

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη αλληλεπίδρασης της LSK1 κινάσης του φυτού *Lotus japonicus*
μέσω ανάλυσης δύο υβριδίων ζυμομύκητα

Interactions of LSK1 kinase of *Lotus Japonicus* using a
Yeast Two Hybrid System

ΡΗΓΟΥ ΙΩΑΝΝΑ



2019



Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- Τριμελής Επιτροπή:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ψαρρά Άννα-Μαρία: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γκαραγκούνης Κωνσταντίνος: Ακαδημαϊκός Υπότροφος, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πριν την οποιαδήποτε περιγραφή και ανάλυση των αποτελεσμάτων, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που με στήριξαν και με βοήθησαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα που εκπόνησα την πτυχιακή μου, στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος. Για τον λόγο αυτό, επιθυμώ, πρωτίστως να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα και καθηγήτρια μου, την κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, για την εμπιστοσύνη και την υπομονή που μου έδειξε, δίνοντας μου την δυνατότητα να γίνω μέλος της ομάδας του εργαστηρίου για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα και να εκπαιδευτώ κατάλληλα ώστε να αποκτήσω τα εφόδια για τους μελλοντικούς μου στόχους. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στον κ. Γκαραγκούνη Κώστα και στην κ. Νταντάμη Ελένη, δύο “μεγάλα κεφάλια”, που στελεχώνουν το εργαστήριο και αποτελούν τους μέντορές μου, καθώς με συμβούλεψαν και με στήριξαν σε κάθε μου προσπάθεια και συνάμα ήταν δίπλα μου σε κάθε δυσκολία. Επιπλέον, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την Δημάκου Φωτεινή, την μεταπτυχιακό του εργαστηρίου, που καθημερινώς συνεργαζόμασταν για να επιτευχθεί η μελέτη, καθώς επίσης και την Αβραμμίδου Μαριάννα, διδάκτορα του εργαστηρίου, με την οποία και ξεκίνησα τα πρώτα μου δειλά βήματα. Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του εργαστηρίου, τόσο για την καθημερινή συναναστροφή και συνεργασία, όσο όμως και για τις ευχάριστες στιγμές που μου χάρισαν και έξω από το εργαστήριο. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου ,για την αμέριστη ανοχή και την βοήθεια καθώς βρίσκονται συνεχώς δίπλα μου και ας μην καταλαβαίνουν τις εργαστηριακές μου ανησυχίες, αλλά παρόλα αυτά συνεχίζουν να με υποστηρίζουν και να μου δείχνουν την αγάπη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 GSK3 στα θηλαστικά	9
1.1.1 Δομή των GSK3	9
1.1.2 Ρύθμιση των GSK3 & σηματοδοτικά μονοπάτια	10
1.2 Οι SKs στα φυτά	13
1.2.1 Λειτουργίες των SKs στα φυτά	13
1.2.2 Σηματοδότηση BR - Απόκριση σε βιοτικούς & αβιοτικούς παράγοντες	15
1.3 <i>Lotus japonicus</i> & SKs	16
1.3.1 Το φυτό-μοντέλο <i>Lotus japonicus</i> & Φυματιογένεση	16
1.3.2 Μηχανισμός αυτορρύθμισης φυματιογένεσης (AON) & LSKs	17
1.4 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις/Protein-Protein Interactions (PPIs)	19
1.4.1 Η αναπαραγωγή του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.4.2 UAS & TATA περιοχές / GAL-UAS	23
1.4.3 Yeast Two Hybrid System: Αρχή της μεθόδου	24
1.4.4 Προσεγγίσεις μεγάλης κλίμακας αλληλεπιδράσεων στο Y2H	26
1.5 Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας	28
2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	29
2.1 Δημιουργία βιβλιοθήκης-Preys	29
2.1.1 Χειρισμός σπόρων του φυτού <i>L japonicus</i>	29
2.1.2 Μόλυνση των αρτίβλαστων με το ριζόβιο <i>M. Loti</i> & δειγματοληψία	29
2.1.3 Απομόνωση & καθαρισμός RNA από δείγματα ριζικού ιστού	30
2.1.4 Σύνθεση cDNA & Long Distance PCR (LD-PCR)	30
2.1.5 Καθαρισμός ds cDNA	31
2.1.6 Μετασηματισμός του στελέχους Y187(MATα)-Δημιουργία Prey Strain.	31
2.2 Προετοιμασία του στελέχους Y2HGGold(MATα)-Bait Strain	32
2.2.1 Μετασηματισμός του στελέχους Y2HGGold(MATα)-Δημιουργία Bait Strain	32
2.2.2 Έλεγχος του στελέχους Y2HGGold(MATα)-Bait Strain για αυτοενεργοποίηση	32
2.2.3 Έλεγχος του στελέχους Y2HGGold(MATα)-Bait Strain για τοξικότητα	33
2.3 Σύζευξη / Yeast Mating	33
2.3.1 Πειράματα συζεύξεων μαρτύρων / Control Matings	33
2.3.2 Σύζευξη: (Y2HGGold-[pGBKT7-LSK1]/Bait) x (Y187-[pGADT7-cDNA ενθέματα βιβλιοθήκης]/Preys)	34

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
3.1 Αποτελέσματα σύνθεσης ds cDNA από ριζικούς ιστούς <i>L japonicus</i>	35
3.2 Έλεγχος βιβλιοθήκης-Library Strain (Preys)	36
3.3 Αποτελέσματα ελέγχου αυτοενεργοποίησης & τοξικότητας	37
3.4 Αποτελέσματα ανεξάρτητων μετασχηματισμών	39
3.5 Αποτελέσματα συζεύξεων μαρτύρων (Control matings)	40
3.6 Αποτελέσματα συζεύξης (Y2HGold-[pGBKT7-LSK1]/Bait) x (Y187-[pGADT7-cDNA ενθέματα βιβλιοθήκης]/Preys).	43
3.7 Έλεγχος απόδοσης της 1 ^{ης} επανάληψης της σύζευξης	44
3.8 Έλεγχος απόδοσης της 2 ^{ης} επανάληψης της σύζευξης.	45
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51
6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	55

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ικανότητα των ζωικών GSK3 κινασών που έχουν ρόλο κινάσης σερίνης/θρεονίνης να ρυθμίζουν πολλά πλειοτροπικά μονοπάτια που συμβάλουν σε διαδικασίες ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού και ανθεκτικότητας των κυττάρων, οδήγησε στην μελέτη ομόλογων κινασών στο βασιλείο των φυτών. Η ανακάλυψη των GSK3-like κινασών στην υποοικογένεια των ψυχανθών και συγκεκριμένα στο είδος *Lotus japonicus*, αποτέλεσε ορόσημο για τη μελέτη τους γύρω από την διαδικασία της φυματιογένεσης· μία διαδικασία αρκετά ωφέλιμη και αξιοποιήσιμη με κεντρικό ρόλο στη βιώσιμη γεωργία. Στο φυτό μοντέλο *L. japonicus* έχουν βρεθεί 6 μέλη GSKs, τα οποία ονομάστηκαν LSKs. Συγκεκριμένα ένα από τα μέλη των LSKs, η LSK1, αποδείχτηκε προσφάτως να ρυθμίζει την έκφραση σηματοδοτικών μορίων της φυματιογένεσης. Σε επόμενο στάδιο λοιπόν, κρίθηκε αναγκαία η μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που αυτή δημιουργεί και την καθιστούν απαραίτητη ώστε να κατασταλεί η διαδικασία της φυματιογένεσης στο *L. japonicus*. Με τη βοήθεια του συστήματος δύο υβριδίων ζυμομύκητα (Yeast 2 Hybrid system), ένα ετερόλογο σύστημα ανίχνευσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, καταμετρήθηκε ένα σύνολο υποψήφιων πρωτεϊνών. Επόμενο στόχο αποτελεί η διαλογή και η ταυτοποίηση των υποψήφιων πρωτεϊνών που κατά πάσα πιθανότητα αλληλεπιδρούν με την LSK1 στα σηματοδοτικά μονοπάτια της φυματιογένεσης. Αυτός ο τρόπος θα βοηθήσει στην διαλεύκανση του ρόλου αφενός της υπό μελέτη πρωτεΐνης LSK1, και αφετέρου των υπόλοιπων μελών της οικογένειας.

Λέξεις - Κλειδιά:

Κινάση 3 συνθάσης γλυκογόνου (GSK3), Shaggy-like κινάση (SKs), Φυματιογένεση, *Lotus japonicus*, *Lotus SHAGGY-Like 1* κινάση (*LSK1*), Ανάλυση δύο υβριδίων ζυμομύκητα (Y2H)

ABSTRACT

The ability of GSK3 kinases found in animals, that act as serine / threonine kinases, to regulate many pleiotropic pathways that contribute to cell growth, proliferation and plant's resistance processes, has led to the study of many homologous kinases in plants. The discovery of GSK3-like kinases in the subfamily of legumes, and particularly in *Lotus japonicus* species, has been a milestone for the study of their involvement in nodulation; a process that is quite beneficial and exploitable with an important role in sustainable agriculture. Six GSK3-like proteins have been found in *L. japonicus*, which were named LSKs. In particular, one of the LSKs members, LSK1, has recently proved to regulate the expression of signalling molecules that are involved in nodulation. As a next step, it was considered necessary to study the protein interactions that it creates and that also make it necessary to suppress the nodulation in *L. japonicus*. With the Yeast 2 Hybrid System, a heterologous system, that detects protein-protein interactions, a set of candidate proteins was counted. Our next goal, is the screening and identification of these candidate proteins that are likely to interact with LSK1 on the signaling pathways of nodulation. This will help to elucidate the role of LSK1 protein and the other members of this family.

Keywords:

Glycogen synthase kinase-3 (GSK3), Shaggy-like kinase (SKs), Nodulation, *Lotus japonicus*, *Lotus* SHAGGY-Like 1 kinase (*LSK1*), Yeast two hybrid system (Y2H).

1 | ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διαδικασία της φωσφορυλίωσης αποτελεί μία από τις εν δυνάμει μεταγωγικές δραστηριότητες των ευκαρυωτικών κυττάρων καθώς μπορεί να ρυθμίζει πλήθος λειτουργιών, όπως τον πολλαπλασιασμό, την έκφραση γονιδίων ή ακόμα και τον μεταβολισμό τους. Για το λόγο αυτό η μελέτη των πρωτεϊνικών κινασών αποτελεί πεδίο εντατικής μελέτης που έχει ως απώτερο στόχο να καταλήξει σε πλήρη κατανόηση των γεγονότων της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών και τον τρόπο που τελικά επηρεάζουν τη συμπεριφορά των κυττάρων.

