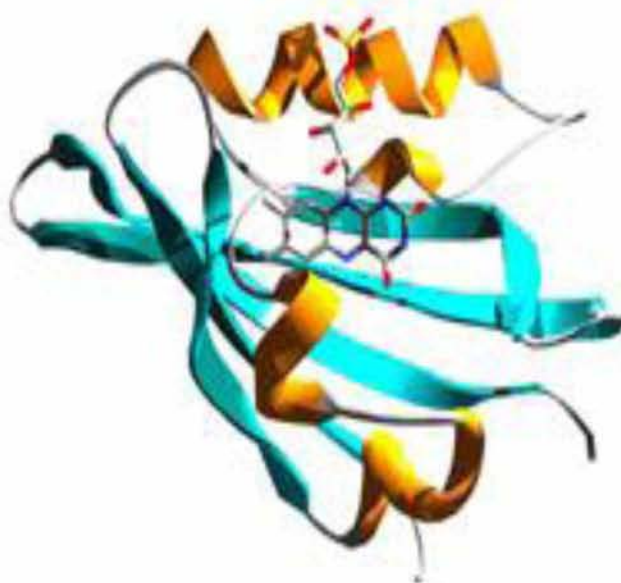


Διπλωματική Εργασία

**Μελέτη της λειτουργίας των πρωτεϊνικών
κινασών που ρυθμίζουν τη μεταφορά
αυξίνης στο *Arabidopsis thaliana***



Φωτοτροπίνη

Ειρήνη Βλαχάκη

Λάρισα 2010

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στην ερευνητική ομάδα του Dr.Claus Schwechheimer, στο Τμήμα Συστημικής Βιολογίας Φυτών του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου του Μονάχου, στη Γερμανία με επιβλέποντα τον Dr. Claus Schwechheimer μέσω μιας ανταλλαγής Erasmus για τρεις μήνες, από τον Οκτώβριο μέχρι το Δεκέμβριο του 2009.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην καθηγήτρια Καλλιόπη Παπαδοπούλου για την ενθάρρυνση της συμμετοχής μου στο πρόγραμμα Erasmus και για τη μεσολάβησή της στον Dr. Claus Schwechheimer να αποδεχί την αίτησή μου για εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας στο εργαστήριό του.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή Dr. Claus Schwechheimer για την επιστημονική του καθοδήγηση και υποστήριξη κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και στην Dr. Μελίνα Ζουρελίδου για την καθημερινή της καθοδήγηση και τις συμβουλές της πάνω σε τεχνικά και θεωρητικά ζητήματα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια και τη συνεργασία τους.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Dr. Κώστα Δελή για τη διόρθωση και επιμέλεια του ελληνικού κειμένου της πτυχιακής διατριβής.

Τριμελής Επιτροπή

Claus Schwechheimer (Καθηγητής, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο
Μονάχου, Γερμανία)

Καλλιόπη Παπαδοπούλου (Επίκουρος Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)

Κώστας Δελής (ΠΔ 407/80, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)

Abstract

Phototropism is the bending of a plant organ towards or away from a light stimulus. This plant movement is the result of differential cellular expansion between the lit and the shaded side, triggered by photoactivated blue light receptors. At least four different molecules have been found to participate in this phenomenon: phototropins, the phytohormone auxin, PIN auxin efflux facilitators and D6 protein kinases.

Phototropins are autophosphorylating protein kinases that act as blue light receptors of the plant. After their activation, they trigger the pathway leading to a redirection of auxin flows in the plant. PINs are membrane-bound auxin efflux carriers. Their localization on the cell determines the auxin transport, creating an auxin gradient, which is essential for shoot bending. D6PKs are protein kinases implicated in PIN phosphorylation. There are several indications suggesting that they act in the same pathway as phototropins.

Although, several lines of evidence indicate that these molecules are key components of phototropism, the exact biochemical mechanisms that govern their interplay remain unknown. However, phosphorylation seems to play a crucial regulating role. In this study I examined whether PINs and D6PKs are phosphorylated by phototropins using *in vitro* kinase assays.

1. Εισαγωγή

1.1 Φωτοτροπισμός

Φωτοτροπισμός ορίζεται η τάση ενός φυτικού οργάνου να κάμπτεται προς ή αντίθετα από την κατεύθυνση ενός φωτεινού ερεθίσματος. Είναι το αποτέλεσμα της διαφορετικής κυτταρικής αύξησης μεταξύ της φωτισμένης και της σκιασμένης πλευράς και πυροδοτείται από την πρόσληψη φωτός από υποδοχείς κυανού φωτός, (Robert et al., 2008).

Τόσο το κυανό φως όσο και η υπεριώδης ακτινοβολία Α (UVA) αποτελούν τις πιο αποτελεσματικές συχνότητες φωτός για την προώθηση του φωτοτροπισμού στα ανώτερα φυτά. Επιπλέον, φωτοτροπισμός έχει παρατηρηθεί μετά από διέγερση με πράσινο και κόκκινο φως σε περιορισμένο αριθμό ειδών. Μέχρι σήμερα η κατανόηση των μηχανισμών μεταγωγής του σήματος μετά τη διέγερση από τη φωτεινή ακτινοβολία δεν είναι ικανοποιητική. Σε αυτό συνέβαλλαν τόσο οι πολλές βιολογικά ενεργές συχνότητες της φωτονικής ροής όσο και η συμμετοχή της κάθε μίας σε περισσότερες από μία βιολογικές διεργασίες. Ωστόσο, η φωτοτροπική απόκριση στο *Arabidopsis thaliana* φαίνεται να είναι αποτέλεσμα των προσαρμογών που συντελούνται σε επίπεδο ενός συστήματος και όχι στη συνεργιστική δράση πολλών συστημάτων, (Liscum et al., 1995).

Η φωτοτροπική απόκριση κάθε φυτικού οργάνου είναι διαφορετική, έτσι ο βλαστός των φυτών χαρακτηρίζεται από θετικό φωτοτροπισμό (κίνηση προς το φως), γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη βελτιστοποίηση της φωτοσύνθεσης λόγω της εκμετάλλευσης μεγαλύτερου μέρους της φωτεινής ενέργειας. Αντίθετα, η ρίζα παρουσιάζει αρνητικό φωτοτροπισμό (κίνηση αντίθετα από την κατεύθυνση του φωτός), ο οποίος ενισχύει την ικανότητα του φυτού για πρόσβαση σε νερό και ανόργανα θρεπτικά στοιχεία, (Christie, 2007; Holland et al., 2009).

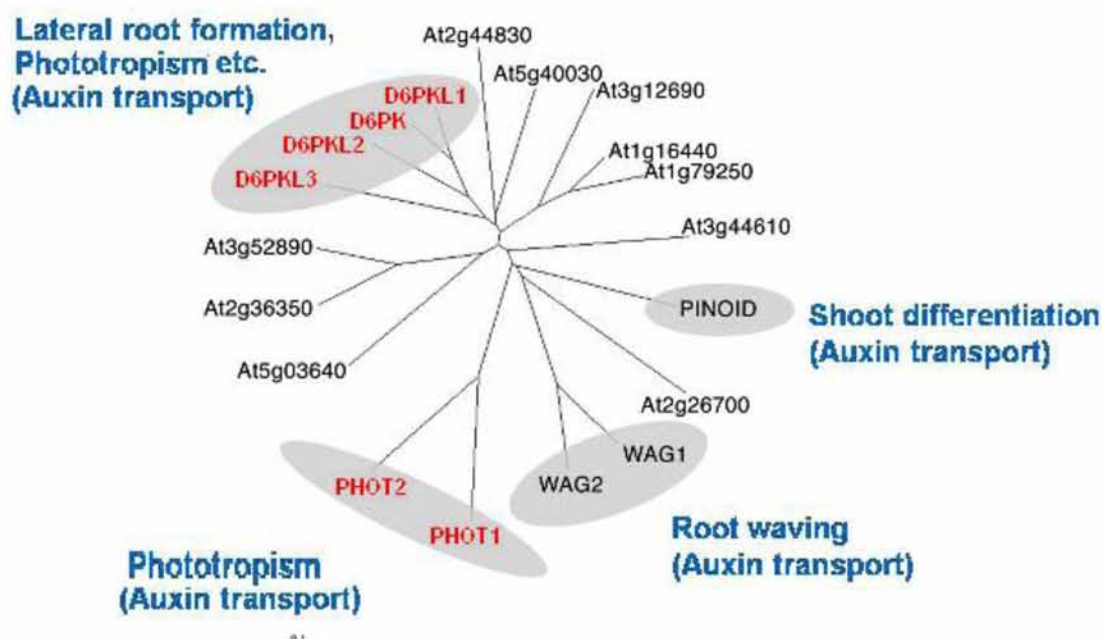
Επομένως, ο φωτοτροπισμός αποτελεί μια οικοφυσιολογική προσαρμογή των φυτών ώστε να διαμορφώνουν το σχήμα τους και την ανάπτυξη τους ανάλογα με της συνθήκες του περιβάλλοντος.

1.2 Παράγοντες-κλειδιά στο φωτοτροπισμό

1.2.1 Οι φωτοτροπίνες

Οι φωτοτροπίνες (PHOT1 & PHOT2) είναι πρωτεΐνες-φωτοϋποδοχείς του κυανού φωτός. Ανήκουν στην AGC οικογένεια φυτικών κινασών, (Εικόνα 1), η οποία παρουσιάζει ομολογία με την c-AMP εξαρτώμενη πρωτεϊνική κίνηση A, την cGMP εξαρτώμενη πρωτεϊνική κίνηση G και την πρωτεϊνική κίνηση C των θηλαστικών που εξαρτάται από φωσφολιπίδια. Οι φωτοτροπίνες είναι μέλη της AGCVIIIb υποοικογένειας, (Christie, 2007).

Το γεγονός ότι είναι ανεξάρτητες από κινάσες-ενεργοποιητές που δρουν ανοδικά (upstream) τις κάθιστα μοναδικές στην οικογένεια AGC, (Bögre et al., 2003).

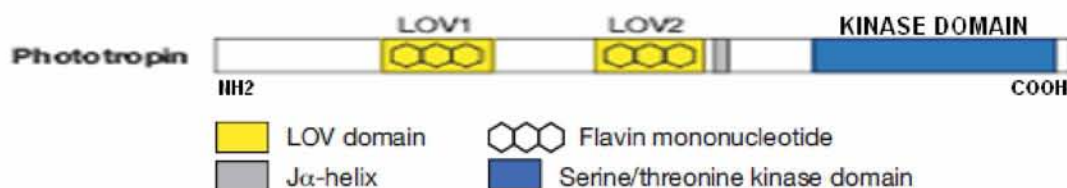


Εικόνα 1: Οι φωτοτροπίνες και οι πρωτεϊνικές κινάσες της οικογένειας D6PK ανήκουν στην AGCVIII οικογένεια, (Τμήμα Συστημικής Βιολογίας Φυτών, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Μονάχου).

Τα γονίδια *PHOT1* και *PHOT2* προέρχονται πιθανότητα από το διπλασιασμό ενός αρχικού γονιδίου γεγονός που δικαιολογεί τη μεγάλη ομοιότητα των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν, (Holland et al., 2009). Επιπρόσθετα, η ανάλυση των γενετικών τόπων των δύο γονιδίων έδειξε παρόμοια οργάνωση των ιντρονίων επιβεβαιώνοντας την κοινή προέλευσή τους, (Galván-Ampudia et al., 2007).

Οι φωτοτροπίνες απαντώνται σε όλα τα ανώτερα φυτά καθώς επίσης, τα πτεριδόφυτα, τα βρυόφυτα και τα φύκη, (Christie, 2007).

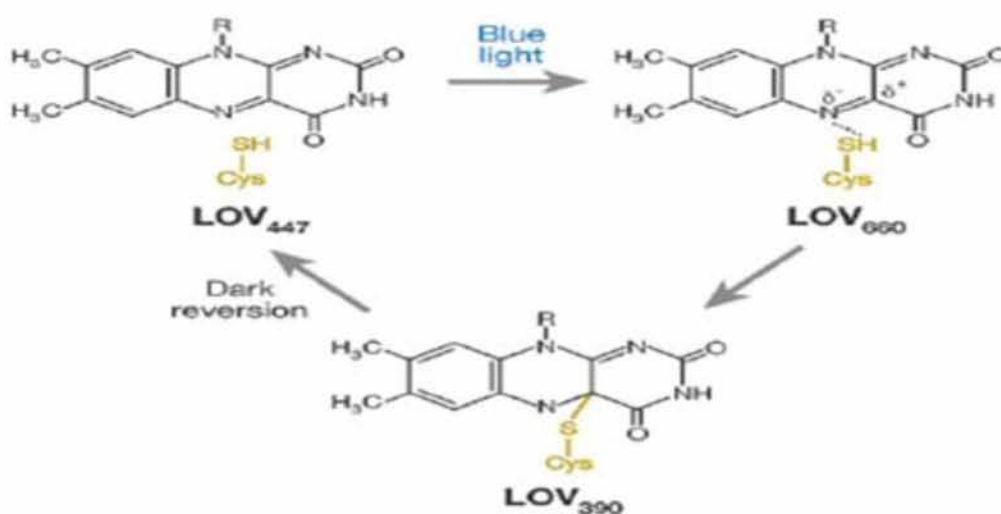
Στην πρωτεϊνική δομή των φυτικών φωτοτροπινών διακρίνονται δύο μέρη: το φωτο-αισθητήριο στο άμινο-τελικό άκρο και το πρωτεϊνικό τμήμα της κινάσης σερίνης/θρεονίνης στο κάρβοξυ-τελικό άκρο, (Christie, 2007), (Εικόνα 2). Τόσο το τμήμα της πρωτεΐνης που αποτελεί το δέκτη της φωτεινής ενέργειας όσο και η περιοχή της κινάσης είναι απαραίτητα για τη διαμεταγωγή του σήματος του φωτοτροπισμού, (Holland et al., 2009).



Εικόνα 2: Απεικόνιση των δομικών περιοχών των φωτοτροπινών, με τα χρωμοφόρα τους, (Christie, 2007).

Η άμινο-τελική περιοχή που περιλαμβάνει τους φωτοαισθητήρες των φωτοτροπινών διαθέτει δύο αρκετά συντηρημένες επαναλαμβανόμενες πρωτεϊνικές περιοχές 110 περίπου αμινοξέων που ορίζονται ως LOV1 και LOV2. Το ακρωνύμιο LOV προκύπτει από τα εξωγενή σήματα φως (light), οξυγόνο (oxygen) και τάση (voltage) που ρυθμίζουν τις περιοχές αυτές. Οι LOV περιοχές αποτελούνται από 5 αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, συνδεδεμένες με 2 α-έλικες. Κάθε περιοχή LOV συνδέεται με ένα αποπρωτεϊνικό φωτοδέκτη, το φλαβινομονονουκλεοτίδιο (FMN) που λειτουργεί ως αισθητήρας του κυανού φωτός, (Christie, 2007).

Μια εξαρτώμενη από το φως περιοδική επανάληψη συμβαίνει στις φωτοευαίσθητες περιοχές LOV σε απόκριση στην απορρόφηση κυανού φωτός, (Εικόνα 3). Στο σκοτάδι, το χρωμοφόρο FMN βρίσκεται σε μονήρη θεμελιώδη κατάσταση (singlet ground state), δεσμευμένο μη ομοιοπολικά στην περιοχή LOV. Σε αυτή την κατάσταση, η LOV περιοχή είναι σε θέση να απορροφήσει κυανό φως και αναφέρεται ως LOV₄₄₇. Απορρόφηση ενός και μόνο φωτονίου με συχνότητα στην περιοχή του κυανού φωτός έχει ως αποτέλεσμα τη γένεση ενός διεγερμένου μονήρους FMN που ταχύτατα μετατρέπεται σε μια τριπλή κατάσταση LOV₆₆₀, μετατοπισμένη προς την ερυθρή περιοχή του φάσματος ακτινοβολίας. Η φλαβίνη τριπλής κατάστασης που προκύπτει, γρήγορα διασπάται για να σχηματίσει εκ νέου ένα ομοιοπολικό προϊόν προσθήκης ανάμεσα στο C(4a) άτομο του FMN και στην κυστεΐνη στο εσωτερικό ενός υψηλά συντηρημένου μοτίβου της περιοχής LOV. Η κατάσταση αυτή παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης που πλησιάζει την υπεριώδη ακτινοβολία και αναφέρεται ως LOV₃₉₀. Το FMN-κυστεϊνικό προϊόν προσθήκης είναι πλήρως αναστρέψιμο στο σκοτάδι ή μετά από απορρόφηση ενός δεύτερου πρωτονίου που πλησιάζει τη συχνότητα της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Είναι ευρέως αποδεκτό, ότι το FMN-κυστεϊνικό προϊόν προσθήκης LOV₃₉₀ είναι η ενεργή σηματοδοτική κατάσταση που ενεργοποιεί τον φωτοϋποδοχέα, (Holland et al., 2009).

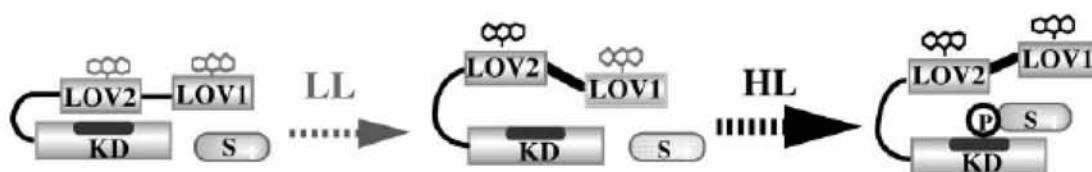


Εικόνα 3: Σχηματική παράσταση της φωτοχημικής διαδικασίας της περιοχής LOV υπό ακτινοβολία μπλέ φωτός, (Christie, 2007).

Η LOV2 είναι σημαντικά πιο φωτοχημικά ενεργή (photodynamic) σε σχέση με τη LOV1 και οι πιέσεις της φυσικής επιλογής σε αυτήν είναι ισχυρότερες σε σχέση με αυτές στη LOV1, (Holland et al., 2009).

Ο όρος **κβαντική απόδοση** αποδίδει το λόγο των μορίων φωτοϋποδοχέα που συμμετέχουν στη φωτοχημική αντίδραση προς τον αριθμό των φωτονίων που απορροφώνται. Τόσο για τη PHOT1 όσο και για τη PHOT2, η LOV2 έχει μεγαλύτερη κβαντική απόδοση για τον ωθούμενο από το φως σχηματισμό του FMN-κυστεϊνικού προϊόντος προσθήκης σε σχέση με τη LOV1. Επιδρά ως καταστολέας της δραστηριότητας κινάσης της φωτοτροπίνης στο σκοτάδι και είναι απαραίτητη στο μηχανισμό αυτοφωσφορυλίωσης της PHOT1 (Εικόνες 4, 9). Συμπερασματικά, η LOV2 μπορεί να θεωρηθεί ως ένας μοριακός διακόπτης για το φως που ελέγχει τη ενεργότητα της καρβοξυ-τελικής περιοχής κινάσης, (Christie, 2007).

Η φωτο-αντιδραστικότητα (photoreactivity) της LOV1, αντίθετα, δεν αρκεί για να προκαλέσει την αυτοφωσφορυλίωση της PHOT1 και την κάμψη του φυτού. Ο ακριβής ρόλος της LOV1 παραμένει άγνωστος. Μελέτες προτείνουν ότι παίζει ρόλο στο διμερισμό της φωτοτροπίνης. Διαφορετικά πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι παρατείνει τη διάρκεια ζωής της ενεργότητας του φωτοϋποδοχέα, (Christie, 2007). Τέλος, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι δρα ως εξασθενητής της ενεργοποίησης της κινάσης της φωτοτροπίνης από το φως, (Matsuoka et al., 2005), (Εικόνα 4).

