριμελούς επιτροπής και Επίκουρο καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης στο μέλος του διδακτικού προσωπικού του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας φυτών Τσίκου Δανιέλα, για την αμέριστη βοήθειά της και υπομονή μέσα στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος που με στήριξαν και βοήθησαν να περάσουν οι μήνες γεμάτοι ευχάριστες αναμνήσεις και χαμόγελα.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Η συμβιωτική σχέση ψυχανθών-ριζοβίων.....	7
1.2 Έναρξη της συμβίωσης και σχηματισμός του φυματίου	7
1.2 Σηματοδότηση για εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης.....	9
1.3 Οι πρωτεΐνες που φέρουν επαναλήψεις Argm και πολυλειτουργικότητά τους.....	10
1.4 Δομή των περιοχών με επαναλήψεις Argm.....	11
1.6 Πρωτεΐνες με επαναλήψεις Argm στα φυτά.....	12
1.7 Δομικές περιοχές που συναντώνται σε φυτικές πρωτεΐνες ταυτόχρονα με τις επαναλήψεις Argm	13
1.8 Φυτικές U-box Argm E3 λιγάσες της ουβικουιτίνης	14
1.9 Λειτουργικά παραδείγματα PUB-Argm πρωτεϊνών στα φυτά	15
1.9.1 Ρόλος της Brassica ARC1 στην αναγνώριση και απόρριψη ασύμβατης γύρης	15
1.9.2 Άμεση ουβικουιτινίωση του υποδοχέα FLS2 από τις PUB12/13 εξασθενεί την innate immune resistanse στο <i>Arabidopsis</i>	16
1.9.3 Η πρωτεΐνη PHOR 1 της πατάτας ανταποκρίνεται στο φως και στη γιββερελλίνη	19
1.9.4 Η NtPUB4 του καπνού αλληλεπιδρά με τον σχετιζόμενο με χιτινάση υποδοχέα κινάση-1 (CHRK 1)	19
1.9.5 Το Spotted Leaf 11 ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό θάνατο και τις αποκρίσεις άμυνας στο Ρύζι.....	20
1.9.6 Η ARIA του <i>Arabidopsis</i> εμπλέκεται σε αποκρίσεις αβιοτικής καταπόνησης	21
1.9.7 Ο ρόλος της UPL3/KAKTUS στην ανάπτυξη του τριχώματος και της ενδο-αντιγραφής στο <i>Arabidopsis</i>	22
1.10 Το φυτό <i>L. japonicus</i> και ο μικροσυμβιώτης του <i>M. loti</i>	23
2. Υλικά και Μέθοδοι	24
2.1.1 Φυτικό υλικό, συνθήκες ανάπτυξης και βακτηριακά στελέχη.....	24
2.1.2. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμιδιακό DNA	24
2.1.3. Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα....	25
2.1.5 Απομόνωση RNA από φυτά <i>Lotus japonicas</i>	26
2.1.6. Απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα ολικού RNA	26
2.1.7. Υπολογισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊνικών οξέων	28
2.2. Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων.....	28
2.2.1. Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης	28
2.2.2. Απομόνωση DNA υψηλής καθαρότητας από πηκτή αγαρόζης	29
2.2.3. Αντίδραση ενοποίησης τμημάτων DNA	29
2.2.4. Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	30

2.2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	31
2.2.6. Κλωνοποίηση προϊόντων PCR σε πλασμιδιακούς φορείς.....	33
2.2.7. Αντίδραση PCR για επέκταση τελικών νουκλεοτιδίων αδενοσίνης (A's extension).....	34
2.2.8. Colonies PCR:	34
2.2.9. RT-qPCR πραγματικού χρόνου	35
2.2.10. 3' race PCR:	36
2.2.11. 5' race	38
2.3. Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης.....	42
2.3.1. Δεκτικά κύτταρα ζύμης.....	42
2.3.2. Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης.....	43
2.3.3. Έλεγχος για την ύπαρξη αλληλεπίδρασης με δοκιμή ιστιδίνης.....	43
2.4. Διαλύματα και θρεπτικά μέσα.....	44
2.4.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης φυτών.....	44
2.4.2 Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων-Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης.....	44
2.4.3 Θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη κυττάρων ζύμης	44
2.4.5 Διαλύματα για τον μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης	45
2.4.6 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης.....	45
2.5. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	46
3. Σκοπός παρούσας εργασίας.....	47
4. Πειραματικά Αποτελέσματα	48
4.1 Ανίχνευση αλληλουχιών σε βάσεις δεδομένων.....	48
4.2 Ενίσχυση των γονιδίων με PCR και κλωνοποίηση.....	50
4.3 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων <i>LjPUB13</i> και <i>LjARIA</i> στις ρίζες του <i>Lotus japonicus</i>	55
4.4 Ενίσχυση του γονιδίου <i>LjSERK3</i> με 5' race.....	56
4.5 Έκφραση του <i>LjSERK3</i> σε μολυσμένα και μη μολυσμένα φυτά.....	59
4.6 Κλωνοποίηση των <i>LjPUB13</i> και <i>LjSERK3</i> σε φορείς έκφρασης στη ζύμη.....	59
4.7 Έλεγχος αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών <i>LjSERK3</i> - <i>LjPUB13</i>	62
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
Παράρτημα:	70
Βιβλιογραφία:	75

Περίληψη

Στα φυτά έχουν αναγνωρισθεί πρωτεΐνες που φέρουν δομικά μοτίβα γνωστά ως επαναλήψεις Arm. Μέσα από την παρούσα εργασία ταυτοποιήθηκαν γονίδια του *Lotus japonicus*, οι πρωτεΐνες των οποίων έφεραν τις συγκεκριμένες δομικές περιοχές αλλά και άλλα μοτίβα που συνήθως συνυπάρχουν με τις επαναλήψεις Arm. Απομονώθηκαν δύο πλήρους μήκους αλληλουχίες που η μία (*LjPUB13*) κωδικοποιεί για ομόλογη πρωτεΐνη της PUB13 του *Arabidopsis thaliana* οπότε πιθανότατα είναι μία Ε3 λιγάση της ουβικιτίνης, ενώ η δεύτερη (*LjARIA*) παρουσιάζει υψηλή ομολογία με τη χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη ARIA του *A. thaliana*. Ανάλυση με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου έδειξε ότι η *LjPUB13* επάγεται σημαντικά (σχεδόν διπλάσιο ποσοστό) σε ρίζες που είχαν μολυνθεί με ριζόβιο σε σχέση με μη μολυσμένες, υποδεικνύοντας πιθανή συσχέτιση της *LjPUB13* με την εγκαθίδρυση της συμβίωσης ανάμεσα σε ψυχανθή και ριζόβια. Στο *A. thaliana* η PUB13 αλληλεπιδρά με την κινάση BAK1/SERK3 στο μονοπάτι ουβικουιτινώσεως του FLS2 (Lu *et al.*, 2011). Παρόλο που η δοκιμή της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών (*LjPUB13* και *LjSERK3*) του *Lotus japonicus* με το σύστημα δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα δεν ήταν θετική, η ανάλυση των μεταγραφημάτων του *LjSERK3* με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου έδειξε ότι και το γονίδιο αυτό επάγεται σημαντικά σε μολυσμένες με ριζόβια ρίζες. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να υποδεικνύουν πιθανή ύπαρξη ενός μονοπατιού παρόμοιο με αυτό του PUB13/ SERK3/ FLS2 που έχει περιγραφεί στο *A. thaliana*, στις ρίζες του *L. japonicus* με πιθανό ρόλο στη συμβιωτική σχέση ριζοβίων-ψυχανθών.

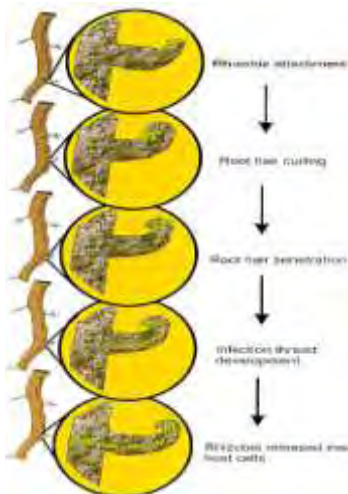
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η συμβιωτική σχέση ψυχανθών-ριζοβίων

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους, τα φυτά έχουν εφεύρει διάφορες λύσεις για το πρόβλημα της διαθεσιμότητας των θρεπτικών στη γη. Μια από τις λύσεις ήταν η εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων. Η συμβίωση φυτού-μύκητα πριν από 450 εκατομμύρια χρόνια ίσως ήταν μια εξέλιξη καθοριστική που κατέστησε τα φυτά ικανά να αποικήσουν τη γη (Pirozynski & Malloch, 1975; Remy *et al.*, 1994).

Μία διαφορετικού είδους αλληλεπίδραση φυτού-μικροβίου που εφοδιάζει ένα περιορισμένο εύρος φυτών με το συχνά ελλιπές μακροστοιχείο άζωτο είναι η συμβιωτική αζωτοδέσμευση (SNF: symbiotic nitrogen fixation). Αυτού του τύπου η συμβίωση εξελίχθηκε πιο πρόσφατα, περίπου 60 εκατομμύρια χρόνια πριν, και περιορίζεται σε ψυχανθή και σε ελάχιστα μη-ψυχανθή (Doyle, 1998) τα οποία συμβιώνουν με ριζόβια ή άλλα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, αντίστοιχα (Pawlowski & Bisseling, 1996). Πρόκειται για μια πολύ ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτού ξενιστή και του βακτηριακού στελέχους, όπου βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* και *Sinorhizobium* προκαλούν το σχηματισμό του φυματίου στο αντίστοιχο φυτό ξενιστή. Το φυτό παρέχει στον ενδοσυμβιώτη του φωτοσυνθετικά προϊόντα, με αντάλλαγμα άζωτο σε μορφή αμμωνιακών ιόντων και αμινοξέων (Udvardi & Day, 1997).

1.2 Έναρξη της συμβίωσης και σχηματισμός του φυματίου

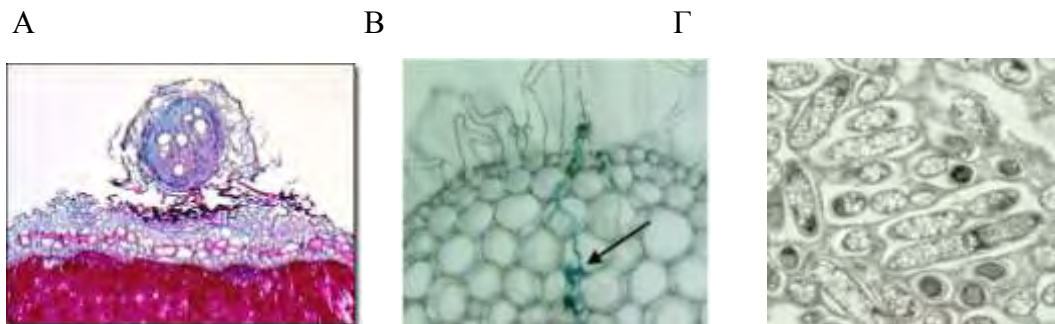


Εικόνα 1: Έναρξη σχηματισμού του φυματίου

Η περιοχή της ρίζας που είναι δεκτική στη μόλυνση από τα ριζόβια είναι αυτή των νεοαναπτυσσόμενων ριζικών τριχιδίων. Η πρώτη αντίδραση των ριζικών τριχιδίων στην παρουσία των ριζοβίων είναι η παραμόρφωσή τους. Μόλις τα βακτήρια έρθουν σε επαφή με το άκρο των ριζικών τριχιδίων του φυτού, δημιουργείται κύρτωση στο άκρο του τριχιδίου και τα βακτήρια που βρίσκονται

προσκολλημένα στο τριχίδιο παγιδεύονται μέσα σ' αυτή (Εικόνα 1). Εκείνη τη στιγμή συμβαίνουν

πολλές μορφολογικές αλλαγές στο φυτικό κύτταρο, όπως αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης (Ehrhardt *et al.*, 1992), αυξημένη ροή ασβεστίου, έκκριση πρωτονίων, αναδιοργάνωση των νηματίων ακτίνης (Allen *et al.*, 1994) και αναδιάταξη του κυτταροπλάσματος (Heidstra *et al.*, 1994). Στο σημείο επαφής το κυτταρικό τοίχωμα υδρολύεται (Callaham & Torrey, 1981; Van Spronsen *et al.*, 1994), παρατηρείται εγκόλπωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και στην περιοχή γύρω από την εγκόλπωση αρχίζει να εναποτίθεται νέο κυτταρικό τοίχωμα (Bauer, 1981; Newcomb, 1981; Brewin, 1991; Kijne, 1992). Η εναπόθεση νέου κυτταρικού τοιχώματος καταλήγει στο σχηματισμό μιας κυλινδρικής δομής που ονομάζεται **μολυσματικό νημάτιο** μέσω της οποίας εισέρχονται τα βακτήρια στο εσωτερικό του φυτού (Εικόνα 2B).



Εικόνα 2: Α) Φυμάτιο, Β) Μολυσματικό νημάτιο, Γ) Βακτηριοειδή

Ταυτόχρονα με το σχηματισμό του μολυσματικού νηματίου, ενεργοποιείται η κυτταροδιαίρεση των κυττάρων του φλοιώδους παρεγχύματος για να σχηματιστεί το αρχέφυτρο του φυματίου. Το μολυσματικό νημάτιο μεγαλώνει με κατεύθυνση προς το αρχέφυτρο του φυματίου και μόλις φτάσει εκεί τα βακτήρια απελευθερώνονται και εισέρχονται στο φυμάτιο με μια διαδικασία που μοιάζει με ενδοκύττωση (Basset *et al.*, 1977). Εντός του φυτικού κυττάρου τα ριζόβια χάνουν το κυτταρικό τους τοίχωμα και μεταπίπτουν στη συμβιωτική τους μορφή, τα **βακτηριοειδή** (Εικόνα 2Γ). Στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων τα βακτηριοειδή περιβάλλονται από μια μεμβράνη η οποία προέρχεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του φυτικού κυττάρου και ονομάζεται **περιβακτηριακή μεμβράνη**. Η πρωτεϊνική σύνθεση της

μεμβράνης αυτής διαφέρει από την αντίστοιχη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, γεγονός που της προσδίδει κάποιες ιδιαίτερες λειτουργίες (Verma, 1992). Η περιβακτηριακή μεμβράνη έχει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στο να ελέγχει την ανταλλαγή των μεταβολιτών μεταξύ φυτού και βακτηριοειδούς. Ο χώρος που δημιουργείται μεταξύ της περιβακτηριακής μεμβράνης και της μεμβράνης του βακτηριοειδούς ονομάζεται **περιβακτηριακός χώρος**. Η νεοσχηματισμένη δομή που αποτελείται από τα βακτηριοειδή μαζί με την περιβακτηριακή μεμβράνη που τα περιβάλλει, ονομάζεται **συμβίωση**. Μόλις απελευθερωθούν τα βακτήρια, το αρχέφυτρο του φυματίου διαφοροποιείται σε αζωτοδεσμευτικό φυμάτιο (Εικόνα 1Α).

1.2 Σηματοδότηση για εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης

Στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης ριζοβίου-ψυχανθούς κεντρικό ρόλο έχουν σηματοδοτικά μόρια όπως οι παράγοντες Nod ή οι λιπο-χιτο-ολιγοσακχαρίτες (Denarie *et al.*, 1996; Long, 1996; Oldroyd, 2001). Η παραγωγή τέτοιων σηματοδοτικών μορίων ενεργοποιείται από την απελευθέρωση φαινολικών ουσιών, κυρίως φλαβονοειδών, από το φυτό προς τη ριζόσφαιρα. Η παρουσία των ουσιών αυτών στη ριζόσφαιρα ενεργοποιεί την παραγωγή των Nod παραγόντων του κατάλληλου ριζοβιακού στελέχους μέσω επαγωγής των αντίστοιχων *nod* γονιδίων.

Πολύ σημαντικό στοιχείο στη σηματοδότηση των Nod παραγόντων αποτελεί το ασβέστιο (Ehrhardt *et al.*, 1996). Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι πραγματοποιούνται αλλαγές στη συγκέντρωση του ασβεστίου των ριζικών τριχιδίων οι οποίες επάγονται από τους παράγοντες Nod (Cardenas *et al.*, 2000). Παρατηρούνται δύο γεγονότα που αφορούν το ασβέστιο και διαφέρουν τοπικά και χρονικά. Το ένα είναι αυξημένη ροή ασβεστίου στην άκρη του ριζικού τριχιδίου και το άλλο είναι ταλάντευση συγκέντρωσης ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα (Oldroyd & Downie, 2004). Το ασβέστιο είναι ένας συχνός δευτερογενής αγγελιοφόρος που είναι πιθανό να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων ανταποκρινόμενος σε ένα σηματοδοτικό μόριο.

Ο υποδοχέας των Nod παραγόντων είναι πιθανότατα ένα ετεροδιμερές δύο τύπων κινασών που περιέχουν από έναν τομέα LysM στην εξωκυττάρια περιοχή (Limpens *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003). Οι τομείς LysM δεσμεύουν

πολυσακχαρίτες, ιδιαίτερα αλυσίδες γλυκοσαμινών, που αποτελούν το σκελετό των μορίων των Nod παραγόντων. Μεταλλάξεις στον υποδοχέα αυτό αποτρέπουν όλες τις αλλαγές που επάγονται από τους παράγοντες Nod, όπως είναι οι αλλαγές στο ασβέστιο (Amor *et al.*, 2003; Limpens *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003).

Επόμενα στοιχεία του σηματοδοτικού μονοπατιού φαίνεται να είναι το DMI1, που είναι πιθανώς ένα κανάλι κατιόντων, και το NORX/SYMRK/DMI2, άλλη μια κινάση με πλούσιες σε λευκίνη (Leu) επαναλαμβανόμενες περιοχές στο εξωκυττάριο τμήμα (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Ane *et al.*, 2004). Μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες αυτές αποτρέπουν τις αλλαγές που επάγονται από τους παράγοντες Nod, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στο ασβέστιο (Wais *et al.*, 2000; Shaw & Long, 2003). Η παρουσία κινασών εμπλέκει φωσφορυλιώσεις αρκετά νωρίς στο μονοπάτι σηματοδότησης των Nod παραγόντων, δείχνοντας ότι οι στόχοι των κινασών αυτών είναι βασικής σημασίας για τη σύνδεση της υποδοχής των Nod παραγόντων με την ενεργοποίηση των αλλαγών στο ασβέστιο.

Η πρωτεΐνη DMI3 από το *M. truncatula* είναι απαραίτητη για τη σηματοδότηση, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο *dmi3* είναι φαινοτυπικά όμοιες με τις *dmi1* και *dmi2*, εκτός από το γεγονός ότι μπορούν να ενεργοποιηθούν οι αλλαγές στο ασβέστιο (Catoira *et al.*, 2000; Wais *et al.*, 2000). Αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση στις αλλαγές ασβεστίου προηγείται της λειτουργίας της πρωτεΐνης DMI3, οπότε είναι πολύ πιθανό η πρωτεΐνη αυτή να αποκωδικοποιεί το σήμα των αλλαγών στο ασβέστιο και στη συνέχεια να το μεταδίδει. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η DMI3 είναι μια χειμαιρική ασβέστιο/καλμοδουλίνη-εξαρτώμενη κινάση (Levy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004a).

1.3 Οι πρωτεΐνες που φέρουν επαναλήψεις Argm και πολυλειτουργικότητά τους

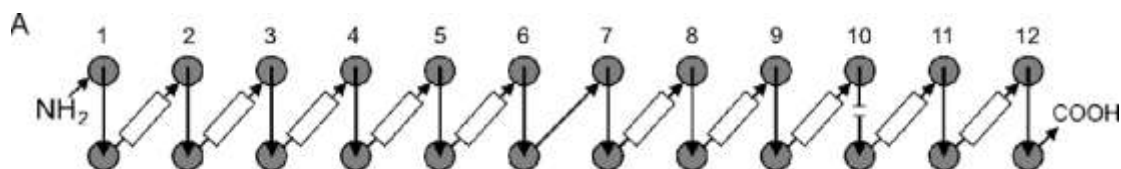
Δίκτυα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών ρυθμίζουν έναν αριθμό ποικίλων κυτταρικών διεργασιών όπως είναι η γονιδιακή έκφραση, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών, η διακίνηση των κυστιδίων και η μεταγωγή σήματος. Σε αυτές τις διαδικασίες διαμεσολαβεί μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνικών περιοχών αλληλεπίδρασης που είναι παρούσες σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Bomberg-Bauer *et al.*, 2005). Ενώ περιοχές

αλληλεπίδρασης μπορούν να υφίστανται σαν ανεξάρτητες κασέτες, υπάρχουν επίσης και περιοχές όπου πολλαπλές επαναλήψεις του ίδιου μοτίβου συναρμολογούνται για να σχηματίσουν μία μεγαλύτερη επιφάνεια πρόσδεσης. Ένα τέτοιο μοτίβο είναι και οι Armadillo (Arm) επαναλήψεις, μήκους περίπου 42 αμινοξέων, οι οποίες αναγνωρίστηκαν πρώτη φορά στην πρωτεΐνη *β-κατενίνη* που κωδικοποιείται από το γονίδιο πολικότητας της *Drosophila*, *armadillo* (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Peifer *et al.*, 1994; Riggleman *et al.*, 1989). Οι επαναλήψεις Arm βρίσκονται στα πρωτεώματα όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών. Γονιδιωματική ανάλυση 52 ευκαρυωτικών οργανισμών αποκάλυψε ότι οι επαναλήψεις Arm σχετίζονται συχνά με έναν αριθμό διαφορετικών δομικών περιοχών, μερικές από τις οποίες έχουν μοναδική οργάνωση ανάλογα με το αν βρίσκονται σε φυτικό ή ζωικό οργανισμό. Πρωτεΐνες με επαναλαμβανόμενες Arm περιοχές είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο σε ένα αριθμό διαφορετικών κυτταρικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένης και της μεταγωγής σήματος, της ρύθμισης του κυτταροσκελετού, της εισαγωγή στον πυρήνα, καθώς και της μεταγραφικής ρύθμισης και ουβικουτινίωσης. Οι πιο γνωστές Arm πρωτεΐνες περιλαμβάνουν την οικογένεια των importin α , που εντοπίζονται σε όλους τους ευκαρυώτες, καθώς και τη *β-κατενίνη* των μεταζώων και τις φυτικές U-box-Arm πρωτεΐνες (Samuel *et al.*, 2006).

1.4 Δομή των περιοχών με επαναλήψεις Arm

Οι περιοχές με επαναλήψεις Arm ανήκουν σε μια ευρύτερη τάξη περιοχών, με ελικοειδείς επαναλήψεις στις οποίες περιλαμβάνονται επαναλαμβανόμενα μοτίβα όπως τα HEAT, τα τετρατρικοπεπτίδια καθώς και επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (Groves and Barford, 1999). Τα μοτίβα αυτά βασίζονται σε σειριακές, πολλαπλές ελικοειδείς δομικές μονάδες οι οποίες δεν εμφανίζουν λειτουργικότητα μόνες τους, αλλά συναρμολογούνται σε μοναδικές υπερελικοειδείς δομές και δίνουν ειδικές περιοχές αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών (Groves and Barford, 1999). Σε αμινοξικό επίπεδο, διαφορετικές Arm επαναλήψεις επιδεικνύουν χαμηλή συντήρηση της αλληλουχίας τους ανάμεσα σε πρωτεΐνες, αλλά διατηρούν υψηλό επίπεδο συντήρησης της συνολικής δομής τους. Για παράδειγμα, η κρυσταλλογραφική ανάλυση της δομής των Arm επαναλήψεων της *β-κατενίνης* της *Drosophila* αποκάλυψε ότι κάθε επανάληψη Arm συντίθεται από τρεις α -έλικες (H1-H3), από τις

οποιές μία μικρή α -έλικα, H1, είναι συνήθως τοποθετημένη κάθετα στις δύο μακρύτερες α -έλικες, H2 και H3, με τις δύο αυτές έλικες να βρίσκονται αντιπαράλληλα η μία της άλλης (Huber *et al.*, 1997). Η συνεχής τριπλέτα α -ελίκων σε 12 Arm επαναλήψεις στη β -κατενίνη διπλώνει για να σχηματίσει μία δεξιόστροφη υπερέλικα από α -έλικες (Εικόνα 3A).