Τα τελευταία 30 χρόνια οι επιστήμονες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στη μελέτη της κινάσης 3 της συνθάσης του γλυκογόνου, GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3 (GSK3), γνωστή επίσης και ως Shaggy στην *Drosophila* (Ruel et al., 1993). Η GSK3 είναι μία εξαιρετικά συντηρημένη κινάση σε όλους τους ευκαρυώτες (Ali et al., 2001, Saidi et al., 2012). Η πρώτη ανακάλυψη της λειτουργίας της GSK3 αφορούσε την απενεργοποίηση του ενζύμου συνθάση του γλυκογόνου σε σκελετικούς μύες κουνελιού (Embi et al., 1980, Woodgett and Cohen, 1984). Έκτοτε η συμμετοχή της GSK3 έχει επιβεβαιωθεί σε μεγάλο αριθμό σηματοδοτικών μονοπατιών τόσο στην ομοταξία των θυλαστικών (Frame and Cohen, 2001, Kaidanovich-Beilin and Woodgett, 2011) όσο και στο βασιλείο των φυτών με την ανακάλυψη των GSK3-like κινασών στο φυτό μοντέλο *Medicago sativa* (Pay et al., 1993) και μετέπειτα στο *Arabidopsis thaliana* (Bianchi et al., 1994, Dornelas et al., 1997).

Η συνεχής έρευνα οδήγησε στην ανακάλυψη των GSK3-like κινασών στο φυτό *Lotus japonicus* (Kameshita et al., 2004), μοντέλο που ανήκει στην υποοικογένεια των ψυχανθών και κατατάσσεται στα φυτά με μεγάλη αγροοικονομική σημασία, καθώς αποτελούν σημαντική πηγή τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα και παρέχουν τις πρώτες ύλες στη βιομηχανία (Graham & Vance 2003).

Όσο αυξάνονται οι απαιτήσεις και οι ανάγκες για κατανάλωση, τόσο περισσότερο απασχολούν το επιστημονικό πεδίο τα ψυχανθή, καθώς και οι συμβιωτικές σχέσεις που δημιουργούν με το μικροβιόκοσμο τους, ώστε να μπορέσουν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν. Έτσι, η μελέτη των κινασών και δε των GSK3-like κινασών, κατά τη διάρκεια, της φυματιογένεσης καθίσταται αναγκαία. Η μελέτη μάλιστα, μέσω των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων βοηθάει στην κατανόηση του ρόλου τους.

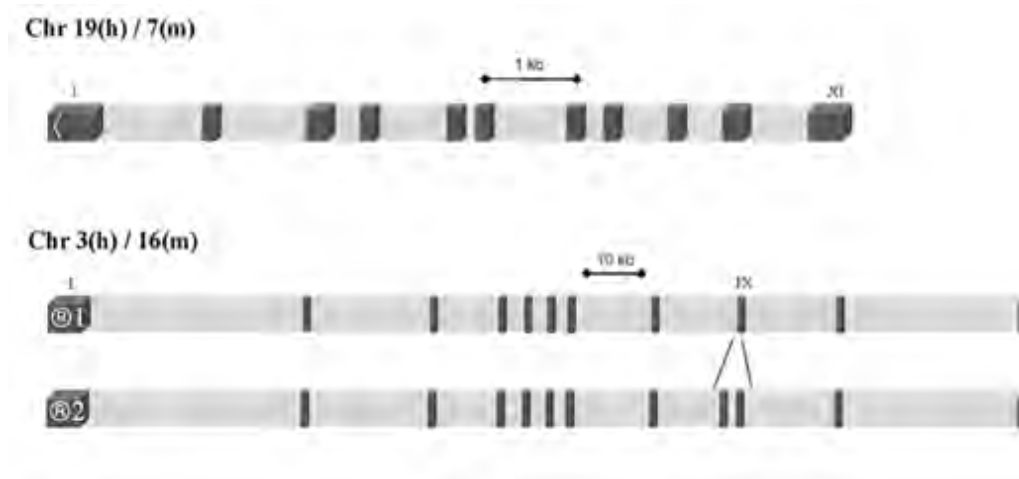
1.1 | GSK3 στα θηλαστικά

1.1.1 | Δομή των GSK3

Η GSK-3 (ATP: πρωτεϊνική φωσφοτρανσφεράση, E.C. 2.7.1.37) είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης που ταξινομείται στην ομάδα των CMCG κινασών [(Cyclin-dependent kinases (CDKs), Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), Glycogen synthase kinases (GSKs), and CDK-like kinases (CLKs)] (Kaidanovich-beilin and Woodgett 2011).

Το 1990, ο Woodgett και οι συνεργάτες του απομόνωσαν δύο cDNA από εγκέφαλο αρουραίου που κωδικοποιούσαν την GSK3 και αντιστοιχούσαν σε δύο ισοένζυμα που ονομάστηκαν GSK-3 alpha (α) και GSK-3 beta (β). Βρέθηκε ότι, κάθε μία από τις δύο ισομορφές αποτελείται από 11 εξώνια και το μοριακό του βάρος είναι 51.000 Da (483 aa στους ανθρώπους) και 47.000 Da (433 aa στους ανθρώπους), αντίστοιχα. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις GSK-3 α και β βρίσκονται στο χρωμόσωμα 7 στον ποντικό (19^ο αντίστοιχο ανθρώπινο χρωμόσωμα) και στο χρωμόσωμα 16 στον ποντικό (3^ο ανθρώπινο χρωμόσωμα) (εικόνα 1.1.1). Οι GSK-3 α και β μοιράζονται μία συνολική ομολογία αλληλουχίας της τάξεως του 85%, συμπεριλαμβανομένης 98% ταυτόσιμης αλληλουχίας αμινοξέων στην περιοχή κινάσης (Woodget, 1990). Παρά την ομοιότητα που παρουσιάζουν στις καταλυτικές περιοχές, οι GSK-3 αποκλίνουν στα N-άκρα και C-άκρα τους. Για παράδειγμα, τα δύο γονιδιακά προϊόντα παρουσιάζουν μόνο 34% ομοιότητα στα τελευταία 76 aa στο C-άκρο (Woodgett, 1990). Επιπλέον, μία μοναδική περιοχή της GSK-3 α είναι πλούσια σε γλυκίνες στο N-άκρο, (71% glycine) (Doble, B. W., 2003).

Αποτελεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι, ενώ πολλά είδη όπως τα ψάρια, τα αμφίβια και οι σαύρες διαθέτουν και τις δύο ισομορφές, τα πτηνά έχουν μόνο την ισομορφή GSK-3 β και φαίνεται ότι έχουν χάσει επιλεκτικά κατά την διάρκεια της εξέλιξης την ισομορφή GSK-3 α (Alon et al., 2011). Σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, η εναλλακτική σύνδεση μεταξύ του εξωνίου 8 και 9 της GSK-3 β οδηγεί στη δημιουργία ενός εναλλακτικού μεταγράφου, που περιέχει επιπλέον 13 αμινοξέα εντός της καταλυτικής του περιοχής (GSK3 β 2) (εικόνα 1.1.1). Τα 13 επιπρόσθετα αμινοξέα βρίσκονται μεταξύ των 303 και 304 καταλοίπων αμινοξέων και πλαισιώνονται από δύο εγγύς α-έλικες των υποτομέων κινάσης X και XI (Hanks & Hunter, 1995, Mukaietal., 2002). Το εναλλακτικό μετάγραφο GSK-3 β 2 εκφράζεται κυρίως σε νευρικούς ιστούς (Mukaietal., 2002, Wood-Kaczmaretal., 2009).



Εικόνα 1.1.1| Οι δομές ιντρονίου / εξονίου των δύο γονιδίων GSK-3 θηλαστικών. Πάνω απεικονίζεται η μορφή GSK-3 α και κάτω απεικονίζονται οι 2 εναλλακτικές μορφές της GSK-3β καθώς και η θέση που συμβαίνει το εναλλακτικό μάτισμα. (Προσαρμοσμένη από Kaidanovich-Beilin & Woodgett, 2011).

1.1.2| Ρύθμιση των GSK3 & σηματοδοτικά μονοπάτια

Η GSK3 συμμετέχει σε πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών, γεγονός που την καθιστά ελκυστική για μελέτη της ρύθμισης της και των φυσιολογικών διεργασιών που μπορεί να συμμετέχει. Η GSK-3 είναι μία κινάση, που παραμένει ενεργοποιημένη κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ηρεμίας του κυττάρου και μόνο όταν ένα εξωκυτταρικό ερέθισμα διεγείρει το κύτταρο, τότε αυτό είναι ικανό να προκαλέσει την απενεργοποίησή της. Πολύτιμο χαρακτηριστικό του ενζύμου αποτελεί η προτίμηση υποστρωμάτων που έχουν ήδη φωσφορυλιωθεί προηγουμένως από άλλες κινάσες (priming kinases). Η περιοχή δέσμευσης των ήδη φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων μέχρι και το 2001 με την ανακάλυψη τη δομής της, ήταν δύσκολο να ταυτοποιηθεί (Bax et al., 2001; Ter Haar, E. (2006). Έκτοτε, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν, τρία βασικά κατάλοιπα (αργινίνη 96, αργινίνη 180 και λυσίνη 205), τα οποία σχηματίζουν εντός της GSK3-β έναν θύλακα για την φωσφορική ομάδα του υποστρώματος. Η δέσμευση ενός ήδη φωσφορυλιωμένου υποστρώματος στη περιοχή T-loop της GSK3 φαίνεται ότι μπορεί να αντισταθμίσει την έλλειψη ενός τμήματος φωσφοθρεονίνης, που απαιτείται συνήθως σε κινάσες που παρομοιάζουν δομικά με την GSK3 (Patel and Woodgett 2017).

Μέχρι προσφάτως, η GSK3 φαίνεται να συμμετέχει:

α) στο **σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης**, το οποίο λαμβάνει χώρα όταν η ινσουλίνη συνδεθεί στον υποδοχέα της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου (Insulin Receptor) και αρχίζει ένας καταρράκτης σηματοδοτικών αντιδράσεων που θα οδηγήσουν σε φωσφορυλίωση της GSK3 από την ενεργοποιημένη AKT, την απενεργοποίησή της και άρα στην αναστολή της φωσφορυλίωσης-ενεργοποίησης του υποστρώματός της, της συνθάσης του γλυκογόνου.

β) στο **μονοπάτι σηματοδότησης της β-κατενίνης (Wnt/β-catenin)**, που φαίνεται ότι η GSK3 φωσφορυλιώνει το μικρό γραμμικό μοτίβο (Asp-Ser-Gly-Ile-His-Ser) στο N- άκρο της β-κατενίνης. Η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη ώστε η β-κατενίνη να δεσμεύεται από την λιποσίνη E3 της ουβικουϊτίνης TrCP1 (β-TrCP) και κατά αυτόν τον τρόπο, να ελέγχεται σε κυτταρικό επίπεδο η αποικοδόμησή της.