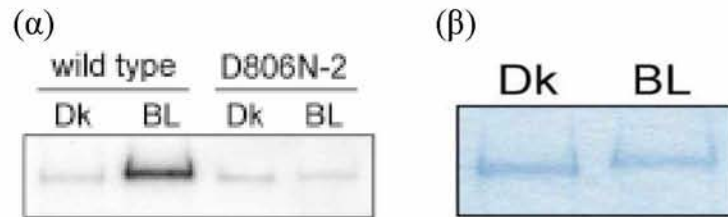


Εικόνα 4: Οι ρόλοι των περιοχών LOV1 και LOV2 σε συνδυασμό με την επίδραση του φωτός στη φωσφορυλίωση υποστρωμάτων από τη φωτοτροπίνη. P: φωσφορικό, S: υπόστρωμα, LL: συνθήκες χαμηλού φωτισμού, HL: συνθήκες υψηλού φωτισμού, (Matsuoka et al., 2005).

Παρόλο που οι πρωτεΐνες PHOT1 και PHOT2 ενεργούν από κοινού στη ρύθμιση του φωτοτροπισμού στο υποκοτύλιο του *Arabidopsis* ως απόκριση σε συνθήκες υψηλού φωτισμού, μόνη της η PHOT1, αναλαμβάνει τον έλεγχο της διαδικασίας υπό συνθήκες χαμηλού φωτισμού, (Christie, 2007). Επιπλέον, το μετάλλαγμα *phot1* είναι μη φωτοτροπικό σε αντίθεση με το μετάλλαγμα *phot2* που εμφανίζει φωτοτροπική κάμψη, (Εικόνα 20). Αυτό σημαίνει ότι η PHOT1 είναι ο κυρίαρχος υποδοχέας που μεσολαβεί στο φωτοτροπισμό. Ως εκ τούτου, στις μελέτες για αυτή την εργασία εστίασα στην PHOT1.

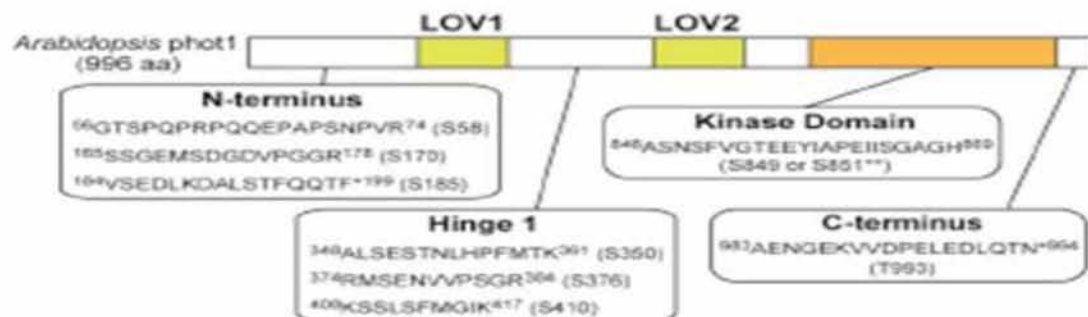
Ως απόκριση στο κυανό φως, η PHOT1 αυτοφωσφορυλιώνεται. Πράγματι, η PHOT1 σε πολλά φυτικά είδη παρουσιάζει μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα μετά από ακτινοβολία με κυανό φως, πράγμα που εν μέρει μπορεί να δικαιολογηθεί από αυτοφωσφορυλίωση σε πολλαπλές θέσεις, (Christie, 2007), (Εικόνα 5). Έχει δειχθεί ότι οι φωτοτροπίνες αυτοφωσφορυλιώνονται τόσο σε διαλυτά εκχυλίσματα κυττάρων εντόμων που

εκφράζουν φωτοτροπίνες (*in vitro*) όσο και σε τμήματα μεμβρανών του *Arabidopsis* (*in vivo*), (Matsuoka et al., 2005).



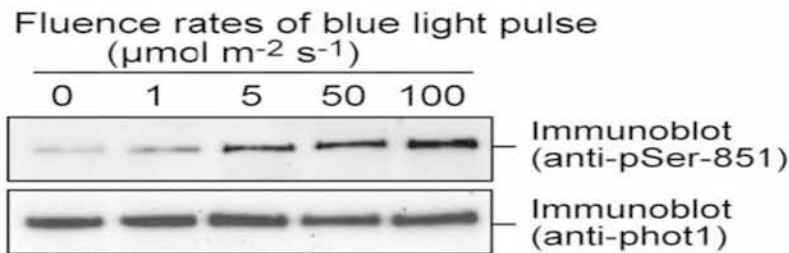
Εικόνα 5: (α) Αυτοφωσφορυλίωση της PHOT1 *in vivo* στο *Arabidopsis*, που προκλήθηκε από κυανό φως. Εκχλωτικά νεαρά φυτά σημασμένα με ^{32}P διατηρήθηκαν στο σκοτάδι (D) ή ακτινοβολήθηκαν με κυανό φως σε $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ για ένα λεπτό (BL). Από τα μικροσώματα των φυταρίων απομονώθηκε με ανοσοκατακρήμνιση η πρωτεΐνη PHOT1 και διαχωρίστηκε με SDS/PAGE. Στην εικόνα παρατίθεται ένα αυτοραδιογράφημα. Όταν απενεργοποιηθεί η κινάση D806N-2 δεν αυξάνεται η ποσότητα της φωσφορυλίωσης μετά από ακτινοβολήση με κυανό φως και η ηλεκτροφορητική κινητικότητα της BL ακτινοβολημένης PHOT1 αγρίου τύπου είναι μειωμένη. (β) Ανοσοκαθαρισμένη PHOT1 με χρώση Coomassie Brilliant Blue σε πήκτωμα. Είναι εμφανές ότι η δραστηριότητα της PHOT1 και στα δύο δείγματα είναι η ίδια. Φαίνεται επίσης, η μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα της BL ακτινοβολημένης PHOT1, (Inoue et al., 2008).

Η αυτοφωσφορυλίωση της PHOT1 συντελείται σε πολλαπλά κατάλοιπα σερίνης, (Εικόνα 6). Έχει δειχθεί ότι χαρακτηριστικά κατάλοιπα σερίνης μπορεί να φωσφορυλιώνονται ως απόκριση στη διαφορετική ποιότητα φωτισμού ενός φυτικού οργανισμού, (Christie, 2007).



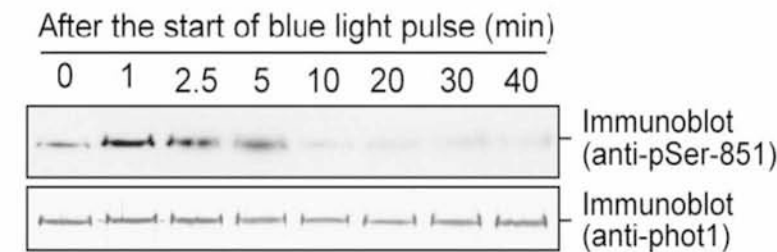
Εικόνα 6: Οι αναγνωρισμένες θέσεις φωσφορυλίωσης στην PHOT1. Επισημαίνονται οι φωσφοπεπτιδικές αλληλουχίες και οι θέσεις Ser και Thr, (Inoue et al., 2008).

Η αυτοφωσφορυλίωση των φωτοτροπινών εξαρτάται από την ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας. Υψηλότερες τιμές έντασης κυανής ακτινοβολίας αντιστοιχούν σε ισχυρότερα σήματα στην αυτοραδιογραφία, (Inoue et al., 2008), (Εικόνα 7).



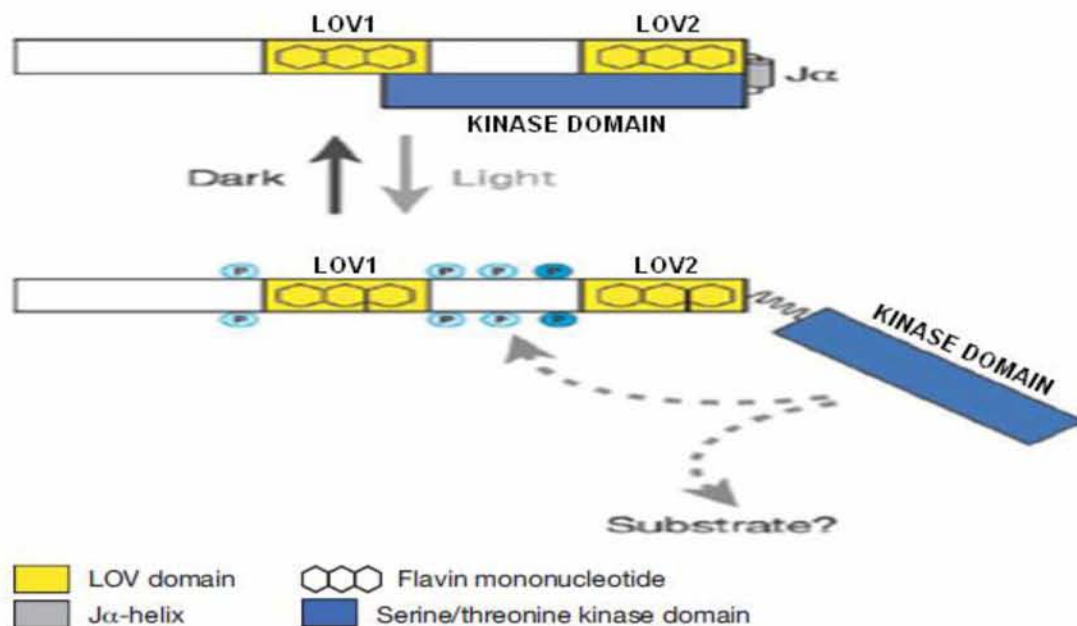
Εικόνα 7: Εξάρτηση της φωσφορυλίωσης της Ser-851 από την ένταση της κυανής ακτινοβολίας. Εκχλωτικά νεαρά φυτά ακτινοβολήθηκαν με κυανό φως για 30 δευτερόλεπτα στις τιμές φωτισμού που παρουσιάζονται. Ένα λεπτό μετά την έναρξη φωτισμού απομονώθηκαν μεμβράνες από μικροσώματα. 40 μg και 20 μg πρωτεΐνης της μεμβράνης χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση pSer-851 (πάνω) και PHOT1 (κάτω), αντίστοιχα, (Inoue et al., 2008).

Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η φωσφορυλίωση της PHOT1 μειώνεται μετά από κάποιο χρόνο *in vivo*, (Inoue et al., 2008), (Εικόνα 8). Η μοριακή βάση αυτής της συμπεριφοράς δεν έχει κατανοηθεί ακόμη.



Εικόνα 8: Χρονική εξέλιξη της φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης της Ser-851 ως απόκριση σε κυανό φως. Τα φυτά ακτινοβολήθηκαν με κυανό φως έντασης $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, ελήφθησαν δείγματα σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία μετά την έναρξη της ακτινοβολίας. Μεμβράνες από μικροσώματα απομονώθηκαν άμεσα και χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση της pSer-851 (πάνω) και της PHOT1 (κάτω), (Inoue et al., 2008).

Μοντέλο φωτο-ενεργοποίησης του υποδοχέα: Μελέτες πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) έχουν αναγνωρίσει μια συντηρημένη α -έλικα ("Ja") στο κάρβοξυ-τελικό άκρο της LOV2. Σε συνθήκες σκότους, η Ja αλληλεπιδρά με τη LOV2 καθιστώντας τη φωτοτροπίνη μη φωσφορυλιωμένη και ανενεργή, (Εικόνα 9). Με την απορρόφηση ενός φωτονίου από το μη ομοιοπολικά συνδεδεμένο μόριο FMN σχηματίζεται το ενεργό κυστεϊνικό προϊόν προσθήκης της περιοχής LOV2 που επιφέρει προοδευτικές δομικές αλλαγές στην Ja. Η Ja-έλικα αποδιατάσσεται και η κάρβοξυ-τελική περιοχή κινάσης ενεργοποιείται. Αυτό σταθερά οδηγεί σε αυτοφωσφορυλίωση του φωτοϋποδοχέα και πιθανή φωσφορυλίωση άγνωστων μέχρι τώρα πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, (Christie, 2007).



Εικόνα 9: Σχηματική επισκόπηση της ενεργοποίησης της κάρβοξυ-τελικής περιοχής κινάσης των φωτοτροπινών από το φως, (Christie, 2007).

Οι κινήσεις των φωτοτροπινών δεν περιορίζονται στο επίπεδο των Å μετά το σχηματισμό του LOV₃₉₀. Στο σκοτάδι, η PHOT1 είναι σε στενή αλληλεπίδραση με την πλασματική μεμβράνη, πιθανώς μέσω της κάρβοξυ-τελικής περιοχής κινάσης. Το κυανό φως επιφέρει μια σχετικά ταχεία (τάξη μεγέθους min) μετακίνηση μέρους των PHOT1 σε διαφορετικές ενδοκυτταρικές θέσεις. Παρόμοιες ιδιότητες έχουν παρατηρηθεί και στη PHOT2 που εντοπίζεται στο σύστημα Golgi.

Ολόκληρη η φωτοτροπίνη, λοιπόν, φαίνεται να μετακινείται από το ένα τμήμα του κυττάρου στο άλλο σε απόκριση στο κυανό φως. Προς το παρόν, δεν είναι γνωστό πώς η μετακίνηση των φωτοτροπινών επιφέρει μια συγκεκριμένη φυσιολογική απόκριση. Στοιχεία υποστηρίζουν ότι αυτή η δυναμική συμπεριφορά μπορεί να σχετίζεται με προσαρμογή ή απευαισθητοποίηση του υποδοχέα ή εξασθένηση του σήματος. Συνεπώς, η PHOT1 στη μεμβράνη είναι πιο 'ενεργή' σε σχέση με την εσωτερικευμένη PHOT1, (Holland et al., 2009).

1.2.2 Η φυτορμόνη αυξίνη

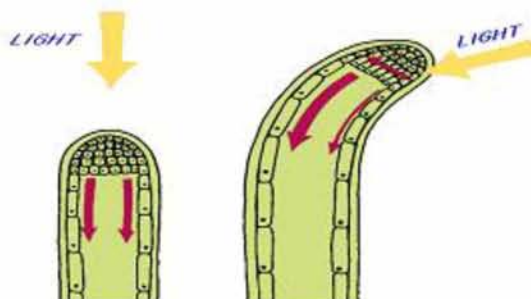
Η αυξίνη είναι μια φυτορμόνη που συντίθεται κατά κύριο λόγο στο ακραίο μερίστωμα του βλαστού. Στα ανώτερα φυτά παράγεται κυρίως μέσω των βιοσυνθετικών μονοπατιών τρυπταμίνης (TAM) και ινδολ-3-πυρουβικού οξέος (IPA). Ανάμεσα στις πολλαπλές φυτικές διαδικασίες στις οποίες εμπλέκεται η αυξίνη ανήκει και ο φωτοτροπισμός.

Όταν ο βλαστός αναπτύσσεται κατακόρυφα, η αυξίνη μεταφέρεται πολικά από την αναπτυσσόμενη κορυφή προς τη ζώνη επιμήκυνσης. Ο πολικός τρόπος με τον οποίο μεταφέρεται από την κορυφή προς τη βάση καθορίζεται αναπτυξιακά και είναι ανεξάρτητος από τη βαρύτητα. Η αυξίνη, ωστόσο,

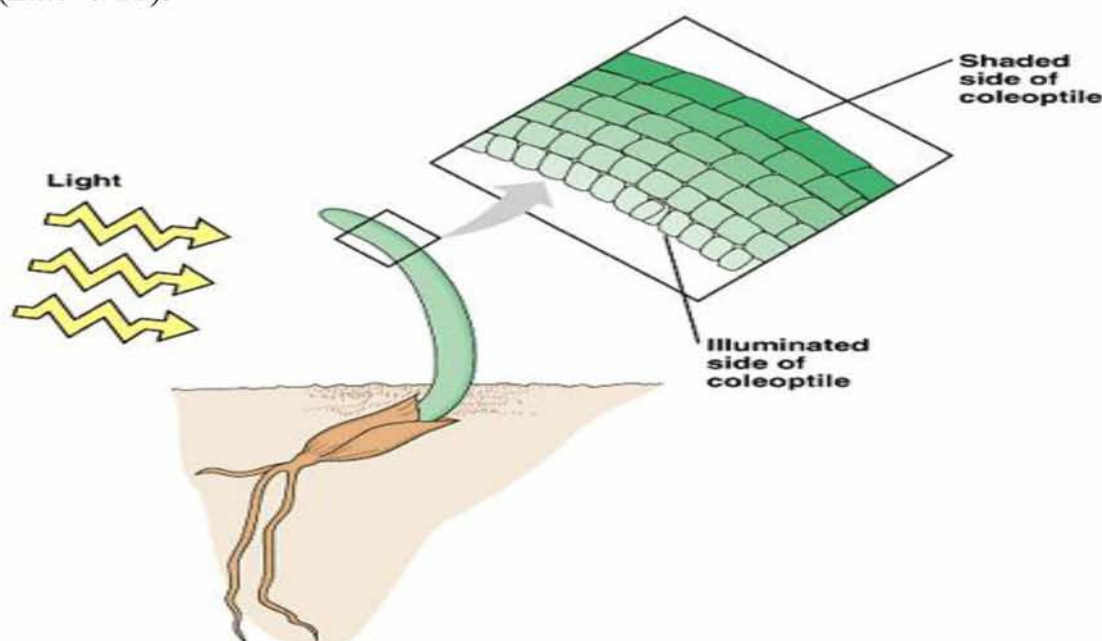
μπορεί να μεταφερθεί και πλευρικά. Αυτή η πλευρική μετακίνησή της αποτελεί βασικό στοιχείο του μηχανισμού των τροπισμών.

Το μοντέλο φωτότροπισμού με βάση την αυξίνη: Η αυξίνη που παράγεται στην κορυφή, όταν δεχθεί ένα κατευθυνόμενο φωτεινό ερέθισμα, αντί να κινηθεί βασιπεταλικά, μεταφέρεται πλευρικά προς τη σκιασμένη πλευρά.

Μόλις βρεθεί στη σκιασμένη πλευρά της κορυφής, η αυξίνη κινείται βασιπεταλικά προς τη ζώνη επιμήκυνσης, όπου προωθεί την επιμήκυνση των κυττάρων, (Εικόνα 10). Η επιτάχυνση της ανάπτυξης στην σκιασμένη πλευρά και η επιβράδυνσή της στην φωτιζόμενη (differential growth) οδηγεί στην κάμψη προς την κατεύθυνση του φωτός, (Taiz, Zeiger, 2006), (Εικόνα 11).



Εικόνα 10: Σχηματική παράσταση του μοντέλου φωτότροπισμού με βάση την αυξίνη (<http://www.cartage.org.lb/en/themes/Sciences/BotanicalSciences/PlantHormones/Nutrition/Nutrition.htm>)



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της κάμψης του κολεόπτλου προς φωτεινό ερέθισμα ως αποτέλεσμα διαφορετικής κυτταρικής επέκτασης ανάμεσα στην φωτιζόμενη και σκιαζόμενη πλευρά, (<http://biotic.no.sapo.pt/images/phototropism.jpg>).

1.2.3 Πρωτεΐνες PIN

Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες PIN-FORMED (PIN) ορίζονται, μέσω μοριακών μελετών γενετικής στο *Arabidopsis*, ως πρωτεΐνες εκροής της αυξίνης. Καθορίζουν την Πολική Μεταφορά Αυξίνης (Π.Μ.Α.) μέσω του ασύμμετρου υποκυτταρικού εντοπισμού τους, (Robert et al., 2008). Οι PINs πήραν το όνομά τους από τα μεταλλάγματα σε σχήμα καρφίτσας που παρατηρήθηκαν στα *pin1* του *Arabidopsis*, (Taiz, Zeiger, 2006). Ανάμεσα

στους μεταφορείς εκροής αυξίνης, οι πρωτεΐνες PIN είναι αποδεδειγμένα οι σημαντικότεροι καθοριστές της Π.Μ.Α., (Robert et al., 2008).