Εικόνα 3: Τοπολογία των Arm επαναλήψεων στη β -κατενίνη: τα παραλληλόγραμμα και οι κύκλοι αντιπροσωπεύουν τις τρεις α -έλικες για κάθε μία από τις 12 Arm επαναλήψεις στη β -κατενίνη.

1.6 Πρωτεΐνες με επαναλήψεις Arm στα φυτά

Όπως συμβαίνει και στα υπόλοιπα ευκαρυωτικά συστήματα, τα φυτικά γονιδιώματα αναμένεται να έχουν μία ποικιλία γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που διαθέτουν δομικές περιοχές με επαναλήψεις Arm. Ανάλυση με μεθόδους βιοπληροφορικής των αλληλουχημένων γονιδιωμάτων των *Arabidopsis thaliana* (δικοτυλήδο), *Oryza sativa* subsp. *japonica* (ρύζι, μονοκοτυλήδο) και του πρωτόγονου μονοκύτταρου πράσινου φύκου, *Chlamydomonas reinhardtii*, αποκαλύπτουν όχι μόνο ενδιαφέρουσες συντηρημένες πρωτεΐνες με επαναλήψεις Arm ανάμεσα σε αυτά τα εξελικτικώς διαφορετικά είδη αλλά και οργανώσεις περιοχών που είναι μοναδικές στα πολυκύτταρα *Arabidopsis* και *Oryza* (Samuel *et al.*, 2006). Παρ' αυτά, οι λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών δεν είναι γενικότερα γνωστές και μόνο λίγες καλά χαρακτηρισμένες φυτικές πρωτεΐνες με επαναλήψεις Arm έχουν συσχετισθεί με βιολογικές λειτουργίες. Αυτές περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες του *Brassica* ARC1 (Gu *et al.*, 1998), της πατάτας PHOR1 (Amador *et al.*, 2001), του καπνού *NtPUB4* (Kim *et al.*, 2003), του ρυζιού SPL11 (Zeng *et al.*, 2004) και τις πρωτεΐνες του *Arabidopsis* UPL3/KAKTUS, ARIA, IMP α 3/MOS6 (Downes *et al.*, 2003; El Refy *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004a; Palma *et al.*, 2005). Οι

λειτουργίες τους αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα φυτικών βιολογικών διαδικασιών που ρυθμίζονται από τις πρωτεΐνες που φέρουν επαναλήψεις Arm.

1.7 Δομικές περιοχές που συναντώνται σε φυτικές πρωτεΐνες ταυτόχρονα με τις επαναλήψεις Arm

Προηγούμενες μελέτες του πρωτεόματος του *Arabidopsis* με μεθόδους βιοπληροφορικής ανάλυσης, έχουν βρει (α) μεγάλους αριθμούς αναμενόμενων Arm πρωτεϊνών και (β) μία ποικιλία τρόπου οργάνωσης δομικών περιοχών που σχετίζονται με τις επαναλήψεις Arm (Coates, 2003; Mudgil *et al.*, 2004). Εξαιτίας της διαθεσιμότητας και των αλληλουχημένων γονιδιωμάτων τους, η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε και στο *Oryza* και στο *Chlamydomonas*. Υπάρχουν αρκετές και ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις που μπορούν να γίνουν από τη σύγκριση των Arm πρωτεϊνών των *Arabidopsis*, *Oryza* και *Chlamydomonas*. Η πιο εμφανής παρατήρηση που προέκυψε είναι ότι η μεγαλύτερη τάξη των πρωτεϊνών με Arm επαναλήψεις ανήκει στη φυτική οικογένεια U-box (PUB) (Azevedo *et al.*, 2001; Mudgil *et al.*, 2004). Οι PUB πρωτεΐνες περιέχουν μία δομική περιοχή U-box που συναντάται στις E3 λιγάσες της ουβικιτίνης και παίζει ρόλο στην ουβουκουιτινώση και στη σηματοδότηση για αποδόμηση μέσω του 26S πρωτεοσώματος (Hatakeyama and Nakayama, 2003). Αυτή η τάξη δεν αντιπροσωπεύεται στο *Chlamydomonas*, πιθανόν υποδεικνύοντας ότι αυτές οι πρωτεΐνες βρίσκονται αποκλειστικά σε πολυκύτταρους οργανισμούς. Ανάμεσα στις PUB-Arm πρωτεΐνες, βρίσκεται μία ομάδα που περιέχει μία δομική περιοχή πρωτύτερα αναγνωρισμένη, την UND (U-box N-terminal domain; Mudgil *et al.*, 2004). Η λειτουργία αυτής της συντηρημένης περιοχής είναι άγνωστη, αλλά η UND περιοχή είναι συντηρημένη τόσο στο *Arabidopsis* όσο και στο Ρύζι και αριθμεί 16 μέλη σε κάθε είδος. Άλλα είδη δομικών περιοχών εκτός των U-box και UND, είναι οι KISC και C2 περιοχές. Δομικές περιοχές που εμφανίζονται τόσο στο *Arabidopsis* όσο και στο Ρύζι και το *Chlamydomonas* είναι η BTB περιοχή, η περιοχή πρωτεϊνικής κινάσης και η περιοχή που εμφανίζει συνδυασμό των patatin/LRR. Ο συνδυασμός των περιοχών F-box/LRR είναι μοναδικός για το *Arabidopsis*. Όσον αφορά σε πιθανές λειτουργίες αυτών των περιοχών, οι επαναλήψεις Arm μαζί με τις LRR είναι γνωστό ότι συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με πρωτεΐνες. Η U-box περιοχή βρίσκεται στην E3 υπομονάδα της λιγάσης της ουβικιτίνης ενώ οι F-box και BTB βρίσκονται σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με πολλαπλές υπομονάδες E3

λιγασών της ουβικιτίνης (Pintard *et al.*, 2004; Smalle and Vierstra, 2004). Το εύρος των λειτουργιών που σχετίζονται με αυτές τις διαφορετικές περιοχές υποδεικνύει ότι πρωτεΐνες με επαναλήψεις Arm εμπλέκονται σε μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών, με την πρωτεϊνική ουβικουιτινίωση να έχει το βασικό ρόλο.

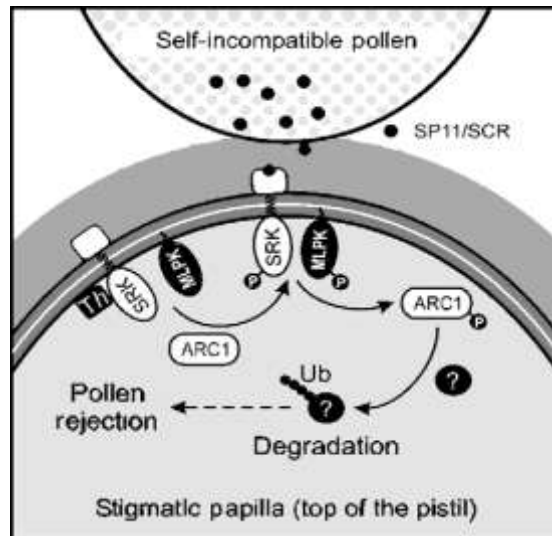
1.8 Φυτικές U-box Arm E3 λιγάσες της ουβικουιτίνης

Η μεγαλύτερη οικογένεια με επαναλήψεις Arm, στο *Arabidopsis* και στο Ρύζι, είναι αυτή των PUB-Arm πρωτεϊνών, οι οποίες φέρουν μία αναμενόμενη U-box περιοχή που έχει δράση E3 λιγάσης της ουβικιτίνης (Hatakeyama and Nakayama, 2003). Σύμφωνα με αυτό το ρόλο είναι τα αποτελέσματα μελέτης και άλλων φυτικών PUB-Arm πρωτεϊνών, που φαίνεται να έχουν δράση E3 λιγάσης της ουβικιτίνης *in vitro* (Mudgil *et al.*, 2004; Stone *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2005). Ανάλυση των δημόσιων βάσεων δεδομένων που περιέχουν μικροσυστοιχίες του *Arabidopsis* υποδεικνύουν ότι τα γονίδια PUB-Arm εκφράζονται σε έναν αριθμό διαφορετικών ιστών και κάτω από μία ποικιλία συνθηκών ανάπτυξης, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι πρωτεΐνες ενδέχεται να εμπλέκονται σε ένα εύρος αποκρίσεων και αναπτυξιακών διαδικασιών (Craigon *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2005; Toufighi *et al.*, 2005, Zimmerman *et al.*, 2005). Αρκετές αναλύσεις έκφρασης έχουν δείξει επίσης ότι τα επίπεδα του mRNA για επιλεγμένα PUB-Arm γονίδια αυξάνονται ταχέως ως απόκριση σε παθογόνα. Ένα ενδιαφέρον θέμα που προκύπτει από αυτές τις μελέτες είναι η επίπτωση των PUB-Arm πρωτεϊνών στη σηματοδότηση μέσω φυτικών υποδοχέων με δράση κινάσης. Οι περιοχές Arm πιστεύεται ότι διαμεσολαβούν στη σηματοδότηση μέσω δέσμευσής τους στην περιοχή της κινάσης (Samuel *et al.*, 2006)

1.9 Λειτουργικά παραδείγματα PUB-Arm πρωτεϊνών στα φυτά

1.9.1 Ρόλος της Brassica ARC1 στην αναγνώριση και απόρριψη ασύμβατης γύρης

Το καλύτερα μελετημένο παράδειγμα στον τομέα αλληλεπίδρασης PUB-Arm πρωτεϊνών με κινάσες είναι αυτό της πρωτεΐνης ARC1 του φυτού *Brassica*, η οποία αλληλεπιδρά με τον S υποδοχέα με δράση κινάσης (SRK) ως μέρος της απόκρισης αυτό-ασυμβατότητας της γύρης. Η πρωτεΐνη ARC1 του *Brassica napus* ταυτοποιήθηκε αρχικά ως μία αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη με την SRK (Gu *et al.*, 1998). Στο *Brassica*, υπάρχει ένα σύστημα αυτο-ασυμβατότητας που εμποδίζει την αυτογονιμοποίηση και προάγει την ετεροδιασταύρωση (Takayama and Isogai, 2005). Η SRK, τοποθετημένη στο στίγμα στην κορυφή του ύπερου του άνθους, αποτελεί συστατικό - κλειδί σε αυτό το σύστημα και είναι υπεύθυνη για την ανίχνευση της γύρης που προέρχεται από το ίδιο το φυτό και ξεκινά το σηματοδοτικό μονοπάτι για την απόρριψή της (Silva *et al.*, 2001; Takasaki *et al.*, 2000). *In vitro*, η ARC1 δεσμεύεται μόνο σε φωσφορυλιωμένη SRK, μέσω της Arm περιοχής, συνεπώς είναι πιθανό να δεσμεύεται στην ενεργοποιημένη SRK ως ενδοκυτταρική σηματοδοτική πρωτεΐνη που βρίσκεται καθοδικά στο μονοπάτι (Gu *et al.*, 1998). Παρομοίως με την SRK, η ARC1 εκφράζεται μόνο στο στίγμα (Gu *et al.*, 1998). Η ARC1 περιέχει έξι με επτά Arm επαναλήψεις στο καρβοξυ-τελικό μισό της πρωτεΐνης και U-box στο κέντρο. Η ARC1 περιέχει επίσης και μία UND περιοχή, η οποία μπορεί να απαρτίζεται από πολλαπλά συντηρημένα μοτίβα, καθώς αυτή η περιοχή φέρει το λειτουργικό σήμα για πυρηνική τοποθέτηση μαζί με δύο περιοχές αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών, ένα φερμουάρ λευκίνης και μία ελικοειδή έλικα (Stone *et al.*, 2003). *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η ARC1 εμφανίζει δράση E3 λιγάσης της ουβικιτίνης και μπορεί, με έναν U-box εξαρτώμενο τρόπο, να σημαδέψει ένα πρωτεϊνικό υπόστρωμα με ουβικιτίνη, οδηγώντας σε πρωτεόλυσή του από το 26S πρωτεάσομα (Stone *et al.*, 2003). Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα των ερευνών φάνηκε ότι η ARC1 είναι θετικός τελεστής της απόκρισης στην αυτό-γονιμοποίηση καθώς στοχεύει πρωτεΐνες-υποστρώματα για ουβικουτινίωση και αποδόμηση ως μέρος αυτής της απόκριση (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Μοντέλο της *ARC1* σηματοδότησης στο μονοπάτι αυτο-ασυμβατότητας του *Brassica*. Μόλις ενεργοποιηθεί η *SRK* προσδένεται στην *ARC*, μία E3 λιγάση της ουβικιτίνης, με τρόπο που εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση. Αυτή η πρόσδεση στη συνέχεια επάγει την *ARC1* διαμεσολαβούμενη αποδόμηση των υποστρωμάτων που είναι απαραίτητα για τη γονιμοποίηση, μέσω του πρωτεοσώματος, οδηγώντας στην απόρριψη της ασύμβατης γύρης.

1.9.2 Άμεση ουβικουιτινώση του υποδοχέα *FLS2* από τις *PUB12/13* εξασθενεί την innate immune resistance στο *Arabidopsis*

Τα φυτά, για να εμποδίσουν την εξάπλωση των μολύνσεων έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ανοσίας που στηρίζονται στην ανίχνευση μοριακών μοτίβων από παθογόνους μικροοργανισμούς (PAMPs/MAMPs) μέσω υποδοχέων που αναγνωρίζουν τα συγκεκριμένα μοτίβα (PRRs) (Takeuchi O, Akira S. *et al.*, 2010; Boller T, Felix G. *et al.*, 2009; Jones JD, Dangl JL. *et al.*, 2006; Dodds PN, Rathjen JP. *et al.*, 2010). Ο *FLS2* (Flagellin-Sensing 2) του *Arabidopsis*, είναι ένας υποδοχέας πλούσιος σε επαναλήψεις λευκίνης και ομοιάζει με κινάση (LRR-RLK), βρίσκεται τοποθετημένος στην πλασματική μεμβράνη και είναι ο υποδοχέας της βακτηριακής φλαζελλίνης (Gomez-Gomez L, Boller T. *et al.*, 2000). Μόλις αντιληφθεί την παρουσία φλαζελλίνης, ο *FLS2* αλληλεπιδρά με μια άλλη LRR-RLK πρωτεΐνη, την *BAK1*. Η *BAK1* έχει βρεθεί επίσης να εμπλέκεται στη σηματοδότηση των μπρασσινοστεροειδών αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα των μπρασσινοστεροειδών (Chinchilla D, *et al.* 2007; Heese A, *et al.*, 2007; Li J, *et al.* 2002; Nam KH, Li J. *et al.*, 2002; Schulze B, *et al.* 2010). Η *BIK1*, μία κυτταροπλασματική κινάση που

ομοιάζει με υποδοχέα φωσφορυλιώνεται ταχέως παρουσία φλαζελλίνης και ενεργοποιεί το σύμπλεγμα FLS2/BAK1 (Lu D *et al.*, 2010; Zhang J *et al.*, 2010). Η αποδόμηση του FLS2 που επάγεται από τον προσδέτη, έχει προταθεί ότι είναι συζευγμένη με την ενεργοποίηση της σηματοδότησης εξαιτίας της φλαζελλίνης (Robatzek S, Chinchilla D, Boller T., 2006). Όσο σημαντική είναι η ενεργοποίηση των PRRs, τόσο κρίσιμη φαίνεται να είναι και η κατασταλτική ρύθμισή τους για την παρεμπόδιση της υπέρμετρης ή παρατεταμένης ενεργοποίησης των ανοσολογικών αποκρίσεων με επιζήμιες επιδράσεις στα φυτά-ξενιστές.

Για την ταυτοποίηση των στοιχείων της MAMP σηματοδότησης, πραγματοποιήθηκε δοκιμή δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα, χρησιμοποιώντας την περιοχή κινάσης της BAK1 ως “δόλωμα”. Ένα απ τα στοιχεία που βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την κινάση του BAK1, κωδικοποιούσε την καρβοξυτελική περιοχή της PUB13 του *Arabidopsis*. Η PUB13 είναι μία τυπική φυτική U-box (PUB) E3 λιγάση της ουβικιτίνης με ένα U-box στο αμινοτελικό άκρο (UND), μία περιοχή U-box και μία καρβοξυτελική περιοχή με επαναλήψεις ARMADILLO (Yee D, Goring DR., 2009; Azevedo C, Santos-Rosa MJ, Shirasu K. 2001). Για να ελεγχθεί η υπόθεση ότι η πλήρους μήκους PUB13 και η BAK1 αλληλεπιδρούν *in vivo*, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνισή τους ακολουθούμενη από παροδικό μετασχηματισμό πρωτοπλαστών. Αποδείχτηκε ότι η PUB13 αλληλεπιδρά με τη BAK1 ανεξάρτητα από την παρουσία της flg22, ενός πεπτιδίου 22 αμινοξικών καταλοίπων της φλαζελλίνης. Με παρόμοιες μεθόδους απόδειχτηκε ότι απουσία flg22, η αλληλεπίδραση ανάμεσα στον FLS2 και στην PUB13 ήταν ελάχιστα ανιχνεύσιμη ενώ παρουσία flg22 αλληλεπιδρούν ισχυρά. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η περιοχή Argm της PUB13 ήταν επαρκής για την αλληλεπίδραση με τον FLS2.

Στη συνέχεια, μιας και το flg22 ήταν αρκετό για να ξεκινήσει η αλληλεπίδραση του FLS2 τόσο με τη BAK1 όσο και με την PUB13, ερευνήθηκε αν η ύπαρξη αλληλεπίδρασης FLS2-PUB13 υπό την επίδραση του flg22 απαιτεί τον BAK1. Αυτό που αποδείχθηκε, σε μεταλλαγμένα φυτά *bak1-4*, είναι ότι η αλληλεπίδραση FLS2-PUB13 δεν ήταν ανιχνεύσιμη. Παρολ’ αυτά, η αλληλεπίδραση BAK1-PUB12 δεν απαιτεί τον FLS2 κάτι που αποδεικνύει ότι ο BAK1 αλληλεπιδρά ιδιοσυστατικά με τις PUB12/13 απουσία προσδέτη. Παρόμοια με την άμεση συσχέτιση του FLS2 με τη BAK1, παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση του FLS2 με την PUB13 μόλις 30 δευτερόλεπτα μετά από την προσθήκη flg22. Συνολικά, τα αποτελέσματα δείχνουν

ότι η BAK1 και οι PUB12/13 πιθανότατα υπάρχουν ως σύμπλοκο που στρατολογείται ταχύτατα στον υποδοχέα FLS2 με τη διέγερση από flg22.

Αυτό που είναι ενδιαφέρον, είναι ότι η BAK1 φωσφορυλιώνει άμεσα την PUB13. Η ικανότητα φωσφορυλίωσης εξαρτάται από την ενεργότητα κινάσης της BAK1, μιας και μεταλλάγματα της κινάσης δεν ήταν ικανά να φωσφορυλιώσουν την PUB13. Για τη διερεύνηση του ερωτήματος αν το flg22 μπορεί να ενισχύσει τη BAK1-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της PUB13, πραγματοποιήθηκε μια δοκιμή ανοσοκατακρήμνισης συμπλέγματος σε πρωτοπλάστες που είχαν εκτεθεί σε flg22 και εξέφραζαν τον πλήρους μήκους BAK1. Ο ανοσοκατακρημνισμένος BAK1 και όχι το μετάλλαγμα του, κατάφερε να φωσφορυλιώσει την PUB13. Ουσιαστικά, τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι PUB12/13 είναι υποστρώματα του BAK1 και ότι η παρουσία flg22 διεγείρει τη φωσφορυλίωση τους από τον BAK1.

Στη συνέχεια μέσω μιας δοκιμασίας *in vitro* ουβικουιτινίωσης αποδείχθηκε ότι οι PUB12 και PUB13 έχουν ικανότητα αυτό-ουβικουιτινίωσης και φαίνεται ότι πολύ-ουβικουιτινώνουν την κυτταροπλασματική περιοχή του FLS2. Συνεπώς οι PUB12/13 ουβικουιτινώνουν εξειδικευμένα τον PRR FLS2, αλλά όχι τον BAK1. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι το flg22 επάγει τη μετακίνηση του FLS2 σε ενδοκυτταρικά κυστίδια και στη συνέχεια την αποδόμησή του. Συνεπώς, η ουβικουιτινίωση συμβαίνει μόνο στον FLS2 και όχι στον BAK1, που είναι ένας συνηθισμένος «συνέταιρος» στη σηματοδότηση πολλών μεμβρανικών υποδοχέων που εμπλέκονται στην ανοσία και στην ανάπτυξη.

Συνοπτικά, η φλαζελλίνη επάγει τη στρατολόγηση δύο στενά σχετιζόμενων U-box E3 λιγασών της ουβικιτίνης, PUB12 και PUB13, στο σύμπλεγμα του υποδοχέα FLS2 στο *Arabidopsis*. Η BAK1 φωσφορυλιώνει τις PUB12/13 και απαιτείται για τη συσχέτιση των FLS2-PUB12/13. Οι PUB12/13 πολυουβικουιτινώνουν τον FLS2 και προάγουν την επαγόμενη από τη φλαζελλίνη, αποδόμηση του FLS2. Τα μεταλλάγματα pub12 και pub13 δείχνουν αυξημένα επίπεδα ανοσολογικής απόκρισης σε προσθήκη φλαζελλίνης.

1.9.3 Η πρωτεΐνη PHOR 1 της πατάτας ανταποκρίνεται στο φως και στη γιββερελλίνη

Οι γιββεριλλίνες (GAs) είναι φυτικές ορμόνες που ελέγχουν πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένης της βλάστησης των σπόρων και της ανάπτυξης των καρπών (Olszewski *et al.*, 2002; Peng and Harberd, 2002; Thomas and Sun, 2004). Στο φυτό της πατάτας, ο σχηματισμός των κονδύλων ελέγχεται τόσο από GAs όσο και από την ανάπτυξη σε μέρες με μικρή φωτοπερίοδο (Martinez-Garcia *et al.*, 2001). Η PHOR 1 (photoperiod responsive-1) ταυτοποιήθηκε ως το μετάγραφο που είναι άφθονο στα φυτά που μεγαλώνουν σε μικρή φωτοπερίοδο σε σχέση με φυτά που μεγαλώνουν σε μικρή φωτοπερίοδο η οποία ακολουθείται από μία περίοδο νύκτας. Τα επίπεδα έκφρασης της PHOR 1 ρυθμίζονται στα φύλλα επίσης με βάση τη φωτοπερίοδο (Amador *et al.*, 2001). Η πρωτεΐνη PHOR 1 περιέχει επτά Arm επαναλήψεις στην καρβοξυτελική περιοχή και ένα U-box στην αμινοτελική περιοχή (Amador *et al.*, 2001; Monte *et al.*, 2003). Η παρουσία U-box υποδηλώνει ότι η PHOR 1 ενδέχεται να λειτουργεί ως μία E3 λιγάση της ουβικιτίνης (Hatakeyama and Nakayama, 2003). Καταστολή της PHOR 1 με αντινοσηματικό κλώνο έδωσε έναν αριθμό επιδράσεων που συσχέτισαν την PHOR 1 με απόκριση στις GAs (Amador *et al.*, 2001). Οι GAs είναι γνωστό ότι προάγουν την επιμήκυνση του βλαστού για αυτό το λόγο και τα φυτά που προέκυψαν ήταν κοντύτερα από τα φυτά αγρίου τύπου. Φυτά στα οποία είχε γίνει υπερέκφραση της PHOR 1 παρουσίασαν χαρακτηριστικά αντίθετα απ αυτά των φυτών στα οποία είχε γίνει καταστολή (Amador *et al.*, 2001). Η πρωτεΐνη PHOR 1 βρέθηκε να αποκρίνεται σε παροχή GA, η οποία οδήγησε στην άμεση συσσώρευση PHOR 1 από το κυτόπλασμα στον πυρήνα (Amador *et al.*, 2001). Συνεπώς, η πρωτεΐνη PHOR 1 εμπλέκεται σε αποκρίσεις στις Gas, στις οποίες ενδεχομένως λειτουργεί ως E3 λιγάση της ουβικιτίνης.