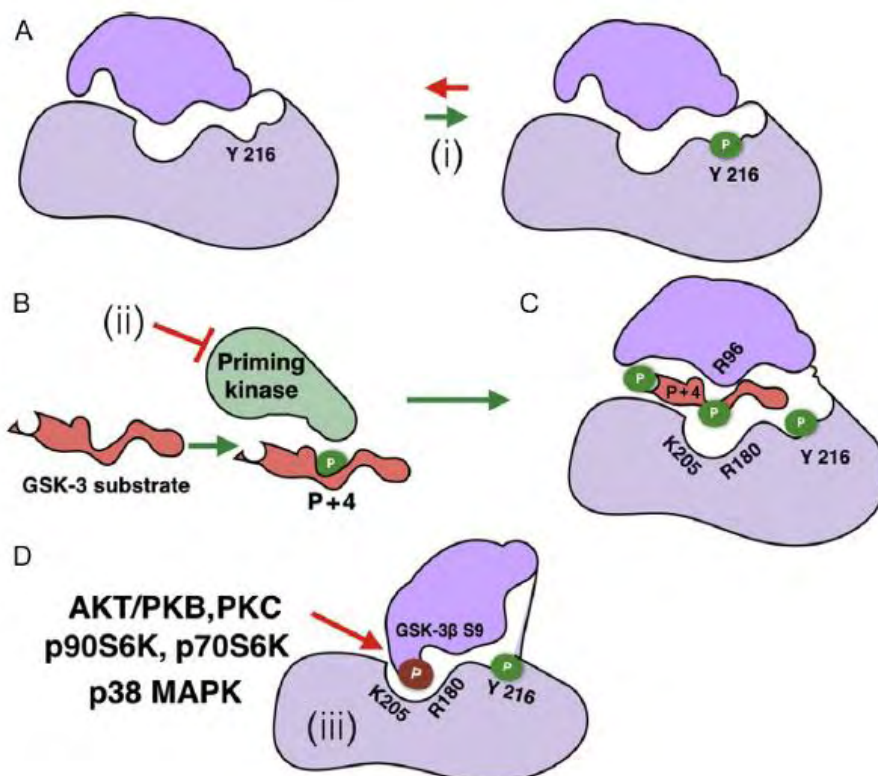
γ) στο **μονοπάτι σηματοδότησης μέσω Notch υποδοχέων**, κατά το οποίο η GSK3 έχει δειχθεί ότι φωσφορυλιώνει την ενδοκυτταρική περιοχή του υποδοχέα (NICD). Ωστόσο, μέχρι πρότινος οι μελέτες για τον ρόλο της στο συγκεκριμένο μονοπάτι παραμένουν αποσαφηνισμένες.

δ) στο **μονοπάτι σηματοδότησης Hedgehog**, στο οποίο η GSK3 συμμετέχει έμμεσα στη φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων Gliz/3 στο κυτταρόπλασμα. Μόνο όταν ένα ερέθισμα διεγείρει το κύτταρο, τότε η GSK3 παύει να φωσφορυλιώνει και έτσι οι Gliz/3 εισέρχονται στον πυρήνα και επάγουν την μεταγραφή των γονιδίων.

ε) στο **μονοπάτι σηματοδότησης του Tgf-β** (Transforming Growth Factor β), ελέγχοντας πολλές διαδικασίες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη, τη διάδοση, τη διαφοροποίηση, τη μορφογένεση και την αναγέννηση. Κύριος ρόλος της φαίνεται να είναι η φωσφορυλίωση των Smad2/3 και Smad4 μεταγραφικών παραγόντων, ρυθμίζοντας έμμεσα την υποκυτταρική τους εντόπιση και άρα την μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζονται από τους Smad μεταγραφικούς παράγοντες.

Συνεπώς, η ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχει μπορεί να περιγραφεί μέσω τεσσάρων μηχανισμών (εικόνα 1.1.2):

- (1) απενεργοποίηση της δράσης της μέσω φωσφορυλίωσης από άλλες πρωτεϊνικές κινάσες και συγκεκριμένα στη σερίνη-21 της ισομορφής GSK-3α ή στη σερίνη-9 της ισομορφής GSK-3β (εικόνα 1.1.2D). Η ινσουλίνη, οι αυξητικοί παράγοντες ακόμα και ορισμένα αμινοξέα μπορούν να απενεργοποιήσουν την δράση της GSK-3 μέσω φωσφορυλίωσης στη σερίνη 21 (GSK-3α) ή στη σερίνη 9 (GSK-3β) με τη βοήθεια της δράσης κινασών όπως AKT/PKB, p90orsk, και p70orsk (Patel and Woodgett 2017). Αυτού του είδους φωσφορυλίωσεις, που εντοπίζονται στην αμινοτελική περιοχή των GSK-3α και β, έχουν ως αποτέλεσμα τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα να δεσμεύονται στην περιοχή δέσμευσης των υποστρωμάτων υιοθετώντας το ρόλο του ψευδοϋποστρώματος, παρεμποδίζοντας έτσι τη δέσμευση ενός φυσιολογικού υποστρώματος (εικόνα 1.1.2D) (Dajani et al., 2001).
- (2) μεταβολές στην υποκυτταρική διαμερισματοποίηση των GSK-3α ή GSK-3β,
- (3) μεταβολές στη φωσφορυλίωση του καταλοίπου τυροσίνης, Tyr-279, της GSK-3α και του καταλοίπου τυροσίνης Tyr-216 της GSK-3β. Σε αντίθεση με τη φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης στις ισομορφές της GSK-3, που την απενεργοποιούν, η φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης προκαλεί την ενεργοποίησή της. Αυτό απεδείχθη με τη δημιουργία μίας μετάλλαξης, που είχε ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του συντηρημένου καταλοίπου τυροσίνης Y216 της GSK-3β από φαινυλαλανίνη, η οποία οδήγησε σε μείωση της φωσφορυλίωσης της και άρα μείωση της δραστηριότητά της (Dajani et al., 2003, Hughes et al., 1993). Η φωσφορυλίωση των GSK-3α και β στα κατάλοιπα τυροσίνης φαίνεται να επιτελείται, τουλάχιστον *in vitro*, μέσω κινασών όπως FYN2, FYN2 και PYK2 (Hartigan, Xiong, & Johnson, 2001, Lesort, Jope, & Johnson, 1999). Πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν, ωστόσο, ότι η άγριου τύπου GSK-3β, αλλά όχι η καταλυτικά ενεργή μορφή της, είναι ικανή να αυτοφωσφορυλιώνει τα κατάλοιπα τυροσίνης (Cole, Frame, & Cohen, 2004, Lochhead et al., 2006).
- (4) μέσω απενεργοποίησης των πρώιμων κινασών που δρουν στα υποστρώματα της GSK3 και φυσιολογικά φωσφορυλιώνουν (εικόνα 1.1.2D).

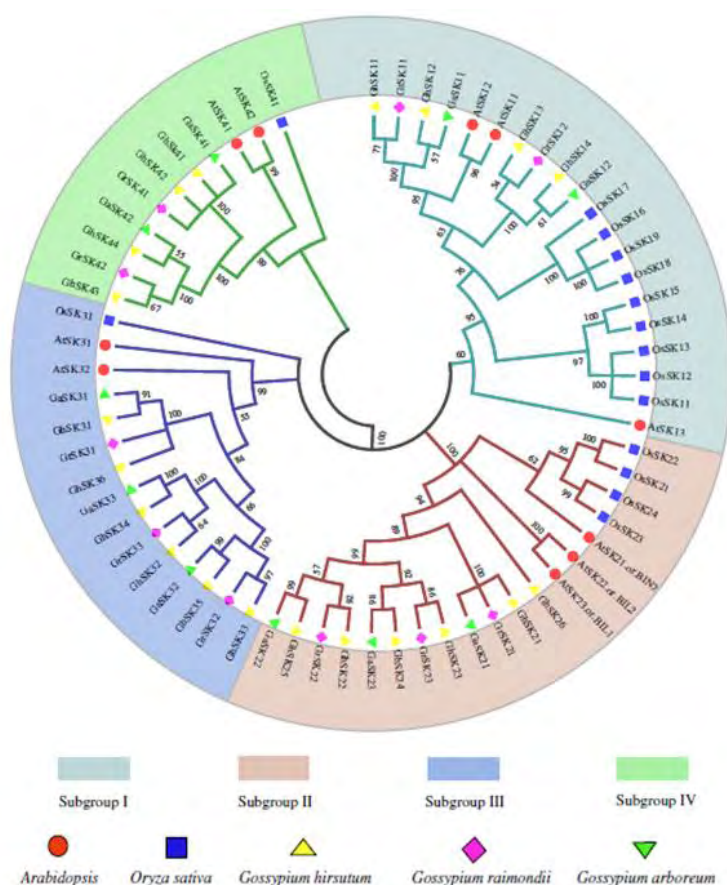


Εικόνα 1.1.2 | Μηχανισμοί δράσης, ενεργοποίησης και αδρανοποίησης της GSK3. (A) Η φωσφορυλιωμένη GSK-3β στην τυροσίνη 216, η οποία μπορεί να αυξάνει τη πιθανότητα για τη δέσμευση του υποστρώματος. (B) Η πλειοψηφία των υποστρωμάτων της GSK-3 απαιτούν μία πρώιμη φωσφορυλίωση τεσσάρων C-τελικών καταλοίπων κοντά στην περιοχή φωσφορυλίωσης από την GSK-3 (C) Η δέσμευση του φωσφορυλιωμένου καταλοίπου στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος επιτρέπει την κατάλληλη τοποθέτηση του, ώστε έπειτα να φωσφορυλιωθεί στο N-τελικό άκρο από την GSK-3. (D) Η φωσφορυλίωση στην σερίνη 9 της GSK-3β οδηγεί στην αναδίπλωση της και δημιουργεί ένα ψευδοϋπόστρωμα το οποίο εμποδίζει ένα φυσιολογικό υπόστρωμα να συνδεθεί στην περιοχή δέσμευσης υποστρώματος της GSK3. Τα κόκκινα βέλη υποδηλώνουν τους μηχανισμούς που μπορεί να αναστείλουν τη δράση της GSK3: (i) η παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη 216 μπορεί να αποτρέψει την αποτελεσματική πρόσβαση των υποστρωμάτων στη θέση δέσμευσης υποστρώματος GSK3, (ii) απενεργοποίηση των πρώιμων κινασών που δρουν στα υποστρώματα της GSK3 που φυσιολογικά φωσφορυλιώνουν και άρα να αποτραπεί η φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων από την GSK3, και (iii) κινάσες όπως το AKT / PKB μπορούν να φωσφορυλιώσουν την σερίνη 9 στην GSK-3β και τη σερίνη 21 στην GSK-3α. Τότε η GSK-3 αναγνωρίζει πολλά από τα υποστρώματά της μέσω μιας πρώιμης φωσφορυλίωσης στο μοτίβο S/TXXXpS/T. Η πρώιμη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων, απαιτεί τη φωσφορυλίωση μίας σειράς καταλοίπων σερίνης /θρεονίνης (P+4) από τη θέση φωσφορυλίωσης της GSK3. Οι πρώιμες κινάσες ποικίλουν για κάθε υπόστρωμα και λαμβάνουν υπόψη την ικανότητα της GSK-3 να ρυθμίζει πολλά πλειοτροπικά μονοπάτια ταυτόχρονα. (προσαρμοσμένη από Patel et. al., 2017)

1.2 | Οι SKs στα φυτά

1.2.1 | Λειτουργίες των SKs στα φυτά

Οι GLYCOGEN SYNTHASE KINASE (GSKs), όπως έχει ήδη αναφερθεί, αντιπροσωπεύουν μία εξαιρετικά συντηρημένη ομάδα πρωτεϊνών που βρίσκονται σε όλους τους ευκαρυώτες. Γονίδια που κωδικοποιούν για κινάσες έχουν βρεθεί και σε γονιδιώματα φυτών. Σε αντίθεση με τις ζωικές κινάσες, οι κινάσες τύπου σερίνης/θρεονίνης των φυτών κωδικοποιούνται από οικογένειες πολλών γονιδίων (multigene families) όπως έχει αποδειχθεί από τον Yoo και τους συνεργάτες του το 2006 για το *A. thaliana* (10 μέλη αυτής της οικογένειας (*AtSK s*)) και για το ρύζι (9 (*OsSKs*)). Αυτό φάνηκε και σε μία πρόσφατη φυλογενετική ανάλυση που κατηγοριοποίησε τις GSK3 του *Arabidopsis*, του ριζιού, και τριών ειδών βαμβακιού σε 4 κλάδους (εικόνα 1.2.1) (Wang et al., 2018).