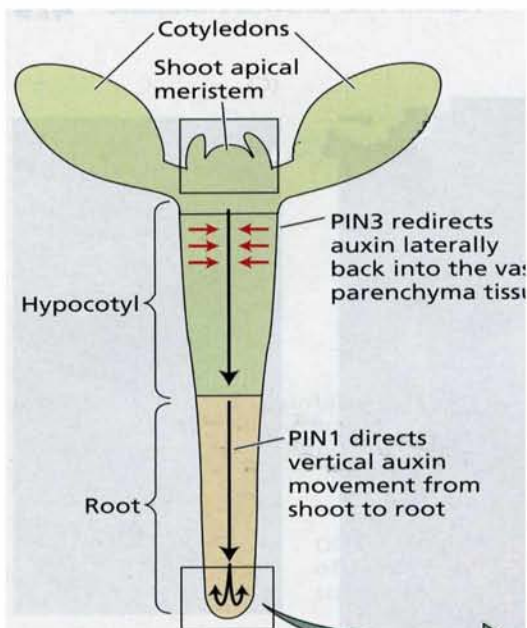
Το γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana* διαθέτει 8 PIN γονίδια: τα PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN5, PIN6, PIN7, PIN8. Η λειτουργία των πρωτεϊνών PIN1-PIN4 και PIN7 έχει αναλυθεί λεπτομερώς, ενώ εκείνη των PIN5, PIN6 και PIN8 παραμένει αδιευκρίνιστη, (Robert et al., 2008).

Οι πρωτεΐνες PIN μεσολαβούν σε διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες όπως η ανάπτυξη αγγειακού ιστού και ανθέων (PIN1), οι τροπισμοί (PIN2, PIN3) και η διαμόρφωση του προτύπου της ρίζας (PIN4), (Benková et al., 2003). Ο πολικός εντοπισμός των PINs στα κύτταρα είναι έντονα δυναμικός.

Αποκρίνεται σε εξωγενή και ενδογενή σήματα, μεταξύ των οποίων και η αυξίνη και ρυθμίζεται από την κυκλοφορία κυστιδίων, την αποδόμηση και φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Σε κυτταρικό επίπεδο, η προσαρμοστικότητα του συστήματος μεταφοράς μπορεί να απορρέει από τη συνεχή ανακύκλωση των PINs μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και των ενδοσωμάτων. Έτσι επιτυγχάνονται γοργές αλλαγές στον πολικό εντοπισμό των PINs και κατ' επέκταση στην αναδιανομή της αυξίνης, (Benková et al., 2003; Robert et al., 2008).

Διαφορετικά μέλη της οικογένειας PIN μεσολαβούν στην εκροή αυξίνης σε κάθε ιστό. Οι PIN είναι πρωτεΐνες με χαμηλή ενεργότητα μεταφοράς (weak transport carrier activity). Η μεταφορά αυξίνης επιταχύνεται μέσω της αλληλεπίδρασης των PIN με άλλες πρωτεΐνες. Ο λειτουργικός πλεονασμός των PIN πρωτεϊνών είναι εμφανής τόσο από το, εν μέρει, αλληλεπικαλυπτόμενο πρότυπο έκφρασης διαφόρων PIN όσο και από το γεγονός ότι σε πολλές περιπτώσεις, απλά *pin* μεταλλάγματα, εμφανίζουν μόνο ήπιες βλάβες, (Benková et al., 2003; Taiz, Zeiger, 2006)

Η κατακόρυφη μεταφορά της αυξίνης από το βλαστό προς τη ρίζα πραγματοποιείται από την PIN1. Διαφοροποιημένος φωτοτροπισμός του υποκοτυλίου παρατηρείται σε μεταλλάγματα που επηρεάζουν τον εντοπισμό της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Ανακατανομή της αυξίνης πίσω στον αγγειακό παρεγχυματικό ιστό, όπου λαμβάνει χώρα η πολική μεταφορά, πραγματοποιείται από την PIN3, (Taiz, Zeiger, 2006), (Εικόνα 12). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται πλευρικά στα κύτταρα της ενδοδερμίδας του βλαστού και στα κύτταρα του περικυκλίου και της καλύπτρας. Η PIN3



Εικόνα 12: Κατευθυνόμενη μετακίνηση της αυξίνης σε σχέση με την ιστοειδική κατανομή των καναλιών εκροής PINs. Παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες PIN1 και PIN3 (Taiz, Zeiger, 2006).

φαίνεται να παίζει τον καθοριστικότερο ρόλο στην εδραίωση της απαραίτητης για το φωτοτροπισμό βαθμίδωσης συγκέντρωσης αυξίνης.

1.2.4 Πρωτεϊνικές κινάσες D6PK

Οι πρωτεΐνες D6PK συνθέτουν μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών της πλασματικής μεμβράνης, της οποίας τα μέλη, όπως και οι φωτοτροπίνες, ανήκουν στην οικογένεια AGCVIII, (Εικόνα 1). Η οικογένεια D6PK των AGC κινασών αποτελείται από την D6 PROTEIN KINASE (D6PK), όπως επίσης, τις D6PK-LIKE1 (D6PKL1), D6PK-LIKE2 (D6PKL2) και D6PK-LIKE3 (D6PKL3) που είναι στενά ομόλογες της D6PK.

Η υψηλά συντηρημένη αλληλουχία αυτών των πρωτεϊνών και η έλλειψη ορατού φαινοτύπου στα *d6rk* απλά μεταλλάγματα υποδεικνύουν ότι οι D6PKs έχουν πλεονάζουσα βιοχημική λειτουργία. Παράλληλα, τα τουλάχιστον εν μέρει, αλληλεπικαλυπτόμενα πρότυπα έκφρασής τους υποδεικνύουν ότι δρουν στους ίδιους ιστούς.

1.3 Παρατηρήσεις που προτείνουν την αλληλεπίδραση των τεσσάρων παραγόντων-κλειδιά στο πλαίσιο του φωτοτροπισμού.

Πειραματικά στοιχεία προτείνουν ότι οι φωτοτροπίνες, η αυξίνη, οι πρωτεΐνες PIN και οι D6PKs δρουν στο ίδιο βιοχημικό μονοπάτι για το φωτοτροπισμό. Σύμφωνα με το μοντέλο που περιγράφηκε στην 1.2.2, η διαφορετική αναδιανομή της αυξίνης είναι υπεύθυνη για την κάμψη του βλαστού. Παράλληλα, ο έντονα δυναμικός κυτταρικός εντοπισμός των PINs επηρεάζει την ροή της αυξίνης (1.2.3).

Βασική παρατήρηση που αποτέλεσε έναυσμα των πειραμάτων της παρούσας εργασίας είναι ότι τα μεταλλάγματα *d6rk* διαθέτουν κοινούς φαινότυπους με τα μεταλλάγματα *phot1*. Πιο συγκεκριμένα, και τα δύο είναι μη φωτοτροπικά, (Εικόνα 20).

Από πειράματα φυσιολογίας, μεταλλάγματα ελαττωματικά σε πολλαπλά γονίδια *D6PK*, μειώνουν τη μεταφορά αυξίνης αλλά δεν είναι ελαττωματικά στην απόκριση σε αυτήν (auxin response). Επιπλέον, φυτάρια αγρίου τύπου επεξεργασμένα με NPA, ένα μη φυτικό αναστολέα μεταφοράς αυξίνης, αντιγράφουν φαινοτυπικά, ως ένα βαθμό, τα συγκεκριμένα μεταλλάγματα, (Zourelidou et al., 2009). Το γεγονός ότι η D6PK εντοπίζεται και σε κύτταρα του βλαστού ενισχύει την άποψη ότι θα μπορούσε να συμβάλλει στην κάμψη του κατά το φωτοτροπισμό.

Οι κυτταροπλασματικές περιοχές (κυτταροπλασματικές θηλιές) των πρωτεϊνών PIN αποτελούν υποστρώματα φωσφορυλίωσης για την D6PK τόσο *in vitro* όσο και *in planta*. Έχοντας ως δεδομένο ότι η φωσφορυλίωση των PINs από άλλες φυτικές κινάσες (πχ PINOID) ρυθμίζει την πολικότητά τους, ενισχύεται η πιθανότητα οι D6PKs να επηρεάζουν την λειτουργία εκροής αυξίνης των PIN. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω φωσφορυλίωσης ή άλλων μηχανισμών, επηρεάζοντας την ικανότητά των PIN για αλληλεπίδραση με

πρωτεΐνες που απαιτούνται στην αποτελεσματική μεταφορά αυξίνης, (Zourelidou et al., 2009).

Επιπλέον, τα μεταλλάγματα *d6pk* εμφανίζουν έναν αριθμό μορφολογικών χαρακτηριστικών που έχουν επίσης παρατηρηθεί σε μεταλλάγματα *pin*. Ταυτόχρονα, έχει δειχθεί ότι οι D6PKs και οι PINs συνεντοπίζονται σε ορισμένους ιστούς, όπως η βασική μεμβράνη των κυττάρων της στήλης, της πλευρικής καλύπτρας στη ρίζα και τα κύτταρα του φλοιού. Αυτό συνιστά μια πιθανή λειτουργική σχέση μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών στον έλεγχο μεταφοράς της αυξίνης, (Zourelidou et al., 2009).

Έχει παρατηρηθεί ότι η ενεργοποίηση της PHOT1 από κυανό φως, έχει ως αποτέλεσμα μεταβολή στον εντοπισμό της PIN1 στα κύτταρα του υποκοτυλίου του *Arabidopsis*. Παράλληλα, ο εντοπισμός της PHOT1 στην πλασματική μεμβράνη των κορυφαίων και βασικών τοιχωμάτων των κυττάρων αποτελεί ιδανική θέση για να επηρεάσει την κατανομή των καναλιών εισροής και εκροής αυξίνης. Συνεπώς, υπάρχει πιθανότητα η σηματοδότηση των φωτοτροπινών να πυροδοτεί τον επανεντοπισμό των PINs με τη βοήθεια παραγόντων κυκλοφορίας των PINs, (Christie, 2007).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω πειραματικά ευρήματα γεννάται το ερώτημα εάν η PHOT1 φωσφορυλιώνει την D6PK ή φωσφορυλιώνεται από την D6PK.

2. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης τεσσάρων σημαντικών παραγόντων του φωτοτροπισμού. Πιο συγκεκριμένα: των φωτοτροπινών, της αυξίνης, των πρωτεϊνών PIN και των D6PKs. Για αυτό το λόγο, εξετάστηκε η επίδραση της απώλειας των πρωτεϊνών D6PK και PHOT στο φαινότυπο του *Arabidopsis*, όπως επίσης η ενζυματική συμπεριφορά των φωτοτροπινών απέναντι σε μόρια με τα οποία πιθανώς αλληλεπιδρούν, δηλαδή οι PINs και οι D6PKs.

Είναι ενδιαφέρον να ερευνηθεί η αλληλεπίδραση αυτών των πρωτεϊνών καθώς αρκετές παρατηρήσεις προτείνουν ότι αυτές οι πρωτεΐνες εμπλέκονται στο φωτοτροπισμό. Παρόλα αυτά, οι βαθύτεροι βιοχημικοί μηχανισμοί παραμένουν αδιευκρίνιστοι.

Τα πειράματα περιελάμβαναν υπερέκφραση και καθαρισμό των σημασμένων με GST παραλλαγών των φωτοτροπινών, των περιοχών κινάσης των φωτοτροπινών, των PINs και της D6PK. Οι περιοχές κινάσης των φωτοτροπινών συμπεριλήφθηκαν στα πειράματα με σκοπό να εξεταστεί η δραστηριότητα των φωτοτροπινών χωρίς την αναστολή από τους τομείς LOV.

Όλες οι απαιτούμενες πρωτεϊνικές κατασκευές έκφρασης ήταν διαθέσιμες στο εργαστήριο εκτός από την GST-PHOT1 που κλωνοποιήθηκε μέσω της Τεχνολογίας Gateway στο φορέα προορισμού pDEST 15, ο οποίος περιέχει το σήμα GST. Οι καθαρισμένες φωτοτροπίνες ελέγχθηκαν σε δοκιμές κινάσης ως προς τη συμπεριφορά φωσφορυλίωσης απέναντι στις πρωτεΐνες PIN και την D6PK. Η καζεΐνη, ως μη ειδικό υπόστρωμα πρωτεϊνικών κινασών, χρησίμευσε ως δείκτης ενεργότητας των φωτοτροπινών.

3. Υλικά

3.1 Κύτταρα

E.coli XL1Blue (Stratagene, catalog #200228)

E.coli BL21 (Stratagene, catalog #200132)

3.2 Πλασμίδια/Φορείς

pDONR Φορέας-δότης (Invitrogen)

pDEST 15 Φορέας προορισμού (Invitrogen)

3.3 Κατασκευές Έκφρασης

Διαθέσιμες στο Εργαστήριο

GST-D6, GST-D6in, GST-1KD, GST-2KD, GST-PHOT2, GST-PIN1, GST-PIN2, GST-PIN3, GST-PIN4 (Μελίνα Ζουρελίδου)

3.4 Ένζυμα για PCR

Phusion-πολυμεράση (Finnzymes)

Taq-πολυμεράση (Τμήμα Συστηματικής Βιολογίας Φυτών-Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Μονάχου)

3.5 Υπολογισμός της Tm για primers σε °C

$T_m = (GC\text{-}\% \text{ποσοστό}) \cdot 0,41 - (650/\text{μήκος αλληλουχίας}) + 69,3$

3.6 Ένζυμα Περιορισμού και Ρυθμιστικά Διαλύματα

SacI (Fermentas)

10x Ρυθμιστικό Διάλυμα SacI (Fermentas)

3.7 Kits

BP Clonase kit (Invitrogen)

LRClonase kit (Invitrogen)

Wizard SV Πήκτωμα and PCR Clean-Up System (Promega)

3.8 Μάρτυρες Γνωστών

Μοριακών Βαρών

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

(Fermentas)

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas)

3.9 Σεφαρόζη για Καθαρισμό Πρωτεϊνών

Glutathion Sepharose 4B fast flow (GE Healthcare-Amersham Biosciences)

3.10 Ρυθμιστικά Διαλύματα και πηκτώματα για Ηλεκτροφόρηση

Πήκτωμα Διαχωρισμού 10% SDS^[1]

(για 2 πηκτώματα)

3,34ml ddH₂O

2ml 4x Ρυθμιστικό Διάλυμα

Πηκτώματος Διαχωρισμού

2,66ml 30% Ακρυλαμίδιο

50μl 10% APS^[2]

6μl TEMED^[3]

Πήκτωμα Διαχωρισμού 12% SDS

(για 2 πηκτώματα)

2,8 ml ddH₂O

2 ml 4x Ρυθμιστικό Διάλυμα

Πηκτώματος Διαχωρισμού

3,2 ml 30% Ακρυλαμίδιο

50μl 10% APS

6μl TEMED

Πήκτωμα Επιστοίβασης 5% (για 2 πηκτώματα)

2,28ml ddH₂O

1ml 4x Ρυθμιστικό Διάλυμα

Πηκτώματος Διαχωρισμού

0,66ml 30% Ακρυλαμίδιο

50μl 10% APS

6μl TEMED

Ρυθμιστικό Διάλυμα Πηκτώματος

Διαχωρισμού 4x:

1,5M Tris/HCl (pH 8,8)

0,4% SDS

Ρυθμιστικό Διάλυμα Πηκτώματος

Επιστοίβασης 4x:

0,5M Tris/HCl (pH 6,8)

0,4% SDS

Ρυθμιστικό Διάλυμα

Ηλεκτροφόρησης (loading buffer) για SDS-PAGE:

25mM Tris

192mM Γλυκίνη

0,04% SDS

Πήκτωμα Αγαρόζης 0,8%:

0,5% Αγαρόζη

0,006% Βρωμιούχο Αιθίδιο-stock
σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE^[4] 1x

Ρυθμιστικό Διάλυμα TAE 50x:

2M Tris

50mM EDTA (pH 8,0)

5,71% Οξικό Οξύ

Ρυθμιστικό Διάλυμα TE^[5] 1x:

10mM Tris (pH 8,0)

1mM EDTA

3.11 Διαλύματα για Απομόνωση πλασμιδικού DNA

Διάλυμα I

50mM Γλυκόζη

25mM Tris/HCl (pH 8,0)

10mM EDTA (pH 8,0)

2μl/ml RNAάση-stock

Διάλυμα II

0,2M NaOH

1% SDS

Διάλυμα III

3M CH₃COOK

2M 100% Οξικό Οξύ

3.12 Υλικά για Αποτύπωση Western

Μεμβράνη Νιτροκυτταρίνης

Nitrocellulose Amersham

Biosciences ECL

Semi-dry Buffer Στυπώματος

25mM Tris-Βάση

192mM Γλυκίνη

20% Μεθανόλη

1,3mM SDS

pH 8,3 (ρύθμιση με NaOH)

Ρυθμιστικό Διάλυμα AP

Tris-HCl (pH 9.5) 100mM

NaCl 100mM

MgCl₂ 5mM

NBT^[6]

50mg/ml NBT σε 70% Διμέθυλ-
φορμαμίδιο

BCIP^[7]

50mg/ml BCIP σε Διμέθυλ-
φορμαμίδιο

3.13 Θρεπτικά υλικά

LB

10g/L Τρυπτόνη

5g/L Εκχύλισμα Ζύμης

10g/L NaCl

(ρύθμιση pH 7,0 με NaOH)

LB Άγαρ

LB με προσθήκη 15g/l Bacto-άγαρ

GM

4,3g/l Murashige & Skoog
10g/l Σακαχρόζη
0,5g/l MES
5,5g/l Άγαρ
pH 5,8 (ρύθμιση με KOH)

3.14 Άλλα Διαλύματα

Ρυθμιστικό Διάλυμα PBS^[8] 1x

139mM NaCl
2,7mM KCl
12,5mM Na₂HPO₄
1,8mM K₂HPO₄

Ρυθμιστικό Διάλυμα PBS-Pi^[9] 1x

50ml 1x PBS
1 Ταμπλέτα EDTA-free Complete Inhibitor (ROCHE)

Ρυθμιστικό Διάλυμα GST-

Έκλουσης

50mM Tris/HCl (pH 8,0)
40mM Γλουταθειόνη
EDTA-free Complete Inhibitor (ROCHE)

Διάλυμα Laemmli 5x

310mM Tris/HCl pH 6,8
50% Γλυκερόλη
10% SDS
0,5% Μπλέ της Βρωμοφαινόλης
3,5% β-Μερκαπτοαιθανόλη

^[1] SDS: Sodium Dodecyl Sulphate/
Dodecyl Θεικό Άλας Νατρίου)

^[2] APS: Ammonium Persulfate/
Υπερθειϊκό Αμμώνιο

^[3] TEMED: N, N, N', N'-
Tetramethylethylenediamine/
N, N, N', N'-Τετρα-Μεθυλ-
Αιθυλεν-Διαμίνη

^[4] TAE: Tris-Acetate-EDTA

^[5] TE: Tris-base, EDTA

^[6] NBT: Nitro Blue Tetrazolium
Chloride/ Μπλε Νιτροτετραζολικό
Άλας

^[7] BCIP: 5-Bromo-4-Chloro-
Indolyl-Phosphatase/ 5-Βρωμο-4-
Χλωρο-3-Ινδολο-Φωσφορικό

^[8] PBS: Phosphate Buffered Saline

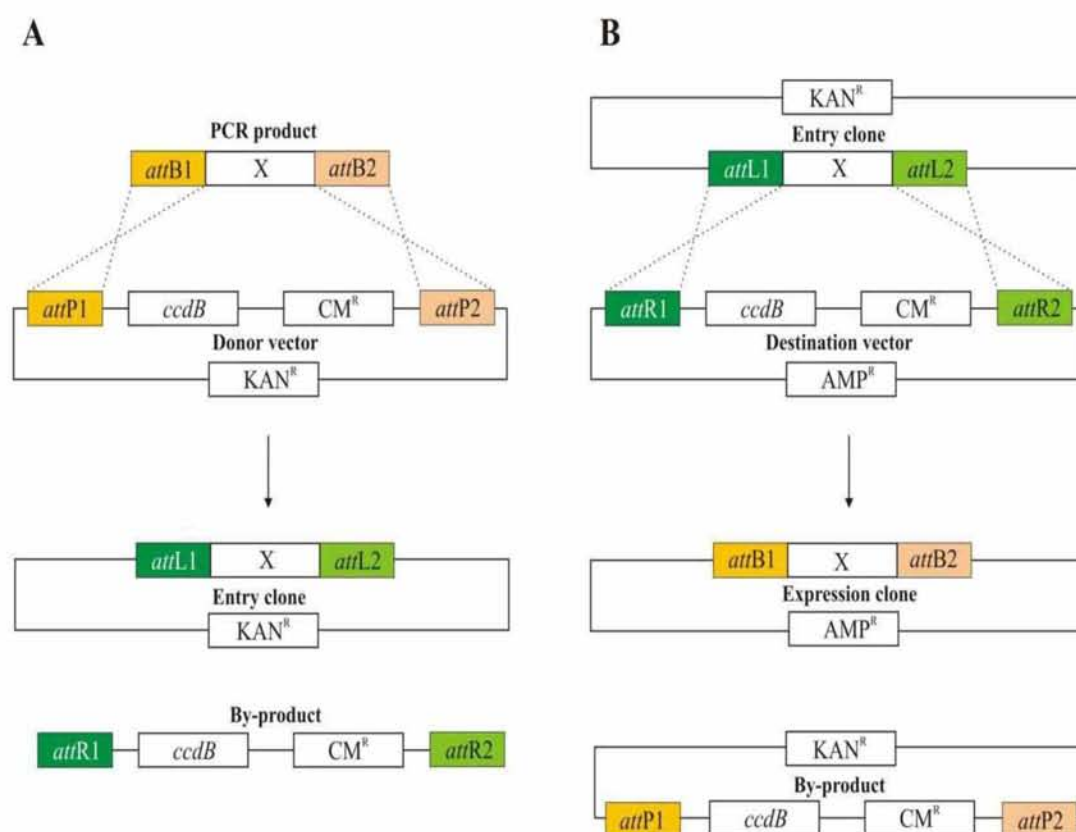
^[9] PBS-Pi: Phosphate Buffered
Saline-Protease Inhibitor

4. ΜΕΘΟΔΟΙ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ GATEWAY

Ετερόλογες αλληλουχίες DNA, που διαθέτουν περιοχές att στα άκρα, μεταφέρονται μεταξύ φορέων μέσω της Τεχνολογίας Gateway. Η μοριακή βάση της μεθόδου βρίσκεται στο σύστημα ανασυνδυασμού ειδικής θέσης του βακτηριοφάγου λ για την εισαγωγή του στο χρωμόσωμα του *E. coli* και την μετάβαση ανάμεσα στο λυτικό και λυσιγονικό μονοπάτι. Στην Τεχνολογία Gateway λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις BP και LR.