1.9.4 Η NtPUB4 του καπνού αλληλεπιδρά με τον σχετιζόμενο με χιτινάση υποδοχέα κινάση-1 (CHRK 1)

Ο υποδοχέας-κινάση 1 που σχετίζεται με τη χιτινάση στον καπνό (CHRK1) είναι ένα νέο είδος φυτικού υποδοχέα-κινάση με εξωκυτταρική περιοχή που μοιάζει με

χιτινάση (Kim *et al.*, 2000). Καταστολή με αντινοηματικό κλώνο του CHRK1 βρέθηκε ότι προκαλεί αναπτυξιακά προβλήματα σε σπόρους, συμπεριλαμβανομένου και του σχηματισμού βλαστικού κάλλου, υποδηλώνοντας ότι αυτός ο υποδοχέας-κινάση είναι απαραίτητος για τη σωστή ανάπτυξη και αύξηση στον καπνό (Lee *et al.*, 2003).

Μέσω του συστήματος δύο υβριδίων ζυμομύκητα, που χρησιμοποιήθηκε για τη ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την περιοχή κινάσης του CHRK1, απομονώθηκε η *NtPUB4* (U-box πρωτεΐνη 4 του *Nicotiana tobacum*) (Kim *et al.*, 2003). Η *NtPUB4* φαίνεται να έχει μία UND περιοχή που ακολουθείται από ένα U-box και επτά επαναλήψεις Arm. Παρόμοια με την *BnARC1*, η περιοχή των Arm επαναλήψεων στην *NtPUB4* είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση στην περιοχή κινάσης του CHRK1. Οι επαναλήψεις Arm είναι απαραίτητες και επαρκείς για αυτήν την αλληλεπίδραση, αλλά η περιοχή ανάμεσα στο U-box και στις επαναλήψεις Arm προσθέτει επιπλέον ισχύ στην αλληλεπίδραση. Η *NtPUB4* έχει παρόμοιο προφίλ έκφρασης με τον CHRK1, με περιοχές άφθονης έκφρασης να είναι τα ανθισμένα λουλούδια και μειωμένης έκφρασης οι σπόροι, οι ρίζες, ο βλαστός και τα νεαρότερα λουλούδια (Kim *et al.*, 2003).

1.9.5 Το Spotted Leaf 11 ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό θάνατο και τις αποκρίσεις άμυνας στο Ρύζι

Η πρωτεΐνη spotted leaf 11 του Ρυζιού (SPL11) έχει παρόμοια αρχιτεκτονική με τις *NtPUB4* και *BnARC1* στις περιοχές UND, U-box και στις Arm επαναλήψεις. Η SPL11 προσδιορίστηκε μέσω μιας έρευνας φυτικών μεταλλαγμάτων που μιμούνται τις οργανικές βλάβες, ακόμα και απουσία παθογόνου, παρουσιάζοντας αυθόρμητα σε ορισμένες περιοχές προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Yin *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2002, 2004). Τα μεταλλαγμένα φυτά *spl11* βρέθηκαν ανθεκτικότερα σε σχέση με τα κανονικά, σε πολλά παθογόνα. Το γονίδιο εκφράζεται στα φύλλα, στο βλαστό και σε ριζικούς ιστούς. Αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου ανιχνεύθηκαν μετά από μόλυνση με παθογόνο. Ακολούθησαν δοκιμασίες *in vitro* ουβικουιτινώσης χρησιμοποιώντας διάφορες περιοχές της SPL11 πρωτεΐνης και επιβεβαιώθηκε ότι η U-box περιοχή έδινε τη δυνατότητα στην SPL11 να λειτουργεί ως μία E3 λιγάση της ουβικιτίνης. Στη συνέχεια έγιναν μεταλλάξεις σε βασικά κατάλοιπα που είχαν ως αποτέλεσμα την απώλεια αυτής της δράσης ουβικουιτινώσης (Zeng *et al.*, 2004).

Συνολικά, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η SPL11 εμπλέκεται σε βασικές αποκρίσεις άμυνας σε παθογόνες μολύνσεις στο Ρύζι, αν και το πώς η SPL11 λειτουργεί ώστε να ρυθμίσει αρνητικά τον κυτταρικό θάνατο δεν είναι ακόμα γνωστό (Zeng *et al.*, 2004)

1.9.6 Η ARIA του *Arabidopsis* εμπλέκεται σε αποκρίσεις αβιοτικής καταπόνησης

Η φυτική ορμόνη αβισικό οξύ (ABA) έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικός ρυθμιστής της φυτικής αύξησης καθώς και της απόκρισης σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις, διαφοροποιώντας έναν αριθμό ποικίλων μεταγραφικών αποκρίσεων (Chinnusamy *et al.*, 2004; Giraudat, 1995; Gubler *et al.*, 2005; Mauch-Mani and Mauch, 2005). Ο ABF2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που διαμεσολαβεί στη ρύθμιση, μέσω ABA, των γονιδίων που αποκρίνονται στις καταπονήσεις (Fujita *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004b; Rushton *et al.*, 1995). Σε ένα σύστημα δύο υβριδίων για την εύρεση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον ABF2, η πρωτεΐνη με επαναλήψεις Arm, ARIA (Arm repeat protein interacting with ABF2) ήταν μία από τις δύο πρωτεΐνες που απομονώθηκαν (Kim *et al.*, 2004a). Η ARIA έχει 9 Arm επαναλήψεις μαζί με μία καρβοξυτελική BTB περιοχή (Kim *et al.*, 2004a;). Η περιοχή BTB είναι μια περιοχή αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών και σχετίζεται με E3 λιγάσες της ουβικιτίνης που φέρουν πολλαπλές υπομονάδες (Pintard *et al.*, 2004). *In vitro* μελέτες πρόσδεσης επαλήθευσαν ότι τόσο η πλήρους μήκους όσο και η περιοχή των επαναλήψεων Arm ή η BTB περιοχή είναι ικανές να δεσμεύονται στον ABF2, με την ισχυρότερη αλληλεπίδραση να παρατηρείται με την πλήρους μήκους πρωτεΐνη. Τόσο ο ABF2 όσο και η ARIA έχουν αυξημένη συσσώρευση με προσθήκη αλάτων και ABA. Και οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονται τοποθετημένες στον πυρήνα, η ARIA όμως μπορεί να παρατηρηθεί και στην πλασματική μεμβράνη (Kim *et al.*, 2004a). Αν η ARIA λειτουργεί ως συν-ρυθμιστής του ABF2 ή είναι μέρος των πολλαπλών υπομονάδων του συμπλέγματος της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης ώστε να ρυθμίζει τον ABF2 ακόμα δεν έχει καθοριστεί.

1.9.7 Ο ρόλος της UPL3/KAKTUS στην ανάπτυξη του τριχώματος και της ενδο-αντιγραφής στο *Arabidopsis*

Ο ενδοαναδιπλασιασμός είναι μια διαδικασία κατά την οποία το κύτταρο αποτυγχάνει να διαιρεθεί αλλά συνεχίζει να αντιγράφει το DNA του, έχοντας ως αποτέλεσμα αυξημένο επίπεδο πλοειδίας (Traas *et al.*, 1998). Ένα πρότυπο σύστημα για έναν τέτοιο κύκλο ενδο-αντιγραφής παρατηρήθηκε στο τρίχωμα του *Arabidopsis* (Hülkamp *et al.*, 1994). Το τρίχωμα προκύπτει από μεγάλα, μοναδικά επιδερμικά κύτταρα που υπόκεινται σε τέσσερις κύκλους ενδο-αντιγραφής και εκφύονται σχηματίζοντας ένα κεντρικό στέλεχος με τρεις διακλαδώσεις στην κορυφή. Μελέτες γενετικής σε μεταλλάγματα στα οποία έχει επηρεαστεί η διαφοροποίηση του τριχώματος, έχουν οδηγήσει στη ταυτοποίηση ενός αριθμού γονιδίων στο *Arabidopsis* (Hülkamp *et al.*, 1994). Ένα από τα γονίδια που εμπλέκεται σε αυτήν τη διαδικασία αντιστοιχεί στο γενετικό τόπο *KAKTUS* και έχει ταυτοποιηθεί ως καταστολέας του ενδοαναδιπλασιασμού. Απουσία λειτουργικής πρωτεΐνης *KAKTUS* οδηγεί σε τρίχωμα με υπεράριθμες διακλαδώσεις (Perazza *et al.*, 1999). Οι El Refy *et al.* (2003) χαρτογράφησαν τα μεταλλάγματα *kak* και ανακάλυψαν ότι συνέπηπταν με το γονίδιο UPL3. Η UPL3 ανήκει στην οικογένεια E3 λιγασών της ουβικιτίνης με περιοχή HECT και φέρει μια περιοχή με επαναλήψεις Argm στο αμινοτελικό άκρο (Downes *et al.*, 2003; El Refy *et al.*, 2003;). Η UPL3, ως ένας καταστολέας που ρυθμίζει τον αριθμό των κύκλων ενδο-αντιγραφής και ως μία πιθανή E3 λιγάση της ουβικιτίνης, έχει προταθεί ότι παίζει ένα ρόλο στην αποδόμηση των θετικών ρυθμιστών σε αυτήν τη διαδικασία. Δεν είναι γνωστό σε ποιο στάδιο λειτουργεί η UPL3, καθώς και αν πρόκειται για κάποιον αρνητικό ρυθμιστή του σήματος GA όπως προτάθηκε από τους El Refy *et al.* (2003) ή για έναν αρνητικό ρυθμιστή μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι GL1, GL2 και TTG, που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του τριχώματος, όπως προτάθηκε από τους Downes *et al.* (2003). Ορθόλογα της UPL3 βρίσκονται τόσο στο Ρύζι όσο και στη *Chlamydomonas*, υποδηλώνοντας μία εξελικτική συντήρηση αυτής της πρωτεΐνης, πιθανότατα για τη ρύθμιση του ενδοαναδιπλασιασμού.

1.10 Το φυτό *L. japonicus* και ο μικροσυμβιώτης του *M. loti*

Η οικογένεια των *Leguminosae* (*Fabaceae*), η οποία είναι και η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια Αγγειόσπερμων, περιέχει ένα σημαντικό αριθμό καλλιεργούμενων φυτών και ξυλώδων δέντρων που παράγουν πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λάδι για ανθρώπινη κατανάλωση αλλά και για ζωοτροφές. Τα ψυχανθή είναι “πρωτοπόρα” φυτά που μπορούν να αναπτυχθούν σε εδάφη φτωχά σε θρεπτικά στοιχεία, στηριζόμενα στις συμβιωτικές σχέσεις που εγκαθιδρύουν με αζωτοδεσμευτικά ριζόβια βακτήρια και με μύκητες που τους προσφέρουν τον απαιτούμενο φώσφορο. Αυτά τα φυσικά χαρακτηριστικά ευνόησαν την επιλογή των ψυχανθών στη γεωργία και τα έκαναν μέρος ενός αειφόρου γεωργικού συστήματος. Με κοντά στα 18,000 περίπου είδη, η οικογένεια των ψυχανθών περιλαμβάνει πολλά καλλιεργούμενα είδη. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος θα άξιζε η εφαρμοσμένη, βοτανική και βασική έρευνα πάνω σε ένα φυτό μοντέλο. Η μικρή ικανότητα του *Arabidopsis* να εγκαθιδρύσει συμβιωτική σχέση με μυκόρριζες καθώς και η ανικανότητά του να σχηματίζει αζωτοδεσμευτικά φυμάτια με το *Rhizobium* απέδειξε ότι δε θα ήταν δυνατό να αποτελέσει και φυτό-πρότυπο για τη μελέτη των ψυχανθών. Ένα από τα φυτά μοντέλα που επιλέχθηκαν να αντικαταστήσουν το *Arabidopsis* είναι το *Lotus japonicus* κυρίως γιατί προσφέρει μια πληθώρα πλεονεκτημάτων που διευκολύνουν τη μελέτη του. Έτσι ως φυτό μοντέλο έχει υψηλή απόδοση μετασχηματισμού, πολλαπλασιάζεται με αυτό-επικονίαση, έχει μικρού μεγέθους γένωμα (περίπου 450 MB), έχει μικρό μέγεθος το ίδιο το φυτό, ευδιάκριτους σπόρους και μικρό χρόνο ζωής (περίπου τρεις μήνες).

Ο σκοπός της μελέτης των *Mesorhizobium* είναι κυρίως η περαιτέρω κατανόηση της διαδικασίας της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης καθώς και η οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανάμεσα σε φυσικούς μικροσυμβιώτες. Το *Mesorhizobium loti* απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα του *Lotus japonicus* σε περιοχές της Νέας Ζηλανδίας και της Κίνας. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να βρεθούν και σε άλλα είδη *Lotus*. Το *Mesorhizobium loti* είναι μέλος των ριζόβιων και βρίσκονται στο έδαφος και στη ριζόσφαιρα φυτών με τα οποία αναπτύσσουν συμβιωτική σχέση αζωτοδέσμευσης. Πρόκειται για ένα κινούμενο, Gram-αρνητικό βακτήριο που δεν μπορεί να εκτελέσει τη δέσμευση του αζώτου χωρίς φυτό ξενιστή.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1 Φυτικό υλικό, συνθήκες ανάπτυξης και βακτηριακά στελέχη

Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του φυτού *L. japonicus* (Gifu B-129). Οι σπόροι επώαστηκαν στους 4°C για 24 ώρες ώστε να διακοπεί ο λήθαργος και την επόμενη μέρα έγινε η απολύμανσή τους. Για την απολύμανση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα χλωρίνης 20% και επώαση για 1 λεπτό και στη συνέχεια έγιναν πλύσεις με απιονισμένο H₂O. Οι σπόροι επιστρώθηκαν σε θρεπτικό MS. Τα νεαρά φυτά μολύνθηκαν με καλλιέργεια *Mesorhizobium loti* (στέλεχος R7a) που είχε αναπτυχθεί μέχρι OD₆₀₀=0,1. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον με φωτοπερίοδο 16 ώρες μέρα/8 ώρες νύχτα, θερμοκρασία 22 °C την ημέρα/18 °C τη νύχτα και υγρασία 70% (Handberg & Stougaard, 1992).

2.1.2. Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* με πλασμιδιακό DNA

1. Σε 100μl δεκτικών κυττάρων DH5a προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA.
2. Το μείγμα αναμιγνύεται και επώάζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
3. Ακολουθεί θερμικό σοκ με επώαση για 2 λεπτά στους 42°C.
4. Επώαση για 1λεπτό στον πάγο και για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμιξη του δείγματος και επώαση για 1 ώρα στους 37°C.
6. Φυγοκέντρωση στις 3000rpm για 5 λεπτά και αφαίρεση περίπου 800μl LB.
7. Επαναδιάλυση του ιζήματος.
8. Κατάλληλη ποσότητα του δείγματος επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει ως μέσο επιλογής αντιβιοτικό. Σε περίπτωση πλασμιδιακού φορέα που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, υπάρχει η δυνατότητα επιλογής μπλε/άσπρων αποικιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη στο θρεπτικό μέσο του χρωμοφόρου υποστρώματος X-gal και

του παράγοντα IPTG που δρα σαν επαγωγέας του υποκινητή του lacZ γονιδίου, σε τελικές συγκεντρώσεις 5mM και 50mM αντίστοιχα.

9. Επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 12-16 ώρες.

2.1.3. Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα

1. Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους το οποίο πρόκειται να αποθηκευτεί, αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών στους 37°C για 12 ώρες.
2. 700μl από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρονται σε αποστειρωμένο φιαλίδιο erpendorf.
3. Προσθέτονται 300μl γλυκερόλης 99%.
4. Το μείγμα αναμιγνύεται έντονα και ψύχεται σε υγρό άζωτο.
5. Αποθήκευση στους -80°C.

2.1.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *Escherichia coli*

A. Μέθοδος αλκαλικής λύσης με το plasmid purification kit της Macherey-Nagel.

B. Μέθοδος boiling prep:

1. Γέμισμα του erpendorf 2 φορές (2x1,5ml) και φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στις 6000rpm.
2. Αφήνεται να στεγνώσει από το θρεπτικό και να μείνει μόνο το ίζημα.
3. Προσθήκη 300μl STET pH 8 και ανάδευση.
4. Βρασμός σε νερό για 45 δευτερόλεπτα.
5. Φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 20 λεπτά.
6. Απομάκρυνση του ιζήματος.
7. Προσθήκη 360μl ισοπροπανόλης, φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου.

8. Ξέπλυμα με 300μl αιθανόλης 70%, φυγοκέντρωση στις 13000rpm για 5 λεπτά και αφήνεται να στεγνώσει.
9. Επαναδιάλυση σε 30 μl H₂O.

2.1.5 Απομόνωση RNA από φυτά *Lotus japonicas*

Απομόνωση RNA με RNA from plants extraction kit της Macherey-Nagel και RNA extraction kit της Qiagen.

2.1.6. Απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα ολικού RNA

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης του RNA από τους φυτικούς ιστούς απομονώνεται και μέρος του γονιδιωματικού DNA, επομένως, απαιτείται ο καθαρισμός του RNA από το γονιδιωματικό DNA. Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται σε ένζυμα που κόβουν - καταστρέφουν το DNA, ενώ ταυτόχρονα αφήνουν ανέπαφο το RNA.

A. Απομάκρυνση του DNA με τη χρήση ενζύμου DNase της εταιρίας invitrogen:

1. 0,5μl αναστολέα RNase
2. 1 μg δείγματος RNA
3. 1μl 10x DNase I ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης
4. 1μl DNase I Amp Grade, 1u/μl
5. Απιονισμένο H₂O μέχρι τα 10μl

Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Απενεργοποίηση του ενζύμου: 1μl 25mM EDTA και θέρμανση για 10 λεπτά στους 65° C.

B. Απομάκρυνση του DNA με τη χρήση ενζύμου DNase της εταιρίας promega :

1. 0,5μl RNase out
2. 2μg δείγματος RNA
3. 1μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα
4. DNase 1u/ μg RNA

Επώαση στους 37° C για 1 ώρα και στη συνέχεια καθαρισμός από το ένζυμο με φαινόλη-χλωροφόρμιο.

1. Προσθήκη H₂O για να φτάσει στα 150 μl το δείγμα.
2. Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης και ανάδευση για ½ λεπτό.
3. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά και κρατάμε το υπερκείμενο
4. Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης-χλωροφόρμιου.
5. Ανάδευση για ½ λεπτό και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά.
6. Συλλέγεται το υπερκείμενο και προστίθεται 150 μl χλωροφόρμιου, ανάδευση για ½ λεπτό και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 3λεπτά.
7. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθεται 1/10 του όγκου CH₃COONa pH 5,3 και 3 όγκοι αιθανόλης 100%. Το δείγμα τοποθετείται στους -80° C για 20 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στους 4° C για 30 λεπτά.
8. Συλλογή υπερκείμενου και προσθήκη 500μl κρύας αιθανόλης 70%, φυγοκέντρηση στους 4° C για 15 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα.
9. Αφαίρεση υπερκείμενου και επαναδιάλυση ιζήματος σε 12 μl H₂O.

2.1.7. Υπολογισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊνικών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA βασίστηκε στη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των προς εξέταση δειγμάτων στα 260nm και 280 nm. Η μέτρηση στα 260nm μας επιτρέπει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης τόσο του RNA όσο και του DNA σύμφωνα με το νόμο των Beer-Lambert. Σε καθαρά δείγματα RNA, όπου δεν υπάρχουν προσμίξεις, ο λόγος $O.D_{260}/O.D_{280}$ ισούται με 2. Ισχύει ότι οπτική απορρόφηση στα 260nm ίση με τη μονάδα, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση RNA ίση με 40μg/ml. Έτσι ο προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης του RNA υπολογίζεται από την εξίσωση :

$$[RNA]_{mg/ml} = 40_{mg/ml} \times O.D_{260} \text{ του δείγματος} \times \text{συντελεστή αραίωσης}$$

Σε καθαρά δείγματα DNA, όπου δεν υπάρχουν προσμίξεις, ο λόγος $O.D_{260}/O.D_{280}$ ισούται με 1,8. Επίσης ισχύει ότι οπτική απορρόφηση στα 260nm ίση με τη μονάδα, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA ίση με 50μg/ml. Έτσι ο προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης του DNA υπολογίζεται από την εξίσωση :

$$[DNA]_{mg/ml} = 50_{mg/ml} \times O.D_{260} \text{ του δείγματος} \times \text{συντελεστή αραίωσης}$$

2.2. Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων

2.2.1. Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος του μεγέθους των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αγαρόζης με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, μια χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και φθορίζει υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η αναλυτική ικανότητα της πηκτής αγαρόζης είναι ανάλογη της περιεκτικότητάς της σε αγαρόζη. Η συνήθης συγκέντρωση κυμαίνεται από 0.7%-2% αγαρόζη. Για την πιστοποίηση του μεγέθους χρησιμοποιείται μάρτυρας DNA γνωστού μοριακού βάρους.

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε **1x TAE**.
- Θέρμανση του μείγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διάφανο.
- Προσθήκη διαλύματος **βρωμιούχου αιθιδίου** σε τελική συγκέντρωση 0.005% v/v.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά την πήξη, απομακρύνεται η χτένα και προστίθεται στη συσκευή κατάλληλος όγκος διαλύματος 1x TAE που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης.
- Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται κατάλληλη ποσότητα **διαλύματος φόρτωσης**.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120V, ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού και την περιεκτικότητά της σε αγαρόζη.

2.2.2. Απομόνωση DNA υψηλής καθαρότητας από πηκτή αγαρόζης

- Το δείγμα αναλύεται ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 0.8-2%.
- Όταν η ζώνη που πρόκειται να απομονωθεί έχει διαχωριστεί ικανοποιητικά από τις υπόλοιπες, αφαιρείται με τη χρήση κοπιδίου.
- Για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκε η στήλη καθαρισμού και το πρωτόκολλο της εταιρίας Macherey-Nagel.

2.2.3. Αντίδραση ενοποίησης τμημάτων DNA

Η αντίδραση ενοποίησης είναι μια αντίδραση κατά την οποία δίκλινα μόρια DNA, με κολλώδη (5' ή 3' εξέχοντα άκρα) ή τυφλά άκρα ενώνονται μεταξύ τους.

Ο πλασμιδιακός φορέας και το τμήμα DNA προς ενοποίηση απομονώνονται και καθαρίζονται. Η συνήθης αναλογία άκρων πλασμιδιακού φορέα προς ένθετου DNA είναι 1:3. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι συνήθως 10μl.

- Σε φιαλίδιο erpendorf τοποθετείται κατάλληλη ποσότητα DNA από τον πλασμιδιακό φορέα και από το προς υποκλωνοποίηση ένθετο, σε μέγιστο τελικό όγκο 4μl.
- Προσθήκη 5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης
- Προσθήκη 1μl T4 DNA λιγάσης (1 unit/μl) (Takara)
- Το δείγμα επώαζεται στους 4⁰C για 14-16 ώρες

Στην περίπτωση ενοποίησης κομματιών με τυφλά άκρα, στην αντίδραση ενοποίησης χρησιμοποιείται μεγαλύτερη ποσότητα T4 DNA λιγάσης και η συνιστώμενη θερμοκρασία επώασης είναι οι 25⁰ C.