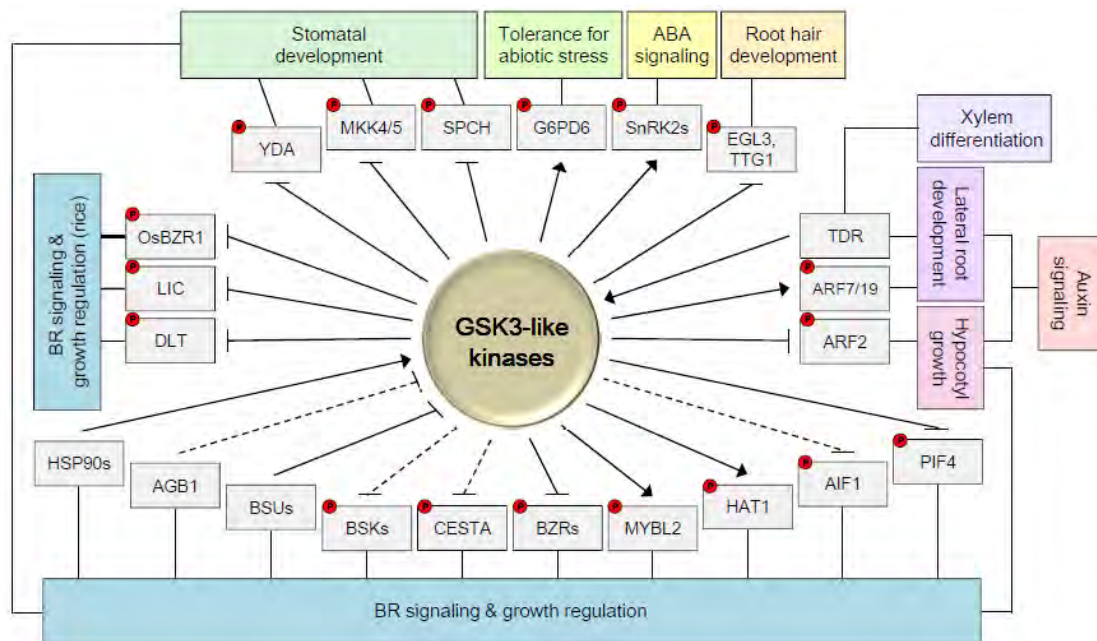
Εικόνα 1.2.1| Φυλογενετική ανάλυση των GSK3 πρωτεϊνών στο *Arabidopsis*, το ρύζι, και σε 3 διαφορετικά ήδη βαμβακιού. Οι 10 *AtSKs*, 15 *OsSKs*, 20 *GhSKs*, 10 *GaSKs*, and 10 *GtSKs* κατηγοριοποιημένες σε 4 κλάδους (προσαρμοσμένη από το Wang et al., 2018).

Όλες οι φυτικές κινάσες που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι στιγμής, διατηρούν συντηρημένη την λειτουργική περιοχή της κινάσης, διαφέρουν όμως αρκετά μεταξύ της N-τελικής και C-τελικής τους περιοχή (Jonak & Hirt, 2002). Στο *A. thaliana* η καρβοξυτελική περιοχή των *AtSKs* διατηρείται συντηρημένη και επηρεάζει σημαντικά την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα. Αντίθετα η αμινοτελική τους περιοχή συνήθως διαφέρει, και επηρεάζει την υποκυτταρική τους τοποθέτηση (Kim et al., 2009). Επίσης, εμφανίζουν αρκετά συντηρημένη τη φωσφορυλίωση της Tyr216 της GSK3β των θηλαστικών (Kaidanovich-Beilin & Woodgett, 2011), καθώς και αρκετά συντηρημένα

εμφανίζονται στις αντίστοιχες θέσεις τα αμινοξικά κατάλοιπα που ευθύνονται για την πρόσδεση του ενεργοποιημένου (από πρώιμες κινάσες) υποστρώματος (Arg94, Arg180, και Lys205 στην ανθρώπινη GSK3β).

Στον αντίποδα, μελέτες έχουν δείξει διαφορές μεταξύ των φυτικών και των ζωικών κινασών υποδεικνύοντας ένα διαφορετικό τρόπο ρύθμισης της ενεργότητας. Έχει αποδειχθεί ότι δεν απαιτείται πρώιμη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων τους, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως για τις ζωικές, αλλά και ούτε η πρόσδεσή τους σε πρωτεΐνες ικρίωματα (He *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2002). Ωστόσο αυτό δεν αναιρεί το γεγονός ότι οι GSK3-like πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες ικρίωματα όπως έχει αποδειχθεί στο *Arabidopsis* για την AGB1 (ARABIDOPSIS G protein β subunit) ότι αλληλεπιδρά με την AtSK21/BIN2 χωρίς να την φωσφορυλιώνει υποδικνύοντας, τον πιθανό ρόλο της ως πρωτεΐνη ικρίωμα που ρυθμίζει την ενεργότητά της AtSK21/BIN2. Παρόλα αυτά, η φυσιολογική σημασία της δέσμευσης της AGB1 με την AtSK21/BIN2 αναμένεται να διερευνηθεί (Youn & Kim 2014). Έχει φανεί επίσης, ότι οι φυτικές SKs δεν διατηρούν συντηρημένη την Ser9/21 στο N-τελικό τους άκρο, είδος φωσφορυλίωσης που αναστέλλει τη δράση των GSK3 των θηλαστικών (Forde & Dale, 2007).

Οι δράσεις των φυτικών SKs αφορούν πλήθος φυτικών λειτουργιών όπως την ανάπτυξη και τον σχηματισμό της ρίζας και του αγγειακού συστήματος, την ανάπτυξη των ανθέων και των στομάτων, και τη συμμετοχή στις αποκρίσεις του φυτού (σηματοδότηση μέσω αυξίνης, βρασινοστεροειδών, αμπισικού οξέος), σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως το βιοτικό και αβιοτικό στρες (Youn & Kim, 2015). Σε αντίθεση με τις GSK3 των ζωικών οργανισμών για τα φυτά έχει περιγραφεί ο ρόλος τους τόσο ως αρνητικοί αλλά και ως θετικοί ρυθμιστές της σηματοδότησης (εικόνα 1.2.2).



Εικόνα 1.2.2 | Συνοπτική απεικόνιση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος και ο ρόλος των GSK3-like κινασών στο *Arabidopsis* και το ρύζι. Διακρίνεται ο διττός ρόλος των πρωτεϊνών GSK3 τόσο ως αρνητικός όσο και ως θετικός ρυθμιστής των μορίων στόχων άρα και των επαγόμενων μονοπατιών που αυτοί ρυθμίζουν. Τα συνεχή βέλη υποδηλώνουν την ενεργοποίηση του υποστρώματος, ενώ οι συνεχείς παύλες την αναστολή. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν υποθετικές/μη επιβεβαιωμένες *in vivo* αλληλεπιδράσεις. Τα υποστρώματα που φωσφορυλιώνονται από τις SKs δείχνονται με ένα κόκκινο κύκλο που περιέχει το γράμμα P (προσαρμοσμένο από Youn & Kim, 2015).

1.2.2 | Σηματοδότηση BR - Απόκριση σε βιοτικούς & αβιοτικούς παράγοντες

Οι περισσότερες μελέτες μέχρι πρότινος για τον ρόλο των GSK3 στα φυτά αφορούν το μονοπάτι μεταγωγής σήματος των βρασσινοστεροειδών και την απόκριση βιοτικού και αβιοτικού στρες.

Όσο αφορά το μονοπάτι των βρασσινοστεροειδών έχει μελετηθεί αρκετά στο *Arabidopsis*. Τα BRs αναγνωρίζονται από τη μεμβρανική κινάση υποδοχέα την BR-INSENSITIVE 1 (BR1). Σε αυτή τη μεταγωγή σήματος συμμετέχει η πρώτη φυτική SK που χαρακτηρίστηκε λειτουργικά, η BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2). Οι κυριότερες μεταλλάξεις στο BIN2 καταλήγουν σε φυτά νάνους, που δεν είναι ευαίσθητα στα βρασσινοστεροειδή. Το ενεργό κέντρο κινάσης της BIN2 παρουσιάζει 70% ομοιότητα με τη ζωική GSK3β (Li & Nam, 2002). Οι σημειακές μεταλλάξεις κέρδους στο BIN2 και η υπερέκφραση του BIN2 προκαλούν τον ίδιο φαινότυπο, μη ευαίσθητα στα BR, επιβεβαιώνοντας έτσι, ότι η BIN2 δρα ως αναστολέας της σηματοδότησης των BR (Li, et al., 2001, Pe, Ponce, & Micol L, 2002). Η BIN2 φωσφορυλιώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες BZR1/BES1 σε πολλά υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης, με τρόπο που θυμίζει το ρόλο της GSK3 στα μονοπάτια σηματοδότησης Wnt και Hedgehog (Patel et al., 2017). Ο μηχανισμός με τον οποίο το σήμα στο μονοπάτι ενεργοποίησης των BRs μεταδίδεται από την μεμβράνη στην BIN2 ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα όπου φάνηκε ότι κινάσες αποφωσφορυλιώνουν το κατάλοιπο τυροσίνης 200 και αναστέλλουν τη δράση κινάσης (Jaillais, Y. et al., 2011). Ακόμα η BIN2 πρωτεΐνη συνδέει το μονοπάτι των BRs με το μονοπάτι απόκρισης στην αυξίνη καθώς φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα ARF, ο οποίος φυσιολογικά δεσμεύεται ανοδικά των γονιδίων απόκρισης στην αυξίνη και καταστέλλει την μεταγραφή του, ενώ ταυτόχρονα το αμπισικό οξύ συμμετέχει και αυτό στο μονοπάτι των βρασσινοστεροειδών αναστέλλοντάς το.