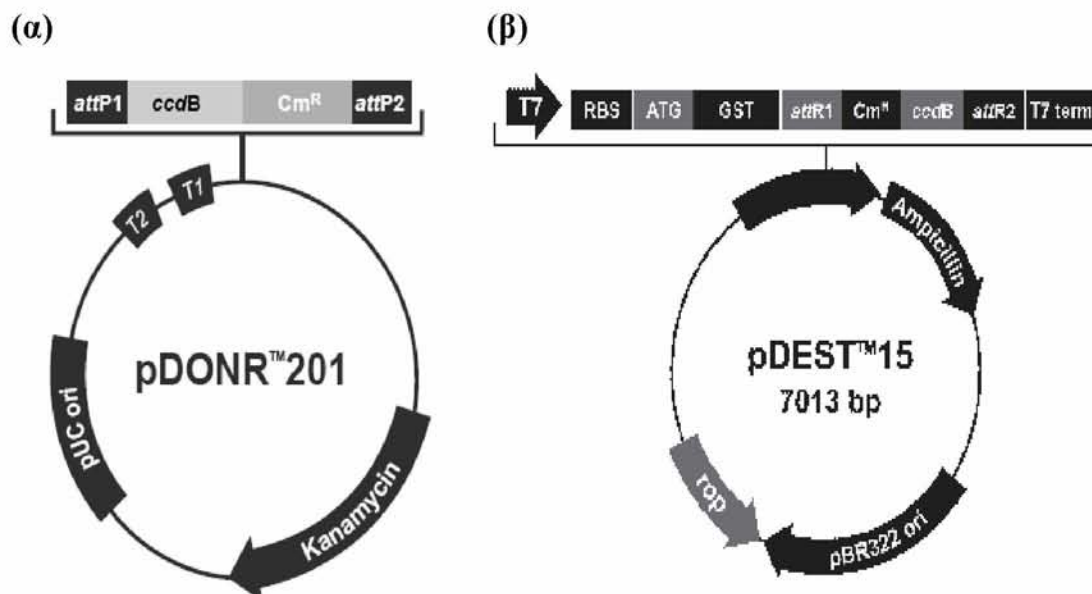
Με την αντίδραση BP ανασυνδυάζεται ένα attB προϊόν PCR ή ένας attB κλώνος έκφρασης (expression clone) που έχει καταστεί γραμμικός, με έναν attP φορέα-δότη (donor vector) για τη δημιουργία ενός κλώνου εισαγωγής (entry clone) με attL άκρα, (Εικόνα 13Α). Το ενζυμικό μείγμα της BP κλωνάσης καταλύει την αντίδραση. Με την αντίδραση LR ανασυνδυάζεται ένας attL κλώνος εισαγωγής (entry clone) με έναν attR φορέα προορισμού (destination vector) για τη δημιουργία ενός κλώνου έκφρασης (expression clone), (Εικόνα 13Β). Το ενζυμικό μείγμα της LR κλωνάσης καταλύει την αντίδραση.



Εικόνα 13: Οι αντιδράσεις ανασυνδυασμού της τεχνολογίας Gateway (A) Αντίδραση BP (B) Αντίδραση LR, (<http://www.biomedcentral.com/1471-2199/7/46/figure/F1>).

Οι πρωτεΐνες ανασυνδυασμού συνδέονται στις att περιοχές, φέρνουν κοντά τις περιοχές στόχους, τις κόβουν και συνδέουν ομοιοπολικά το DNA. Από τον ανασυνδυασμό μεταξύ των περιοχών attB και attP προκύπτουν οι

περιοχές attL και attR, (Gateway Manual, Invitrogen, Version C, 060302, 25-0522).



Εικόνα 14: Φορείς Gateway που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.
 (α) pDONR201 φορέας της αντίδρασης BP, (β) pDEST 15 φορέας της αντίδρασης LR.
ccdB γονίδιο: επιτρέπει την αρνητική επιλογή του πλασμιδίου. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που παρεμποδίζει στη δράση της DNA γυράσης του *E.coli*, αναστέλλοντας την ανάπτυξη στους ξενιστές *E.coli* που δε φέρουν το ένθεμα. Μετά τον ανασυνδυασμό, το γονίδιο *ccdB* αντικαθίσταται από το γονίδιο που μας ενδιαφέρει για την παρούσα εργασία. *Cm^R*: γονίδιο ανθεκτικότητας σε χλωραμφενικόλη. Επιτρέπει την ειδική επιλογή του πλασμιδίου (counterselection). *'Ampicillin' / 'Kanamycin'*: γονίδια ανθεκτικότητας σε Αμπικιλίνη/Καναμυκίνη. Επιτρέπουν την επιλογή του πλασμιδίου στα *E.coli*. Περιοχές έναρξης pUC/pBR322: επιτρέπουν την αντιγραφή και συντήρηση των φορέων στο *E.coli*. Περιοχές attP1/attP2/attR1/attR2: αλληλουχίες ανασυνδυασμού DNA προερχόμενες από τον βακτηριοφάγο λ. rmT1/rmT2: Ακολουθίες τερματισμού της μεταγραφής. Προστατεύουν το κλωνοποιημένο γονίδιο από έκφραση υποκινούμενη από προαγωγείς κωδικοποιούμενους από το φορέα, περιορίζοντας έτσι πιθανή τοξικότητα. RBS: περιοχή σύνδεσης στο ριβόσωμα. T7: προαγωγέας κλωνοποιημένου γονιδίου. rop_ORF: αλληλεπιδρά με το pBR322 origin με σκοπό την αντιγραφή 'χαμηλού αριθμού αντιγράφων' στο *E. coli*. GST: σήμα. ATG: τριπλέτα έναρξης της μεταγραφής. T7 term: περιοχή τερματισμού μεταγραφής από T7 προαγωγέα (Gateway Technology manual, Invitrogen, Version C, 060302, 25-0522).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η Τεχνολογία Gateway για να επιτευχθεί η σύντηξη του γονιδίου *PHOT1* με το σήμα S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (*GST*). Για το συγκεκριμένο σκοπό, κλωνοποιήθηκε το *PHOT1* στο φορέα pDEST 15 με την αντίδραση LR. Κρίσιμο σημείο για την ανάλυση Western και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης PHOT1 που ακολούθησαν.

4.1 Κλωνοποίηση Gateway

4.1.1 Ενίσχυση γονιδίου *PHOT1* μέσω PCR με ειδικούς primers

Αντίδραση ενίσχυσης PCR

Ρυθμιστικό διάλυμα PCR (high fidelity 5x)	10μl
dNTPs (2,5mM)	5μl
Εκκινητής FW (20μM)	1μl
Εκκινητής RV (20 μM)	1μl
<i>PHOT1</i> μήτρα DNA- Πλασμίδιο pda 02102 <i>PHOT1</i>	1μl
Ένζυμο (Πολυμεράση Phusion)	0,5μl
H ₂ O	31,5μl
Τελικός όγκος	50μl

Πίνακας 1	Εκκινητές για το <i>PHOT1</i>	Tm
Εκκινητής FW	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGA ACCAACAGAAAAACCATCG-3'	59,3°C
Εκκινητής RV	5'-GGGGACCCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAAA AACATTTGTTGCAGATCTTCTAG-3'	60°C

Στην αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκαν 35 κύκλοι. Κάθε κύκλος περιελάμβανε 0,10 min στους 98°C, 0,30 min στους 62°C και 0,90 min στους 72°C.

4.1.2 Απομόνωση DNA από πήκτωμα

Το ενισχυμένο προϊόν PCR, *PHOT1*, ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αгарόζης 0,8%, σε 120V για 30 λεπτά και απομονώθηκε με το 'Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System' της Promega. Οι ζώνες στο πήκτωμα αгарόζης, που αντιστοιχούν στο ύψος του γονιδίου *PHOT1* (3 kb) αναγνωρίζονται υπό υπεριώδη ακτινοβολία.

4.1.3 Αντίδραση BP (Τεχνολογία Gateway)

Για να κλωνοποιηθεί το γονίδιο *PHOT1* στο φορέα pDONR 201 με την αντίδραση BP έπρεπε να προσδιοριστεί η σωστή αναλογία μεταξύ φορέα-δότη και ενθέματος. Η αναλογία προσδιορίστηκε βάσει της ποσότητά τους στο έκλουσμα. Η ποσότητά τους ήταν ανάλογη με την ένταση της ζώνης στο

πήκτωμα αγαρόζης. Σύμφωνα με την ένταση του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών και των ζωνών χρησιμοποιήθηκαν 150ng/μl pDONR 201 και 15-150ng *PHOT1*. Αυτές είναι οι προτεινόμενες ως βέλτιστες συγκεντρώσεις σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (Invitrogen). Επίσης, προστέθηκαν 2μl BP κλωνάσης και 1x TE σε τελικό όγκο 10μl.

Επειδή το *PHOT1* έχει μεγάλο μέγεθος (3 kb), η αντίδραση επώαστηκε για 12-16 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου, καθώς μετά από πολύωρη επώαση προκύπτουν 5 φορές περισσότερες αποικίες συγκριτικά με επώαση μιας ώρας.

4.1.4 Εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης BP

4.1.4.1 Βακτηριακός μετασχηματισμός σε Xl1Blue κύτταρα με ηλεκτροπόρωση

Το προϊόν σύνδεσης της BP χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό σε ηλεκτροδεκτικά κύτταρα ^[10] από το βακτηριακό κλώνο *Escherichia coli* (XL1 Blue κύτταρα) με ηλεκτροπόρωση σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο.

5μl από την αντίδραση BP μεταφέρθηκαν σε ένα νέο eppendorf 1,5ml. 0,6μl διαλύματος πρωτεάσης K (BP clonase Kit) προστέθηκαν. Το διάλυμα επώαστηκε στους 37°C για 10 λεπτά. Ένα υδατόλουτρο 37°C χρησιμοποιήθηκε για αυτό το σκοπό. 50μl των κυττάρων XL1Blue μετασχηματίστηκαν με 1μl της αντίδρασης μέσω της τεχνικής της ηλεκτροπόρωσης στα 2.500 volts. Τα κύτταρα που υπέστησαν ηλεκτροπόρωση μεταφέρθηκαν σε 1ml υγρό θρεπτικό υλικό, απουσία αντιβιοτικού και επώαστηκαν στους 37°C υπό ανακίνηση (200 rpm ^[11]) για 1 ώρα. Τα κύτταρα κατακρημνίστηκαν με φυγοκέντρηση στα 13.000 rcf ^[12] για 1 λεπτό ώστε να συλλεχθούν όλα τα πιθανά θετικά κύτταρα της αντίδρασης BP. Διατηρήθηκαν 100μl στα οποία το ίζημα των βακτηρίων διαλυτοποιήθηκε. Το υπόλοιπο υπερκείμενο απορρίφθηκε. Τα 100μl διαλυτοποιημένου ιζήματος βακτηρίων επιστρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιείχε Καναμυκίνη (50mg/ml), καθώς ο pDONR 201 περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην Kan, και επώαστηκαν στους 37°C για 12-16 ώρες.

^[10]: Τα ηλεκτροδεκτικά κύτταρα είναι κύτταρα δεκτικά σε μετασχηματισμό με ηλεκτροπόρωση.

^[11]: Ο όρος 'rpm' αποτελεί συντομογραφία του 'revolutions per minute' ('περιστροφές ανα λεπτό'). Είναι ο αριθμός των πλήρων περιστροφών γύρω από ένα σταθερό άξονα σε χρόνο ενός λεπτού.

^[12]: Ο όρος 'rcf' αποτελεί συντομογραφία του 'relative centrifugal force' ('σχετική δύναμη φυγοκέντρωσης'). Είναι μέτρο της επιτάχυνσης ενός δείγματος σε μια φυγόκεντρο.

Μετά από καποιους μη επιτυχημένους μετασχηματισμούς θεωρήθηκε ότι είτε το μέγεθος του *PHOT1* ήταν πολύ μεγάλο για να εισαχθεί στο βακτηριακό φορέα είτε ότι υπήρχαν δευτερογενείς δομές στο άμινο-τελικό άκρο του, που δεν επέτρεπαν στις περιοχές ανασυνδυασμού να αλληλεπιδράσουν. Συνεπώς,

αποφασίστηκε ο σχεδιασμός ενός νέου εκκινητή FW για το *PHOT1* που να ξεκινάει από τη βάση 463.

Πίνακας 2	Εκκινητές για το 'περιτμημένο' <i>PHOT1</i> που σχεδιάστηκε	Tm
Εκκινητής FW (<i>Phot1</i> -GW-155S-FW)	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTCTCGCAGAGAACTCGCAAACTC-3'	60,6°C
Εκκινητής RV (<i>PHOT1</i> FL primer)	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTTCAAAAAACATTTGTTTGCAGATCTTCTAG-3'	60°C

Τελικά το προϊόν PCR απομονώθηκε υπό υπεριώδη ακτινοβολία χαμηλότερης έντασης και η αντίδραση Gateway ήταν επιτυχής και για τα δύο γονίδια (περικομμένο και ολόκληρο). Τα πειράματα συνεχίστηκαν με το *PHOT1 Full Length*.

4.1.4.2 PCR αποικιών (Colony PCR)

Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν στο LB+Kan θρεπτικό υλικό, περιείχαν το φορέα με ή χωρίς το γονίδιο *PHOT1*. Για να επιλεγθούν οι θετικοί κλώνοι πραγματοποιήθηκε PCR αποικιών. Αποικίες επιλέχθηκαν από το τρυβλίο μετασχηματισμού με *tir* πιπέτας και εμβαπτίστηκαν στο μείγμα της αντίδρασης (mastermix).

Αντίδραση PCR colony

Ρυθμιστικό διάλυμα PCR 10x	2,5μl
dNTPs (2,5mM)	2,5μl
Εκκινητής FW (20μM)	0,5μl
Εκκινητής RV (20μM)	0,5μl
Ένζυμο (Taq πολυμεράση)	0,2μl
H ₂ O	18,8μl
Τελικός όγκος	25μl

Πίνακας 3	Εκκινητές για την αντίδραση PCR αποικιών	Tm
Εκκινητής FW	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TCCCACTAGACGGGAGCAAGCAC-3'	61,4°C
Εκκινητής RV	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCAAAAAACATTTGTTTGCAGATCTTCTAG-3'	60°C

Οι εκκινητές ανήκαν στην περιοχή κινάσης του *PHOT1*. Στην αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκαν 35 κύκλοι. Κάθε κύκλος περιελάμβανε 10sec στους 95°C, 30sec στους 60°C και 1min στους 72°C. Το προϊόν της PCR αποικιών ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αгарόζης 0,8% και στις περιπτώσεις που ο φορέας περιείχε το ένθεμα, το ενισχυμένο τμήμα εμφανίστηκε στο αντίστοιχο μέγεθος, (Εικόνα 21).

4.1.4.3 Manual Minipreps-απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Έξι από τις θετικές αποικίες επιλέχθηκαν τυχαία. Κάθε μια μεταφέρθηκε σε 2 ml υγρό θρεπτικό υλικό LB+Kan σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Οι καλλιέργειες απώσθηκαν υπό ανακίνηση (200 rpm) στους 37°C για 12-16 ώρες.

Κάθε υγρή καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε eppendorf 1,5ml. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση στα 14.000 rcf για 1 λεπτό. Το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε με αναρρόφηση αφήνοντας το βακτηριακό ίζημα στεγνό. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε 150μl παγωμένου διαλύματος I και RNAάσης.

300μl διαλύματος II προστέθηκαν στο μείγμα που ανακινήθηκε απαλά με αναστροφή ώστε όλη η επιφάνεια του eppendorf να έρθει σε επαφή με το διάλυμα II. 225μl παγωμένου διαλύματος III προστέθηκαν και το μείγμα ανακινήθηκε καλά ώστε να αναμειχθεί το διάλυμα III στο πυκνότερο κυτταρικό λύμα. Το eppendorf διατηρήθηκε στον πάγο για 3-5 λεπτά. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 16.000 rcf, στους 4°C για 5 λεπτά σε μικροφυγόκεντρο. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf.

Το δίκλωνο DNA κατακρημνίστηκε με 700μl ισοπροπανόλης σε θερμοκρασία δωματίου. Το μείγμα αναμειχθηκε με αναστροφή και διατηρήθηκε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 16.000 rcf, 4°C για 20 λεπτά σε μικροφυγόκεντρο. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε με αναρρόφηση. Το ίζημα του δίκλωνου DNA διαλυτοποιήθηκε σε 500μl αιθανόλης 70% στους 4°C. Το μείγμα αναμειχθηκε με αναστροφή και διατηρήθηκε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, φυγοκεντρήθηκε στα 16.000 rcf, 4°C για 10 λεπτά σε μικροφυγόκεντρο. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το κατακρημνισμένο DNA αφέθηκε να στεγνώσει είτε ομαλά είτε με θερμαινόμενη φυγοκέντρωση υπό κενό στους 30°C για 10-15 λεπτά. Το ίζημα-DNA διαλύθηκε σε 50μl TE 1x (8.0 pH).