Ο υπολογισμός της ποσότητας DNA που χρησιμοποιείται για την αντίδραση ενοποίησης έγινε μέσω του τύπου:

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert} \times \frac{\text{insert}}{\text{vector}} \text{ molar ratio}}{\text{kb size of vector}}$$

2.2.4. Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Σε φιαλίδιο erpendorf προστίθενται κατάλληλος όγκος ddH₂O, 1/10 του όγκου του κατάλληλου 10x ρυθμιστικού διαλύματος ανάλογα με το ένζυμο, 1/10 του όγκου 10x BSA (Bovine Serum Albumin) εάν απαιτείται, κατάλληλη ποσότητα DNA και τέλος το ένζυμο περιορισμού.

10x ρυθμιστικό διάλυμα, τελικό ποσοστό

10%

10x BSA (όπου απαιτείται)

<i>Δείγμα DNA</i>	$\leq 80\%$
<i>Ένζυμο περιορισμού</i>	$\leq 10\%$
<i>ddH₂O</i>	<i>μέχρι 100%</i>

Ανάμειξη του δείγματος και επώαση 1-12 ώρες στους 37°C. Η άριστη θερμοκρασία δράσης διαφέρει μεταξύ των ενζύμων περιορισμού, αλλά για τα περισσότερα η άριστη θερμοκρασία είναι 37°C.

2.2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση ακολουθιών DNA. Ο πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών του DNA γίνεται με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Τα απαραίτητα συστατικά μιας αντίδρασης PCR είναι:

- Το δίκλωνο μόριο DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε.
- Ένα ζεύγος κατάλληλων εκκινητών που υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA και προσδιορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής (0,1-1μM).
- Μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (20-25 units/ml),
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (200μM από το καθένα) και
- Ιόντα Mg⁺²

Μια τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει σε πρώτη φάση την αποδιάταξη του DNA στόχου σε υψηλή θερμοκρασία. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας και υβριδισμός των εκκινητών στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες. Στην συνέχεια αυξάνουμε την θερμοκρασία για να γίνει η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων από την πολυμεράση. Οι τρεις αυτές διαδικασίες επαναλαμβάνονται από 20 έως 30 φορές με αποτέλεσμα η αλληλουχία στόχος να πολλαπλασιάζεται εκθετικά.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των κωδικών περιοχών των γονιδίων που έφεραν *Agm* επαναλήψεις στο φυτό *L. japonicus*

καθώς και για την δημιουργία κατάλληλων άκρων που επιτρέπουν την κλωνοποίησή τους στον φορέα έκφρασης. Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκαν κλώνοι που προέρχονταν από cDNA βιβλιοθήκη μολυσμένων και μη ριζών. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε είναι η Phusion από την Finnzymes.

Η αντίδραση πολυμεράσης που πραγματοποιήθηκε είχε ως εξής:

Αντιδραστήρια PCR	Πυκνό διάλυμα	όγκος	Τελική συγκέντρωση
Μήτρα DNA	-	-	10ng
Εκκινητής 1	100 μM	1μl	0,5μM
Εκκινητής 2	100 μM	1μl	0,5μM
Μείγμα dNTP's	10mM	1μl	200μM
Ρυθμιστικό διάλυμα	10X	10μl	1X
Kapa Taq	1unit/μl	0,5μl	1 unit
ddH ₂ O	-	εώς 50μl	-

Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που ακολουθήθηκε είχε την μορφή:

Συνθήκες ενίσχυσης	
Αρχική αποδιάταξη	94 ⁰ C για 3 λεπτά
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 1 λεπτό
Σύνδεση εκκινητή	48 ⁰ C για 1 λεπτό
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 1 λεπτό
	αριθμός κύκλων 5

Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 1 λεπτό
Σύνδεση εκκινητή	58 ⁰ C για 1 λεπτό
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 1 λεπτό αριθμός κύκλων 30
	72 ⁰ C για 10 λεπτά

Μετά από κάθε αντίδραση PCR ακολουθούσε καθαρισμός των δειγμάτων σύμφωνα με το PureLink PCR Purification kit της invitrogen.

Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας υβριδοποίησης για όλους τους εκκινητές έγινε μέσω του τύπου:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \lg M + 0,41(GC) - 500/n$$

2.2.6. Κλωνοποίηση προϊόντων PCR σε πλασμιδιακούς φορείς

Για την κλωνοποίηση προϊόντων PCR, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEM[®]-Teasy (Promega). Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR με την χρήση Taq DNA πολυμεράσης, παρουσιάζουν το χαρακτηριστικό να έχουν ένα προεξέχον νουκλεοτίδιο αδενοσίνης (A). Ο φορέας pGEM[®]-Teasy περιέχει ένα προεξέχον νουκλεοτίδιο θυμίνης (T), κάνοντας εύκολη την κλωνοποίηση προϊόντων PCR. Για να έχουμε όσο το δυνατό μεγαλύτερο ποσοστό προϊόντων PCR με άκρα αδενοσίνης, χρησιμοποιούμε την μέθοδο PCR για επέκταση των νουκλεοτιδίων αδενοσίνης (A's extension).

2.2.7. Αντίδραση PCR για επέκταση τελικών νουκλεοτιδίων αδενοσίνης (A's extension)

Η Taq DNA πολυμεράση έχει το χαρακτηριστικό να προσθέτει τελικά A's στα περισσότερα μόρια του προϊόντος κατά την ενίσχυση τμημάτων DNA σε αντίδραση PCR. Για να έχουμε όσο το δυνατό μεγαλύτερο ποσοστό προϊόντων PCR με άκρα αδενοσίνης, χρησιμοποιούμε την μέθοδο PCR για επέκταση των νουκλεοτιδίων αδενοσίνης (A's extension).

Προϊόν PCR	25μl
dATP(10mM)	2μl
10X ρυθμιστικό διάλυμα της Taq	5μl
Taq DNA πολυμεράση (5u/μl)	0,2 μl
ddH ₂ O	μέχρι 50μl

Η αντίδραση PCR τοποθετείται στους 95 °C για 5 λεπτά προκειμένου να αποδιαταχθούν τα προϊόντα.

Στη συνέχεια γίνεται επώαση της αντίδρασης στους 72 °C για 20 λεπτά, οπότε τα περισσότερα προϊόντα αποκτούν μια τελική αδενίνη.

2.2.8. Colonies PCR:

Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να ανιχνευθεί η παρουσία του σωστού φορέα απευθείας σε αποικίες από καλλιέργειες.

- Προσθήκη σε erpendorf 100 μl νερό και οδοντογλυφίδα με αποικία.
- Στη συνέχεια ρίχνουμε την ίδια οδοντογλυφίδα σε LB και προσθέτουμε το κατάλληλο αντιβιοτικό .

- Στο LB ρίχνουμε 50μl από το αρχικό διάλυμα και στα υπόλοιπα 50μl προσθέτουμε 1μl NaOH.
- Στους 95° C για 5 λεπτά και μετά στον πάγο για 5 λεπτά.
- Φυγοκέντρωση στις 13000rpm για 5 λεπτά στους 4° C.
- Αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση σε 5μl νερό.
- Χρησιμοποιούμε 2 μl σε αντίδραση PCR.

DNA δείγμα	25μl
dNTPs (10mM)	2μl
Εκκινητής 1	1,6μl
Εκκινητής 2	1,6μl
10X ρυθμιστικό διάλυμα της Taq	5μl
Taq DNA πολυμεράση (5u/μl)	0,2 μl
ddH ₂ O	μέχρι 50μl

2.2.9. RT-qPCR πραγματικού χρόνου

- Τα cDNA-στόχοι ενισχύθηκαν με εξειδικευμένους εκκινητές (Πίνακας 1, Παράρτημα) που σχεδιάστηκαν στη μεταγραφόμενη περιοχή του κάθε γονιδίου με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν κοντά στην περιοχή του 3' άκρου των γονιδίων και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 70 έως 150 ζεύγη βάσεων.
- Η αντίδραση PCR περιλάμβανε το μίγμα της Power SYBR Green (Applied Biosystems), τους εξειδικευμένους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0.2μM ο καθένας και 1μl της μήτρας cDNA.

- Οι αντιδράσεις του ποσοτικού RT-PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα MX3005P της εταιρίας Stratagene.
- Το πρόγραμμα του PCR περιλάμβανε 10 λεπτά επώαση στους 95°C και ακολούθησαν 40 κύκλοι με 95°C για 15 δευτερόλεπτα και 60°C για 1 λεπτό.
- Η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός διμερών των εκκινητών ελέγχθηκε για κάθε ζεύγος χωριστά από την ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης στο τέλος της αντίδρασης.
- Τα επίπεδα έκφρασης ενός γονιδίου του *L. japonicus* που κωδικοποιεί για ουβικιτίνη χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικός έλεγχος για να γίνει κανονικοποίηση στις μικρές διαφορές που παρουσιάζονται στις ποσότητες του cDNA.
- Τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου (X) υπολογίστηκαν σε αναλογία προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της ουβικιτίνης (U). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης υπολογίστηκαν από τον τύπο $(1+E)^{-\Delta C_t}$, όπου ΔC_t είναι η διαφορά $C_t^X - C_t^U$ και E είναι η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR.
- Η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR (E) για κάθε γονίδιο υπολογίστηκε από την γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της απορρόφησης ανά κύκλο αντίδρασης, χρησιμοποιώντας το λογισμικό LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003).
- Όλες οι αντιδράσεις qPCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκαν σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

2.2.10. 3'race PCR:

Στη μέθοδο 3'race αξιολογείται η παρουσία της polyA ουράς στο 3' άκρο των ευκαρυωτικών mRNAs, για την ανάγνωση μια άγνωστης περιοχής ενός γονιδίου στο 3' άκρο του. Αρχικά γίνεται η σύνθεση του cDNA μέσω ενός oligodT-anchor primer και η αλυσίδα που έχει συντεθεί χρησιμοποιείται ως μήτρα από την αντίστροφη μεταγραφάση για τη δημιουργία, μέσω PCR, δίκλωνου DNA. Στη συνέχεια, μετά τη σύνθεση του cDNA μπορεί να πραγματοποιηθεί η ενίσχυση του γονιδίου με τη χρήση

του anchor primer και ενός συγκεκριμένου εκκινητή για το γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν από το kit 5'/3'race kit, 2nd generation της εταιρείας Roche.

Η αντίδραση για τη σύνθεση του cDNA ήταν η εξής:

Συστατικά	Ποσότητα
5x ρυθμιστικό διάλυμα σύνθεσης cDNA	4μl
DTT	2μl
Μείγμα dNTPs (10mM)	2μl
Δείγμα RNA	0,5-2μg
Ολιγό dT-anchor εκκινητής (37,5mM)	1μl
RNase out	1μl
Transcriptor Αντίστροφη Μεταγραφή (25u/μl)	1μl
dd H ₂ O	μέχρι τα 20μl

- Ανάδευση και επώαση για 60 λεπτά στους 55° C.
- Επώαση για 50 λεπτά στους 42° C.
- Απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση στους 70° C για 15 λεπτά και από το cDNA χρησιμοποιούμε 1μl για την PCR που ακολουθεί.

Η αντίδραση PCR για την ενίσχυση του γονιδίου ήταν η εξής:

Συστατικά	Ποσότητα
Δείγμα cDNA	1μl
PCR anchor εκκινητής (12,5μM)	2μl
Ειδικός εκκινητής (12,5μM)	2μl
dNTPs (10mM)	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (10x)	10μl
Phusion DNA πολυμεράση	0,5μl
dd H ₂ O	μέχρι τα 50μl

Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που ακολουθήθηκε είχε την μορφή:

Συνθήκες ενίσχυσης	
Αρχική αποδιάταξη	98 ⁰ C για 30 δευτερόλεπτα
Αποδιάταξη	98 ⁰ C για 10 δευτερόλεπτα
Σύνδεση εκκινητή	67 ⁰ C για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 1 λεπτό αριθμός κύκλων 35
	72 ⁰ C για 10 λεπτά

2.2.11. 5' race

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την επιμήκυνση cDNA κλώνων μέσω της ενίσχυσης των 5' αλληλουχιών των αντίστοιχων mRNAs. Η τεχνική αυτή απαιτεί τη γνώση της μερικής αλληλουχίας του cDNA κλώνου. Αρχικά συντίθεται το cDNA με τη χρήση ενός ειδικού για το γονίδιο εκκινητή (SP1). Στη συνέχεια ακολουθεί καθαρισμός του cDNA και προσθήκη μιας πολυΑ ουράς στο 3' άκρο του cDNA με το ένζυμο terminal transferase. Η άγνωστη αλληλουχία ενισχύεται με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές PCR anchor και SP2, ο οποίος είναι σχεδιασμένος εσωτερικά του εκκινητή SP1. Τέλος πραγματοποιείται μια τρίτη PCR (nested) με τους εκκινητές PCR anchor και SP3, ο οποίος είναι σχεδιασμένος εσωτερικά του εκκινητή SP2. Τα προϊόντα της τελευταίας αντίδρασης PCR μπορούν να κλωνοποιηθούν στον κατάλληλο φορέα και στη συνέχεια να αλληλουχηθούν και να χαρακτηριστούν. Το πρωτόκολλο και το kit που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Roche.

Για τη σύνθεση του cDNA η αντίδραση ήταν η εξής:

Συστατικά	Ποσότητα
10x ρυθμιστικό διάλυμα σύνθεσης cDNA	4μl
Μείγμα dNTPs (10mM)	2μl
Δείγμα RNA	0,2-2μg
Εκκινητής σύνθεσης cDNA SP1 (12,5μM)	1μl
Transcriptor Αντίστροφη Μεταγραφή (25u/μl)	1μl
ddH ₂ O	μέχρι τα 20μl

- Επώαση στους 55° C για 60 λεπτά.
- Επιπλέον επώαση για 5 λεπτά στους 85° C.

Για την επιμήκυνση με A's

Συστατικά	Ποσότητα
καθαρό δείγμα cDNA	19μl
2 mM dATP	2,5μl
10x ρυθμιστικό διάλυμα	2,5μl

- Ανάδευση και φυγοκέντρωση.
- Επώαση για 3 λεπτά στους 94° C.
- Αφήνεται σε πάγο.
- Σύντομη φυγοκέντρωση του δείγματος.
- Προσθήκη 1μl Terminal Transferase 80u/μl.
- Ανάδευση και επώαση στους 37° C για 30 λεπτά.
- Επώαση στους 70° C για απενεργοποίηση του ενζύμου.
- Σύντομη φυγοκέντρωση και τοποθέτηση σε πάγο.

Αντίδραση πρώτης PCR με τον εκκινητή SP2:

Συστατικά	Ποσότητα
dA -tailed cDNA	5μl
Μείγμα dNTPs (10mM)	1μl
Ολιγό dT-anchor εκκινητής (37,5μM)	1μl
Ειδικός εκκινητής SP2 (12,5μM)	1μl
Taq DNA πολυμεράση (5u/μl)	0,2μl
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης Taq 10x	5μl
ddH ₂ O	36,8μl

Το πρόγραμμα των θερμοκρασιών που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

Συνθήκες ενίσχυσης	
Αρχική αποδιάταξη	94 ⁰ C για 3 λεπτά
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 30 δευτερόλεπτα
Σύνδεση εκκινητή	51 ⁰ C για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 50 δευτερόλεπτα
	αριθμός κύκλων 10
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 30 δευτερόλεπτα
Σύνδεση εκκινητή	51 ⁰ C για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 50 δευτερόλεπτα
	αριθμός κύκλων 25*
	72 ⁰ C για 7 λεπτά

*+ 20^o C σε κάθε κύκλο

Αντίδραση nested PCR με τον εκκινητή SP3:

Συστατικά	Ποσότητα
Προϊόν PCR	1μl
Μείγμα dNTPs (10mM)	1μl
PCR anchor εκκινητής (12,5μM)	1μl
Specific primer SP3 (12,5μM)	1μl
Taq DNA polymerase (5u/μl)	0,2μl
Reaction buffer 10x	5μl
ddH ₂ O	40,8μl

Το πρόγραμμα των θερμοκρασιών που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

Συνθήκες ενίσχυσης	
Αρχική αποδιάταξη	94 ⁰ C για 3 λεπτά
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 30 δευτερόλεπτα
Σύνδεση εκκινητή	55 ⁰ C για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 50 δευτερόλεπτα
	αριθμός κύκλων 10
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 30 δευτερόλεπτα
Σύνδεση εκκινητή	55 ⁰ C για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 50 δευτερόλεπτα
	αριθμός κύκλων 25*
	72 ⁰ C για 7 λεπτά

*+ 20^o C σε κάθε κύκλο

2.3. Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης

2.3.1. Δεκτικά κύτταρα ζύμης

Η μεθοδολογία που ακολουθεί αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου από τους Guthrie & Fink, (1991).

1. 50ml θρεπτικού μέσου YPD ή κατάλληλου μέσου SD, μολύνονται με αποικίες ζύμης, διαμέτρου 2-3mm.
2. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 30°C για 16-18 ώρες, με ανάδευση στις 250 rpm, μέχρι η οπτική πυκνότητα OD₆₀₀ να ξεπεράσει την τιμή 1,5 (στάσιμη φάση).
3. 30ml της καλλιέργειας αυτής, μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 300ml YPD. Αν είναι απαραίτητο, προσθέτουμε καλλιέργεια μέχρι το OD₆₀₀ να είναι 0.2-0.3.
4. Η καλλιέργεια επωάζεται για άλλες 3 ώρες στους 30°C, με ανάδευση στις 230rpm, μέχρι το OD₆₀₀ να φτάσει το 0.4-0.6.
5. Η καλλιέργεια μοιράζεται σε κατάλληλα δοχεία και φυγοκεντρούμε στις 2500rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-21 °C).
6. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε αποστειρωμένο TE ή αποστειρωμένο νερό. Τα αιωρήματα συγκεντρώνονται σε ένα δοχείο, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 25-50ml.
7. Το αιώρημα φυγοκεντρείται στις 2500rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-21 °C).
8. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1,5ml φρέσκου, αποστειρωμένου 1X TE/1X LiAc.

Δεν υπάρχει δυνατότητα διατήρησης των δεκτικών κυττάρων ζύμης, οπότε πρέπει ο μετασχηματισμός τους να γίνει εντός μιας ώρας από την παρασκευή τους ή εντός λίγων ωρών, με μικρότερη όμως απόδοση μετασχηματισμού.

2.3.2. Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφηκε από τους Ito et al. (1983).

1. Σε 100μl δεκτικών κυττάρων ζύμης προστίθενται με την εξής σειρά:
 - 0,5μg πλασμιδιακό DNA (από το καθένα πλασμίδιο)
 - 600μl διαλύματος PEG/LiAc
 - 25μl carrier DNA (4mg/ml)
2. Ακολουθεί θερμική καταπόνηση του μίγματος για 30 λεπτά στους 20 °C σε 200rpm.
3. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντριση στις 14000rpm για 5 δευτερόλεπτα.
4. Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιώντας πιπέτα.

Το ίζημα των κυττάρων ζύμης επαναιωρείται σε 100μl 1X TE και επιστρώνεται σε τρυβλία τα οποία περιέχουν κατάλληλο θρεπτικό μέσο που θα επιτρέψει την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

2.3.3. Έλεγχος για την ύπαρξη αλληλεπίδρασης με δοκιμή ιστοδίνης

Από τις αποικίες των μετασχηματισμένων και με τα δύο πλασμίδια κυττάρων, που αναπτύχθηκαν στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα SD/-Leu/-Trp, εμβολιάζουμε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα SD/-Leu/-Trp. Μετά από επώαση των υγρών καλλιιεργειών για 20-24 ώρες στους 30⁰ C, μετρήθηκε η οπτική τους πυκνότητα σε μήκος κύματος 600nm (OD₆₀₀) και ρυθμίστηκε στην τιμή 0.5. Με βάση αυτή την οπτική πυκνότητα, ετοιμάστηκαν τέσσερις αραιώσεις 1:1, 1:5, 1:25 και 1:125 για την κάθε καλλιέργεια. Στη συνέχεια, 15μl από την κάθε καλλιέργεια και την κάθε αραιώση τοποθετήθηκαν σε μορφή κηλίδας πάνω σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα SD/-Leu/-Trp/-His, σε τρυβλία. Η τοποθέτηση των κηλίδων για κάθε καλλιέργεια έγινε από τη μικρότερη προς τη μεγαλύτερη αραιώση. Η όλη διαδικασία έγινε και για τα μετασχηματισμένα κύτταρα θετικού και αρνητικού ελέγχου. Τα κύτταρα που είχαν τοποθετηθεί στο

υπόστρωμα SD/-Leu/-Trp/-His επωάστηκαν στους 30⁰ C και η ανάπτυξη των κυττάρων άρχισε να γίνεται ορατή μετά από 48 ώρες.

2.4. Διαλύματα και θρεπτικά μέσα

2.4.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης φυτών.

Θρεπτικό μέσο **MS**

0.441% w/v MS , 2% σουκρόζη , 0.05% w/v MES , ρύθμιση του pH στην τιμή 5.7, 0.3% w/v phytigel και αποστείρωση

2.4.2 Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων-Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

LB: θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *E. coli*

0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 1%(w/v) NaCl, 1% (w/v) πεπτόνη. Στην περίπτωση στερεού υποστρώματος, προστίθεται 1,5% (w/v) άγαρ.

YMB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ριζοβίων *M. loti*.

Για την παρασκευή 1lt θρεπτικού διαλύματος YMB: σε 1lt απιονισμένου νερού προστίθενται 10gr μαννιτόλη, 0,5gr K₂HPO₄, 0,2gr MgSO₄.7H₂O, 0,1gr NaCl, 0,5gr εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract). Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% άγαρ.

2.4.3 Θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη κυττάρων ζύμης

Θρεπτικό μέσο **YPD**

2% (w/v) πεπτόνη, 1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) γλυκόζη. Στην περίπτωση στερεού υποστρώματος, προστίθεται 2% (w/v) άγαρ.

Θρεπτικό μέσο **SD**

0,67% (w/v) βάση αζώτου χωρίς αμινοξέα, 10%(v/v) Drop Out διάλυμα αμινοξέων (DO supplement), 1% (v/v) από τα επιπλέον αμινοξέα, 2% (w/v) γλυκόζη. Στην περίπτωση στερεού υποστρώματος προστίθεται 2% (w/v) άγαρ.

2.4.5 Διαλύματα για τον μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης

carrier DNA

DNA από σπέρμα σολομού διαλύεται σε ddH₂O με τελική συγκέντρωση 4mg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C. Πριν από κάθε χρήση αποστειρώνεται για πέντε λεπτά για να αποδιαταχθεί και διατηρείται αποδιαταγμένο σε πάγο.

10X LiAc

1M Οξικό λίθιο (CH₃COOLi). Το pH ρυθμίζεται στο 7,5 με αραιό οξικό οξύ και αποστειρώνεται.

10X TE

0,1M Tris-HCL, 10mM EDTA, ρύθμιση του pH στο 7,5 και αποστείρωση.

50% PEG (Polyethylene glycol)

50gr PEG σε 100ml υδάτινου διαλύματος. (Αν είναι απαραίτητο, θερμαίνουμε στους 50°C για να υποβοηθήσουμε την διαλυτοποίηση). Όχι αποστείρωση.

2.4.6 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

Ρυθμιστικό διάλυμα 50X TAE

24.2g(w/v) Tris-base, 100ml/lit 0.5M EDTA pH 8.0, 57.1 ml/lit CH₃COOH

Βρωμιούχο αιθίδιο

5mg/ml σε ddH₂O. Διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο μπουκάλι, σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα χρωστικών COL1

5x μητρικό διάλυμα χρωστικών 1.25% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 1.25% (w/v) κυανοξυλένιο, σε ddH₂O. Το COL1 έχει τελική σύσταση 1x διαλύματος χρωστικών και 50% (w/v) σουκρόζης.

2.5. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη στατιστική μέθοδο t-test. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του προγράμματος SigmaStat 3.5 και τα διαγράμματα με το πρόγραμμα SigmaPlot 10.0.