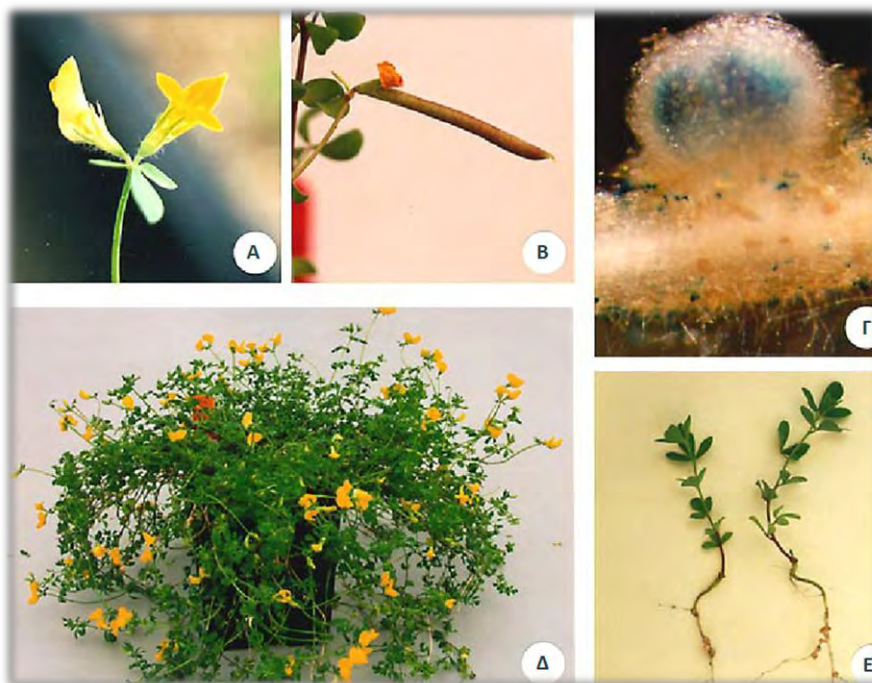
Όσο αφορά τις μελέτες του ρόλου τους στο αβιοτικό και το βιοτικό στρες έχει φανεί:

- ότι πρωτεΐνη WIG (Wound Induced GSK3) του *Medicago sativa*, επάγεται ειδικά μετά από τραυματισμό των φύλλων του φυτού (Jonak et al., 2000).
- σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας και οσμωτικής πίεσης συμβαίνει αύξηση ποσοτήτων μεταγράφων κάποιων μελών των AtSKs για να ενισχυθεί η ανοχή των φυτών (Chartier et al., 2002). Για παράδειγμα η AtSK11 ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης την αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), ένα ένζυμο που επηρεάζει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, οδηγώντας σε ανοχή του *Arabidopsis* σε συνθήκες υψηλής αλατότητας.
- στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος MAP κινάσων που επάγονται από παθογόνα (βιοτικό στρες), ότι η MSK1 του *M. sativa* παρουσιάζει μείωση των επιπέδων και της ενεργότητάς της όταν το φυτό εκτεθεί σε παράγοντες που επάγουν τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών όπως το βακτηριακό ένζυμο cellulose (Wrzaczek et al., 2007). Επιπλέον πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η CaSK23 που είναι μία GSK3-like πρωτεΐνη του φυτού *Capsicum annuum*, έπειτα από μόλυνση με το παθογόνο μειώνεται μεταγραφικά. Η αναστολή της ενεργότητάς της CaSK23 ενισχύει την άμυνα του φυτού καθώς όταν είναι ενεργή μπλοκάρει τα μονοπάτια σηματοδότησης στο σαλικυλικό (SA) και γιασμονικό οξύ (JA) (Qiu et al. 2018).

1.3 | *Lotus japonicus* & SKs

1.3.1 | Το φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus* και Φυματιογένεση

Το φυτό *Lotus japonicus* [Βασίλειο: *Plantae*, Order: *Fabales* (*Leguminosae*) Family: *Fabaceae*, Subfamily: *Faboideae*, Tribe: *Loteae*, Genus: *Lotus*] προτάθηκε ως οργανισμός μοντέλο λόγω ορισμένων χαρακτηριστικών που το καθιστούν πολύ επιδεκτικό στην έρευνα στον τομέα των ψυχανθών. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι το σχετικά μικρό του διπλοειδές γονιδίωμα (470 MB, οργανωμένο σε 6 απλοειδή χρωμοσώματα), η μεγάλη σποροπαραγωγή, ο μικρός χρόνος γενιάς (περίπου 3 μήνες), η ικανότητα αυτογονιμοποίησης, η εύκολη επικονίαση και η ευκολία της καλλιέργειας του φυτού σε ελεγχόμενες συνθήκες. Μορφολογικά, είναι μικρά φυτά με μεγάλα και άφθονα άνθη, αναπτύσσουν ευθεία φασόλια με δύο λοβούς και οι σπόροι του διατάσσονται κατά μήκος ενός γραμμικού άξονα (Stougaard J., 2005).



Εικόνα 1.3 | Στάδια ανάπτυξης του *Lotus japonicus*. Α) ώριμο άνθος στο Gifu (περίπου 8 έως 12 mm σε μήκος) Β) ώριμος λοβός σπόρων που περιέχει περίπου 10 σπόρους (μήκους περίπου 3 cm) Γ) χρωματισμένο, φυμάτιο και τμήμα ρίζας ηλικίας 21 ημερών μετά τον εμβολιασμό με στέλεχος QJ101 *Rhizobium loti* που περιείχε μία κασέτα με το γονίδιο *gus* για απεικόνιση αποικισμού και μόλυνσης. Το φυμάτιο έχει διάμετρο περίπου 1 mm και εμφανίζει εκτεταμένο μπλε χρωματισμό στο εσωτερικό του που προκαλείται από την έκφραση του GUS Δ) ώριμο φυτό που παρουσιάζει άφθονη ανθοφορία. Ε) φυτά 3 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. (προσαρμοσμένη από Qunyi Jiang)

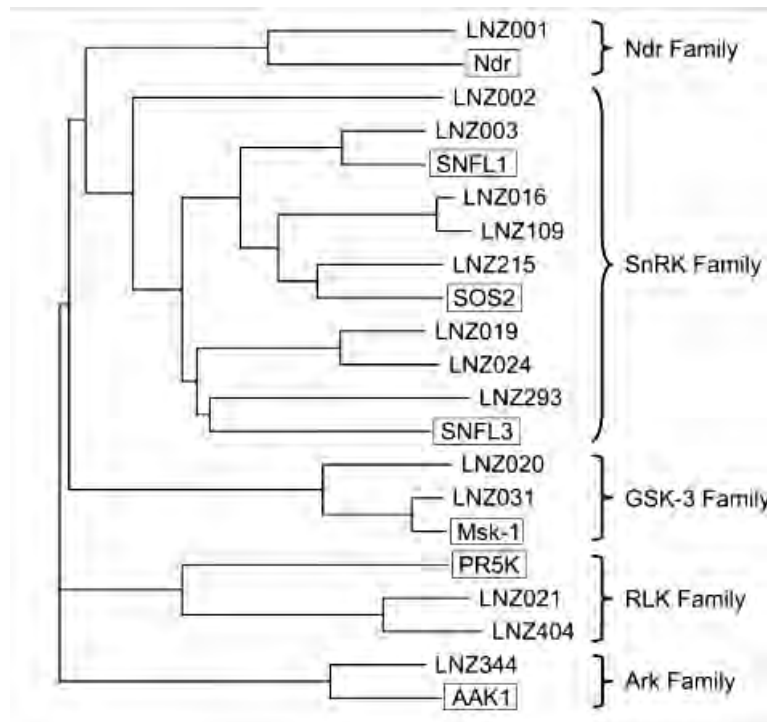
Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό αυτής της τάξης είναι η δημιουργία ειδικών συμβιωτικών δομών, των φυματίων. Το φυμάτιο είναι ένα πολύ εξειδικευμένο όργανο. Το φυτό *Lotus japonicus*, δημιουργεί στη ριζόσφαιρα καθορισμένα μορφολογικά φυμάτια που είναι σφαιρικά και χαρακτηρίζονται από συνεχείς κυτταρικές διαιρέσεις καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Ο συνηθέστερος τύπος βακτηρίων που συμβιώνουν με τα ψυχανθή είναι τα αζωτεδεμευτικά βακτήρια των γένων *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, και *Sinorhizobium*, που ονομάζονται ριζόβια (Martinez-Romero & Caballero-Mellado, 1996). Τα βακτήρια, έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το άζωτο της ατμόσφαιρας σε αμμώνιο. Οι

περισσότεροι από αυτούς τους αζωτοδεσμευτικούς, προκαρυωτικούς οργανισμούς ζουν στο έδαφος, όντας σε γενικές γραμμές ανεξάρτητοι από άλλους οργανισμούς. Την ικανότητα της αζωτοδέσμευσης των συγκεκριμένων βακτηρίων εκμεταλλεύονται τα ψυχανθή, που έχει ως αποτέλεσμα, αφενός την άμεση προσφορά δεσμευμένου αζώτου στο ψυχανθές (φυτό-ξενιστής), και αφετέρου την παραλαβή θρεπτικών στοιχείων και υδατανθράκων από τους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς (Franchete et al., 2009). Αυτή η συμβιωτική σχέση επιτρέπει των εμπλουτισμό των εδαφών σε νιτρικά και υποκαθιστά τα λιπάσματα αζώτου, επιφέροντας τόσο οικονομικά όσο και περιβαλλοντικά οφέλη (λόγω μειωμένης ρύπανσης εδαφών με άζωτο). Έτσι η συμβιωτική σχέση των ψυχανθών παίζει κεντρικό ρόλο στη βιώσιμη γεωργία, λόγω του συμβιωτικού αζώτου, η οποία ενέχει περίπου 40 εκατομμύρια τόνους αζώτου σε γεωργικά συστήματα κάθε χρόνο (Herridge et al., 2008).

1.3.2 | Μηχανισμός αυτορρύθμισης φυματιογένεσης (AON) και LSKs

Η φυματιογένεση, είναι μία ενεργειακά πλούσια διαδικασία κατά τη οποία στρατολογούνται πλήθος σηματοδοτικών μορίων. Σημαντικό χαρακτηριστικό της είναι ο συντονισμένος χωροχρονικός έλεγχος όλων αυτών των μεταγωγικών αντιδράσεων που την χαρακτηρίζουν από την στιγμή της μόλυνσης από τα συμβιωτικά βακτήρια μέχρι και την τελική δημιουργία των ώριμων φυματίων. Η λειτουργία του συντονισμού είναι αναγκαία ώστε να αποφευχθεί μία περιττή εξάντληση ενεργειακών πόρων και μία πιθανή μεταβολική ανισορροπία, ως αποτέλεσμα της ανεξέλεγκτης χρήσης του φωτοσυνθετικού άνθρακα για την αφομοίωση του αζώτου πέραν των αναγκαίων απαιτήσεων του φυτού. Ο έλεγχος του αριθμού των φυματίων ελέγχεται από έναν μηχανισμό αυτορρύθμισης του αριθμού των φυματίων (Autoregulation Of Nodulation, AON). Μέσω του μηχανισμού της αυτορρύθμισης τα παλαιότερα φυμάτια καταστέλλουν τη δημιουργία νέων φυματίων (Caetano-Anolles & Gresshoff 1991).