4.1.4.4 Πέψη με κατάλληλο ένζυμο περιορισμού

Μέσω του προγράμματος 'GENETYX-MAC' αποδείχθηκε ότι το *SacI* είναι ένα περιοριστικό ένζυμο που κόβει το ένθεμα (*PHOT1*) σε 3 σημεία, δημιουργώντας 3 χαρακτηριστικά τμήματα 3000bp, 1400bp και 1000bp αντίστοιχα.

Αντίδραση πέψης

BP <i>PHOT1</i> προϊόν απομόνωσης πλασμιδικού DNA	2μl
SacI	0,5μl
Ρυθμ. διάλυμα 10x SacI	1μl
H ₂ O	6,5μl
Τελικός όγκος	10μl

Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C για 45-60 λεπτά.

Το προϊόν πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% και οι φορείς που περιείχαν το ένθεμα εμφάνισαν τα αναμενόμενα τμήματα στα αντίστοιχα μεγέθη στο πήκτωμα, (Εικόνα 22).

4.1.5 Αλληλούχιση

Από τα έξι θετικά προϊόντα BP που ελέγχθηκαν μέσω πέψης με το ένζυμο SacI, ένας κλώνος επιλέχθηκε τυχαία και στάλθηκε για αλληλούχιση στην εταιρεία GATC biotech. Τα αποτελέσματα αλληλούχισης παρουσιάζονται στο 'Παράρτημα'. Το πρόγραμμα 'Multalin' χρησιμοποιήθηκε για να πραγματοποιήσει τη σύγκριση των αλληλουχιών.

Πίνακας 4	Εκκινητές αλληλούχισης του προϊόντος BP	Tm
pDONR FW	5'-TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC-3'	59°C
pDONR RV	5'-TGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3'	53°C
<i>PHOT1</i> Seg FW	5'-ATGTTGTTCCGTCAGGCCGA-3'	54°C
<i>PHOT1</i> Seg RV	5'-GAGAACCTTCCTAGGTTGTC-3'	52°C

Μέσω της διαδικασίας αλληλούχισης, αποδείχθηκε ότι το γονίδιο *PHOT1* κλωνοποιήθηκε στο φορέα pDONR 201 χωρίς λάθη στην αλληλουχία.

4.1.6 Αντίδραση LR (Τεχνολογία Gateway)

4.1.6.1 Βακτηριακός μετασχηματισμός κυττάρων DB 3.1 μέσω ηλεκτροπόρωσης για πολλαπλασιασμό του pDEST 15.

Ο pDEST 15 χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό ηλεκτροδεκτικών κυττάρων του βακτηριακού κλώνου *Escherichia coli* (κύτταρα DB3.1) σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο.

50μl ηλεκτροδεκτικών κυττάρων DB3.1 μετασχηματίστηκαν με 1μl από το φορέα pDEST 15 με την τεχνική της ηλεκτροπόρωσης. Τα κύτταρα που

υπέστησαν ηλεκτροπόρωση μεταφέρθηκαν σε 1ml υγρού θρεπτικού υλικού, απουσία αντιβιοτικού και επωάστηκαν στους 37°C υπό ανακίνηση (200 rpm) για 1 ώρα. 150μl καλλιέργειας στρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιείχε αμπικιλίνη (100mg/ml), καθώς ο pDEST 15 περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην Amp, και επωάστηκαν στους 37°C για 12-16 ώρες.

Σημείωση: Τα κύτταρα DB3.1 είναι ανθεκτικά στο γονιδιακό προϊόν ccdB, καθώς διαθέτουν μια μετάλλαξη στη DNA γυράση, (Εικόνα 14). Φορείς που περιέχουν το γονίδιο ccdB, όπως φορείς-δότες, υπερελικωμένοι φορείς εισαγωγής και προορισμού πολλαπλασιάζονται στα συγκεκριμένα κύτταρα.

4.1.6.2 Αντίδραση LR

Για να κλωνοποιηθεί το γονίδιο *PHOT1* στο φορέα pDEST 15 (αντίδραση LR), έπρεπε να βρεθεί η σωστή αναλογία μεταξύ φορέα εισαγωγής και προορισμού. Η αναλογία αυτή βρέθηκε σύμφωνα με την ποσότητά τους στο έκλουσμα. Η ποσότητά τους ήταν ανάλογη με την ένταση της ζώνης στο πήκτωμα αγαρόζης. Σύμφωνα με την ένταση του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών και των ζωνών χρησιμοποιούμε 150ng/μl φορέα προορισμού και 15-150ng φορέα εισαγωγής. Αυτές είναι οι προτεινόμενες ως βέλτιστες συγκεντρώσεις σύμφωνα με την κατασκευάστρια εταιρεία (Invitrogen). Επίσης, προστέθηκαν 2μl LR κλωνάσης και 1x TE σε τελικό όγκο 10μl.

4.1.7 Εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης LR

4.1.7.1 Βακτηριακός μετασχηματισμός σε XL1Blue κύτταρα με ηλεκτροπόρωση.

Η διαδικασία ήταν παρόμοια με εκείνη που περιγράφηκε στην 4.1.4.1. Στη συγκεκριμένη όμως περίπτωση, τα μετασχηματισμένα κύτταρα XL1Blue επιστρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιείχε αμπικιλίνη (100 mg/ml), επειδή ο pDEST 15 περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην Amp, και επωάστηκαν στους 37°C για 12-16 ώρες.

4.1.7.2 PCR αποικιών (Colony PCR)

Οι συνθήκες (κύκλοι, θερμοκρασίες, εκκινήτες) ήταν όμοιες με αυτές της 4.1.4.2.

4.1.7.3 Manual Minipreps-απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η διαδικασία ήταν η ίδια με εκείνη που περιγράφηκε στην 4.1.4.3.

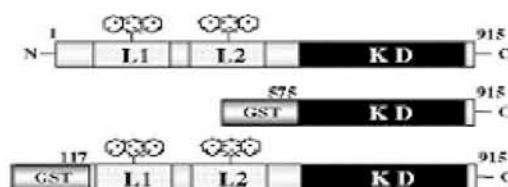
4.1.7.4 Πέψη με κατάλληλο ένζυμο περιορισμού

Η διαδικασία ήταν ίδια με εκείνη που περιγράφηκε στην 4.1.4.4.

4.2 Υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-D6PK (GST-D6), GST-D6 inactive (GST-D6in), GST-PHOT1, GST-περιοχή κινάσης του PHOT1 (GST-1KD), GST-περιοχή κινάσης του PHOT2 (GST-2KD), GST-PHOT2, GST-PIN1, GST-PIN2, GST-PIN3, GST-PIN4 σε βακτήρια BL21.

Οι πρωτεΐνες GST-PHOT1, GST-D6, GST-D6in, GST-1KD, GST-2KD, GST-PHOT2, (Εικόνα 15), GST-PIN1, GST-PIN2, GST-PIN3, GST-PIN4, οι οποίες προσφέρθηκαν ευγενώς από τη Dr. Μελίνα Ζουρελίδου, υπερεκφράστηκαν σε ηλεκτροδεκτικά κύτταρα *E.coli* BL21 που είναι κατάλληλα για υπερέκφραση πρωτεϊνών. Κατόπιν, καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας, με χρήση Γλουταθειόνης-Σεφαρόζης, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών, (Εικόνα 16). Οι περιοχές κινάσης των φωτοτροπινών υπερεκφράστηκαν με σκοπό να εξεταστεί η δραστηριότητα των φωτοτροπινών χωρίς την αναστολή από τις περιοχές LOV.

Η πρωτεϊνική έκφραση στο πλασμίδιο pDEST 15 είναι υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *T7*, που επάγεται με χρήση του αναλόγου λακτόζης 'ισοπροπυλικό b-D-θειογαλακτοσίδιο' (IPTG).



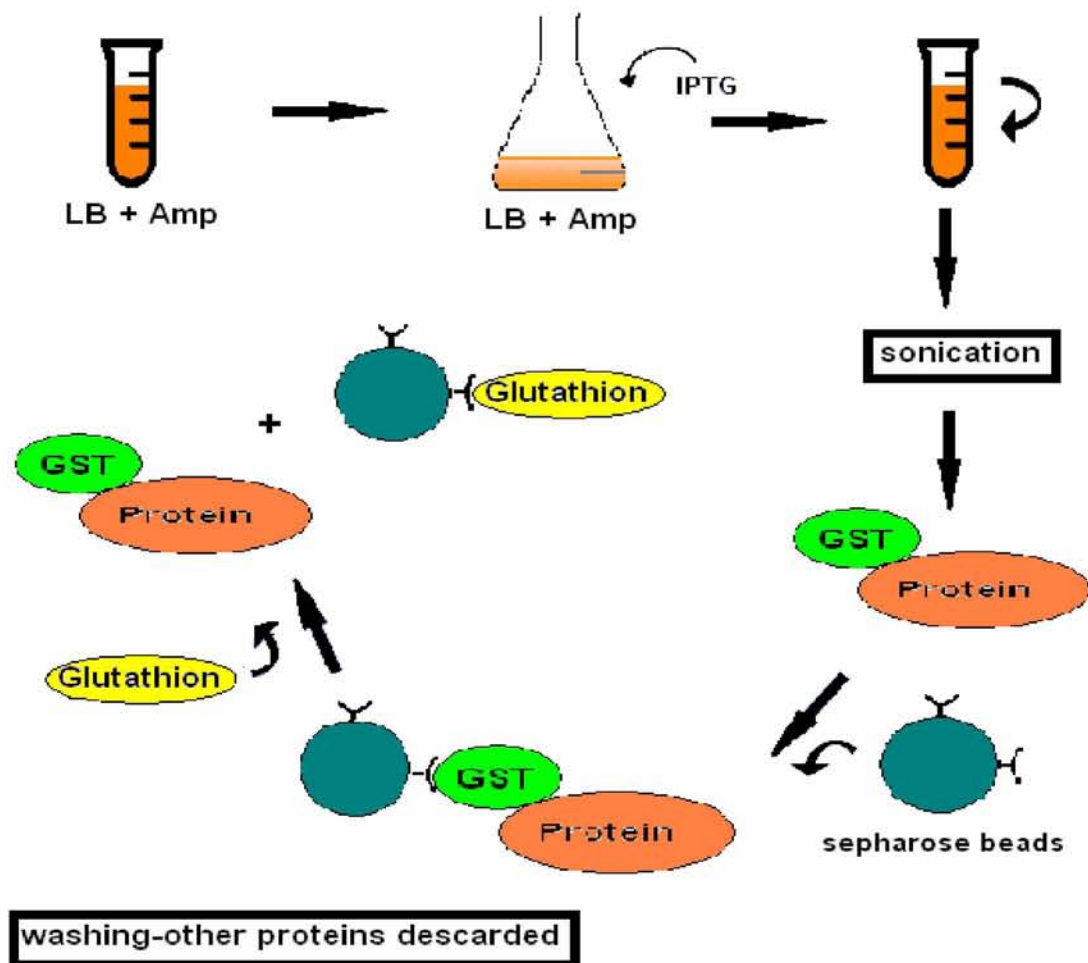
Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση μιας φωτοτροπίνης και δύο συσκευών έκφρασης με N-τελικές απαλείψεις GST-KD και GST-L1-L2-KD αντίστοιχα. KD: περιοχή κινάσης, L1: LOV1, L2: LOV2 (Matsuoka et al., 2005)

4.2.1 Πρωτόκολλο υπερέκφρασης

Ξεχωριστά κύτταρα BL21 μετασχηματίστηκαν με κάθε ένα από τα γονίδια *GST-D6*, *GST-D6in*, *GST-PHOT1*, *GST-1KD*, *GST-2KD*, *GST-PHOT2*, *GST-PIN1*, *GST-PIN2*, *GST-PIN3*, *GST-PIN4* με τρόπο όμοιο με την 4.1.6.1. Κατόπιν, 3ml υγρής καλλιέργειας BL21 παρουσία αμπικιλίνης (100mg/ml) επωάστηκαν επί 12-16 ώρες στους 37°C υπό ανακίνηση, για έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

Στη συνέχεια, κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε 100ml υγρού θρεπτικού υλικού παρουσία Amp 100mg/ml και επωάστηκε στις ίδιες συνθήκες για περίπου 3 ώρες ώσπου η οπτική πυκνότητα να γίνει 0,6-0,8. Δείγμα καλλιέργειας 0,5 ml συλλέχθηκε για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών. 250μl από το ανάλογο λακτόζης b-D-θειογαλακτοσίδιο (IPTG) 0,1M προστέθηκαν. Ο προαγωγέας *T7* επάγεται με αυτό το στοιχείο. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στις ίδιες συνθήκες για περίπου 2 ώρες.

Άλλο ένα δείγμα καλλιέργειας 0,5 ml συλλέχθηκε για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών. Τα κύτταρα συγκεντρώθηκαν με φυγοκέντρηση στα 4000 rcf, 15 λεπτά, 4°C και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.



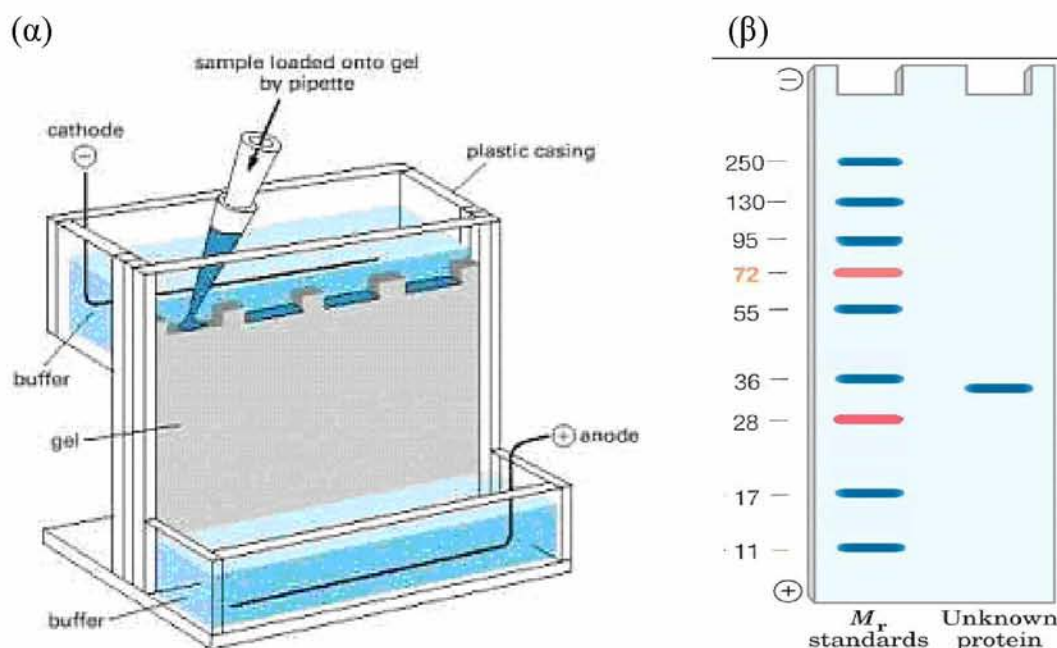
Εικόνα 16: Σχηματική απόδοση της διαδικασίας υπερέκφρασης και καθαρισμού πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

4.2.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Πήκτωμα ακρυλαμιδίου 12% προετοιμάστηκε. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τα δείγματα καλλιέργειας 0,5 ml με φυγοκέντρηση στα 16.000 rcf, 1 λεπτό, 4°C. Τα κατακρημνισμένα κύτταρα διαλύθηκαν σε 100μl διαλύματος Laemmli 1x με vortex και βράστηκαν με το διάλυμα Laemmli στους 98°C για 5 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, 16.000 rcf, 1 λεπτό.

3μl του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder προστέθηκαν στο πήκτωμα. 6μl υπερκείμενο των δειγμάτων χωρίς IPTG και 3μl υπερκείμενο των δειγμάτων με IPTG προστέθηκαν επίσης. Οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν στα 25mA για τα πρώτα 10 λεπτά (ώστε οι καλυμμένες με SDS πρωτεΐνες να συγκεντρωθούν σε μια λεπτή ζώνη εκκίνησης 19μm στο πήγμα επιστοίβασης) και στα 35mA για περίπου 30 λεπτά (ώστε οι πρωτεΐνες να διαχωριστούν ικανοποιητικά στο πήκτωμα διαχωρισμού με βάση το μέγεθός τους).

Για να γίνουν ορατές οι πρωτεΐνες, τα πηκτώματα χρωματίστηκαν με Coomassie Brilliant Blue για 15-30 λεπτά υπό ανακίνηση. Στη συνέχεια, τα πηκτώματα αποχρωματίστηκαν και στεγνώθηκαν.



Εικόνα 17: (α) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα (<http://www.molecular Detective.org/TutorialProteomics/GelElectrophoresis02.JPG>), (β) Δείγμα πρωτεΐνης σε πήκτωμα. Στην πρώτη στήλη εμφανίζεται ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών (PageRulerTMPrestained protein Ladder Plus) που χρησιμοποιείται στα πειράματα και στη δεύτερη στήλη ένα παράδειγμα ηλεκτροφορούμενης πρωτεΐνης.

4.2.3 Ανάλυση κατά Western

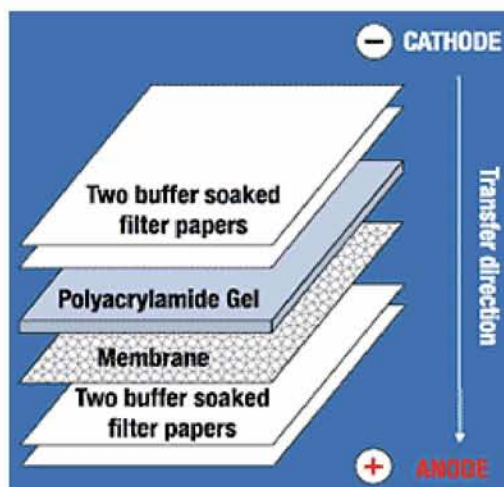
Για να επιβεβαιωθεί ότι οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν βιοχημικό ενδιαφέρον υπερεκφράστηκαν πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο.

Πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% SDS Page, 35mA για 40 λεπτά. Οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Τέσσερα χαρτιά τύπου Whatman, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και το πήκτωμα διαβρέχθηκαν σε Semi-dry Buffer (SD) προς σχηματισμό της διάταξης της Εικόνας 18(α). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε στα 140mA για 1,5 ώρες.

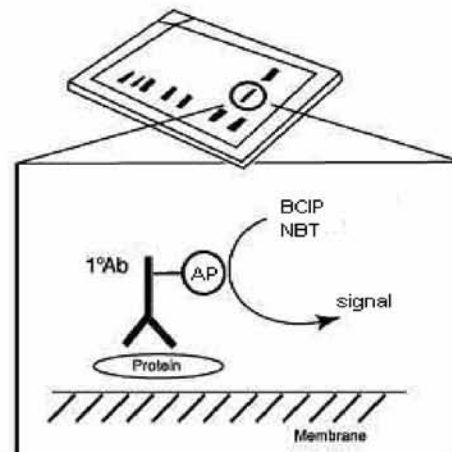
Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη μπλοκαρίστηκε με 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε διάλυμα PBS/Tween για 15 λεπτά υπό ήπια ανακίνηση. Η μεμβράνη επώαστηκε με το αντίσωμα GST-AP (1:2000 σε αποβουτυρωμένο γάλα) για 1-16 ώρες στους 4°C υπό ανακίνηση. Η μεμβράνη ξεπλύθηκε 3 φορές με PBS/Tween για 15 λεπτά. Για να γίνει το σήμα ορατό, 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος AP (αλκαλικής φωσφατάσης) χρησιμοποιήθηκαν μαζί με 33μl BCIP και 66μl NBT (υποστρώματα αλκαλικής φωσφατάσης).

Αν η υπό μελέτη πρωτεΐνη έχει υπερεκφραστεί σε ικανή ποσότητα, το σήμα εμφανίζεται μέσα σε 5-10 λεπτά.