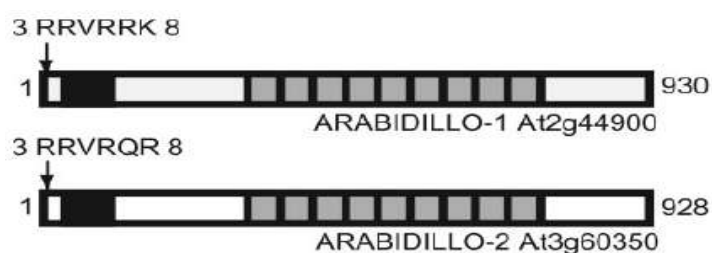
3. Σκοπός παρούσας εργασίας

Στα φυτά έχει αναφερθεί ένα μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που φέρουν επαναλήψεις Argm και διαμεσολαβούν σε μία πληθώρα ενδοκυτταρικών λειτουργιών. Για φυτά όπως το *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν μελετημένες και χαρακτηρισμένες Argm πρωτεΐνες κάτι που μέχρι στιγμής δε συμβαίνει για το φυτό *Lotus japonicus*. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο εντοπισμός και η ενίσχυση γονιδίων του *Lotus japonicus*, που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες οι οποίες φέρουν επαναλήψεις Argm. Η έρευνα αυτών των γονιδίων επικεντρώθηκε κυρίως στη ρίζα, το όργανο όπου λαμβάνει χώρα η συμβίωση με το μικροοργανισμό *M. loti* και ο σχηματισμός των φυματιών. Αυτό είχε ως κύριο στόχο τη μελέτη πιθανής εμπλοκής των πρωτεϊνών αυτών στη διαδικασία της μόλυνσης και ίσως στο σχηματισμό των φυματιών.

4. Πειραματικά Αποτελέσματα

4.1 Ανίχνευση αλληλουχιών σε βάσεις δεδομένων

Αρχικά έγινε η προσπάθεια για εντόπιση γονιδίων που περιέχουν επαναλήψεις Arm και είναι ομόλογα των β-κατενινών των θηλαστικών στο *Lotus japonicus*, στη βάση δεδομένων DFCI Plant Gene Indices. Τα γονίδια απομονώθηκαν σύμφωνα με το ποσοστό ομοιότητάς τους με τα *ARABIDILLO-1* και *-2* του *Arabidopsis thaliana* (Coates *et al.*, 2006).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση των ARABIDILLO-1 και -2 καθώς και των δομικών περιοχών τους. Με μαύρο χρώμα είναι οι περιοχές F-box και με γκρι είναι οι επαναλήψεις Arm.

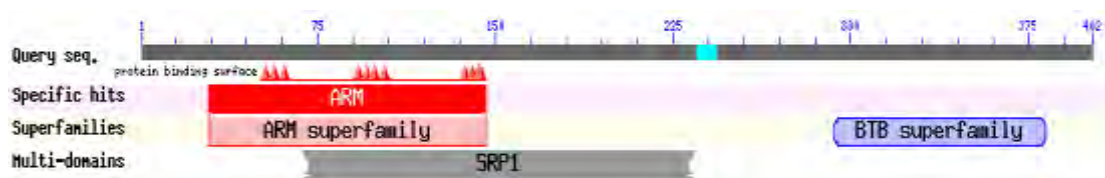
Εντοπίστηκαν γονίδια (βλ. Παράρτημα) που έφεραν ομόλογες περιοχές με τα γονίδια του *Arabidopsis*. Τα γονίδια αυτά είναι τα TC 63883, TC 79428, TC 72809 και το TC 59923. Οι αλληλουχίες των γονιδίων μεταφράστηκαν σε πρωτεΐνες μέσω του υπολογιστικού προγράμματος EXPASY και στη συνέχεια ακολούθησε blast στο Blastn και Blastp. Πιο συγκεκριμένα, τα TC 72809 και 59923 δεν κωδικοποιούν για πλήρους μήκους ORFs και στο κατατεθειμένο κομμάτι τους δεν περιείχαν επαναλήψεις Arm αλλά το TC 72809 περιείχε μία περιοχή F-box όπως και τα ARABIDILLO και το TC 59923 φέρει ένα U-box, που συναντάται συχνά σε

πρωτεΐνες που φέρουν Arm επαναλήψεις. Και για τα δύο παραπάνω TC ήταν αναγκαίο να γίνει 3'race ώστε να συμπληρωθεί η αλληλουχία τους και να εξετασθεί αν έφεραν επαναλήψεις Arm.

A.



B.



Εικόνα 6: Αποτελέσματα μετάφρασης των αλληλουχιών TC 63883 και TC 79428 μέσω υπολογιστών προγραμμάτων. A) Απεικόνιση της αμινοξικής αλληλουχίας καθώς και των δομικών περιοχών που προκύπτουν απ τη μετάφραση του TC 63883. B) Απεικόνιση της αμινοξικής αλληλουχίας καθώς και των δομικών περιοχών που προκύπτουν απ τη μετάφραση του TC 79428. Και στις δύο αμινοξικές αλληλουχίες διακρίνονται επαναλήψεις Arm.

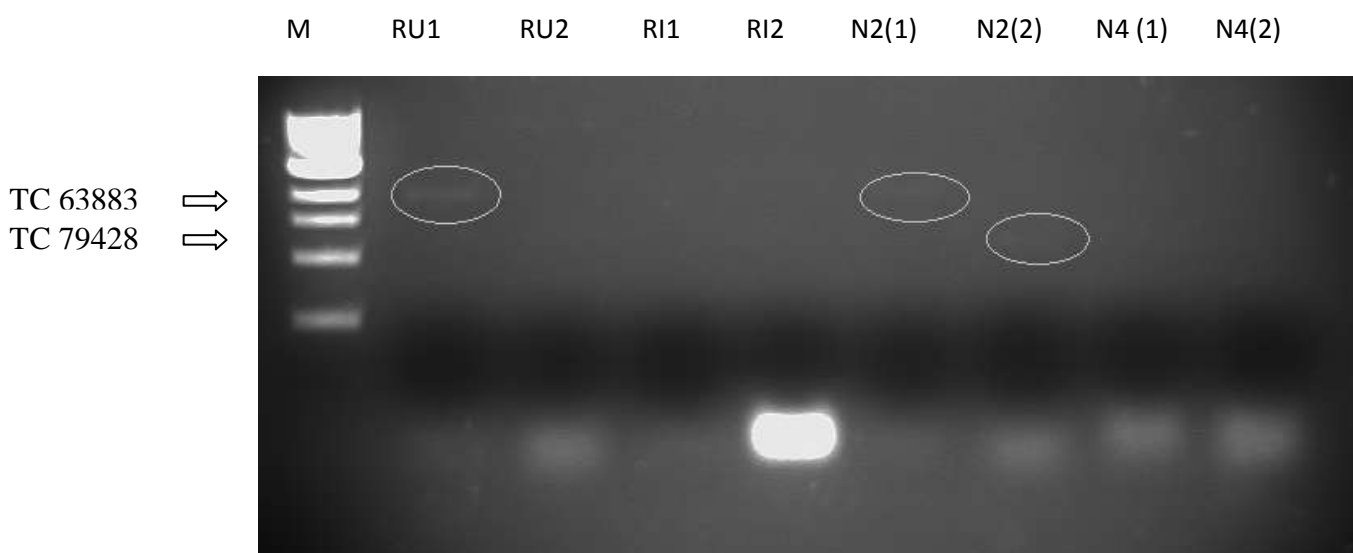
Όσο αφορά τα TC 63883 και TC 79428, φάνηκε να κωδικοποιούν αλληλουχίες πλήρους μήκους οι οποίες φέρουν περιοχές Arm επαναλήψεων οπότε ακολούθησε και περαιτέρω έρευνα στη βάση δεδομένων του *Arabidopsis thaliana* (TAIR), ώστε να βρεθούν παρόμοιες πρωτεΐνες στο πρότυπο αυτό φυτικό σύστημα και να υπάρξει ένας «πρώτος» χαρακτηρισμός τους. Το TC 63883 εμφανίζει ομοιότητα της τάξεως του 69% με το AT3G46510 που πρόκειται για μία φυτική πρωτεΐνη που φέρει δομικό μοτίβο U-box με δραστικότητα E3 λιγάσης της ουβικιτίνης (*AtPUB13*), ενώ έχει 65% ομοιότητα με το AT2G28830 που κωδικοποιεί επίσης για μία πρωτεΐνη με δράση λιγάσης της ουβικιτίνης (*AtPUB12*). Το TC 79428 εμφανίζει ομοιότητα 61% με το AT5G19330 που κωδικοποιεί τη χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη ARIA, η οποία εμπλέκεται στην απόκριση στο αμυσοτικό οξύ και επίσης εμφανίζει 57% ομοιότητα με

τη χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη APAB1, η οποία αλληλεπιδρά με το προ-αντιγραφικό σύμπλοκο και με μεταγραφικούς παράγοντες και έχει ρόλο στην αρνητική ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

4.2 Ενίσχυση των γονιδίων με PCR και κλωνοποίηση

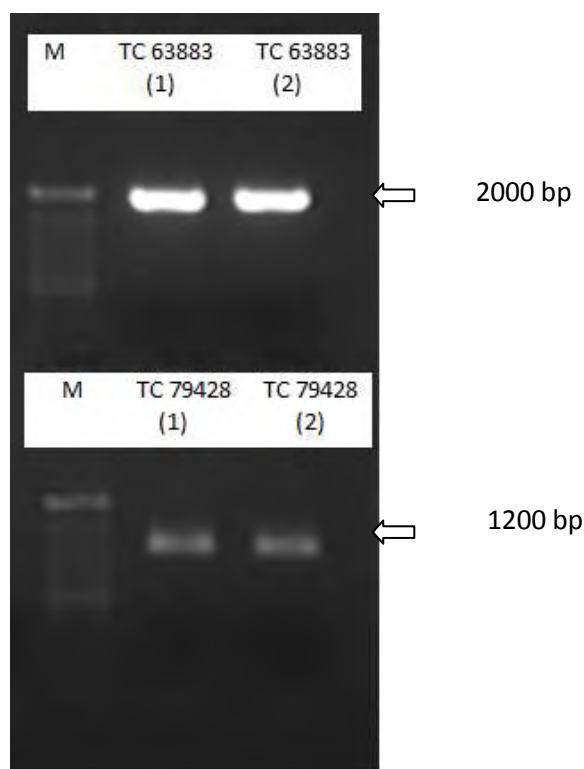
Για την ενίσχυση των πλήρους μήκους αλληλουχιών σχεδιάστηκαν εκκινητές (βλ. Παράρτημα) και για τα δύο γονίδια που αρχικά θα τα αποκαλούμε TC 63883 και TC 79428 μέχρι να επιβεβαιωθεί η φύση τους και η λειτουργία τους.

Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση των δύο γονιδίων και τον εντοπισμό τους σε φυτικούς ιστούς. Χρησιμοποιήθηκαν cDNA από ρίζες που δεν είχαν μολυνθεί με ριζόβιο (RU), από ρίζες μολυσμένες (RI), από φυμάτια δύο εβδομάδων (N2) και από φυμάτια τεσσάρων εβδομάδων (N4). Για το TC 63883 το αναμενόμενο μέγεθος είναι 2080 bp (2kb) και για το TC 79428 είναι 1240 bp (1,2kb). Έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 1% και τα αποτελέσματα είναι τα παρακάτω:



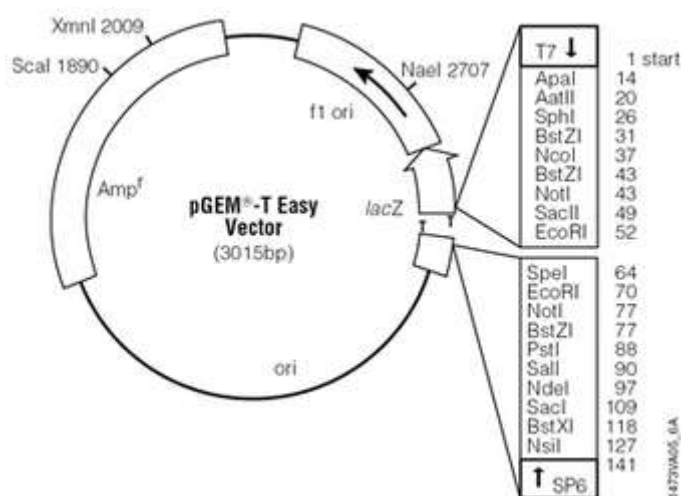
Εικόνα 7: Στην πρώτη στήλη είναι ο μάρτυρας μοριακών βαρών και στη συνέχεια ακολουθούν οι μη μολυσμένες ρίζες (RU1, RU2), οι μολυσμένες ρίζες (RI1, RI2) και τα φυμάτια δύο και τεσσάρων εβδομάδων (N2 1-2, N4 1-2).

Η παρατήρηση της πηκτής κάτω από λάμπα υπεριώδους φωτός έδειξε έκφραση του TC 63883 σε ρίζες που δεν είχαν μολυνθεί και σε φυμάτια δύο εβδομάδων ενώ για TC 79428 υπήρχε μικρή ποσότητα μόνο σε φυμάτια των δύο εβδομάδων. Στη συνέχεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το cDNA από ρίζες που δεν έχουν μολυνθεί για το TC 63883 και το cDNA από φυμάτια των δύο εβδομάδων για το TC 79428. Για την απόκτηση μεγαλύτερης ποσότητας προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε ακόμα μία PCR αυτή τη φορά με διαφορετικό ένζυμο, την high fidelity Phusion DNA πολυμεράση και υπολογίστηκαν ξανά οι θερμοκρασίες των γονιδίων με ειδικό ηλεκτρονικό πρόγραμμα. Η νέα βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης που επιλέχθηκε για όλα τα δείγματα της νέας PCR ήταν οι 56° C για 35 κύκλους επιμήκυνσης. Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης ήταν η εξής:



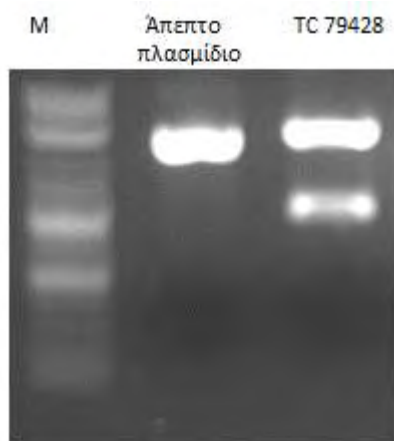
Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων ενίσχυσης των TC 63883 και TC 79428. Το προϊόν του TC 63883 ήταν στις 2000bp περίπου και του TC 79428 ήταν περίπου στις 1200 bp.

Στη συνέχεια έγινε απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης με kit (από την εταιρεία Qiagen) και ακολούθησε αντίδραση PCR για την επέκταση τελικών νουκλεοτιδίων αδενοσίνης. Μετά από την προσθήκη As έγινε καθαρισμός του δείγματος με kit (της εταιρείας Invitrogen) και πραγματοποιήθηκε αντίδραση ενοποίησης τμημάτων DNA και πιο συγκεκριμένα ανάμεσα στα δείγματά μας και στον φορέα pGEM (της εταιρείας Promega).



Εικόνα 9: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGEM-T Easy

Ακολούθησε μετασηματισμός σε κύτταρα *Escherichia coli* DH5 και ανάπτυξη σε τρυβλία LB-αμπικιλίνης με δείκτη το xgal ώστε να μπορεί να γίνει επιλογή μπλε-λευκών αποικιών. Επιλέχθηκαν λευκές αποικίες και αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια LB, έγινε απομόνωση πλασμιδίου και πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoRI*, ηλεκτροφόρηση και επιλογή των κατάλληλων αποικιών που έφεραν το ένθεμα ώστε να σταλούν για αλληλούχιση. Η εικόνα που ακολουθεί είναι από το στάδιο της πέψης με ενδονουκλεάσες περιορισμού για το TC 79428.



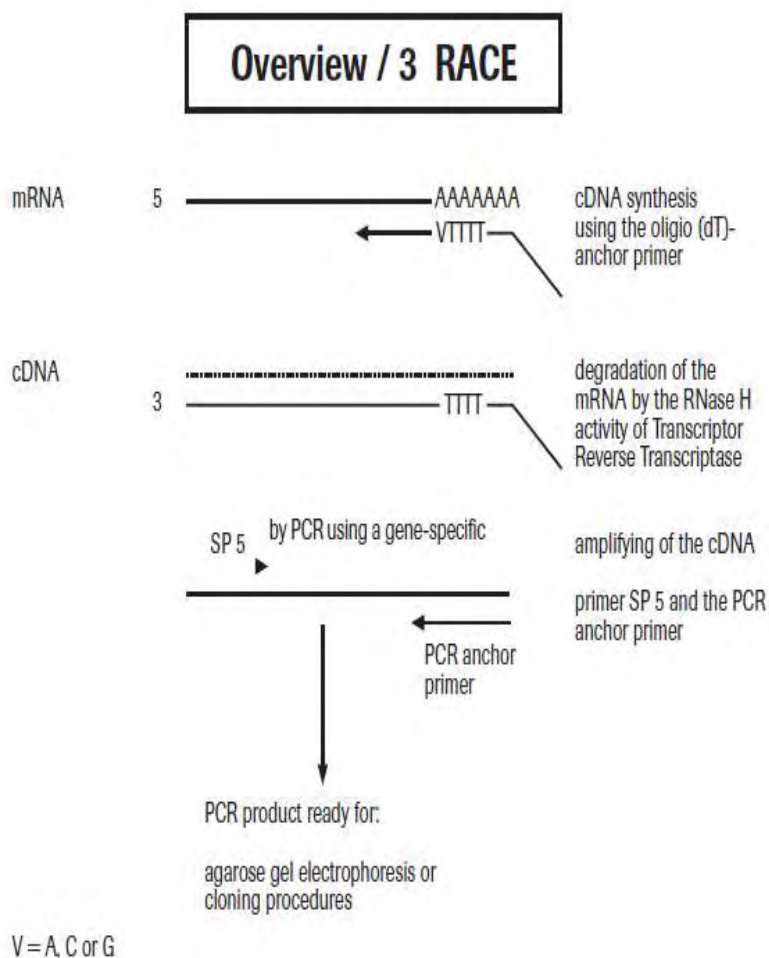
Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του πλασμιδίου που φέρει το ένθεμα TC79428. Στην πρώτη στήλη είναι ο μάρτυρας μοριακών βαρών και ακολουθούν το άπεπτο πλασμίδιο και το πλασμίδιο που έχει υποστεί πέψη *EcoRI* και έχει διαχωριστεί το ένθεμά του.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης (βλ. Παράρτημα) μας έδειξαν ότι το TC 63883 διαβάστηκε σχεδόν ολόκληρο με ορισμένα κενά ενώ το TC 79428 δεν διαβάστηκε καθαρά. Έγινε επανάληψη της διαδικασίας αλληλούχισης τόσο για το TC 63883 όσο και για το TC 79428, για τα οποία σχεδιάστηκαν επιπλέον νέοι εσωτερικοί εκκινητές.

Τα αποτελέσματα της δεύτερης αλληλούχισης επιβεβαίωσαν ότι το TC 63883 ήταν ουσιαστικά το ομόλογο του *PUB13* του *Arabidopsis* στο *Lotus japonicus* και το TC 79428 φαίνεται να είναι το ομόλογο του *ARIA* του *Arabidopsis*.

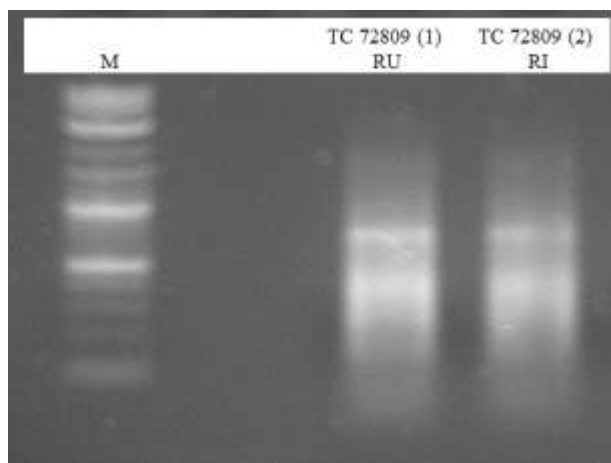
Για τα TC 72809 και TC 59923, που χρειάστηκε να γίνει 3' race, χρησιμοποιήθηκε το kit της Roche και σχεδιάστηκε ένας νέος εκκινητής ο οποίος έπρεπε να έχει περιεκτικότητα σε GC 50-60% και μήκος 20-25 bp. Η διαδικασία που ακολουθείται στο 3' race περιγράφεται στην παρακάτω εικόνα συνοπτικά:

3' RACE Overview



Το cDNA μήτρα που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των TC 72809 και TC 59923 στο 3' race ήταν από μη μολυσμένη ρίζα. Όμως έγιναν προσπάθειες ενίσχυσής τους και σε φυτικούς ιστούς που είχαν μολυνθεί με ριζόβιο.

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται ενδεικτικά μόνο τα αποτελέσματα του TC 72809 καθώς αντίστοιχη εικόνα πήραμε και για το TC 59923.

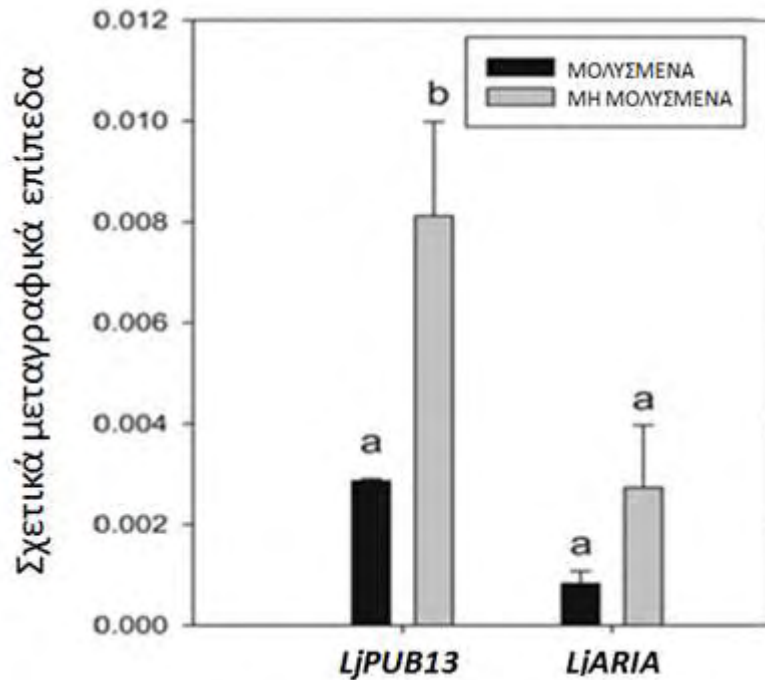


Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR από την αρχική ενίσχυση του TC 72809 με 3' race σε ρίζες μη μολυσμένες (στήλη 2) και μολυσμένες (στήλη 3).

Μετά από ορισμένες επαναλήψεις της PCR, μειώθηκε η ενίσχυση των μη-ειδικών προϊόντων οπότε μονές ζώνες απομονώθηκαν από την πηκτική αγαρόζης, κλωνοποιήθηκαν σε pGEM και στάλθηκαν για αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδειξαν ότι καμία από τις αλληλουχίες δεν έφερε επαναλήψεις Arm οπότε δε φαίνεται να κωδικοποιούν πρωτεΐνες της κατηγορίας των πρωτεϊνών Arm.

4.3 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *LjPUB13* και *LjARIA* στις ρίζες του *Lotus japonicus*.

Για να μελετηθεί η έκφραση των γονιδίων *LjPUB13* και *LjARIA* σε μολυσμένες και μη μολυσμένες ρίζες *L. japonicus* πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Τα cDNA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από φυτά *Lotus* 8 ημερών. Την όγδοη ημέρα τα μισά φυτά μολύνθηκαν με το *M. Loti* και 48 ώρες μετά έγινε συλλογή ιστών. Ακολούθησε ψύξη σε υγρό άζωτο και απομόνωση RNA. Οι ιστοί που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή RNA ήταν ρίζες μολυσμένες και ρίζες μη μολυσμένες.