Μέχρι και το 2005 καμία πρωτεΐνη με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης δεν είχε χαρακτηριστεί στο *L. japonicus*. Η απομόνωση όμως 15 cDNA κλώνων από φυμάτια του *L. japonicus*, οι οποίοι κωδικοποιούσαν για πρωτεΐνες με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης οδήγησε στην φυλογενετική τους ανάλυση, η οποία κατέταξε τις 15 πιθανές κινάσες σε 5 διαφορετικές οικογένειες κινασών (**SnRK family, GSK-3 family, Ndr kinase family, Ark family, and receptor kinase family**) με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης (εικόνα 1.3.2.). Από τις 15 πιθανές κινάσες δύο, οι κλώνοι LNZo20 και LNZo31, φάνηκε ότι ανήκουν στην οικογένεια κινασών GSK3/SHAGGY-like. Ο κλώνος LNZo20 παρουσιάζει ομοιότητα 76% με την AtSKθ κινάση του *A. thaliana* και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με 467 aa ενώ ο κλώνος LNZo31 που παρουσιάζει 89% ομοιότητα με τον κλώνο LNZo20 φάνηκε επίσης να έχει και 78% ομοιότητα με την AtSKα κινάση του *A. thaliana*. Στην παρούσα εργασία τα παραπάνω γονίδια μετονομάστηκαν *Lotus SHAGGY-Like 1 Kinase (LSK1)* (κλώνος LNZo20) και *LSK2* (κλώνος LNZo31), σε συμφωνία με τον τρόπο ονομασίας που έχει επικρατήσει για τις SHAGGY/GSK3 - like κινάσες στο *A. thaliana* (Jonak & Hirt, 2002).



Εικόνα 1.3.2 | Φυλογενετική ανάλυση, των υποτιθέμενων κινασών Ser/Thr βάσει της αμινοξικής τους αλληλουχίας με βάση την αλληλουχία των cDNA κλώνων που απομονώθηκαν από τους (Kameshita et al, 2004). Σε κουτί παρουσιάζονται οι συγγενικές κινάσες από άλλα είδη φυτών (προσαρμοσμένο από Kameshita et al, 2004).

Η ανακάλυψη των LSKs οδήγησε στη μελέτη του ρόλου τους στη διαδικασία της φυματιογένεσης. Συγκεκριμένα, η LSK1 έχει μελετηθεί εκτενέστερα γιατί φάνηκε ότι η ποσοτικοποιημένη έκφραση μέσω ημιποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR), αυξάνεται σημαντικά 1 ώρα μετά τον εμβολιασμό των ριζών του *L. japonicus* με το συμβιωτικό του βακτήριο *Mesorhizobium loti*, αλλά μειώνεται μετά από 48 ώρες, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης. Επιπρόσθετα πειράματα υπερέκφρασης της LSK1 έδειξαν οριακή αλλαγή στον αριθμό των ώριμων φυματίων σε σχέση με τα control φυτά, ενώ παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με τον μηχανισμό αυτορρύθμισης του αριθμού των φυματίων (AON), όπως το γονίδιο *NIN* (Nodule Inception) και τα CLE -RS1/2 πεπτιδία (Clavata3 - like signal peptides implicated in legume AON), σε RNA-i knockdown LSK1 φυτά. Με αυτόν τρόπο φαίνεται ότι η LSK1 προκαλεί καταστολή της φυματιογένεσης μέσω AON (Garagounis et al. 2018).

Στο μηχανισμό του AON, φαίνεται να εμπλέκονται και άλλα σηματοδοτικά μόρια πέρα των ορμονών, των μεταγραφικών παραγόντων ή των ήδη γνωστών πρωτεϊνών. Προσφάτως αποδείχτηκε ότι microRNAs μεταναστεύουν από τους βλαστούς στις ρίζες (shoot-to-root translocation) στο φυτό *L. japonicus* με έναν μηχανισμό που είναι άμεσα συνδεδεμένος με τη μετα-μεταγραφική ρύθμιση του καταστολέα *TML* (Too Much Love). Το miR2111 φαίνεται να λειτουργεί ως ενεργοποιητής της συμβίωσης καθοδικά της ενεργοποίησης του μονοπατιού της κυτοκινίνης στις ρίζες και του παράγοντα HAR1 που συμμετέχει στην διαδικασία του AON (Tsikou et. al., 2018).

1.4 | Protein- Protein Interactions (PPIs)

Τα κυτταρικά σηματοδοτικά δίκτυα επιτρέπουν στα φυτά να ανταποκρίνονται δυναμικά στις περιβαλλοντικές αλλαγές προσαρμόζοντας τις φυσιολογικές, αναπτυξιακές και βιοχημικές τους διαδικασίες. Στην κυτταρική σηματοδότηση σπουδαίο ρόλο διαδραματίζουν και τα ένζυμα που συμμετέχουν στους μηχανισμούς φωσφορυλίωσης-αποφωσφορυλίωσης. Οι πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες αποτελούν το 5% των γονιδίων του *Arabidopsis* (Tchieu et al., 2003). Σε προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί ο ρόλος τους ως κρίσιμα μόρια πολλαπλών μονοπατιών σηματοδότησης, όπως η ανθεκτικότητα στο ψύχος, στη ξηρασία, στην προσαρμογή της μεταβολής της αλατότητας του εδάφους (Chinnusamy et al., 2004, Teige et al., 2004), στην αναγνώριση παθογόνων, ως αμυντικός μηχανισμός (Nurnberger et al., 2004, Rowland et al., 2005), στην σηματοδότηση του αμπισισικού οξέος (ABA) και του αιθυλενίου (Fan et al., 2004, Etheridge et al., 2005), στην αντίληψη του φωτός (Chen et al., 2004), στη ρύθμιση του μεταβολισμού του άνθρακα (Rolland and Sheen, 2005) και στη ρύθμιση κυτταρικού κύκλου (Koroleva et al., 2004). Βασικό χαρακτηριστικό όλων αυτών των μεταγωγικών διαδικασιών αποτελούν οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Protein-Protein Interactions) που μεταξύ άλλων καθορίζουν φυσιολογικές, παθολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες και αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο ερευνητικής μελέτης (Rivas and Fontanillo 2010).

Μέχρι και πριν την δεκαετία του 1980, οι PPIs μελετήθηκαν ως επί το πλείστον χρησιμοποιώντας βιοφυσικές και βιοχημικές διαδικασίες, όπως η χρωματογραφία συγγενείας πρωτεϊνών και η συν-κλασματοποίηση (Klotz et al., 1970, Frieden, 1971, Phizicky and Fields, 1995). Στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980, βασικές τεχνικές ανοσοχημείας, όπως η συν-ανοσοκατακρήμνιση (CoIP), διευκόλυναν την έρευνα των PPIs (Briones and Mao, 1982). Παρά την αναπτυσσόμενη εξέλιξη στην έρευνα με τη βοήθεια των ήδη υπαρχόντων τεχνικών, η πολυπλοκότητα της ζωής από τα σπονδυλωτά στα φυτά έθεσε την ανάγκη μελέτης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε ένα πιο απλοποιημένο σύστημα. Το 1989, οι Fields & Song και οι συνεργάτες τους ανέπτυξαν ένα νέο, καινοτόμο, σύστημα-μοντέλο με τη βοήθεια της χρήσης του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, το οποίο αναφέρεται ως ανάλυση δύο υβριδίων ζυμομύκητα (Yeast Two-Hybrid System).

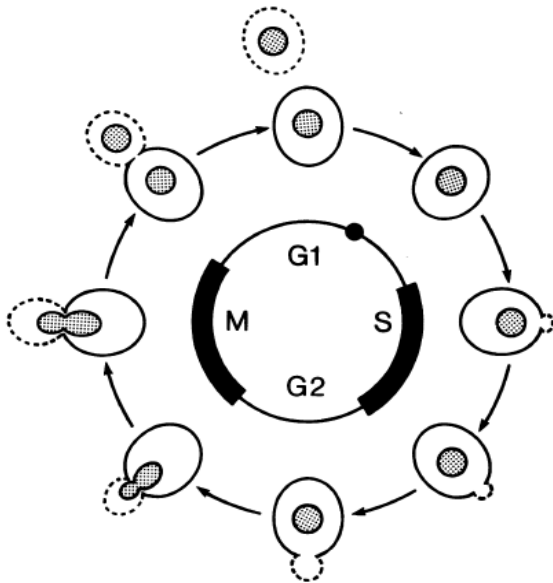
Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες χαρτογραφήσεις αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών έχουν γίνει με γενετική διαλογή σε ζυμομύκητες, δηλαδή χρησιμοποιώντας την ανάλυση δύο υβριδίων ζυμομύκητα (Y2H) (Fields and Song, 1989). Παρόλο που το Y2H σχεδιάστηκε ώστε να διερευνώνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών που προέρχονται από ζυμομύκητα, το σύστημα υιοθετήθηκε γρήγορα από ομάδες άλλων πεδίων που κατάφεραν να εξετάσουν αλληλεπιδράσεις σε αυτό το ετερόλογο σύστημα. Ένας από τους πρώτους στον τομέα των φυτών που εφάρμοσε το σύστημα Y2H, ήταν ο Gregory B. Martins, ο οποίος χρησιμοποίησε την τεχνική Y2H για να εξετάσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της αμυντικής πρωτεΐνης (resistance protein) Pto και των υποψήφιων αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών στο φυτό *Lycopersicon esculentum*, με την κοινή εμπορική ονομασία τομάτα (Zhou et al., 1995). Μέσα σε μία δεκαετία, ένα επιπλέον εγχείρημα από τους Ehlert και Weltmeier, με βάση την αρχή της μεθόδου του συστήματος Y2H, ανέπτυξε την ανάλυση δύο υβριδίων πρωτοπλάστη στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis* (protoplast two-hybrid system) (Ehlert et al., 2006).

1.4.1 | Η αναπαραγωγή του *Saccharomyces cerevisiae*

Η τεχνική του Υ2Η όπως διαμορφώθηκε από τους Fields και Song το 1989 εκμεταλλεύεται τον εγγενή τρόπο αναπαραγωγής του ζυμομύκητα. Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να αναπαραχθεί είτε αγενώς με εκβλάστηση (εικόνα 1.4.11) είτε εγγενώς έπειτα από σύζευξη/ yeast mating (Herskowitz I., 1988) (εικόνα 1.4.12).

- Αγενής αναπαραγωγή

Η παροχή των απαραίτητων συστατικών στα κύτταρα του ζυμομύκητα δημιουργεί υπό φυσιολογικές συνθήκες τον διπλασιασμό των κυττάρων κάθε ενενήντα λεπτά. Κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής του, ο μύκητας επιτελεί μιτωτική διαίρεση με αποτέλεσμα τον διπλασιασμό των 16 χρωμοσωμάτων του μητρικού απλοειδούς κυττάρου. Αποτέλεσμα της μιτωτικής διαίρεσης του κυττάρου είναι, αφενός η εκβλάστηση και αφετέρου στο περής αυτής της διαδικασίας η δημιουργία ενός νέου θυγατρικού απλοειδούς κυττάρου που θα φέρει τα 16 κληρονομήσιμα χρωμοσώματα (εικόνα 1.4.11). Το θυγατρικό κύτταρο που παράγεται είναι μικρότερο σε μέγεθος από το μητρικό κύτταρο αλλά αυτούσιο σε γενετική βάση με το μητρικό (Herskowitz I., 1988).