(α)



(β)



Εικόνα 18: Σχηματική παράσταση της ανάλυσης Western .

(α) Η διάταξη Western (http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/support_images/wblotting.gif), (β) Τα στάδια για τη δημιουργία σήματος από το αντίσωμα GST-AP στην παρούσα εργασία (<http://www.cellsignal.com/products/images/wb.jpg>).

4.3 Καθαρισμός Πρωτεϊνών

Το ακόλουθο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και τον καθαρισμό των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών. Τα βακτηριακά κύτταρα που είχαν αποθηκευτεί στους -80°C μετά τη διαδικασία υπερέκφρασης των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν στην παρούσα εργασία διαλυτοποιήθηκαν σε 1,5ml PBS-Pi 1x στον πάγο και μεταφέρθηκαν σε ένα eppendorf 2ml. Τα κύτταρα υπέστησαν επεξεργασία δύο φορές με χρήση υπερήχων για 1 λεπτό, σε συνθήκες 4°C , 50% cycle και 30% ισχύς.

20% Triton προστέθηκε με στόχο τελική συγκέντρωση 0,5%. Ακολούθησε περιστροφή στους 4°C για 30 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C , 16.000 rcf για 5-20 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ένα νέο 2ml eppendorf και 50μl σεφαρόζης 4B 50% προστέθηκαν. Ακολούθησε περιστροφή για 30 λεπτά στους 4°C . Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C , 500 rcf για 3 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε εκτός από μια ποσότητα που παρέμεινε για να διευκολύνει τη μεταφορά του ιζήματος σε eppendorf 1,5 ml.

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C , 500 rcf για 3 λεπτά. Με προσοχή, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και η σεφαρόζη, συνδεδεμένη με το GST τμήμα της πρωτεΐνης ξεπλύθηκε 3 φορές με 1ml PBS-Pi 1x. Ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος, οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν με 50μl, 40nM γλουταθειόνης με ανακίνηση στους 4°C για 12-16 ώρες.

4.3.1 Ισοστάθμιση της Σεφαρόζης 4B

Η σεφαρόζη 4B διατίθεται κατά προσέγγιση σε διάλυμα 75%. Η ακόλουθη διαδικασία είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή 50% διαλύματος.

Ο αριθμός δειγμάτων για καθαρισμό * 70μl ορίζεται ως 'όγκος α'. Για παραγωγή 50% διαλύματος απαιτείται όγκος α/2 που ορίζεται ως 'όγκος β'. Στο stock, 1ml σεφαρόζης είναι διαλυμένο σε 1,33ml αιθανόλης 20% (διάλυμα συντήρησης).

Έτσι, 'όγκος β*1,33' ml διαλύματος μεταφέρθηκε από το stock σε ένα erppendorf 1,5ml. Η σεφαρόζη φυγοκεντρήθηκε για 3 λεπτά, 500 rcf, 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Το ίζημα ξεπλύνθηκε 3 φορές με 1ml παγωμένο (4°C) PBS-Pi 1x με σκοπό να απομακρυνθεί το διάλυμα συντήρησης (αιθανόλη 20%). 'Όγκος β' παγωμένου (4°C) PBS-Pi 1x προστέθηκε στη σεφαρόζη μετά την τελευταία πλύση. Το αποτέλεσμα ήταν διάλυμα 50% σεφαρόζης 4B.

4.3.2 Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών προϊόντων καθαρισμού

Για να ελεγχθεί ο καθαρισμός, 5μl των πρωτεϊνών ηλεκτροφορήθηκαν σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο. Πήκτωμα ακρυλαμιδίου 12% προετοιμάστηκε. 1μl Laemmli 5x διαλύθηκε σε 5μl πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες βράστηκαν με το διάλυμα Laemmli στους 98°C για 5 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου στα 16.000 rcf, για 1 λεπτό. 4μl PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder προστέθηκαν στο πήκτωμα. Κατόπιν, τα δείγματα προστέθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν στα 25 mA για τα πρώτα 10 λεπτά (ώστε οι καλυμμένες με SDS πρωτεΐνες να συγκεντρωθούν σε μια λεπτή ζώνη εκκίνησης 19 μm στο πήγμα επιστοίβασης) και στα 35 mA για περίπου 30 λεπτά (ώστε οι πρωτεΐνες να διαχωριστούν ικανοποιητικά στο πήγμα διαχωρισμού με βάση το μέγεθός τους).

Όπως και σε προηγούμενη περίπτωση, για να γίνουν ορατές οι πρωτεΐνες, τα πήκτωμα χρωματίστηκαν με Coomassie Brilliant Blue για 15-30 λεπτά υπό ανακίνηση και στη συνέχεια, αποχρωματίστηκαν και στεγνώθηκαν.

4.4 Δοκιμή κινάσης

Για να ελεγχθεί αν μια πρωτεΐνη είναι υπόστρωμα για μια κινάση (φωτοτροπίνες, D6PK κλπ), διεξάγεται η δοκιμή κινάσης. Με βάση αυτή την τεχνική, ραδιοσημασμένο ATP (ATP του οποίου ο φώσφορος έχει αντικατασταθεί με το ραδιοϊσότοπο ³²P) χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μη ραδιοσημασμένο ATP. Οι κινάσες χρησιμοποιούν το ραδιοσημασμένο ATP ως δότη φωσφορικής ομάδας για να φωσφορυλιώσουν τα υποστρώματά τους. Μέσω αυτοραδιογραφίας μπορεί να αποδειχθεί αν και κατά πόσο μια πρωτεΐνη αποτελεί υπόστρωμα κινάσων.

Η δοκιμή κινάσης πραγματοποιήθηκε ως εξής. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν στον πάγο με βασικά συστατικά: MgCl₂, κινάσες, υπόστρωμα, ραδιοσημασμένο ATP και μη ραδιοσημασμένο ATP. Ακολούθησε

μια ώρα επώασης στους 30°C υπό λευκό φως για να ενεργοποιηθούν οι φωτοτροπίνες. Η πηγή φωτισμού αντιστοιχούσε σε $1900\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$ αλλά λόγω της απόστασης 10 εκατοστών στην οποία τοποθετήθηκε η πηγή πάνω από τα δείγματα μειώθηκε σε $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$.

Στις περιπτώσεις που οι κινάσες ήταν συνδεδεμένες με σεφαρόζη απαιτήθηκε ανακίνηση. Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε 2 πηκτώματα ακρυλαμιδίου 10%. Το ένα πηκτώμα χρωματίστηκε με Coomassie Brilliant Blue. Τα πηκτώματα στεγνώθηκαν σε στεγνώτηρα υπό κενό στους 80°C για 2 ώρες. Τελικά, πραγματοποιήθηκε αυτοραδιογραφία σε φιλμ ακτίνων X.

Από τις δοκιμές κινάσης που πραγματοποιήθηκαν, 2 αντιπροσωπευτικές παρατίθενται στη συνέχεια. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι παράγοντες της δοκιμής κινάσης Νο1. Η αντίδραση είχε τελικό όγκο 25μl. Το “e” υποδηλώνει τις πρωτεΐνες στο έκλουσμα. Το “r” υποδηλώνει πρωτεΐνες συνδεδεμένες στα μόρια σεφαρόζης.

Πίνακας 5 Δοκιμή κινάσης Νο1								
Δείγματα/ θέση στο πήκτωμα	1	2	3	4	5	6	7	8
Κινάση 1	D6r 4μl	D6inr 5μl	D6r 4μl	1KDr 4μl	2KDr 5μl	PHOT1r 4μl	PIN3e 10μl	PHOT1r 4μl
Κινάση 2/ υπόστρωμα	-	-	PIN3e 10μl	PIN3e 10μl	PIN3e 10μl	D6e 4μl	-	-
Μείγμα αντίδρασης (mastermix)	5,7μl	5,7μl	5,7μl	5,7μl	5,7μl	5,7μl	5,7μl	5,7μl
H ₂ O	15,3μl	14,3μl	5,3μl	5,3μl	4,3μl	11,3μl	9,3μl	15,3μl

Μείγμα αντίδρασης (mastermix):

2,5μl 10x Διάλυμα I

0,4μl 0,6% triton

0,4μl 60μM DTT

1μl αναστολέας πρωτεασών 50%

0,4μl μη ραδιοσημασμένο ATP

1μl ραδιοσημασμένο ATP

5,7μl τελικός όγκος * 9 αντιδράσεις (8+1)

10x Διάλυμα1:
 100μl NaCl 5M
 200μl Tris pH 7,5, 1M
 100μl MgCl₂ 1M
 600μl H₂O
 1000μl τελικός όγκος

Στην αντίδραση απαιτήθηκε Διάλυμα 1x.

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι παράγοντες της δοκιμής κινάσης No2.

Πίνακας 6 Δοκιμή κινάσης No2									
Δείγματα/ θέση στο πήκτωμα	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Κινάση 1	D6r 4μl	D6inr _r 5μl	PHOT1r 4μl	PHOT1r 4μl	1KDr 4μl	2KDr 5μl	1KDr 4μl	2KDr 5μl	D6r 4μl
Κινάση 2/ υπόστρωμα	-	-	D6r 4μl	-	-	-	PIN1e 5μl	PIN1e 5μl	PIN1e 5μl
Μείγμα αντίδρασης (mastermix)	5,7μl	5,7μl	5,7μl	5,7μl	4,9μl	4,9μl	4,9μl	4,9μl	5,7μl
H ₂ O	15,3μl	14,3μl	11,3μl	15,3μl	16,1μl	15,1μl	11,1μl	10,1μl	10,3μl

Η αντίδραση είχε τελικό όγκο: 25μl. Το “e” υποδηλώνει τις πρωτεΐνες στο έκλουσμα. Το “r” υποδηλώνει πρωτεΐνες συνδεδεμένες στα μόρια σεφαρόζης. Δύο διαφορετικά μείγματα αντίδρασης (mastermix) χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή κινάσης No2.

Το ‘D6PK μείγμα αντίδρασης (mastermix)’ χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα 1, 2, 3, 4, 9.

D6PK μείγμα αντίδρασης (mastermix):
 2,5μl 10% Διάλυμα1
 0,4μl 0,6% triton
 0,4μl 60μM DTT
 1μl αναστολέας πρωτεασών 50%
 0,4μl μη ραδιοσημασμένο ATP
 1μl ραδιοσημασμένο ATP
 5,7μl τελικός όγκος * 6 αντιδράσεις (5+1)

Η D6PK λειτουργεί καλύτερα με το συγκεκριμένο μείγμα αντίδρασης (mastermix), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα δείγματα που περιέχουν D6PK και PHOT1.

Το ‘KD Μείγμα αντίδρασης (mastermix)’ χρησιμοποιήθηκε στα δείγματα 5, 6, 7, 8.

KD μείγμα αντίδρασης (mastermix):

2,5μl 10x Διάλυμα2

1μl αναστολέας πρωτεασών 50%

0,4μl μη ραδιοσημασμένο ATP

1μl ραδιοσημασμένο ATP

4,9μl τελικός όγκος * 5 αντιδράσεις (4+1)

10x Διάλυμα2:

300μl Tris/HCl pH 9, 1M

100μl MgCl₂ 1M

200μl NaCl 5M

100μl EGTA 100mM

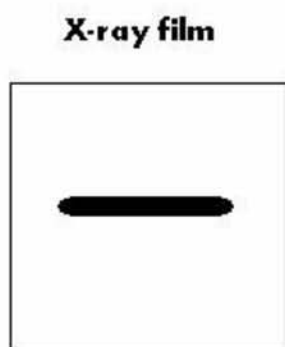
200μl H₂O

1000μl τελικός όγκος

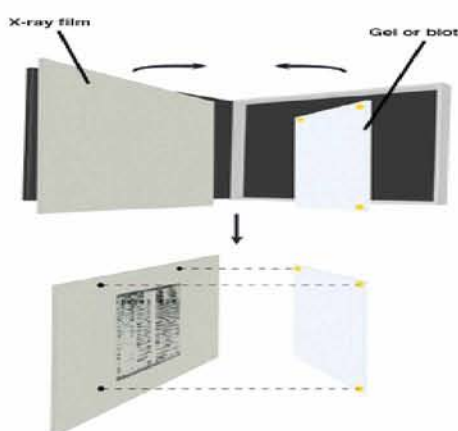
4.4.1 Αυτοραδιογραφία

Το ραδιενεργό πηκτώμα τοποθετήθηκε σε μια κασέτα αυτοραδιογραφίας. Η κασέτα αυτοραδιογραφίας διατηρεί το δείγμα-πήκτωμα σε στενή επαφή με το φιλμ και αποτρέπει το τελευταίο να εκτεθεί σε εξωγενές φως. Ένα φιλμ ακτίνων X τοποθετήθηκε πάνω στο πηκτώμα σε σκοτεινό δωμάτιο υπό ερυθρό φως. Η κασέτα διατηρήθηκε 12-16 ώρες στους -80°C ώστε το σήμα να ενισχυθεί.

(α)



(β)



Εικόνα 19: Αυτοραδιογραφία (α) Σχηματική παράσταση σήματος σε φιλμ ακτίνων X, (<http://teachline.ls.huji.ac.il/72320/methods-tutorial/southern/x-ray%20film.jpg>), (β) Στάδια παραγωγής του σήματος στην αυτοραδιογραφία., (http://nationaldiagnostics.com/images/4_1_3a.gif).

Το ραδιενεργό πύκτωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί παραπάνω από μια φορά για αυτοραδιογραφία μέχρι το φόντο να καθαριστεί αρκετά ώστε το σήμα να είναι ερμηνεύσιμο. 'Σύντομη εκθεση' μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί, στην οποία η κασέτα διατηρείται στους -80°C για περίπου 3 ώρες ώστε το σήμα να μην είναι τόσο ισχυρό και να καταστεί ευκολότερη η ερμηνεία του.

4.5 Εξέταση της ικανότητας φωτοτροπικής κάμψης φυταρίων

Για να ελεγχθεί η ικανότητα φωτοτροπικής κάμψης των *dbp* και *phot* μεταλλαγμάτων, ακολουθήθηκε μια σειρά από στάδια. Αρχικά, αποστειρώθηκαν τα σπέρματα που μας ενδιέφεραν στη συγκεκριμένη εργασία. Στη συνέχεια, τα σπέρματα επιστρώθηκαν σε τριβλία με θρεπτικό υλικό. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν σε κατακόρυφη θέση, σε θάλαμο με συνεχές λευκό φως, για 12-16 ώρες.

Τα τριβλία καλύφθηκαν με 3 στρώσεις αλουμινόχαρτο και διατηρήθηκαν για 3 μέρες σε κατακόρυφη θέση σε θερμοκρασία δωματίου. Το κάλυμμα από τη μια πλευρική περιοχή αφαιρέθηκε και τα τριβλία διατηρήθηκαν σε κατακόρυφη θέση, υπό συνεχές λευκό φως για 12-16 ώρες, φροντίζοντας να μη σκιάζεται το σημείο που αποκαλύφθηκε. Το κάλυμμα από τα τριβλία αφαιρέθηκε για να ελεγχθεί ποιά φυτάρια είναι φωτοτροπικά.

4.5.1 Αποστείρωση σπερμάτων

Για να αναπτυχθούν φυτάρια και να ελεγχθεί ο φαινότυπος του αγρίου τύπου και των μεταλλαγμάτων *phot* and *dbp*, τα σπέρματα έπρεπε να αποστειρωθούν ώστε να περιοριστεί η ανάπτυξη μυκήτων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιελάμβανε μια σειρά από πλύσεις.

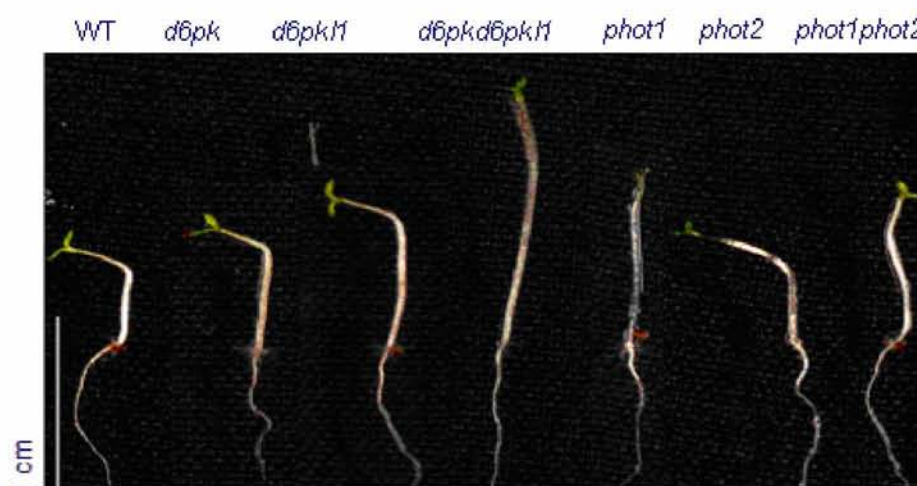
Περίπου 20 σπέρματα συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε erpendorf 1,5ml. 1ml υποχλωρίδιο του Na⁺ προστέθηκε και τα δείγματα περιστράφηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Τα σπέρματα αφέθηκαν να κατακαθίσουν. Το υποχλωρίδιο του Na⁺ απορρίφθηκε και 1ml αιθανόλη 70% προστέθηκε. Μετά από 1 λεπτό ανακίνησης με αναστροφή η αιθανόλη απορρίφθηκε. Τα σπέρματα πλύθηκαν 3 φορές με απεσταγμένο H₂O. 500μl H₂O προστέθηκαν. Τα σπέρματα διατηρήθηκαν στους 4°C μέχρι την επίστρωσή τους.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Τα μεταλλάγματα *phot1* και *d6pk* διαθέτουν κοινούς φαινοτύπους

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, υπάρχουν έντονες ενδείξεις ότι οι πρωτεϊνικές κινάσες D6PK και οι φωτοτροπίνες συμμετέχουν στο ίδιο βιοχημικό μονοπάτι όσο αφορά την φωτοτροπική απόκριση των φυτών. Μια από τις ενδείξεις είναι ο όμοιος, μη φωτοτροπικός φαινότυπος των μεταλλαγμένων φυταρίων *d6pkd6pk11* και *phot1*, *phot1phot2*, (Εικόνα 20).

Φυτάρια *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου (Columbia), τα απλά μεταλλάγματα *d6pk*, *d6pk11*, *phot1*, *phot2*, και τα διπλά μεταλλάγματα *d6pkd6pk11* και *phot1phot2* ελέγχθηκαν όσον αφορά την ικανότητα φωτοτροπικής κάμψης (4.5). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην Εικόνα 20.



Εικόνα 20: Φαινότυπος φυταρίων αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων *A.thaliana* 5 ημερών, που ελέγχθηκαν για ικανότητα φωτοτροπικής κάμψης. WT: αγρίου τύπου.

Με βάση την Εικόνα 20 καταλήγουμε στα ακόλουθα συμπεράσματα. Είναι εμφανές ότι τα *d6pkd6pk11* και *phot1* δε παρουσιάζουν φωτοτροπική απόκριση. Αυτό αποτελεί μια ένδειξη ότι οι παράγοντες D6PK και PHOT1 πιθανώς δρουν στο ίδιο βιοχημικό μονοπάτι. Το *phot2*, αντίθετα, δεν παρουσιάζει εμφανή φαινότυπο.

Τα *d6pk* και *d6pk11* είναι φωτοτροπικά. Αυτό το αποτέλεσμα σε συνδυασμό με το μη φωτοτροπικό διπλό μετάλλαγμα *d6pkd6pk11* δείχνουν ότι πιθανώς οι πρωτεϊνικές κινάσες D6PK είτε έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενες λειτουργίες είτε λειτουργούν συνεργιστικά. Συνεπώς, η απώλεια μιας τέτοιας κινάσης δεν είναι κρίσιμη για την ικανότητα φωτοτροπικής κάμψης του φυταρίου. Αντίθετα, απώλεια δύο ομολόγων D6PK καταστρέφει τη φωτοτροπική κάμψη του υποκοτυλίου.