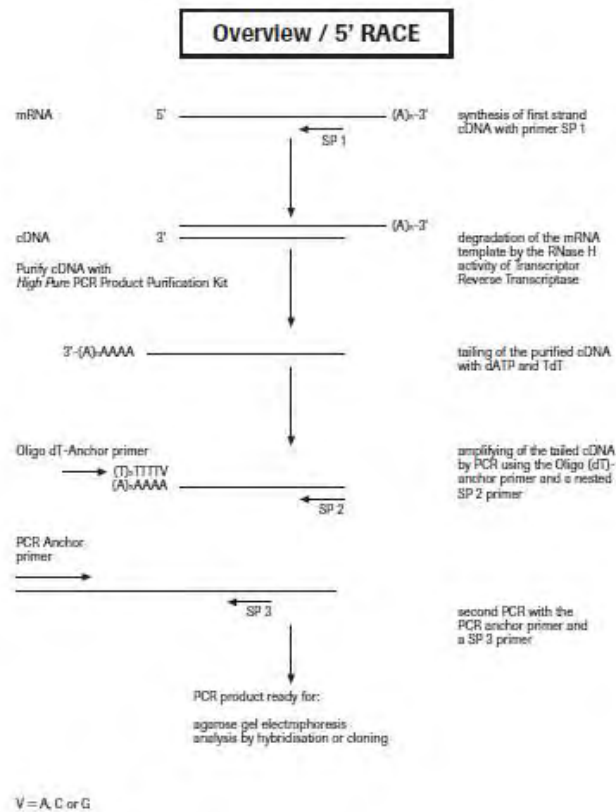
Εικόνα 12: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) όπου παρουσιάζεται η σχετική έκφραση των *LjPUB13* και *LjARIA*. Οι στήλες με μαύρο χρώμα είναι η έκφραση σε μη μολυσμένους ιστούς και με γκρι η έκφραση σε μολυσμένους. Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές έχουν μαρκαριστεί με διαφορετικά γράμματα.

Στα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) φάνηκε ότι το *LjPUB13* επάγεται σχεδόν δύο φορές στις μολυσμένες με *M. Loti* ρίζες ενώ το *LjARIA* δε παρουσίαζε διαφορετική έκφραση στα μολυσμένα σε σχέση με τα μη μολυσμένα φυτά.

4.4 Ενίσχυση του γονιδίου *LjSERK3* με 5' race

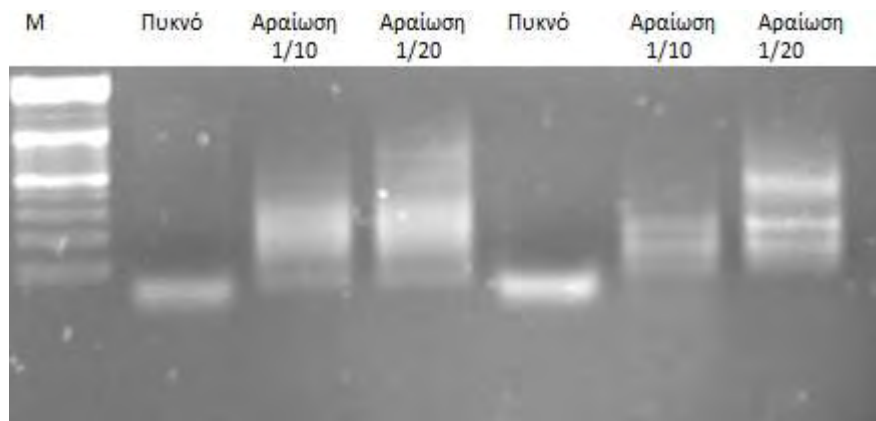
Μελετώντας τη βιβλιογραφία είδαμε ότι η *AtPUB13* αλληλεπιδρά με την *AtBAK1/AtSERK3* στο μονοπάτι ουβικουτινίωσης του υποδοχέα FLS2. Με βάση την αλληλουχία του *AtSERK3* εντοπίστηκε στη βάση δεδομένων DFCI το γονίδιο TC 68728 στο *Lotus japonicus*. Το γονίδιο αυτό πιθανά κωδικοποιεί την SERK3 κινάση στο *Lotus japonicas*. Για την απόκτηση όμως της πλήρους μήκους αλληλουχίας έπρεπε να γίνει 5' race στην αλληλουχία που ήταν κατατεθειμένη στη βάση

δεδομένων. Η διαδικασία του 5' race παρουσιάζεται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα:



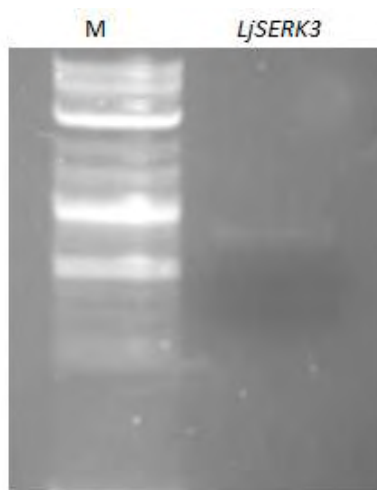
5' RACE allows the amplification of unknown sequences at the 5' end of the mRNA.

Το αρχικό cDNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν από μολυσμένες ρίζες ενώ σχεδιάστηκαν τρεις νέοι εκκινητές με βάση το πρωτόκολλο του kit 5' race από τη Roche. Έγιναν δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR με τους εκκινητές SP1 και SP2. Με τον SP1 έγινε η σύνθεση του cDNA για το 5' race και με τον SP2 έγινε η ενίσχυση του κομματιού cDNA που πλέον λόγω της αντίστροφης μεταγραφάσης έφερε μια πολύ-A ουρά. Τέλος έγινε μία PCR με τον εκκινητή SP3 για την εξειδικευμένη ενίσχυση της περιοχής που έλειπε. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της τρίτης PCR με τον εκκινητή SP3. Τα δείγματα στην ηλεκτροφόρηση ήταν τρία καθώς πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις 1:10 και 1:20 στα προϊόντα της PCR με τον SP2 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η τελευταία PCR με τον SP3.



Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για το *LjSERK3* με τον εκκινητή *SP3*. Στην πρώτη στήλη είναι ο μάρτυρας μοριακών βαρών και ακολουθούν οι αραιώσεις της PCR 1/10 και 1/20. Η διαδικασία έγινε σε δύο δείγματα.

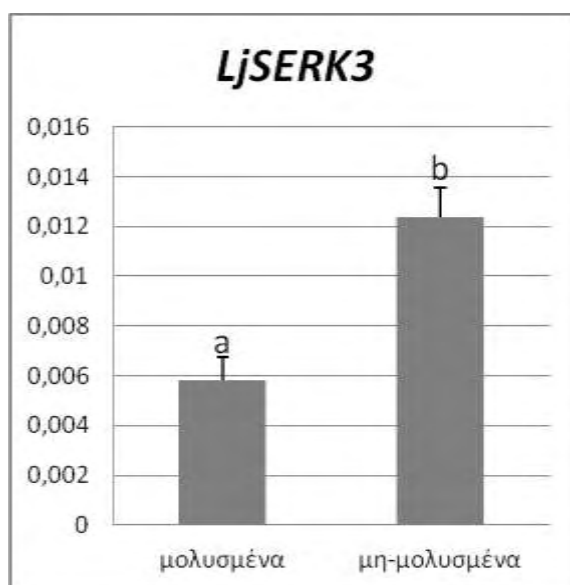
Μετά το στάδιο με τις PCR έγινε απομόνωση ζώνης του DNA από πηκτή αγαρόζης και στη συνέχεια κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα pGEM. Το πλασμίδιο στάλθηκε για αλληλούχιση και το αποτέλεσμα έδειξε ότι το ένθεμα όντως αντιστοιχούσε στην αμινο-τελική περιοχή του γονιδίου *SERK3*.



Εικόνα 14: Η τελική ενίσχυση της αμινο-τελικής περιοχής του *LjSERK3* με 5' *race* όπου διακρίνουμε το κομμάτι DNA που στάλθηκε τελικά για αλληλούχιση

4.5 Έκφραση του *LjSERK3* σε μολυσμένα και μη μολυσμένα φυτά

Για να μελετηθεί η έκφραση του *LjSERK3* στις ρίζες μολυσμένων και μη-μολυσμένων φυτών *L. japonicus* σχεδιάστηκαν εκκινητές και πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Ο φυτικός ιστός προήλθε από φυτά 8 ημερών, τα οποία την όγδοη μέρα μολύνθηκαν με το *M. Loti*. Μετά από 48 ώρες έγινε συλλογή ιστών, ψύξη σε υγρό άζωτο και εξαγωγή RNA. Το RNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν από μολυσμένες και μη μολυσμένες ρίζες.



Εικόνα 15 : Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) όπου παρουσιάζεται η σχετική έκφραση του *LjSERK3* σε ρίζες μη μολυσμένες και μολυσμένες. Η στατιστικώς σημαντική διαφορά έχει μαρκαριστεί με διαφορετικό γράμμα.

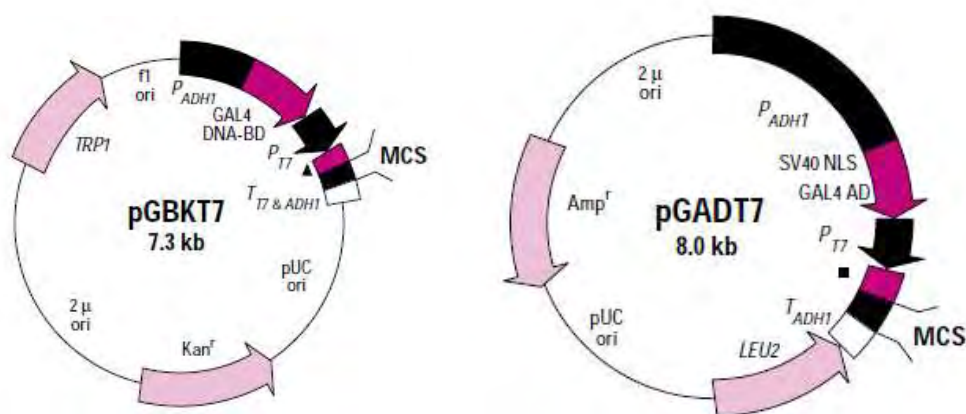
Στα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) φάνηκε ότι το *LjSERK3* επάγεται σχεδόν δύο φορές στις μολυσμένες με *M. Loti* ρίζες.

4.6 Κλωνοποίηση των *LjPUB13* και *LjSERK3* σε φορείς έκφρασης στη ζύμη

Για να μπορέσουμε να μελετήσουμε την πιθανή αλληλεπίδραση των *LjPUB13* και *LjSERK3* κρίθηκε αναγκαία η ένθεσή τους σε ειδικούς πλασμιδιακούς φορείς που

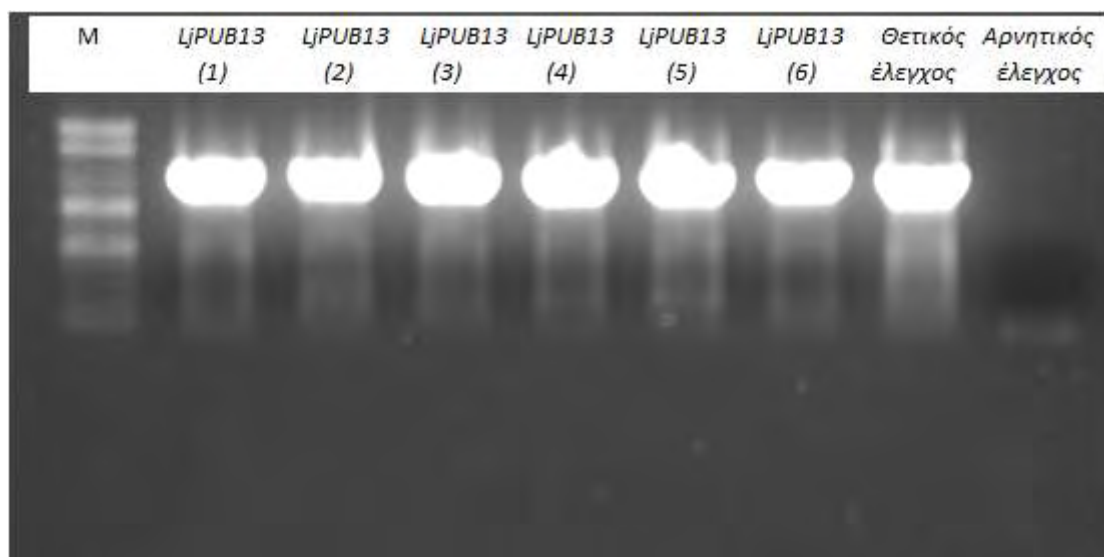
επέτρεπαν την έκφρασή τους σε σύστημα ζύμης. Ενδιαφέρον παρουσίαζε η πιθανή μελέτη της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην *LjPUB13* και στην περιοχή κινάσης της *LjSERK*, κάτι που είναι γνωστό ότι συμβαίνει στο *Arabidopsis*, στο μονοπάτι ουβικουτινώσεως του FLS2, αλλά άγνωστο εάν ισχύει στο *Lotus japonicus*. Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης χρησιμοποιήθηκε η πειραματική δοκιμή δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα.

Πιο συγκεκριμένα οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο pGADT7 και ο pGBKT7, οι οποίοι φέρουν την πληροφορία για τη σύνθεση των αμινοξέων λευκίνη και τρυπτοφάνη αντίστοιχα. Επιπλέον φέρουν πολυσυνδέτες με ειδικές θέσεις αναγνώρισης για πολλά διαφορετικά ένζυμα περιορισμού. Η κλωνοποίηση του πλήρους μήκους *LjPUB13* έγινε στο φορέα pGBKT7 και της περιοχής της κινάσης του *LjSERK3* στο pGADT7 στο σωστό ORF ούτως ώστε οι πρωτείνες να εκφράζονται συντηγμένες με τους δυο τομείς του μεταγραφικού παράγοντα GAL4. Πραγματοποιήθηκαν πέψεις με τα ένζυμα NcoI και EcoRI για τα pGBKT7 και *LjPUB13* και πέψεις με τα ένζυμα EcoRI και XhoI για τα pGADT7 και *LjSERK3*. Στη συνέχεια ακολούθησε ενοποίηση των γονιδίων με τους φορείς, μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* και καλλιέργειά τους σε θρεπτικό LB με επιλογή αντιβιοτικού, καναμυκίνη για το pGBKT7 και αμπικιλίνη για το pGADT7.



Εικόνα 16: Χάρτες των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των *LjPUB13* και *LjSERK3*

Ακολούθησε PCR αποικιών για τη γρήγορη επιβεβαίωση της επιτυχούς ένθεσης του *LjPUB13* στο pGBKT7. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ενισχύουν την πλήρη αλληλουχία του *LjPUB13* οπότε στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων διακρίνουμε ζώνες στις 2000bp περίπου



Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR αποικιών για την ενίσχυση του *LjPUB13*. Στην πρώτη στήλη είναι ο μάρτυρας μοριακών βαρών και ακολουθούν έξι δείγματα. Στις δύο τελευταίες στήλες είναι το θετικό και το αρνητικό δείγμα.

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης του κομματιού κινάσης της *LjSERK* στο pGADT7 πραγματοποιήθηκαν απλές, διαγνωστικές πέψεις με *EcoRI* και *XhoI*. Στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διπλής πέψης διακρίναμε ζώνες στις 1000bp περίπου που αντιστοιχούν στο τμήμα κινάσης του *LjSERK*. Μετά το πέρας αυτών των διαδικασιών τα δείγματα ήταν έτοιμα για τη δοκιμή δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα.

4.7 Έλεγχος αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών *LjSERK3*- *LjPUB13*

Μετά την κλωνοποίηση των *LjPUB13* και *LjSERK3* στους φορείς pGBKT7 και pGADT7, και την επιλογή των σωστών πλασμιδίων που περιείχαν τις ενθέσεις, ακολούθησε μετασχηματισμός κατάλληλων δεκτικών κυττάρων ζύμης.

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ζύμης *S. cerevisiae*, στελέχους AH109. Τα κύτταρα του συγκεκριμένου στελέχους είναι αυξοτροφικά ως προς τα αμινοξέα τρυπτοφάνη και λευκίνη, οπότε δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο που λείπει κάποιο από τα αμινοξέα αυτά. Το AH109 παρέχει επιλογή ως προς τέσσερα γονίδια αναφοράς στο σύστημα δύο υβριδίων. Περιλαμβάνει τα γονίδια *ADE2* για ισχυρή θρεπτική επιλογή ως προς την αδενίνη, *HIS3* για ισχυρή θρεπτική επιλογή ως προς την ιστιδίνη, *lacZ* για επιλογή ως προς τη β-γαλακτοσιδάση και *MEL1* για επιλογή ως προς την α-γαλακτοσιδάση

GAL1 UAS	GAL1 TATA	<i>HIS3</i>
GAL2 UAS	GAL2 TATA	<i>ADE2</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>lacZ</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>MEL1</i>

Εικόνα 18: Τα γονίδια αναφοράς που περιλαμβάνει το στέλεχος ζύμης AH109 για επιλογή στο σύστημα δύο υβριδίων. Αναφέρονται αναλυτικά τα στοιχεία των προαγωγέων τους UAS (*upstream activation site*) και TATA.

Κατά τον μετασχηματισμό, τα κύτταρα μετασχηματίστηκαν ταυτόχρονα με δύο πλασμίδια. Σε κάθε κύτταρο εισήχθη ένα πλασμίδιο που έφερε το *LjPUB13* σε σύντηξη με το GAL4-BD στον φορέα pGBKT7 και ένα πλασμίδιο που έφερε το *LjSERK3* σε σύντηξη με το GAL4-AD στο φορέα pGADT7. Ως θετικό δείγμα χρησιμοποιούνται δύο πλασμίδια που εκφράζουν δύο πρωτεΐνες οι οποίες είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι αλληλεπιδρούν ισχυρά, τα pGADT7-T και pGBKT7-53, ενώ ως αρνητικό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν τα pGBKT7 και pGADT7 χωρίς ένθεμα.

Οι συνδυασμοί των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στο μετασχηματισμό των δεκτικών κυττάρων ήταν οι εξής:

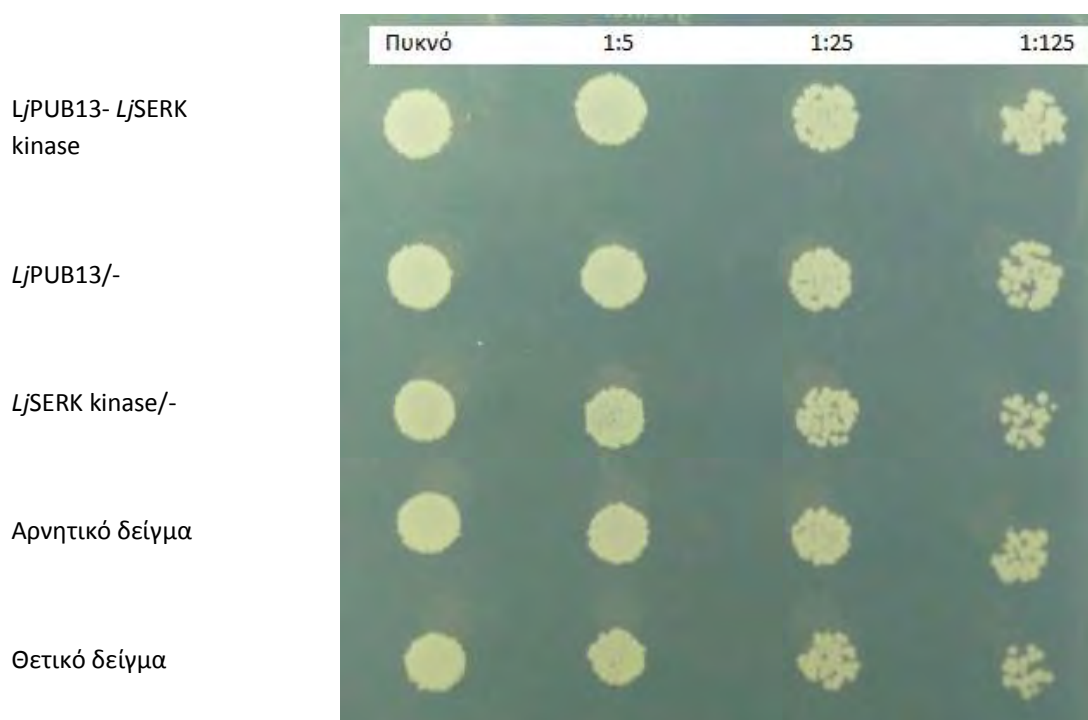
φορέας pGADT7	φορέας pGBKT7
<i>LjSERK</i> περιοχή κινάσης	<i>LjPUB13</i>
χωρίς το ένθεμα	<i>LjPUB13</i>
<i>LjSERK</i> περιοχή κινάσης	χωρίς το ένθεμα
χωρίς το ένθεμα	χωρίς το ένθεμα
pGADT7-T	pGBKT7-53

Μετά το μετασχηματισμό τα κύτταρα ζύμης AH109 επιστρώθηκαν σε θρεπτικό υλικό -Leu/-Trp ώστε να επιβεβαιωθεί η διπλή εισαγωγή των πλασμιδίων στα κύτταρα. Η επιβεβαίωση βασίζεται στο γεγονός ότι το pGADT7 προσδίδει την ικανότητα στα κύτταρα να αναπτύσσονται απουσία λευκίνης ενώ το pGBKT7 δίνει τη δυνατότητα να αναπτύσσονται απουσία τρυπτοφάνης. Εφόσον τα κύτταρα έχουν προσλάβει και τα δύο πλασμίδια θα μπορέσουν να αναπτυχθούν απουσία και των δύο αμινοξέων.

Οι συνδυασμοί των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στο μετασχηματισμό των δεκτικών κυττάρων ήταν οι εξής:

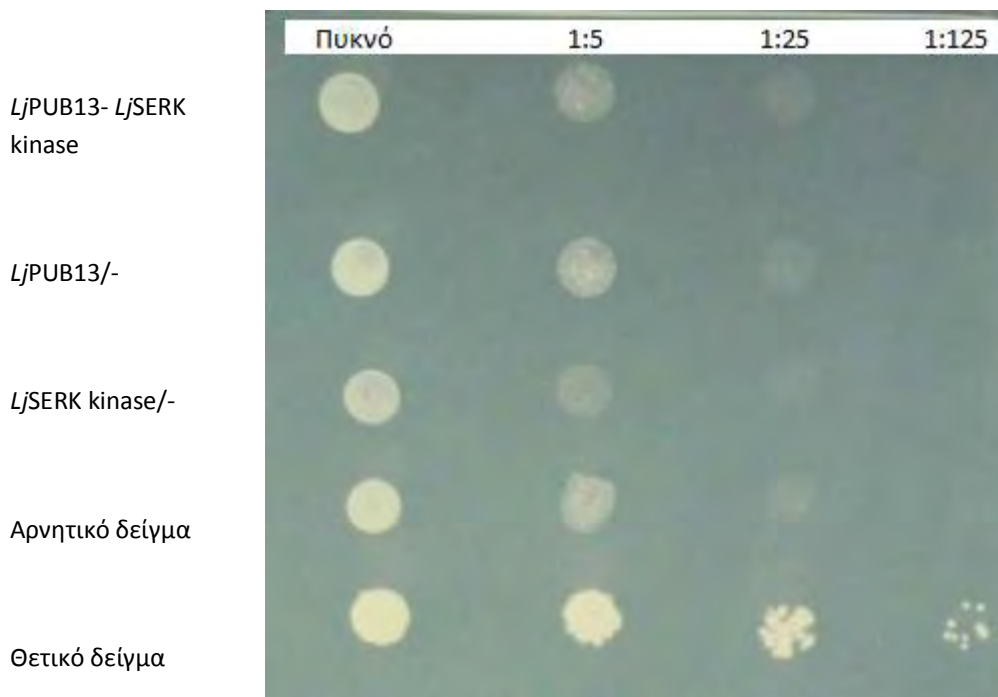
φορέας pGADT7	φορέας pGBKT7
<i>LjSERK</i> περιοχή κινάσης	<i>LjPUB13</i>
χωρίς το ένθεμα	<i>LjPUB13</i>
<i>LjSERK</i> περιοχή κινάσης	χωρίς το ένθεμα
χωρίς το ένθεμα	χωρίς το ένθεμα
pGADT7-T	pGBKT7-53

Οι αποικίες που κατάφεραν να αναπτυχθούν μεταφέρθηκαν στη συνέχεια σε υγρό θρεπτικό μέσο SD-Leu/-Trp στο οποίο αναπτύχθηκαν μέχρι να φτάσουν σε οπτική πυκνότητα OD₆₀₀ 0,5. Στη συνέχεια, έγιναν πενταδικές αραιώσεις των καλλιιεργειών οι οποίες βοηθούν στη μελέτη της ισχύς της αλληλεπίδρασης, σε περίπτωση που αυτή υπάρχει.