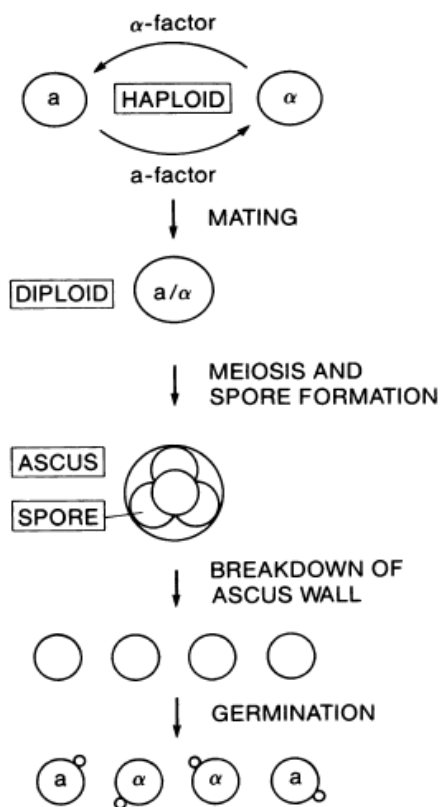


Εικόνα 1.4.11 | Μιτωτικός κυτταρικός κύκλος *S. cerevisiae*. Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου σχεδιασμένες κατά προσέγγιση ως προς το μήκος τους. Η σκιασμένη περιοχή αντιπροσωπεύει τον πυρήνα του κυττάρου. Απεικονίζονται α) η φάση S, που γίνεται η σύνθεση DNA, β) η φάση M, μίτωσης (πυρηνική διαίρεση) (προσαρμοσμένη από Herskowitz I., 1988).

Τα κύτταρα του ζυμομύκητα διακόπτουν τον πολλαπλασιασμό τους όταν βρίσκονται υπό την πίεση ορισμένων περιβαλλοντικών συνθηκών. Παραδείγματος χάριν, αν εξαντληθούν θρεπτικά συστατικά τότε ο πολλαπλασιασμός τους “παγώνει” στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου (εικόνα 1.4.11), αλλά είναι ικανά να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους όταν στο θρεπτικό μέσο γίνουν διαθέσιμα ξανά όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Όμως η διακοπή πολλαπλασιασμού μπορεί να γίνει και λόγω ενός διαφορετικού περιβαλλοντικού παράγοντα, που είναι η παρουσία ενός άλλου κυττάρου ζυμομύκητα στο ίδιο περιβάλλον με ένα ήδη υπάρχον. Το συγκεκριμένο γεγονός σημαίνει την έναρξη της εγγενούς αναπαραγωγής η οποία συμβαίνει μόνο όταν απλοειδή κύτταρα διαφορετικού τύπου σύζευξης βρεθούν κοντά το ένα στο άλλο. Στη συγκεκριμένη διαδικασία καθένα από τα δύο αυτά κύτταρα παροδικά συγκρατεί τον κυτταρικό κύκλο του άλλου στη φάση G1 και τότε υποβάλλονται σε σύζευξη /yeast mating (εικόνα 1.4.12).

- Εγγενής αναπαραγωγή

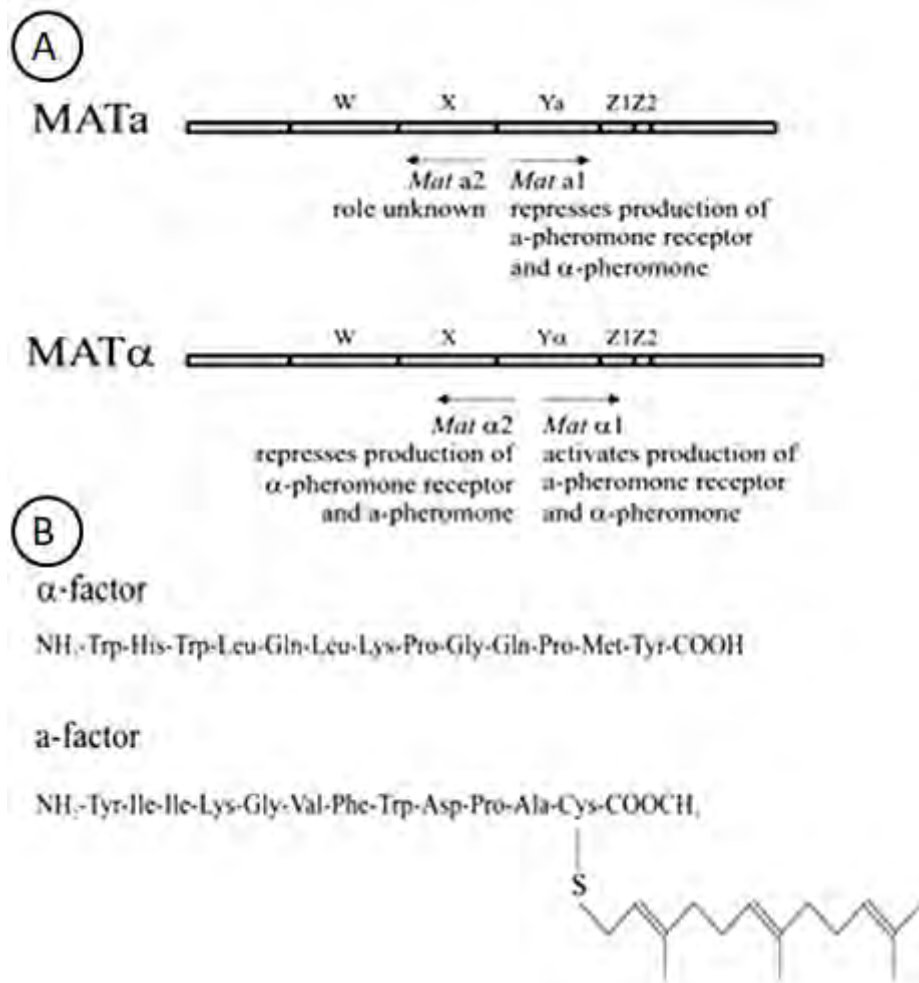
Τα απλοειδή κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae* εμφανίζουν δύο κυτταρικούς τύπους που προορίζονται για σύζευξη, τον τύπο a και τον τύπο α (alpha). Μόνο όταν δύο κύτταρα διαφορετικού τύπου σύζευξης, δηλαδή ένα κύτταρο μύκητα τύπου α και ένα κύτταρο μύκητα τύπου a, συντηχθούν (πλασμογαμία), ακολουθεί και η φάση της καρυογαμίας (σύντηξη πυρηνών). Αποτέλεσμα της σύντηξης, είναι η δημιουργία ενός θυγατρικού κυττάρου που αποτελείται από έναν διπλοειδή πυρήνα. Οι περισσότεροι φυσικοί πληθυσμοί ζυμομυκήτων είναι διπλοειδείς, επειδή τα απλοειδή μειωτικά προϊόντα συζευγνύονται ενώ είναι ακόμη κοντά μεταξύ τους αμέσως μετά την ολοκλήρωση της μείωσης. Τα διπλοειδή κύτταρα αναπαράγονται φυσικά με μίτωση και εκβλαστάνουν μέχρις ότου συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες (έλλειψη αζώτου και υδατανθράκων) οδηγήσουν στη παραγωγή σποριών. Όταν αυτό συμβεί, δημιουργείται ένα μητρικό κύτταρο, ο ασκός. Η εκβλάστηση του ασκόσπορου αποκαθιστά την απλοειδή φάση (Moore & Novak Frazer, 2002) (εικόνα 1.4.12).



Εικόνα 1.4.12 | Μεταβάσεις στον κύκλο ζωής του *S. cerevisiae*. Και οι τρεις κυτταρικοί τύποι *S. cerevisiae* (α, α και a/α) είναι ικανοί να υποστούν μιτωτική κυτταρική διαίρεση. Στο διάγραμμα απεικονίζονται οι μεταβάσεις πλοειδίας που εμφανίζονται στον κύκλο ζωής: η σύζευξη των απλοειδών κυττάρων μύκητα αποδίδει ένα διπλοειδές και η μείωση ενός διπλοειδούς αποδίδει απλοειδή κύτταρα. Τα κύτταρα a / α παράγουν έναν ασκό, ο οποίος περιέχει τα τέσσερα απλοειδή προϊόντα (σπόρια) που προκύπτουν από τη μείωση του διπλοειδούς κυττάρου. Τα σπόρια αρχίζουν να αναπτύσσονται (διαδικασία βλάστησης) και σχηματίζουν αποικίες. Τα διπλοειδή κύτταρα μύκητα έχουν όγκο σχεδόν διπλάσιο από εκείνο των απλοειδών (83% μεγαλύτερο) (προσαρμοσμένη από Herskowitz I., 1988).

Τα α και a απλοειδή κύτταρα παράγουν μόνο τους παράγοντες για τη σύζευξη και τους υποδοχείς που χρειάζονται για είναι πραγματοποιήσιμη. Οι παράγοντες α και a είναι πεπτιδικές ορμόνες, που ονομάζονται φερορμόνες. Τόσο για τον α όσο και τον a παράγοντα υπάρχουν ειδικοί υποδοχείς στους οποίους και προσδένονται. Οι φερορμόνες οργανώνουν τη διαδικασία της σύζευξης και δεν έχουν επίδραση στα κύτταρα του ίδιου τύπου ή στα διπλοειδή. Προσδένονται μόνο σε υποδοχείς φερορμονών στην επιφάνεια απλοειδών κυττάρων αντίθετου τύπου σύζευξης. Τα διπλοειδή κύτταρα α/a δεν επιτελούν σύζευξη. Τα γονιδιακά σύνολα που είναι ενεργά στους διάφορους τύπους κυττάρων προσδιορίζονται από τον γονιδιακό τόπο ζευγαρώματος (Mating-Type locus), ο οποίος δρα ως κύριος ρυθμιστικός τόπος που διέπει την εξειδίκευση των κυττάρων. Τα απλοειδή κύτταρα που εκφράζουν τον a παράγοντα φέρουν το αλληλόμορφο *MATa*, τα

κύτταρα που παράγουν τον παράγοντα α φέρουν το αλληλόμορφο $MAT\alpha$ και τα διπλοειδή κύτταρα που περιέχουν και δύο τα αλληλόμορφα παρουσιάζουν τον φαινότυπο κυττάρων α/a (εικόνα 1.4.13) (Herskowitz I., 1988).



Εικόνα 1.4.13| Α) Λειτουργικές περιοχές των 2 τύπων παραγόντων ζευγαρώματος του *S. cerevisiae*. Οι περιοχές Y παρουσιάζουν ιδιομορφισμούς και έχουν πολύ μικρή ομολογία μεταξύ τους. Η Ya έχει μήκος 642 bp, ενώ η Yα έχει μήκος 747 bp. Οι περιοχές W, X και Z1 και Z2 είναι ομόλογες τερματικές περιοχές. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση της μεταγραφής και κάτω από τα βέλη αναγράφονται οι λειτουργίες των γονιδιακών προϊόντων. Σε κύτταρο του *S. cerevisiae* τύπου a, ένας γενικός ενεργοποιητής μεταγραφής είναι υπεύθυνος για την παραγωγή της α-φερομόνης και του συνδεδεμένου με τη μεμβράνη υποδοχέα α-φερομόνης. Στα διπλοειδή a / α, η ετεροδιμερής πρωτεΐνη MATα1/MATα2 ενεργοποιεί τις μειωτικές και σποριωτικές λειτουργίες και καταστέλλει τις απλοειδείς λειτουργίες. Β) Οι φερομόνες α και a. (προσαρμοσμένο από Moore & Novak Frazer, 2002).