Ο μη φωτοτροπικός φαινότυπος του διπλού μεταλλάγματος *phot1phot2* συγκρινόμενος με το φωτοτροπικό φαινότυπο του *phot2* προάγει την άποψη ότι η PHOT1 είναι κυρίως υπεύθυνη για το φαινότυπο του διπλού

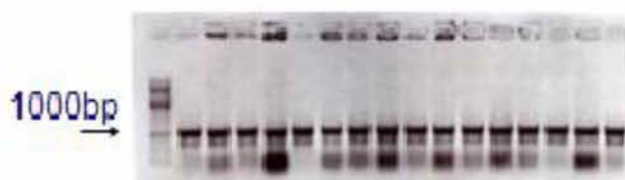
μεταλλάγματα *phot1phot2* και ότι εκείνη διαδραματίζει τον πιο κρίσιμο ρόλο στη φωτοτροπική απόκριση σε σύγκριση με την PHOT2.

5.2 Κλωνοποίηση Gateway για το *PHOT1*

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εξέταση της ενζυματικής συμπεριφοράς των φωτοτροπινών απέναντι σε πρωτεΐνες με τις οποίες πιθανώς αλληλεπιδρούν, δηλαδή τα PINs και τις D6PKs, με δοκιμές κινάσης. Όλες οι αναγκαίες για τις δοκιμές πρωτεϊνικές κατασκευές ήταν διαθέσιμες εκτός από την GST-PHOT1.

Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση της Τεχνολογίας Gateway για να συντηχθεί το γονίδιο *PHOT1* με το σήμα S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) μέσω κλωνοποίησης του στο φορέα pDEST 15 (αντίδραση LR). Αυτό αποτελεί κρίσιμο στάδιο για την ανάλυση Western και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης PHOT1 που ακολούθησαν. Για αυτό το σκοπό, διεξάχθηκε πρώτα η αντίδραση BP (4.1.3).

Για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης BP, κύτταρα XL1Blue μετασχηματίστηκαν με το προϊόν της αντίδρασης BP. Τα κύτταρα που τελικά αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υλικό LB+Kan περιείχαν το φορέα με ή χωρίς το γονίδιο *PHOT1*. Για να βρεθούν οι θετικοί κλώνοι, πραγματοποιήθηκε PCR αποικιών (4.1.4.2) για το τμήμα της περιοχής κινάσης της PHOT1, (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: PCR αποικιών για την αντίδραση BP.

Σε όλες τις περιπτώσεις, το τμήμα είχε το σωστό μέγεθος (1kb) οπότε υπήρχε μεγάλη πιθανότητα οι επιλεγμένοι κλώνοι να είναι θετικοί. Για να επιβεβαιωθεί αυτό, καθώς η PCR σε πολλές περιπτώσεις δίνει ψευδώς θετικά αποτελέσματα και δεν συμπεριλήφθηκε αρνητικός μάρτυρας στη συγκεκριμένη, μετά την απομόνωση πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε πέψη (4.1.4.4) με το περιοριστικό ένζυμο *SacI* που κόβει το ένθεμα (*PHOT1*) σε 3 σημεία, δημιουργώντας 3 χαρακτηριστικά τμήματα 3000bp 1400bp και 1000bp αντίστοιχα, (Εικόνα 22).

Και στους 6 κλώνους που εξετάστηκαν, τα τμήματα είχαν το σωστό μέγεθος (1000kb και 1400kb). Επομένως, η αντίδραση BP ήταν επιτυχής. Ένα από τα προϊόντα απομόνωσης πλασμιδικού DNA (που χρησιμοποιήθηκε αργότερα για την αντίδραση LR) στάλθηκε για αλληλούχιση για να επιβεβαιωθεί ότι η αντίδραση PCR δεν εισήγαγε λάθη στην αλληλουχία (Παράρτημα).



Εικόνα 22: Πέψη των προϊόντων απομόνωσης πλασμιδικού DNA της αντίδρασης BP με το περιοριστικό ένζυμο SacI. 2μl προϊόντος απομόνωσης πλασμιδιακού DNA περιέχονται

Μια αντίδραση LR επακολούθησε (4.1.6) και για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητά της πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία. Συγκεκριμένα, μια PCR αποικιών διεξάχθηκε (4.1.7.2) για το τμήμα της περιοχής κινάσης της PHOT1, (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: PCR αποικιών για την αντίδραση LR.

Το τμήμα είχε το σωστό μέγεθος (1kb), οπότε υπήρχε μεγάλη πιθανότητα οι επιλεγμένοι κλώνοι να είναι θετικοί. Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε με τη μέθοδο απομόνωσης πλασμιδικού DNA και ακολούθησε πέψη του με το περιοριστικό ένζυμο SacI (4.1.7.4), (Εικόνα 24).



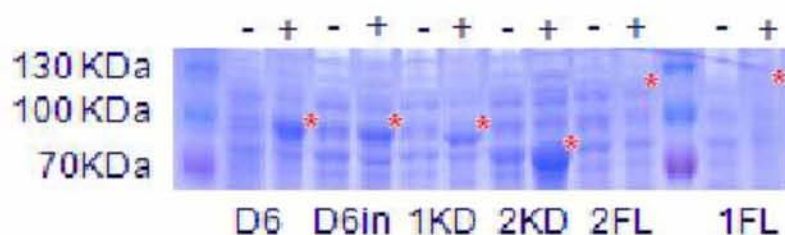
Εικόνα 24: Πέψη των προϊόντων απομόνωσης πλασμιδικού DNA της αντίδρασης LR με το περιοριστικό ένζυμο SacI. 2μl προϊόντος απομόνωσης πλασμιδικού DNA περιέχονται

Τα τμήματα είχαν το σωστό μέγεθος (1000kb και 1400kb). Επομένως, η αντίδραση LR ήταν επιτυχής. Το γονίδιο *PHOT1* μεταφέρθηκε επιτυχώς στο φορέα προορισμού pDEST 15. Δεν απαιτήθηκε αλληλούχιση καθώς πρόκειται για αντίδραση ανασυνδυασμού που σημαίνει ότι είναι συντηρητική (δεν προστίθενται ούτε αφαιρούνται νουκλεοτίδια).

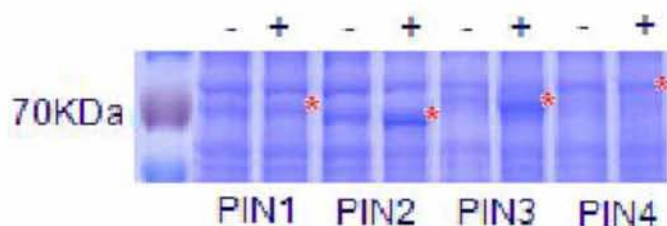
5.3 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών GST-D6, GST-D6in, GST-PHOT1, GST-1KD, GST-2KD, GST-PHOT2, GST-PIN1, GST-PIN2, GST-PIN3, GST-PIN4.

Οι πρωτεΐνες GST-PHOT1, GST-D6, GST-D6in, GST-1KD, GST-2KD, GST-PHOT2, GST-PIN1, GST-PIN2, GST-PIN3, GST-PIN4, υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα *E. coli* BL21. Οι περιοχές κινάσης των φωτοτροπινών υπερεκφράστηκαν με σκοπό να εξεταστεί η δραστηριότητα των φωτουποδοχέων χωρίς την αναστολή από τους τομείς LOV.

Τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης πρωτεϊνών παρουσιάζονται στις Εικόνες 25, 26.



Εικόνα 25: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων υπερέκφρασης GST-D6, GST-D6in, GST-1KD, GST-2KD, GST-PHOT1, GST-PHOT2. 1FL: PHOT1 full length, 2FL: PHOT2 full length, 1KD: περιοχή κινάσης του PHOT1, 2KD: περιοχή κινάσης του PHOT2. (+) Οι πρωτεΐνες μετά την προσθήκη IPTG, 3μl δείγματος ηλεκτροφορήθηκαν. (-) Οι πρωτεΐνες πριν την προσθήκη IPTG, 6μl δείγματος ηλεκτροφορήθηκαν. Οι πρωτεΐνες με βιοχημικό ενδιαφέρον επισημαίνονται με κόκκινο αστερίσκο. Οι GST-D6 και GST-D6in έχουν μοριακό βάρος 82KDa, η GST-1KD: 63,5KDa, η GST-2KD: 62KDa, η GST-1FL: 134KDa και η GST-2FL: 128,5 KDa.



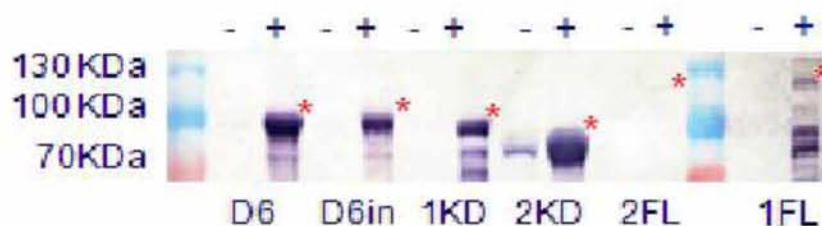
Εικόνα 26: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων υπερέκφρασης GST-PIN1, GST-PIN2, GST-PIN3, GST-PIN4. (+) Οι πρωτεΐνες μετά την προσθήκη IPTG, 3μl δείγματος ηλεκτροφορήθηκαν. (-) Οι πρωτεΐνες πριν την προσθήκη IPTG, 6μl δείγματος ηλεκτροφορήθηκαν. Οι πρωτεΐνες με βιοχημικό ενδιαφέρον επισημαίνονται με κόκκινο αστερίσκο. Η GST-PIN1 έχει μοριακό βάρος 62.5KDa, η GST-PIN2: 65.5KDa, η GST-PIN3: 64.5KDa και η GST-PIN4: 61,2KDa.

Οι πρωτεΐνες GST-D6, GST-D6in, GST-1KD, GST-2KD, GST-PIN2 και GST-PIN3 υπερεκφράστηκαν ικανοποιητικά.

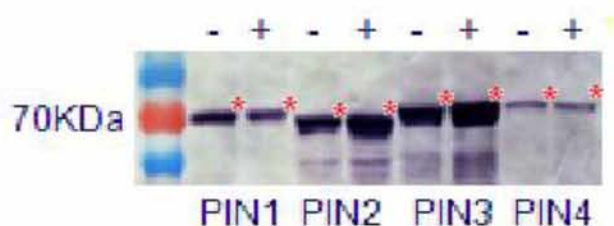
5.4 Ανάλυση Western για τις πρωτεΐνες GST-D6, GST-D6in, GST-PHOT1, GST-1KD, GST-2KD, GST-PHOT2, GST-PIN1, GST-PIN2, GST-PIN3, GST-PIN4

Για κάποιες πρωτεΐνες (GST-PHOT1, GST-PHOT2, GST-PIN1, GST-PIN4) δεν ήταν εμφανές αν είχαν υπερεκφραστεί ή όχι. Έτσι, διεξήχθη ανάλυση ανοσοαποτύπωσης (4.2.3).

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση Western εμφανίζονται στις *Εικόνες 27, 28*.



Εικόνα 27: Αποτελέσματα Western των προϊόντων υπερέκφρασης GST-D6, GST-D6in, GST-1KD, GST-2KD, GST-PHOT1, GST-PHOT2. 1FL: PHOT1 full length, 2FL: PHOT2 full length, 1KD: περιοχή κινάσης του PHOT1, 2KD: περιοχή κινάσης του PHOT2. (+) Οι πρωτεΐνες μετά την προσθήκη IPTG, 3μl δείγματος ηλεκτροφορήθηκαν. (-) Οι πρωτεΐνες πριν την προσθήκη IPTG, 6μl δείγματος ηλεκτροφορήθηκαν. Οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν βιοχημικό ενδιαφέρον επισημαίνονται με κόκκινο αστερίσκο. Οι GST-D6 και GST-D6in έχουν μοριακό βάρος 82KDa, η GST-1KD: 63,5KDa, η GST-2KD: 62KDa, η GST-1FL: 134KDa και η GST-2FL: 128,5KDa.



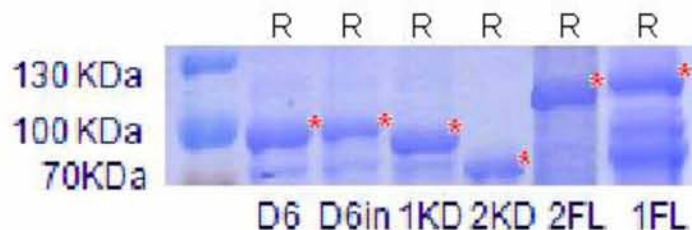
Εικόνα 28: Αποτελέσματα Western των προϊόντων υπερέκφρασης GST-PIN1, GST-PIN2, GST-PIN3, GST-PIN4. (+) Οι πρωτεΐνες μετά την προσθήκη IPTG, 3μl δείγματος ηλεκτροφορήθηκαν. (-) Οι πρωτεΐνες πριν την προσθήκη IPTG, 6μl δείγματος ηλεκτροφορήθηκαν. Οι πρωτεΐνες με βιοχημικό ενδιαφέρον επισημαίνονται με κόκκινο αστερίσκο. Η GST-PIN1 έχει μοριακό βάρος 62.5KDa, η GST-PIN2: 65.5KDa, η GST-PIN3: 64.5KDa και η GST-PIN4: 61,2KDa.

Όλες οι πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν στην παρούσα εργασία ανιχνεύτηκαν με το αντίσωμα αντί-GST και το σήμα είναι καθαρό. Αυτό σημαίνει ότι υπερεκφράστηκαν.

5.5 Καθαρισμός των συνδεδεμένων με GST πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες που εμφανίζουν ενδιαφέρον καθαρίστηκαν (4.3) για να χρησιμοποιηθούν σε δοκιμές κινάσης.

Τα αποτελέσματα καθαρισμού των πρωτεϊνών GST-D6, GST-D6in, GST-PHOT1, GST-1KD, GST-2KD, GST-PHOT2, GST-PIN1, GST-PIN2, GST-PIN3, GST-PIN4 παρουσιάζονται στις *Εικόνες 29, 30*.



Εικόνα 29: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων καθαρισμού GST-D6, GST-D6in, GST-1KD, GST-2KD, GST-PHOT1, GST-PHOT2. 1FL: PHOT1 full length, 2FL: PHOT2 full length, 1KD: περιοχή κινάσης του PHOT1, 2KD: περιοχή κινάσης του PHOT2. 5μl δειγμάτων ηλεκτροφορήθηκαν. R: πρωτεΐνες συνδεδεμένες σε μόρια σεφαρόζης (resin). Οι πρωτεΐνες με βιοχημικό ενδιαφέρον επισημαίνονται με κόκκινο αστερίσκο. Οι GST-D6 και GST-D6in έχουν μοριακό βάρος 82KDa, η GST-1KD: 63,5KDa, η GST-2KD: 62KDa, η GST-1FL: 134KDa και η GST-2FL: 128,5KDa.



Εικόνα 30: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων καθαρισμού GST-PIN1, GST-PIN2, GST-PIN3, GST-PIN4. 5μl δειγμάτων ηλεκτροφορήθηκαν. E: πρωτεΐνες στο έκλουσμα. R: πρωτεΐνες συνδεδεμένες σε μόρια σεφαρόζης (resin). Οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν βιοχημικό ενδιαφέρον επισημαίνονται με κόκκινο αστερίσκο. Η GST-PIN1 έχει μοριακό βάρος 62.5KDa, η GST-PIN2: 65.5KDa, η GST-PIN3: 64.5KDa και η GST-PIN4: 61,2KDa.

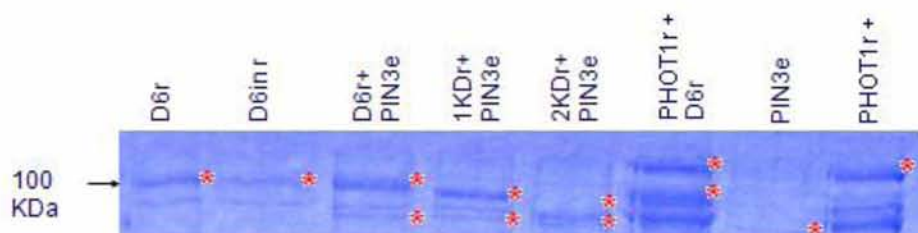
Οι κινάσες δεν εκλούστηκαν με γλουταθειόνη καθώς έχει φανεί για άλλες κινάσες (πχ PINOID) ότι η παρουσία της στο διάλυμα μειώνει αισθητά την ικανότητα των ενζύμων για φωσφορυλίωση. Η σεφαρόζη δε φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τη δραστηριότητα των κινασών.

Το σήμα των πρωτεϊνών με βιοχημικό ενδιαφέρον είναι καθαρά εμφανές. Αυτό σημαίνει ότι έχουν καθαριστεί ικανοποιητικά.

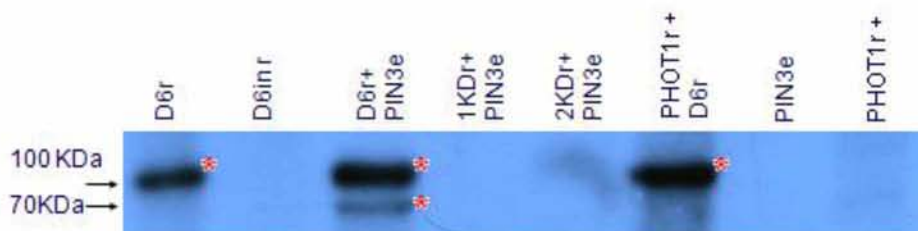
5.6 Δοκιμή κινάσης

Από τις δοκιμές κινάσης (4.4) που πραγματοποιήθηκαν, δύο αντιπροσωπευτικές παρατίθενται στη συνέχεια, (Εικόνες 31/32, 33/34). Από την αυτοραδιογραφία No1 προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

Η πρωτεϊνική κινάση D6r εμφάνισε καθαρά αυτοφωσφορυλίωση. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς η D6PK χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης για την εκτίμηση των φωσφορυλίσεων από τις φωτοτροπίνες. Μια αντικατάσταση της K₁₄₈ προς E₁₄₈ στην θήκη σύνδεσης ATP της D6PK οδηγεί στην ανενεργή της μορφή (D6in). Συνεπώς, η D6inr δεν αυτοφωσφορυλιώνεται παρόλο που η δομή της πρωτεΐνης παραμένει ίδια. Η D6inr χρησιμοποιήθηκε ως ελεγκτικός δείκτης για την επιτυχία της αυτοφωσφορυλίωσης της D6PK.



Εικόνα 31: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων για τη δοκιμή κινάσης No1. Οι ποσότητες των πρωτεϊνών που ηλεκτροφορήθηκαν παρατίθενται στον πίνακα 5. 1KD: περιοχή κινάσης της PHOT1, 2KD: περιοχή κινάσης της PHOT2, r: πρωτεΐνη συνδεδεμένη με σεφαρόζη (resin), e: πρωτεΐνη στο έκλουσμα. Οι πρωτεΐνες με βιοχημικό ενδιαφέρον επισημαίνονται με κόκκινο αστερίσκο. Οι GST-D6 και GST-D6in έχουν μοριακό βάρος 82KDa, η GST-1KD: 63,5KDa, η GST-2KD: 62KDa, η GST-PHOT1: 134KDa και η GST-PIN3: 64,5KDa. Η πρωτεΐνη GST-PIN3 αντιπροσωπεύεται από τη χαμηλότερη ζώνη της διπλής καθώς η ανώτερη ζώνη εμφανίζεται σε όλα τα δείγματα.



Εικόνα 32: Αποτελέσματα αυτοραδιογραφίας για τη δοκιμή κινάσης No1. 1KD: περιοχή κινάσης της PHOT1, 2KD: περιοχή κινάσης της PHOT2, r: πρωτεΐνη συνδεδεμένη με σεφαρόζη (resin), e: πρωτεΐνη στο έκλουσμα. Τα σήματα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον επισημαίνονται με κόκκινο αστερίσκο.