Εικόνα 19: Κηλίδες από υγρές καλλιέργειες κυττάρων, στις οποίες έχουν γίνει πενταδικές αραιώσεις. Το θρεπτικό υλικό είναι SD-Leu/-Trp. Αριστερά της εικόνας φέρεται ο συνδυασμός των πλασμιδίων που φέρουν τα μετασχηματισμένα κύτταρα.

Οι υγρές καλλιέργειες και οι πενταδικές τους αραιώσεις επιστρώθηκαν σε μορφή κηλίδων ταυτόχρονα σε στερεά θρεπτικά SD-Leu/-Trp (Εικόνα 19) και SD-Leu/-Trp/-His (Εικόνα 20). Σε περίπτωση αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών που εκφράζονται τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο που του λείπει η ιστιδίνη. Ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης έγινε επίσης και με απευθείας μεταφορά και επίστρωση αποικιών σε στερεό θρεπτικό SD-Leu/-Trp/-His, χωρίς να προηγηθεί υγρή καλλιέργεια (Εικόνα 21).



Εικόνα 20: Στερεή καλλιέργεια των μετασηματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό *-Leu/-Trp/-His*. Τα κύτταρα προέρχονται από υγρή καλλιέργεια *-Leu/-Tr*, η οποία έχει υποστεί πενταδικές αραιώσεις. Αριστερά της εικόνας είναι οι συνδυασμοί των πλασμιδίων

Από τα αποτελέσματα δεν φάνηκε να αλληλεπιδρούν οι πρωτεΐνες *LjPUB13* και *LjSERK3*. Μόνο τα κύτταρα που φέραν το συνδιασμό του θετικού ελέγχου κατάφεραν να αναπτυχθούν στο θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζε η ιστιδίνη. Το πείραμα επαναλήφθηκε αρκετές φορές έχοντας το ίδιο αποτέλεσμα.



***Εικόνα 21:**Ανάπτυξη κυττάρων ζύμης σε στερεό θρεπτικό $SD -Leu/-Trp/-His$. Είχε γίνει επίστρωση από αρχική στερεή καλλιέργεια $SD -Leu/-Trp$ των κυττάρων που φέρουν τους συνδυασμούς: θετικό δείγμα, αρνητικό δείγμα, $LjPUB13- LjSERK$ kinase, $LjPUB13/-$, $LjSERK$ kinase/ $-$. Από τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναπτύχθηκε τελικά μόνο το θετικό δείγμα*

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πρωτεΐνες που φέρουν επαναλήψεις Arm έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στη διαμεσολάβηση και ολοκλήρωση πολλών βασικών κυτταρικών λειτουργιών, τόσο στα ζωικά συστήματα όσο και στα φυτικά. Η σημασία των πρωτεϊνών αυτών σε διαδικασίες του φυτού όπως είναι η φυτική άμυνα και ανοσία, η απόκριση σε ορμόνες και ο κυτταρικός θάνατος έχει τεκμηριωθεί επαρκώς μέσα από ποικίλες μελέτες (Samuel *et al.*, 2006). Σε αυτήν την εργασία, έγινε προσπάθεια απομόνωσης και ενίσχυσης αλληλουχιών των οποίων οι πρωτεΐνες φέρουν Arm επαναλήψεις, στο φυτό *Lotus japonicus* και μελέτης της πιθανής εμπλοκής τους σε διαδικασίες που επηρεάζουν τη συμβίωση ανάμεσα σε ριζόβια και ψυχανθή. Αρχικά εντοπίσαμε και απομονώσαμε αλληλουχίες γονιδίων που κωδικοποιούσαν για πρωτεΐνες με Arm επαναλήψεις και ήταν κατατεθειμένες σε ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων. Το πρώτο γονίδιο που απομονώθηκε και ενισχύθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης η πλήρης αλληλουχία του, ήταν το *LjPUB13*, το ομόλογο γονίδιο του *AtPUB13* του *Arabidopsis thaliana* που έχει πρόσφατα χαρακτηριστεί (Lu *et al.*, 2011). Το δεύτερο γονίδιο που απομονώθηκε με τον ίδιο τρόπο ήταν το *LjARIA* που παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με το γονίδιο *ARIA* του *Arabidopsis*, που επίσης έχει καλά μελετηθεί (Kim *et al.*, 2004a). Δύο ακόμη αλληλουχίες, που βρέθηκαν να φέρουν δομικά μοτίβα που συνήθως συναντώνται ταυτόχρονα με επαναλήψεις Arm, ενισχύθηκαν με την τεχνική του 3'race, αλλά τελικά η αλληλουχισή τους έδειξε ότι δεν έφεραν επαναλήψεις Arm. Για να ελέγξουμε πιθανή συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων που φέρουν Arm επαναλήψεις και της εγκαθίδρυσης της συμβιωτικής σχέσης ριζοβίων-ψυχανθών, μελετήσαμε την έκφραση των *LjPUB13* και *LjARIA* σε μη-μολυσμένες ρίζες *Lotus* καθώς και σε μολυσμένες ρίζες, 48 ώρες μετά τη μόλυνση με το ριζόβιο. Ανάλυση με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου έδειξε ότι η έκφραση του *LjPUB13* είναι σχεδόν διπλάσια στις μολυσμένες ρίζες ενώ του *LjARIA* δε μεταβάλλεται. Η διαφορετική έκφραση του *LjPUB13* μεταξύ μολυσμένων και μη μολυσμένων ριζών μας ώθησε να επικεντρωθούμε στο γονίδιο *LjPUB13*. Το γονίδιο αυτό φαίνεται ότι διαμεσολαβεί στην αποδυνάμωση της κυτταρικής άμυνας σε περίπτωση εισβολής κάποιου φυτοπαθογόνου. Το μονοπάτι στο οποίο πιθανώς εμπλέκεται είναι αυτό της ουβικουιτινώσεως του υποδοχέα της βακτηριακής φλαζελλίνης FLS2 από την PUB13, η οποία φαίνεται να είναι μια E3 λιγάση της ουβικιτίνης. Πιο συγκεκριμένα, στο *Arabidopsis thaliana* ο υποδοχέας-κινάση

BAK1/SERK3 σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τον FLS2 παρουσία φλαζελλίνης ενώ ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με την AtPUB13 και την φωσφορυλιώνει. Η φωσφορυλίωση αυτή είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση της PUB13 με τον FLS2 (Chinchilla *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2011). Με αυτά τα δεδομένα, η μελέτη στράφηκε προς τον εντοπισμό του ομόλογου γονιδίου AtSERK3 στο *Lotus japonicus*. Πράγματι, μετά από ενίσχυση με 5'race μια αλληλουχίας που εντοπίστηκε στη βάση δεδομένων, καταφέραμε να έχουμε την πλήρους μήκους αλληλουχία του *LjSERK3*. Για να ελέγξουμε πιθανή συσχέτιση της έκφρασης του *LjSERK3* και της εγκαθίδρυσης της συμβιωτικής σχέσης ριζοβίων-ψυχανθών, μελετήσαμε τη συσσώρευση των μεταγράφων του σε μη-μολυσμένες ρίζες *Lotus* καθώς και σε μολυσμένες ρίζες, 48 ώρες μετά τη μόλυνση με το ριζόβιο. Ενδιαφέρον προκάλεσε το αποτέλεσμα της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, που έδειξε ότι το *LjSERK3* επίσης παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης στις μολυσμένες ρίζες (σε σύγκριση με τις μη-μολυσμένες), ακολουθώντας ακριβώς το πρότυπο έκφρασης που είχε παρατηρηθεί και για το *LjPUB13*. Το επόμενο στάδιο ήταν η μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών των γονιδίων *LjPUB13* και *LjSERK3*. Η σχέση τους μελετήθηκε με βάση το σύστημα δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα. Από τη συγκεκριμένη πειραματική δοκιμή δεν προέκυψαν στοιχεία που να στηρίζουν την άμεση αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών όπως συμβαίνει στο *Arabidopsis* (Lu *et al.*, 2011). Οι λόγοι για τους οποίους παρατηρήθηκε απόκλιση από το πρότυπο μονοπάτι του *Arabidopsis* είναι ακόμα άγνωστοι και μπορούν να γίνουν μόνο υποθέσεις. Υπάρχει η πιθανότητα πράγματι να μην αλληλεπιδρούν άμεσα οι δύο πρωτεΐνες, αντίθετα με αυτό που συμβαίνει στο *Arabidopsis*, οπότε κάτι τέτοιο θα σήμαινε ότι η *LjPUB13* δε συμμετέχει στο μονοπάτι ουβικουιτινίωσης του FLS2 και έχει ένα ρόλο διαφορετικό στις ρίζες του *Lotus*. Ενδέχεται όμως και να υπάρχει η αλληλεπίδραση αυτή αλλά να μην έγινε ορατή στις πειραματικές συνθήκες που ακολουθήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία. Μελλοντικές πειραματικές δοκιμές που θα είναι βασισμένες σε διαφορετικά συστήματα έκφρασης από αυτό του ζυμομύκητα και θα χρησιμοποιούν διαφορετικά πειραματικά πρωτόκολλα ίσως μπορέσουν να δώσουν μία πιο ξεκάθαρη εικόνα για τον αν τα αρχικά αυτά αποτελέσματά είναι σωστά. Ανεξάρτητα πάντως με τη συμμετοχή ή όχι των γονιδίων *LjPUB13* και *LjSERK* στο μονοπάτι ουβικουιτινίωσης του *LjFLS2*, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποτελούν μια αρχική ένδειξη της εμπλοκής και των δύο γονιδίων στις

αρχικές διαδικασίες αναγνώρισης ριζοβίου-ψυχανθούς και της εγκαθίδρυσης της συμβιωτικής σχέσης.

Παράρτημα:

Οι εκκινητές για την ενίσχυση του *LjPUB13* με PCR είναι:

Εκκινητής ευθύς 5'-CTTCCTTCAAGCGTTAGCAG-3'

Εκκινητής αντίστροφος 5'-CTCAGGTATCATCAAGGTTAG-3'

Οι εκκινητές για την ενίσχυση του *LjPUB13* με RT-PCR είναι:

Εκκινητής ευθύς 5'-ATGAAACTGCTGACAGAACCAA-3'

Εκκινητής αντίστροφος 5'-TCACCAGAAGAAAGGTGCACTA-3'

Η αλληλουχία του *LjPUB13* όπως προκύπτει μετά την ενίσχυσή του είναι:

```

5 ATGGAGTTGTTTGGAGTTGAGATAGCTGGCTCGGTGATTGAGCTGGTGAATGAGATAGCTAGCATCTGACTTCAGACCTATGTTGAAAGAGCAGTACTGCAACTGGCAGCGAGG
10
3 TACCTCCAACAACAACCTCAACTCTATCGACCGAGCCACTAATCGACCACTTACTCTATCGATCGTAGAGACTGAAGTCTGGATACCCTTCTTCGTATGACGTGAACCTCGCTCC
1 M E V V V E I A G S V I E L V N E I A S I S D F R P M V K K Q Y C N L A R R
9
5 TTGAAGTCTTCGTGCCTTTGTTGAGGAAATTAGGGACATGAAAGATCCCATCACTGACGAACTTCGAAATCCATGCTTGCCTTTAAGGAAGCTCTTGAATCGCAAGGAGCTTCTC
240
3 AACCTCGAAGAGCAGGAAACAAGCTCTTAATCCCTGACTTTCTAGGGTAGTGAATGCTTTGAAGCTTTAGGTAGCAAGCAAAATCTCTCGAGAACTTAGAGCTTTCTCGAAGAG
1 L K L L P L F E I R D M K D P I T D E T S K S M L A F K E A L E S A K E L L
9
5 AAATTCGGATGTGAAGCGCAAGATTACATGGTCTTGGAGGGGACCAATCATGAACAATTTATGAGGTGACAGCTCGGTGGAACAATCATTGAATGAATTTTCATGATAAA
360
3 TTTAAGCCTACACTTCGGTCTTAAATGTACCAAGAATCTCCCTGGTTAGTACTGTTTAAAGTACTCCACTGTCGAGCGACCTTGTATGTAAGTACTACCTTAAGGATACATTTT
1 K F G C E G S K I Y M V L E R D Q I M N K F Y E V T A R L E Q S L N G I S Y D K
9
5 CTTGACATTTCTGATGAAGTTAAGGACAGGTGAATGGTCTTCCGCACTTTGAAGAGGCAAAAGGAGGTTGATGAACCTGATGCAAGTTGATGAGGATATTTGTCCCTTTAC
480
3 GAACGTAAAGACTACTCAATTCCTGCTCCAACTTAACCAAGAAGGGTCAAACTTCTCCGGTTCCCTCCCAACTACTGGACTACAGTTCACATACCTCTATATACAGGAAATG
1 L D I S D E V K E Q V E L V L A Q F R R A K G R V D E P D V K L Y E D I L S L Y
9
5 AATGATAGTAGTGATGCAGCTACAGATCCAGCTGTTCTTAGCCGATTAGCTGAAAATTTGCAATTTGATGGGATAGCCGATTTTATTCATGAATCTCTCACATACATGATGGGA
600
3 TTAATATCCTACCTACCTGATGTTAGTCCGACCAAGATCGGCTAATCGACTTTTAACTGTTAACTCCCTATCGGCTAAAATAAGTACTTAGAGAGTGAATGATGATACACACCT
1 N D S L S D A A T D P A V L S R L A E K L Q L M G I A D F I H E S L T L H D M V G
9
5 CGAGTGGTGGGGATCCAGGGCCAGCCATCGAGAGATGTCATGTTATGGAAGAAGTAAAGGATTTATGTGCAAACTGAAACCTAGTCAAGGATGATATGTTGGAGCAAAGGCGCTT
720
3 CGCTCACCACCTTAGTCCCGGCTAGCTTCTACAGTTCACAACTTCTTCTAATTCCTAATCACAGCTTGAAGTTCGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
1 A S G G L D P G A R I E K M S M L L K I K D Y V Q T E N L V K D D N V G A K G L
9
5 CCTTCAAGCGTTAGCAGATTAGGCTCAATCGAAAGAATCATCCGCGCTTGTATTCCTACTGATTTTAAATGTCGGATTTCCTTGGAAATGATGCAAGATCCTGCTATTGTTCAACA
840
3 GGAAGTTCGCAATGCTCAATCCCACTAGCTTTCTTAGTAGGGCGGGAACAATAGGGATGACTAAAATTTACAGGCTAAAGGACCTTAACTAGCTCCTTAGCAGAGTAAACAAGTGT
1 P S S V S R L G S I E K N H P A L V I P T D F K C P I S L E L M Q D P V I V S T
9
5 GGACAGACTTATGAGCGTCTTGTATTTGAGAAGTGGTGAAGTGGGATGGGACATGCCCCAAAACAACAAGAGTCTCACTAGTACTGTTCTCACACCCCACTAGTGTGGAGCC
960
3 CCTGTCTGAACTCGGAAGAACAATCACTCTACCAACGTTCCGACCGTACCTCTGACGGTTTTGTGTGCTCAGAGTATCATGACAAAGAGTGGGTTGATGACCAATGCCTCG
1 G Q T Y E R S C I E K W L Q A G H G T C P K T Q Q S L T S T V L T P N Y V L R S
9
5 CTCATAGAACATGTTGATGAAGCAATGGCATAGACCCAAAACGACCCAGCCTCTCAACTAGCAAAATCAGCATCAGCTGCACCCAGCTGAGCGAAGTAAAGTGAATACTT
1080
3 GAGTATCTTATACCACTGCTCGGTACCGTATCTCGGTGGTTTTCGCGGTTGGAGAGTGGATCGTTAGTCTGATCGGACGTTGGGTCGACTCGCTTCACTTAACTTTAGAA
1 L I E Q W C E A N G I E P P K R P S T S Q P S K S A S A C T P A E R S K I E N L
9
5 CTCCAAAGCTCTCACTGTTAATCCTGAAGACAGAGATTTAGCTGCTGGTGAATCGCCCTTCTTSCAAAGCGCAATGAGATTAATCGGGTCGCAATTTGCTGAAGCTGGAGCAATCACT
1200
3 GAGTTTTGAGAGTAGACATAGGACTTCTGCTCTAATCGACGACCACTTAGCGGGAAGCACTTTCGCGTACGCTAATGACCGAGGTTAAGCACTTGACCTGTTATGGA
1 L Q K L S G N P E D Q R L A A G E I R L L A K R N A D N R V A I A E A G A I P
9
5 CTCCTTGTGTCTCTTTCGCTGCCGACTCTCGCACTCAAGAGCATGCTGTGACAGCGCTTTTGAATCTTCCATATATGAGAATAACAAGGGTGCATTGTCTTCTGGAGCAGTC
1320
3 GAGAAACAACAGGAGACAGGACCGGCTGAGAGCGTGAATCTCTGACGACACTCTCGCGAAAACCTTAGAAGGATATATCTCTTATTGTTCCACGTTAACACAGAAGACCTCGTCAG
1 L L V G L L S V P D S R T Q E H A V T A L L N L S I Y E N N K G C I V S S G A V
9
5 CCAGTATAGTTCATGTCGCTGAGGAAGGAGCATGGAAGCCCGTGAATGCGAGCAACACTTTTACGCTTTTCGGTGTGGAGCAAAACAAGGTTACATTTGTTTTCAGGAGCC
1440
3 GGTCCATATCAAGTACAGCACTCTTCTTCTGACCTTCGGCACTTTTACGTCGTCGTTGTGAAAAGTGGAAAGCCAACTGCTTTTGTTCATGTTAACCAAGAGTCTCTCGG
1 P G I V H V L R K G S M E A R E N A A A T L F S L S V V D E N K V T I G S S G A
9
5 ATACCCCGCTAGTACCGCTGAGTGAAGTACCAAGGGGTAAGAAGAGCGTGAACAAGCAGCTCTCAATTTGTGCATTTACAGGGTAAACAAGGAAGGCGGTGAGGCGGGT
1560
3 TATGGGGGATCACTCGACGACTCACTCCATGGTTTCCCACTTTCTGCGAGTTCGTCGAGAAGTAAACAGTAAATGCTCCATTTCTCTTCCGCACTCCCGCCA
1 I P P L V T L L S E G T Q R G K K D A A T A L F N L C I Y Q G N K G K A V R A G
9
5 GTTATCCCACTGATGAATCTGACAGCAAGTGGAGGAATGGTGGAGCAAGCATTTGGCAATTTGGCAATCTTGTCTAGTATCTGATGGGAGGCTCGGATTTGCTGCTCA
1680
3 CAATAGGGGTGACTACTTTGACGAGCTGCTTGGTTCACTTCTACCACTGCTTCTGTAACCGGTAACCCGTTAGAACAGATCAGTAGGACTACCTTCGAGCAGTAAACAGAGCT
1 V I P T L M K L L T E P S G M V D E A L A I L A I L S S H P D G K A A I G A A
9
5 GATGCGGTTCCAATTTGTTAGATTATTTGGAATGATCGCCGAGGAACAAGAGAAGTCACTGCTGTTTGTGACCTTTCTTCTGTTGATCAACAATATCTAGCACAAGCACAC
1800
3 CTAGCCCAAGTTAAAACCACTCAAAATAACCTTACCTAGCGGCTCTTGTCTTGTGAGTGCAGCAAAATCAGTGGAAAGAACCACTAGTGTATAGATCGTGTCTGTGTG
1 D A V P I L V E F I G N G S P R N K E N S A A V L V H L S S G D Q Q Y L A Q A H
9
5 AAATAGGTTGATGCTCTTTGTTGAACTGGCTCAACATGTCACAGATAGAGGCAAAAGAAAGGCGGCAAAATGATAGATGAGCAGGTTTCTTGGAGCAGAGGAGCAG
1920
3 TTTGATCCCACTACTGAGGAACAACCTTACCAGGTTTACCAATGCTATCTCCGTTTCTTCCGCGTGTAACTATCTAGCTACTGTCGCAAGAACTCGTCTCTCCGCTGTC
1 K L G L M T P L L E L A Q H G T D R G K R K A A Q L I D R M S R F L E Q Q R Q Q
9
5 CAGGAGCAGTGGAGGAAGTTCAACAACAACCTGAACCTCAAGCTCAGATGAGGATATCGAACCACCTTCAATTTCAACCTTGAATGATCACTGA
3
3 GTCTCTGCTCCACTCTCAAGTTTGTGTTGACTTGGAGTTCGAGTCTTACTCTTATGCTTGGTGAAGTAAAGATTGGAAGTACTATGACT
1
1 Q E Q V E E V Q T Q T E P Q A Q N E D I E P P S I S N L D D T
0

```

Οι εκκινητές για την ενίσχυση του *LjARIA* με PCR είναι:

Εκκινητής ευθύς 5'-ACTCTTGTACTAATGCTTGC-3'

Εκκινητής αντίστροφος 5'-TCAAACAATAAAAAAATTTCTACAAGCG-3'

Οι εκκινητές για την ενίσχυση του *LjARIA* με RT-PCR είναι:

Εκκινητής ευθύς 5'-GATCTTCTTGAATCTGCCAACC-3'

Εκκινητής αντίστροφος 5'-AACTTGAATGATGGAGGAGCAT-3'

Οι εκκινητές για την ενίσχυση του TC 72809 με 3'race είναι:

Εκκινητής ευθύς 5'-GGTAGCAATGAGTCGTAGAGTGAGG-3'

Anchor primer

Οι εκκινητές για την ενίσχυση του TC 59923 με 3' race είναι:

Εκκινητής ευθύς 5'-ACTTCATCATCAACCCCGCCACTGC-3'

Anchor primer

Οι εκκινητές για την ενίσχυση του *LjSERK3* με 5' race είναι:

SP1: 5'-TTGTCAAAGTCATGGGAATGCC-3'

SP2: 5'-TATTGAGACGCAGGAAACGTAG-3'

SP3: 5'-ATCCAAGCTCACCAAGTTTGTC-3'

Οι εκκινητές για την ενίσχυση του *LjPUB13* με RT-PCR είναι:

Εκκινητής ευθύς 5'-TTGGTTTGGCAAACTTATGG-3'

Εκκινητής αντίστροφος 5'-GTGCTAGATCGAAAGCCCTCT-3'