Όσον αφορά το δείγμα PHOT1 + D6r, εμφανίζεται μια πιο έντονη ζώνη στο ύψος των 100KDa. Παρόλα αυτά δεν μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η PHOT1 αυτοφωσφορυλιώθηκε σε κάποιο πρωτεϊνικό θραύσμα αυτού του ύψους (η PHOT1 παρουσιάζει πολλά πρωτεϊνικά θραύσματα αποικοδόμησης όπως είναι εμφανές στις *Εικόνες 27 και 29*) ούτε ότι φωσφορυλιώνει τη D6PK. Αυτό συμβαίνει διότι η D6PK έχει ικανότητα αυτοφωσφορυλίωσης καθιστώντας δυσχερή την ερμηνεία της προέλευσης του σήματος φωσφορυλίωσης. Η υψηλότερη ένταση της ζώνης στο ύψος αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα δείγματα που είναι συνδεδεμένα στα μόρια σεφαρόζης (resin) δε μπορούν να φορτωθούν στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου ισάξια παρόλο που φορτώνεται ο ίδιος όγκος δείγματος και στις δύο περιπτώσεις.

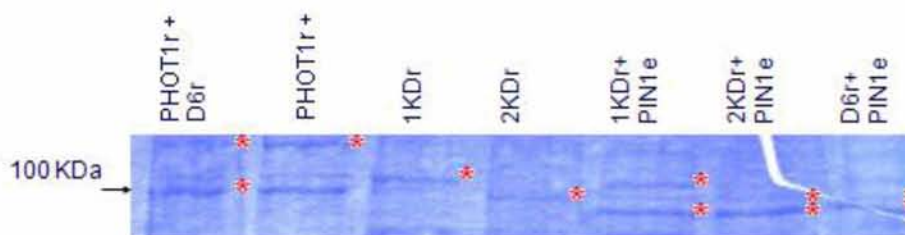
Η PIN3e αποτελεί υπόστρωμα φωσφορυλίωσης της D6r (δείγμα D6r + PIN3e). Αυτό είναι αποδεδειγμένο και χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων φωσφορυλίωσης από τις φωτοτροπίνες. Η PIN3e δε φαίνεται να φωσφορυλιώθηκε από την περιοχή κινάσης της PHOT1 και της PHOT2 (δείγματα 1KDr + PIN3e και 2KD + PIN3).

Η PIN3 αποτελεί μια πρωτεΐνη-υπόστρωμα της D6PK και πιθανό υπόστρωμα της PHOT1 χωρίς ικανότητα αυτοφωσφορυλίωσης. Χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας στη δοκιμή κινάσης όπου δε θα έπρεπε να εμφανίζει κανένα σήμα φωσφορυλίωσης, πράγμα που όντως

συνέβη. Συνεπώς, μπορούμε να εμπιστευθούμε το αποτέλεσμα φωσφορυλίωσης της PIN3 από την D6PK στο δείγμα D6r + PIN3e.

Η PHOT1r δεν εμφάνισε ξεκάθαρη αυτοφωσφορυλίωση. Παρουσιάστηκαν ορισμένες αχνές ζώνες στο ύψος κάποιων θραυσμάτων της αλλά δε μπορεί να επιβεβαιωθεί ότι δεν πρόκειται για ψευδο-αποτελέσματα των επιδράσεων του φόντου (background effects).

Δοκιμή κινάσης No2



Εικόνα 33: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων για τη δοκιμή κινάσης No2. Οι ποσότητες των πρωτεϊνών που ηλεκτροφορήθηκαν στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου παρατίθενται στον πίνακα 6. 1KD: περιοχή κινάσης της PHOT1, 2KD: περιοχή κινάσης της PHOT2, r: πρωτεΐνη συνδεδεμένη με σεφαρόζη, e: πρωτεΐνη στο έκλουσμα. Οι πρωτεΐνες με βιοχημικό ενδιαφέρον επισημαίνονται με κόκκινο αστερίσκο. Η GST-D6 έχει μοριακό βάρος 82KDa, η GST-1KD: 63,5KDa, η GST-2KD: 62KDa, η GST-PHOT1: 134KDa και η GST-PIN1: 62,5KDa.



Εικόνα 34: Αποτελέσματα αυτοραδιογραφίας για τη δοκιμή κινάσης No2. 1KD: περιοχή κινάσης της PHOT1, 2KD: περιοχή κινάσης της PHOT2. r: πρωτεΐνη συνδεδεμένη με σεφαρόζη, e: πρωτεΐνη στο έκλουσμα. Τα σήματα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον επισημαίνονται με κόκκινο αστερίσκο.

Από την αυτοραδιογραφία No2 προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα: Η PIN1e αποτελεί υπόστρωμα φωσφορυλίωσης της D6r (δείγμα D6r + PIN1e) καθώς εμφανίζεται σήμα φωσφορυλίωσης στο ύψος των 70KDa. Αυτό είναι αποδεδειγμένο και χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων φωσφορυλίωσης από τις φωτοτροπίνες. Η αυτοφωσφορυλίωση της D6PK είναι επίσης εμφανής στο ύψος των 100KDa. Η PIN1e δε φαίνεται να φωσφορυλιώνεται από την περιοχή κινάσης της PHOT1 και PHOT2 (δείγματα 1KDr + PIN1e και 2KDr + PIN1e).

Οι περιοχές κινάσης των PHOT1 και PHOT2 δεν εμφάνισαν ικανότητα αυτοφωσφορυλίωσης (δείγματα 1KDr και 2KDr). Στο δείγμα PHOT1r + D6r είναι εμφανής η αυτοφωσφορυλίωση της D6PK όπως και στη δοκιμή κινάσης No1. Το έντονο σήμα που εκπέμπει το φόντο δεν επιτρέπει να επιβεβαιωθεί

πιθανή αυτοφωσφορυλίωση της PHOT1. Επίσης, η πιθανότητα η D6PK να είναι υπόστρωμα φωσφορυλίωσης της PHOT1 δεν επιβεβαιώνεται λόγω της ικανότητας αυτοφωσφορυλίωσης της D6PK. Στο δείγμα PHOT1r δεν εμφανίστηκε κάποιο σήμα που να υποδηλώνει αυτοφωσφορυλίωση σε κάποιο θραύσμα του.

Η υψηλότερη ένταση της ζώνης στο ύψος που εμφανίζεται η αυτοφωσφορυλίωση της D6PK μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα δείγματα που είναι συνδεδεμένα στα μόρια σεφαρόζης (resin) δεν μπορούν να φορτωθούν στο πήκτωμα αγαρόζης ισάξια παρόλο που φορτώνεται ο ίδιος όγκος δείγματος και στις δυο περιπτώσεις.

Σχόλια:

Παρόλο που όλες οι πρωτεΐνες PIN υπερεκφράστηκαν και καθαρίστηκαν δόθηκε βάρος στην εξέταση της PIN1 και της PIN3. Η PIN3 είναι πολύ σημαντική καθώς είναι υπεύθυνη για την πλευρική μεταφορά της αυξίνης. Η PIN1 είναι καλό υπόστρωμα για δυο άλλες AGC κινάσες, την D6PK και την PINOID. Δεδομένου ότι τα PIN αλληλοσυμπληρώνονται διαλεξαμε το PIN1 στη δοκιμή με την PHOT1.

Η PHOT2 παρόλο που υπερεκφράστηκε και καθαρίστηκε δεν έδειξε ενδιαφέρουσα συμπεριφορά στη δοκιμή κινάσης και έτσι δεν εμφανίζεται στις δοκιμές κινάσης που παρατίθενται

Τέλος η καζεΐνη αποτελεί κοινό υπόστρωμα φωσφορυλίωσης πρωτεϊνικών κινάσων. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα που την περιλαμβάνουν ως πιθανό υπόστρωμα των φωτοτροπινών για να ελέγξουμε την ικανότητα φωσφορυλίωσης των τελευταίων. Αποδείχθηκε ότι η καζεΐνη εμφανίζεται στο ίδιο ύψος με προϊόντα αποικοδόμησης των φωτοτροπινών. Αυτό κατέστησε αδύνατη την ερμηνεία των σημάτων. Έτσι, κρίθηκε μη απαραίτητο να ενσωματωθούν τα σχετικά αποτελέσματα στην παρούσα διατριβή.

6. Συμπεράσματα/Συζήτηση

Ο φωτοτροπισμός είναι η κατευθυνόμενη αύξηση ενός φυτικού οργάνου (βλαστού, ρίζας κ.ο.κ.) σε απόκριση στην αλλαγή διεύθυνσης του φωτός. Αποτελεί μια από τις ποικίλες αποκρίσεις του φυτού στα πολυάριθμα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που οδηγούν σε αναπτυξιακό αναπρογραμματισμό και αύξηση. Τέσσερις σημαντικοί παράγοντες φαίνεται να παίζουν ρόλο σε μοριακό επίπεδο: οι φωτοτροπίνες, η φυτορμόνη αυξίνη, οι πρωτεΐνες PIN και η πρωτεϊνική κίνηση D6PK.

Το 'μοντέλο φωτοτροπισμού με βάση την αυξίνη' που υποστηρίζει την πλευρική μεταφορά της και τη δημιουργία βαθμίδωσης συγκέντρωσής της είναι η επικρατούσα θεωρία σχετικά με τις κάμψεις φωτοτροπισμού. Οι φωτοτροπίνες είναι οι υποδοχείς κυανού φωτός των φυτών. Συμπεριφέρονται ως διακόπτες-κλειδιά που μέσω της ρύθμισης της έκφρασης και ενεργότητάς τους ενσωματώνουν πολλά βιοτικά και αβιοτικά ερεθίσματα. Παράλληλα, καθορίζουν τη φυτική ανάπτυξη καθοδηγώντας την Πολική Μεταφορά Αυξίνης (ΠΜΑ). Η βαθμίδωση στη φωσφορυλίωσή τους έχει φανεί ότι προάγει την πλευρική μετακίνηση της αυξίνης.

Οι πρωτεΐνες PIN είναι μεμβρανικά κανάλια εκροής αυξίνης. Η θέση τους στο κύτταρο καθορίζει τη μεταφορά της οδηγώντας σε βαθμιδώσεις συγκέντρωσής της. Οι D6PKs είναι πρωτεϊνικές κινάσες που φωσφορυλιώνουν τις PINs. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που προωθούν ανάμειξή τους στο ίδιο μοριακό μονοπάτι με τις φωτοτροπίνες.

Παρόλα τα ισχυρά στοιχεία που προάγουν αυτά τα μόρια ως παράγοντες κλειδιά στο φωτοτροπισμό, οι βιοχημικοί μηχανισμοί τους παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Καθώς η φωσφορυλίωση φαίνεται να διαδραματίζει καίριο ρυθμιστικό ρόλο, στην παρούσα εργασία εξετάσαμε μέσω δοκιμών κινάσης αν οι φωτοτροπίνες φωσφορυλιώνουν τους παράγοντες PIN και D6PKs σε μια προσπάθεια να διευκρινιστεί ένα τμήμα του μονοπατιού.

Αυτό επιτεύχθηκε σύμφωνα με την ακόλουθη στρατηγική. Αρχικά, το γονίδιο *PHOT1* κλωνοποιήθηκε μέσω της Τεχνολογίας Gateway στο φορέα προορισμού pDEST 15 (που διαθέτει το σήμα GST) έτσι ώστε το *PHOT1* να συντηχθεί με το *GST*. Οι άλλες πρωτεϊνικές κατασκευές, που μας ενδιέφεραν στην παρούσα εργασία (GST-D6, GST-D6in, GST-1KD, GST-2KD, GST-PHOT2, GST-PIN1, GST-PIN2, GST-PIN3, GST-PIN4), ήταν διαθέσιμες. Οι περιοχές κινάσης συμπεριλήφθηκαν στα δείγματά μας με σκοπό να εξεταστεί η δραστηριότητα των φωτοτροπινών χωρίς αναστολή από τους τομείς LOV. Οι πρωτεΐνες υπερεκφράστηκαν με IPTG και καθαρίστηκαν με σεφαρόζη. Τα PIN εκλούστηκαν με γλουταθειόνη. Οι καθαρισμένες φωτοτροπίνες ελέχθηκαν μέσω δοκιμών κινάσης όσον αφορά τη συμπεριφορά φωσφορυλίωσης απέναντι στις PINs, την D6PK και την καζεΐνη καθώς δεν έχει αποδειχθεί μέχρι σήμερα αν οι φωτοτροπίνες φωσφορυλιώνουν τις PINs.

Τα συμπεράσματα που μπορούν να προκύψουν από την παρούσα εργασία είναι τα εξής: η *PHOT1* δεν αυτοφωσφορυλιώνεται ούτε trans-φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες PIN1 και PIN3. Επίσης, οι περιοχές κινάσης των *PHOT1* και

PHOT2 δεν αυτοφωσφορυλιώνονται ούτε trans-φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες PIN1 και PIN3.

Μπορούμε να εμπιστευτούμε τα πειραματικά αποτελέσματα καθώς χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι ελεγκτικοί δείκτες στις δοκιμές κινάσης: Η αυτοφωσφορυλίωση της D6PK που ήταν εμφανής σε όλες τις δοκιμές και η trans-φωσφορυλίωση της PIN1 και της PIN3 από την πρωτεϊνική κινάση D6PK.

Όπως είναι εμφανές από τις αντιπροσωπευτικές δοκιμές κινάσης που παρατίθενται στα αποτελέσματα, οι PIN1 και PIN3 δεν φαίνεται να φωσφορυλιώνονται από τις φωτοτροπίνες. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό είναι ότι πρωτεΐνες PIN1 και PIN3 δεν αποτελούν άμεσα υποστρώματά τους. Υπάρχει επίσης η περίπτωση, να απαιτείται υψηλότερη ένταση λευκού φωτός ή χρήση αποκλειστικά κυανού φωτός κατά την επώαση των δειγμάτων για να ενεργοποιηθούν οι φωτοτροπίνες και να αλληλεπιδράσουν με τα πιθανά υποστρώματά τους.

Θα μπορούσε επίσης να υπάρχει ένας άγνωστος μέχρι τώρα φυτικός συμπαράγοντας που ενεργοποιεί τις φωτοτροπίνες, ο οποίος δεν συμπεριλήφθηκε στα δείγματά μας. Αυτό θα εξηγούσε γιατί οι περιοχές κινάσης, δεν αυτοφωσφορυλιώνονται ενώ στα δείγματα δεν περιλαμβάνονται οι αναστολείς LOV. Ένα πείραμα που θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί για να αποσαφηνιστεί αυτή υπόθεση είναι η απομόνωση εκχυλισμάτων από εκχλωτικά νεαρά φυτά, στα οποία σίγουρα θα περιλαμβάνεται ο υποτιθέμενος συμπαράγοντας και η εξέτασή τους σε μια δοκιμή κινάσης υπό την επίδραση φωτός.

Η δράση των περιοχών κινάσης των φωτοτροπινών απέναντι στην D6PK δεν ελέγχθηκε καθώς παρουσιάζονται στο ίδιο περίπου ύψος στο πήκτωμα και η αυτοφωσφορυλίωση της D6PK καθιστά αδύνατη την ερμηνεία των σημάτων. Για τον ίδιο λόγο, δεν μπορεί να απορριφθεί η πιθανότητα η PHOT1 να φωσφορυλιώνει την D6PK. Ένα πείραμα που θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί για να διευκρινιστεί αυτό το ερώτημα είναι μια δοκιμή κινάσης που να περιλαμβάνει τις φωτοτροπίνες απέναντι στην D6in, όπως και τις περιοχές κινάσης των φωτοτροπινών απέναντι στην D6in. Η αδυναμία της D6in να αυτοφωσφορυλιωθεί θα οδηγούσε σε πιο καθαρά αποτελέσματα.

Όσον αφορά την καζεΐνη, αποτελεί ένα κοινό υπόστρωμα φωσφορυλίωσης πρωτεϊνικών κινασών. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα που την περιλαμβάνουν ως πιθανό υπόστρωμα των φωτοτροπινών για να ελέγξουμε την ικανότητα φωσφορυλίωσης των τελευταίων. Αποδείχθηκε ότι η καζεΐνη εμφανίζεται στο ίδιο ύψος με προϊόντα αποικοδόμησης των φωτοτροπινών. Αυτό κατέστησε αδύνατη την ερμηνεία των σημάτων.

Η αυξίνη δεν συμπεριλήφθηκε στα πειράματά μας καθώς ανήκει στους τελευταίους παράγοντες του βιοχημικού μονοπατιού του φωτοτροπισμού. Συνεπώς, δεν είναι ιδιαίτερα πιθανό η αυξίνη να αλληλεπιδρά με τις φωτοτροπίνες που εμφανίζονται στα αρχικά στάδια.

7. Βιβλιογραφία

1. John M. Christie, (2007), Phototropin Blue-Light receptors, *Annual Review of Plant Biology*, 58: 21-45
2. Jennifer L. Holland, Diana Roberts, Emmanuel Liscum, (2009), Understanding phototropism: from Darwin to today, *Journal of Experimental Botany*, 60(7): 1969-1978
3. Daisuke Matsuoka, Satoru Tokutomi, (2005), Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin, *PNAS*, 102 (37): 13337-13342
4. Melina Zourelidou, Isabel Müller, Björn C. Willige, Carola Nill, Yusuke Jikumaru, Hanbing Li, Claus Schwechheimer, (2009), The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in *Arabidopsis thaliana*, *Development*, 136: 627-636.
5. Shin-ichiro Inoue, Toshinori Kinoshita, Masaki Matsumoto, Keiichi I. Nakayama, Michio Doi, Ken-ichiro Shimazaki, (2008), Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signalling, *PNAS*, 105(14): 5626-5631.
6. Helen S Robert, Remko Offringa, (2008), Regulation of auxin transport polarity by AGC kinases, *Current Opinion on Plant Biology*, 11: 495-502
7. Eva Benková, Marta Michniewicz, Michael Sauer, Thomas Teichmann, Daniela Seifertova, Gerd Juergens, Jiri Friml, (2003), Local Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation, *Cell*, 115: 591-602
8. Laszlo Bögre, Laszlo Ökresz, Rossana Henriques, Richard G. Anthony, (2003), Growth signaling pathways in *Arabidopsis* and the AGC protein kinases, *TRENDS in Plant Science*, 8(9): 424-431
9. Ullas V. Pedmale, Emmanuel Liscum, (2007), Regulation of Phototropic Signaling in *Arabidopsis* via Phosphorylation Protein State Changes in the Phototropin 1-interacting Protein NPH3, *Journal of Biological Chemistry*, 282(27): 19992-20001.
10. Emmanuel Liscum, Winslow R. Briggs, (1995), Mutations in the NPH1 Locus of *Arabidopsis* Disrupt the Perception of Phototropic Stimuli, *The Plant Cell*, 7: 473-485
11. Carlos S. Galván-Ampudia, Remko Offringa, (2007), Plant evolution: AGC kinases tell the auxin tale, *TRENDS in Plant Science*, 12(12): 541-547
12. Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger, (2006), "Auxin, The Growth Hormone", *Plant Physiology*, Eds 4, Sinauer Associates Inc, Sunderland, pp 467-505
13. Gateway Technology manual, Invitrogen, Version C, 060302, 25-0522

Παράρτημα

[illegible]

Εικόνα 35: Αποτελέσματα αλληλούχισης για το γονίδιο *PHOT1* μέσω του προγράμματος 'Multalin'. Παρουσιάζεται αλληλούχιση του πρώτου μισού του γονιδίου. Με κυανό χρώμα αποδίδονται οι αλληλουχίες που συμπίπτουν πλήρως με τη μήτρα του γονιδίου ενώ με κόκκινο οι περιοχές όπου όλες οι εξεταζόμενες αλληλουχίες συμπίπτουν. Υπάρχει πλήρης αλληλεπικάλυψη.