Η αλληλουχία του *LjSERK3* όπως προκύπτει μετά την ενίσχυσή του είναι:


```

5 ATGGAGGTTGTTGTTGAGGTTGAGATAGCTGGCTCGGTGATTGAGCTGGTGAATGAGATAGCTAGCATCTCTGACTTCAGACCTATGGTGAAGAAGCAGTACTGCAACTTGGCAGCGAGG
120
1 TACCTTCAACAACAACCTCAACTCTATCGACCGAGCCACTAATCGACCACTTACTCTACCGTCTGAGAGACTGAAGCTGGATACCCTCTTCGTCATGACCTGGAACCGTGGCTCC
3 M E V V V E V E I A G S V I E L V N E I A S I S D F R P M V K K Q Y C N L A R R
1
5 TTGAAGCTCTCTGCTCCCTTTGTTGAGGAAATTAGGACATGAAAGATCCCACCTGACGAACTCGAAATCCATGCTTGTCTTTAAGGAAGCTCTTGAATCGCAAAGAGCTTCTC
0
3 AACTTCAAGAGCAGGAAACAGCTCCCTTAATCCCTGACTTCTTAGGGTAGTGACTGCTTTGAAGCTTTAGTACGAACGAAATTCCTTCGAGAACTTAGACGTTTCTCGAAGAG
240
1 L K L L V P L F E E I R D M K D P I T D E T S K S M L A F K E A L E S A K E L L
3
5 AAATTCGGATGTGAAGCAGCAAGATTACATGGTCTTGAGAGGGACCAATCATGAACAATTCATGAGGTGACAGCTCGGCTGGAACAATCATTGAATGGAATTTCCATGATAAA
0
3 TTTAAGCCTACACTTCCGTCGTTCTAAATGACCAAGAACTCTCCCTGGTTAGTACTGTTTAAAGATACTCCACTGTCGAGCCGACCTTGTAGTAACTTACCTTAAGGATACTATTT
360
1 K F G C E G S K I Y M V L E R D Q I M N K F Y E V T A R L E Q S L N G I S Y D K
5
3 CTTGACATTTCTGATGAAGTTAAGGACGAGTTGAATGGTCTTGCACGTTTGAAGAGCCAAAGGAGGGTTGATGAACCTGATGTCAGTCAAGTTGATGAGGATATATTGTCCTTAC
0
1 GAACTGTAAGACTACTCAATTCCTCGTCCAACTTAACCAAGAACGGGTCAATCTTCCGTTTCTCCCACTACTGGACTACAGTTCAACATACCTCTATATACAGGAAATG
480
3 L D I S D E V K E Q V E L V L A Q F R R A K G R V D E P D V K L Y E D I L S L Y
5
3 AATGATAGTAGTGATGACGATACAGATCCAGCTTCTTAGCCGATTAGCTGAAAATGCAATTTGATGGGGATAGCCGATTTTATCATGAATCTCTCACATACATGACATGGTGGGA
0
3 TTACTATCATCACTACGATGTCTAGGTCGACAAGAATCGGCTAATCGACTTTTAAAGTTAATCCCTTACCCCTTACGGCTAAAATAAGTACTTAGAGAGTGAATGACTGTACACCT
600
1 N D S S D A A T D P A V A L S R L A E K L Q L M G I A D F I H E S L T L H D M V G
5
3 CGGATGGTGGGATCCAGGGCACGATCGAGAAGATGCAATGTTATGAAGAAGATAAAGGATTTATGCGAACTGAAAACCTAGTCAAGGATGATAATGTTGGAGCAAAGGCTT
0
3 CGCTCACCCCTAGTCCCGTGGTGTCTTACAGTTACAACTACTTCTTATTTCCTAATACAGCTTGTACTTTGGATCAGTCCCTACTATACACCTCGTTCCTCGGAA
720
1 A S G G D P G A R I E K M S M L L K K I K D Y V Q T E N L V K D D N V G A K G L
5
3 CCTCAAGCGTTAGCAGATTAGGTCATCGAAAAGAAATCATCGGCCCTTGTATCCCTACTGATTTAAATGTCGATTTCTTGAATGATGACGAGTCTGTCATGTTTCAACA
0
3 GGAATTCGCAATCGTCAATCCAGTTAGCTTCTTAGTAGCCGGGAAACATAGGGATGACTAAAATTCAGGCTAAAGGAACTTAACTACGCTTAGGACAGTAAACAAGTTGT
840
1 P S S V S R L G S I E K N H P A L V I P T D F K C P I S L E L M Q D P V I V S T
5
3 GGACAGACTTATGAGCGTCTTGTATTGAGAAGTGGTTGCAAGCTGGGCATGGGACATGCCCCAAAACACACAGAGTCTCCTAGTACTGTTCTCACACCCAACTACGTTTACGGAGC
0
3 CCTGTCTGAATCTCGAAGAACAATACTCTCACCAAGCTTCGACCCGTTACCTGTACGGTGTGTTGTTGTCCTCAGAGTGATGACAAGAGTGGGTTGATGACAAATGCTCG
960
1 G Q T Y E R S C I E K W L Q A G H G T C P K T Q Q S L T S T V L T P N Y V L R S
5
3 CTCATAGAACAATGTTGTAAGCCAAATGGCATAGAGCCACCAAAACGACCCAGCACTCTCAACCTAGCAAAATCAGATCAGCTGCAACCCAGCTGAGCGAAGTAGATTGAAAATCTT
0
3 GAGTATCTGTTACCACTACGCTTACCGTATCTCGTGGTGTGTTGGTGGTCTGGAGAGTTGGATGCTTTAGTCTAGTCCGACCTGGGTCGACTCGTCTTCACTTCACTTTAGAA
1080
1 L I E Q W C E A N G I E P P K R P S T S O P S K S A S A C T P A E R S K I E N L
5
3 CTCAAAAGCTCTCATCTGGTAACTCCTGAAGACAGAGATTAGCTGCTGGTGAATCGCCCTTCTGCAAAAGCGCAATCGAGATAATCGGTCGCAATGCTGAAGCTGGAGCAATACCT
0
3 GAGGTTTCGAGAGTAGACCATTAGGACTTCTGGTCTCAATCGACGACCACTTAGCGGGAAGAACGTTTCGCGTTACGCTATTAGCCAGCGTTAACGACTTGCACCTGTTATGGA
1200
1 L Q K L S S G N P E D Q R L A A G E I R L L A K R N A D N R V A I A E A G A I P
5
3 CTCCTTGTGGTCTTCTGTCGCTGCCGACTCTCGCACTCAAGAGCATGCTGTGACAGCGCTTTTGAATCTTTCCATATATGAGAATAACAAGGGTGCATTGTGCTTCTGGAGCAGTC
0
3 GAGGAACAACAGAGAAGCAGGACGCGCTGAGAGCGTGAGTTCTGATGACACTGTGCGGAAACTTAGAAAAGTATATACTTATTGTTCCACGTAACACAGAAGACCTCGTCAG
1320
1 L L V G L L S V P D S R T Q E H A V T A L L N L S I Y E N N K G C I V S S G A V
5
3 CCAGGTATAGTCTAGTGTGAGGAAAGGAAAGCATGGAAGCCCTGAAAATGCAGCAGCAACACTTTTCAGCCTTCGCTTGTGGAGCAAAACAAGGTACAAATTTGTTCTTCAGGAGCC
0
3 GGTCATATCAAGTACAGACTCTCTTCCCTGATACCTTCGGGCACTTTTACGCTGTGTTGTAAGTGGAAAGTGGAAAGCCAAACCTGCTTTTGTCCAATGTTAACAGAAAGTCTCGG
1440
1 P G I V H V L R K G S M E A R E N A A A T L F S L S V V D E N K V T I G S S G A
5
3 ATACCGCCCTAGTACGCTGCTGAGTGAAGTACCAAAAGGGTGAAGAAGACGCTGCAACAGCACTTTCAAATTTGTGCAATTCACAGGTAACAAAGGAAAGCGGTGAGGGCGGGT
0
3 TATGGCGGATCACTGCGACGACTCACTTCCATGGGTTCCCATCTTCTTCCGACGCTTTCGCTGAGAAAGTAAACACGTAATGGTCCCATTTCTTCCGCACTCCCGGCCA
1560
1 I P P L V T L L S E G T Q R G K K D A A T A L F N L C I Y Q G N K K A V R A G
5
3 GTTATTTCCACACTGATGAACTGCTGACAGAACAAGTGGAGGAATGGTGGACGAAGCATTTGGCCATTTTGTCTAGTATCCTGATGGGAAGGCTGCGATTTGGTGTGCA
0
3 CAATAAGGTTGACTACTTTGAGCACTGCTTGGTTCACCTCTTACCACCTGCTTGTGTAACCGGTAACCGTTAGAACAGATCAGTAGGACTACCTTCCGACGCTAACACAGCAGT
1680
1 V I P T L M K L L T E P S G G M V D E A L A I L A I L S S H P D G K A A I G A A
5
3 GATCGGTTCAATTTTGTAGAGTTTATTGGAAATGATCGCCGAGGAACAAGAACTCAGCTGCTGTTTATGTCACCTTTCTCTGTTGATCAACAATATCTAGCACAAGCACAC
0
3 CTACGCCAAGTTAAAACCATCTAAATACCTTACCTAGCGCTCTTGTCTTCTTGTAGTGCAGCAAAAATCAGTGGAAAGAACCACTAGTTGTTATAGATCGTGTCTGTTG
1800
1 D A V P I L V E F I G N G S P R N K E N S A A V L V H L S S G D Q Q Y L A Q T A H
5
3 AAATGAGGTTGATGACTCTTGTGGAACCTGACATGTTGACAGTACAGATGAGGCAAAAGGAGCGGCAATGATAGATCGCATGACGAGTTTCTTGGACGACAGAGGAGCAG
0
3 TTTGATCCCACTACTGAGGAACAACCTTACCGAGTTGTACCATGCTATCTCCGTTTCTTCCCGCTGTTAACTACTAGCCTGCTCCAAAGAACTCGTGTCTCCGCTGTC
1920
1 K L G L M T P L L E L A Q H G T D R G K R K A A Q L I D R M S R F L E Q Q R Q Q
5
3 CAGGAGCAGTGGAGGAAGTTCAACAACAACCTGAACTCAAGCTCAGAATGAGGATATCGAACCACTTCAATTTTCAACTGATGATACCTGA
0
3 GTCTCGTCCACTCCTTCAAGTTTGTGTTGACTTGGAGTTCGAGTCTTACTCTATAGCTTGGTGAAGTTAAAGATTGGAACACTATGAGACT
1
3 Q E Q V E E V Q T Q T E P Q A Q N E D I E P P S I S N L D D T .

```

Εκκινητές για κλωνοποίηση των *LjPUB13* και *LjSERK3* σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης:

LjPUB13:

Εκκινητής ευθύς EcoRI: 5'-ACGGAATTCATGGAGGTTGTTGTTGAG-3'

Εκκινητής αντίστροφος XhoI: 5'-AGCTCTCGAGTCAGGTATCATCAAGGTTAG-5'

LjSERK3:

Εκκινητής ευθύς EcoRI: 5'-ACGGAATTCATTTGCGAAAAAAGAAACC-3'

Εκκινητής αντίστροφος XhoI: 5'-AGCTCTCGAGTCATCTAGGGCCTGATAG-3'

Βιβλιογραφία:

Allen N.S., Bennett M.N., Cox D.N., Shipley A., Ehrhardt D.W. and S.R. Long (1994) Effects of Nod factors on alfalfa root hair Ca²⁺ and H⁺ currents and on cytoskeleton behavior. *Advances in Mol. Gen. of Plant-Microbe Interaction* **3**:107-114

Amador, V., Monte, E., Garcia-Martinez, J. L., and Prat, S. (2001). Gibberellins signal nuclear import of PHOR1, a photoperiod-responsive protein with homology to *Drosophila armadillo*. *Cell* **106**, 343–354.

Amor B.B., Shaw S.L., Oldroyd G.E., Maillet F., Penmetsa R.V., Cook D., Long S.R., Denarie J. and C. Gough (2003) The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J* **34**: 495–506

Ane J.M., Kiss G.B., Riely B.K., Penmetsa R.V., Oldroyd G.E., Ayax C., Levy J., Debelle F., Baek J.M., Kalo P., et al (2004) *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* **303**:1364–1367

Azevedo C, Santos-Rosa MJ, Shirasu K. *Trends Plant Sci.* Aug.2001 **6**:354.

Azevedo, C., Santos-Rosa, M. J., and Shirasu, K. (2001). The U-box protein family in plants. *Trends Plant Sci.* **6**, 354–358.

Basset B., Goodman R.N. and A. Novacky (1977) Ultrastructure of soybean nodules: Release of rhizobia from the infection thread. *Can. J. Microbiol.* **23**:573-582

Bauer W.D. (1981) Infection of legumes by rhizobia. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**:407-449

Boller T, Felix G. *Annu Rev Plant Biol.* 2009; **60**:379.

Bornberg Bauer, E., Beaussart, F., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A., and Weiner, J., 3rd (2005). The evolution of domain arrangements in proteins and interaction networks. *Cell.Mol. Life Sci.* **62**, 435–445.

Brewin N.J. (1991) Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**:191-226

Callaham D.A. and J.G. Torrey (1981) The structural basis of infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **59**:1647-1664

- Cardenas L., Holdawa-Clarke T.L., Sanchez F., Quinto C., Feijo J.A., Kunkel J.G. and P.K. Hepler** (2000) Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. -Plant Physiol 123: 443–451
- Catoira R., Galera C., de Billy F., Penmetsa R.V., Journet E., Maillet F., Rosenberg C., Cook D., Gough C. and J. Denarie** (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. Plant Cell 12: 1647–1665
- Chinchilla D,** et al. Nature. Jul 26.2007 448:497.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., and Zhu, J. K.** (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. J. Exp. Bot. 55, 225–236.
- Coates, J. C.** (2003). Armadillo repeat proteins: Beyond the animal kingdom. Trends Cell Biol.13, 463–471.
- Craigon, D. J., James, N., Okyere, J., Higgins, J., Jotham, J., and May, S.** (2004). NASCArrays: A repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. Nucleic Acids Res. 32, D575–D577.
- Denarie J., Debelle F. and J.C. Prome** (1996) *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Annu Rev Biochem **65**: 503–535
- Dodds PN, Rathjen JP.** Nat Rev Genet. Aug.2010 11:539.
- Downes, B. P., Stupar, R. M., Gingerich, D. J., and Vierstra, R. D.** (2003). The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in Arabidopsis: UPL3 has a specific role in trichome development. Plant J. 35, 729–742.
- Doyle J.J.** (1998) Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. Trends Plant Sci **3**: 473–478
- Ehrhardt D.W., Atkinson E.M. and S.R. Long** (1992) Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. Science **256**:998-1000
- Ehrhardt D.W., Wais R. and S.R. Long** (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. Cell 85: 673–681
- El Refy, A., Perazza, D., Zekraoui, L., Valay, J. G., Bechtold, N., Brown, S., Hu"lskamp, M., Herzog, M., and Bonneville, J. M.** (2003). The Arabidopsis KAKTUS gene encodes a HECT protein and controls the number of endoreduplication cycles. Mol. Genet. Genomics 270, 403–414.

Endre G., Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kalo P. and G.B. Kiss (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417:962–966

Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme Takagi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi Shinozaki, K. (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 3470–3488.

Giraudat, J. (1995). Abscisic acid signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 232–238.

Gomez-Gomez L, Boller T. *Mol Cell.* Jun.2000 5:1003.

Groves, M. R., and Barford, D. (1999). Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 383–389.

Gu, T., Mazzurco, M., Sulaman, W., Matias, D. D., and Goring, D. R. (1998). Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 382–387.

Gubler, F., Millar, A. A., and Jacobsen, J. V. (2005). Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 183–187.

Hatakeyama, S., and Nakayama, K. I. (2003). U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 635–645.

Heese A, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 17.2007 104:12217.

Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spaink H.P., van Kammen A. and T. Bisseling (1994) Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant physiol.* **105**:787-797

Hülkamp, M., Misera, S., and Jurgens, G. (1994). Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* 76, 555–566.

Huber, A. H., Nelson, W. J., and Weis, W. I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90, 871–882.

Jones JD, Dangl JL. *Nature.* Nov 16.2006 444:323.

Kijne J.W. (1992) The *Rhizobium* infection process. *Biological Nitrogen Fixation* pp. 349-398

Kim, M., Cho, H. S., Kim do, M., Lee, J. H., and Pai, H. S. (2003). CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase, interacts with NtPUB4, an armadillo repeat protein, in tobacco. *Biochim. Biophys. Acta* 1651, 50–59.

Kim, S., Choi, H. I., Ryu, H. J., Park, J. H., Kim, M. D., and Kim, S. Y. (2004a). ARIA, an *Arabidopsis* arm repeat protein interacting with a

transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, is a novel abscisic acid signaling component. *Plant Physiol.* 136, 3639–3648.

Kim, S., Kang, J. Y., Cho, D. I., Park, J. H., and Kim, S. Y. (2004b). ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J.* 40, 75–87.

Kim, Y. S., Lee, J. H., Yoon, G. M., Cho, H. S., Park, S. W., Suh, M. C., Choi, D., Ha, H. J., Liu, J. R., and Pai, H. S. (2000). CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase in tobacco. *Plant Physiol.* 123, 905–915.

Lee, J. H., Takei, K., Sakakibara, H., Sun Cho, H., Kim do, M., Kim, Y. S., Min, S. R., Kim, W. T., Sohn, D. Y., Lim, Y. P., and Pai, H. S. (2003). CHRK1, a chitinase-related receptorlike kinase, plays a role in plant development and cytokinin homeostasis in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 53, 877–890.

Levy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E.P., Ane J.M., Lauber E., Bisseling T., et al (2004) A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* **303**: 1361–1364

Li J, et al. *Cell.* Jul 26.2002 110:213.

Limpens E., Franken C., Smit P., Willemse J., Bisseling T and R. Geurts (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302: 630– 633

Long S.R. (1996) *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**: 1885–1898

Lu D, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 5.2010 107:496.

Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalska M., Szczyglowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., et al (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637–640

Martinez-Garcia, J. F., Garcia-Martinez, J. L., Bou, J., and Prat, S. (2001). The interaction of gibberellins and photoperiod in the control of potato tuberization. *J. Plant Growth Regul.* 20, 377–386.

Mauch Mani, B., and Mauch, F. (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 409–414.

Mitra R.M., Gleason C.A., Edwards A., Hadfield J., Downie J.A., Oldroyd G.E. and S.R. Long (2004a) A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4701–4705

- Monte, E., Amador, V., Russo, E., Martinez-Garcia, J., and Prat, S.** (2003). PHOR1: A U-Box GA signaling component with a role in proteasome degradation? *J. Plant Growth Regul.* 22, 152–162.
- Mudgil, Y., Shiu, S. H., Stone, S. L., Salt, J. N., and Goring, D. R.** (2004). A large complement of the predicted Arabidopsis ARM repeat proteins are members of the U-box E3 ubiquitin ligase family. *Plant Physiol.* 134, 59–66. *mycotrophism. Biosystems* 6: 153–164
- Nam KH, Li J.** *Cell.* Jul 26.2002 110:203.
- Newcomb W.** (1981) Nodule morphogenesis and differentiation. In *Biology of the Rhizobiaceae*. pp. 247-297
- Nusslein-Volhard, C., and Wieschaus, E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795–801.
- Oldroyd G.E. and J.A. Downie (2004)** Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 566–576
- Oldroyd G.E.D** (2001) Dissecting symbiosis: developments in Nod factor signal transduction. *Ann Bot (Lond)* 87: 709–718
- Olszewski, N., Sun, T. P., and Gubler, F.** (2002). Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14(Suppl.), S61–S80.
- Palma, K., Zhang, Y., and Li, X.** (2005). An importin alpha homolog, MOS6, plays an important role in plant innate immunity. *Curr. Biol.* 15, 1129–1135.
- Pawlowski K. and T.Bisseling** (1996) Rhizobial and actinorhizal symbioses: What are the shared features? *Plant Cell* 8: 1899–1913
- Peifer, M., Berg, S., and Reynolds, A. B.** (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* 76, 789–791.
- Peng, J., and Harberd, N. P.** (2002). The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 376–381.
- Perazza, D., Herzog, M., Hülskamp, M., Brown, S., Dorne, A. M., and Bonneville, J.-M.** (1999). Trichome cell growth in *Arabidopsis thaliana* can be derepressed by mutations in at least five genes. *Genetics* 152, 461–476.
- Pintard, L., Willems, A., and Peter, M.** (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J.* 23, 1681–1687.
- Pirozynski K.A. and D.W. Malloch** (1975) The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* 6: 153–164
- Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Gronlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., et al** (2003) Plant recognition

of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585–592

Remy W., Taylor T.N., Hass H. and H. Kerp (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11841–11843

Riggleman, B., Wieschaus, E., and Schedl, P. (1989). Molecular analysis of the armadillo locus: Uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Dev.* 3, 96–113.

Robatzek S, Chinchilla D, Boller T. *Genes Dev.* Mar 1.2006 20:537.

Rushton, P. J., Macdonald, H., Huttly, A. K., Lazarus, C. M., and Hooley, R. (1995). Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of alpha-Amy2 genes. *Plant Mol. Biol.* 29, 691–702.

Samuel M.A., Salt JN., Shiu SH., Goring D.R. (2006) Multifunctional arm repeat domains in plants.

Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D., and Lohmann, J. U. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* 37, 501–506.

Schulze B, et al. *J Biol Chem.* Mar 26.2010 285:9444.

Shaw S.L. and S.R. Long (2003) Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiol* 131:976–984

Silva, N. F., Stone, S. L., Christie, L. N., Sulaman, W., Nazarian, K. A., Burnett, L. A., Arnoldo, M. A., Rothstein, S. J., and Goring, D. R. (2001). Expression of the S receptor kinase in self-compatible *Brassica napus* cv. Westar leads to the allele-specific rejection of self-incompatible *Brassica napus* pollen. *Mol. Genet. Genomics* 265, 552–559.

Smalle, J., and Vierstra, R. D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 555–590.

Stone, S. L., Anderson, E. M., Mullen, R. T., and Goring, D. R. (2003). ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell* 15, 885–898.

Stracke S., Kistner C., Yoshida S., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Szczyglowski K. and M. Parniske (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959–962

- Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and Hinata, K.** (2000). The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. *Nature* 403, 913–916.
- Takayama, S., and Isogai, A.** (2005). Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 467–489.
- Takeuchi O, Akira S.** *Cell.* Mar 19.2010 140:805.
- Thomas, S. G., and Sun, T. P.** (2004). Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiol.* 135, 668–676.
- Toufighi, K., Brady, S. M., Austin, R., Ly, E., and Provart, N. J.** (2005). The Botany Array Resource: E-Northern, Expression Angling, and promoter analyses. *Plant J.* 43, 153–163.
- Traas, J., Hu"lskamp, M., Gendreau, E., and Ho"fte, H.** (1998). Endoreduplication and development: Rule without dividing? *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 498–503.
- Udvardi M.K. and D.A. Day** (1997) Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**:493–523
- Van Spronsen P.C., Bakhuizen R., van Brussel A.A.N. and J.W. Kijne** (1994) Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur. J. Cell Biol.* **64**:88-94
- Verma D.P.S** (1992) Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* **4**:373-382 vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11841–11843
- Wais R.J., Galera C., Oldroyd G., Catoira R., Penmetza R.V., Cook D., Gough C., Denarie J. and S.R. Long** (2000) Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13407–1341
- Yee D, Goring DR.** *J Exp Bot.* 2009; 60:1109.
- Yin, Z., Chen, J., Zeng, L., Goh, M., Leung, H., Khush, G. S., and Wang, G. L.** (2000). Characterizing rice lesion mimic mutants and identifying a mutant with broad-spectrum resistance to rice blast and bacterial blight. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 869–876.
- Zeng, L. R., Qu, S., Bordeos, A., Yang, C., Baraoidan, M., Yan, H., Xie, Q., Nahm, B. H., Leung, H., and Wang, G. L.** (2004). Spotted leaf11, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity. *Plant Cell* 16, 2795–2808.

Zeng, L., Yin, Z., Chen, J., Leung, H., and Wang, G. L. (2002). Fine genetic mapping and physical delimitation of the lesion mimic gene *Spl11* to a 160-kb DNA segment of the rice genome. *Mol. Genet. Genomics* 268, 253–261.

Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., and He, X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873–877.

Zhang J, et al. *Cell Host Microbe*. Apr 22.2010 7:290.

Zimmermann, P., Hennig, L., and Grisse, W. (2005). Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator. *Trends Plant Sci.* 10, 407–409.