1.4.2 | UAS and TATA regions/GAL-UAS

Η έναρξη της γονιδιακής μεταγραφής στον ζυμομύκητα, όπως και σε άλλους οργανισμούς, επιτυγχάνεται με το συντονισμό αρκετών μοριακών μηχανισμών. Ανοδικά των δομικών γονιδίων του ζυμομύκητα (η μεταγραφή των οποίων πραγματοποιείται από την πολυμεράση II του RNA) προηγείται μία περιοχή που περιέχει μία συντηρημένη αλληλουχία (TATA box) που καθορίζει τη θέση έναρξης της μεταγραφής και ελέγχει το βασικό επίπεδο της μεταγραφής. Επιπλέον, η έκφραση πολλών γονιδίων ρυθμίζεται από τα cis-ενεργά στοιχεία, τους μεταγραφικούς παράγοντες, αλλά και διάφορες trans-acting πρωτεΐνες. Ο όρος "υποκινητής" ("promoter") συνήθως περιλαμβάνει τόσο την περιοχή TATA box όσο και τα cis-ρυθμιστικά στοιχεία του DNA. Αυτό συμβαίνει γιατί τα cis-ρυθμιστικά στοιχεία σχετίζονται άμεσα με την περιοχή TATA box (Yocum, 1987). Αντίθετα στους πολυκύτταρους ευκαρυώτες, τα cis-ρυθμιστικά στοιχεία, λόγω χάρη οι ενισχυτές, τοπολογούνται αρκετά απομακρυσμένα από τους υποκινητές των γονιδίων που ρυθμίζουν την έκφρασή τους.

Η περιοχή TATA box στον ζυμομύκητα, τοποθετείται τυπικά περίπου 25bp ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής. Οι περιοχές των TATA boxes των ζυμομυκήτων παρομοιάζουν λειτουργικά με τις Pribnow boxes των προκαρυωτών. Επιπλέον, ορισμένες μεταγραφικές περιοχές του ζυμομύκητα περιλαμβάνουν ανοδικά, παραπάνω από μία TATA box περιοχή. Στο γονίδιο *HIS3* του ζυμομύκητα, για παράδειγμα, υπάρχουν δύο διαφορετικές, περιοχές TATA boxes: TR & TC (Mahadevan & Struhl, 1990). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των περιοχών TATA boxes, είναι ότι η μετακίνηση τους δίπλα σε νέα cis-ενεργά στοιχεία δεν επηρεάζει το ρυθμιστικό τους ρόλο στην μεταγραφή.

Ένας τύπος cis-ενεργού στοιχείου μεταγραφής στους ζυμομύκητες, αποτελεί η ανοδική αλληλουχία ενεργοποίησης (Upstream Activating Sequence), UAS. Η UAS αναγνωρίζεται από ειδικούς μεταγραφικούς ενεργοποιητές που ενισχύουν τη μεταγραφή των παρακείμενων καθοδικών περιοχών των TATA boxes. Η ενισχυτική λειτουργία των αλληλουχιών UAS στους ζυμομύκητες έχει μεγάλο εύρος δράσης, αρκεί η απόσταση των κωδικοποιημένων περιοχών να μην υπερβαίνει μερικές εκατοντάδες ζεύγη βάσεων. Επιπλέον, μπορεί να υπάρχουν πολλαπλά αντίγραφα μιας UAS περιοχής ανοδικά από μία κωδικοποιούσα περιοχή, ενώ ταυτόχρονα οι UASs μπορούν είτε να αφαιρεθούν, είτε να αντικατασταθούν για να αλλάξουν τη ρύθμιση των καθοδικών μεταγραφόμενων γονιδίων (Xiao 2005).

Τα γονίδια *GAL* του *S. cerevisiae* επιτρέπουν στον ζυμομύκητα να μεταβολίζει τη γαλακτόζη αντί της γλυκόζης στο μονοπάτι της γλυκολυτικής οδού (Douglas and Hawthorne, 1966). Η πρωτεΐνη *GAL4*, είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που απαρτίζεται από 881 αμινοξέα και αποτελείται από μία περιοχή σύνδεσης στο DNA (DNA Binding Domain) που αντιστοιχεί στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (1-147 aa) και μία ενεργή μεταγραφικά περιοχή (Active Domain) που αποτελεί το C-τελικό άκρο (768- 881 aa). Η DBD περιοχή δεσμεύεται σε ένα μοτίβο 17 ζευγών βάσεων, την προαναφερθείσα ανοδική αλληλουχία ενεργοποίησης (Upstream Activating Sequence), *UAS_{GAL}*. (Giniger et al., 1985, Keegan et al., 1986, Ma and Ptashne, 1987). Η *UAS_{GAL}* με αλληλουχία 5'-CGGRNNRCYNYNCNCCG-3' (UniProtKB - P04386) βρίσκεται ανοδικά των γονιδίων *GAL1*, *GAL2*, *GAL7*, *GAL10* και *MEL1*, των οποίων η έκφραση ελέγχεται παρουσία γαλακτόζης όταν από το

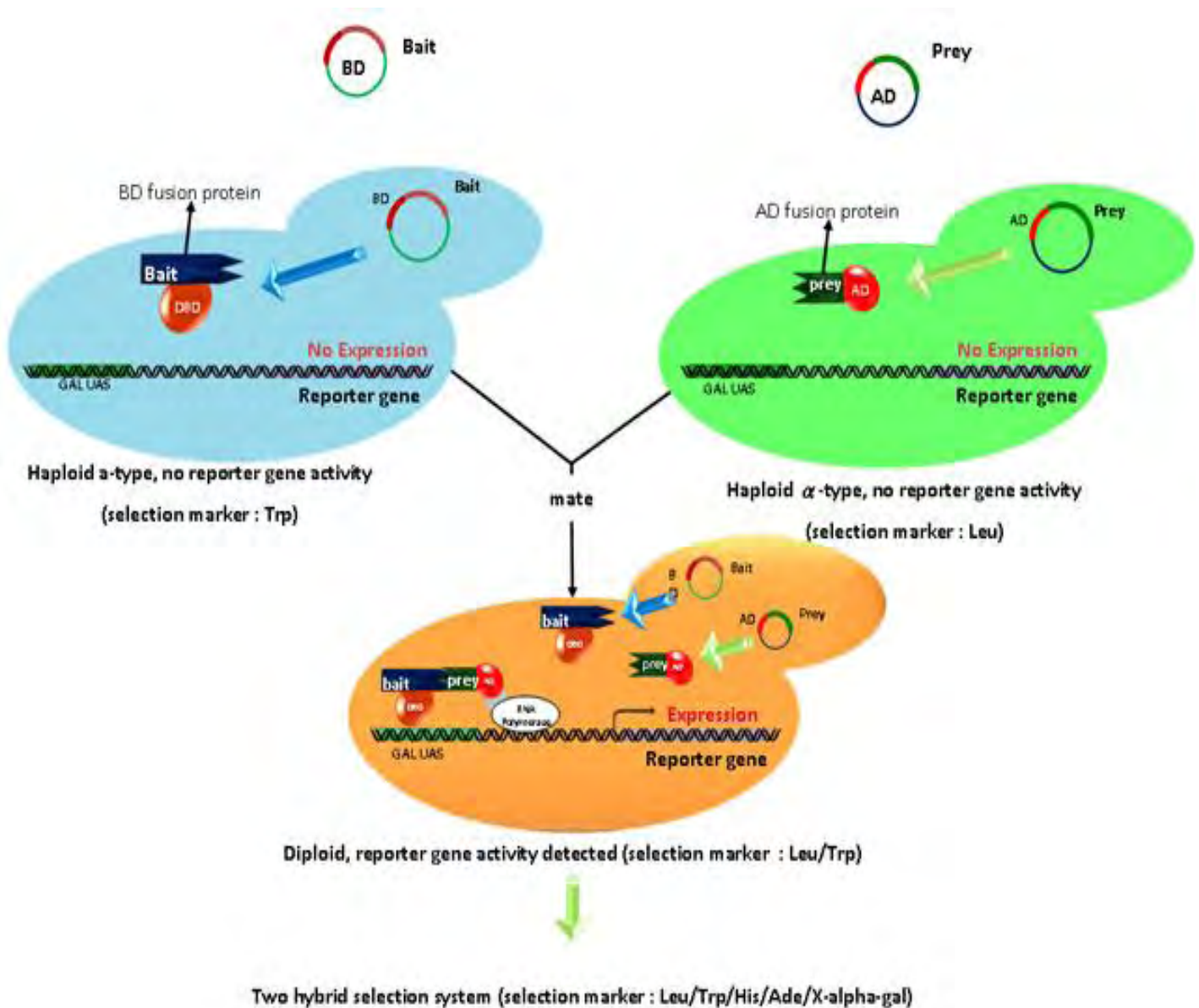
θρεπτικό υλικό ανάπτυξης του οργανισμού απουσιάζει γλυκόζη. Κατά αυτόν τον τρόπο η γαλακτόζη μετατρέπεται σε γλυκόζη.

1.4.3 | Yeast Two Hybrid System: Αρχή μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου του συστήματος Y2H βασίζεται στο χαρακτηριστικό αυτό γνώρισμα του παράγοντα GAL4, όπου η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο ενδιαφερόμενων πρωτεϊνών (Proteins Of Interest) ανιχνεύεται μέσω της ανασύστασης του ίδιου παράγοντα μεταγραφής και την επακόλουθη ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς υπό τον έλεγχο αυτού του μεταγραφικού παράγοντα (Fields and Song, 1989).

Με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα που κωδικοποιεί την ενδιαφερόμενη πρωτεΐνη X μαζί με την περιοχή δέσμευσης DNA (DBD) του παράγοντα GAL4, εκφράζεται η υβριδοποιημένη πρωτεΐνη DBD-X. Η συντηγμένη DBD-X ονομάζεται συνήθως "δόλωμα" ("bait"). Λόγω της συγγένειας της περιοχής DBD για τις ανοδικές ακολουθίες, το δόλωμα συνδέεται σε έναν υποκινητή που βρίσκεται ανοδικά των γονιδίων αναφοράς, ο οποίος δεν ενεργοποιείται λόγω της έλλειψης της ενεργούς μεταγραφικά περιοχής (AD). Ένας δεύτερος πλασμιδιακός φορέας, κωδικοποιεί την Y πρωτεΐνη μαζί με την ενεργό μεταγραφικά περιοχή του GAL4 και εκφράζει την υβριδοποιημένη πρωτεΐνη AD-Y, κοινώς ονομαζόμενη "θήραμα" ("prey"). Συνήθως, το θήραμα επίσης δεν είναι ικανό να ενεργοποιήσει την μεταγραφή των καθοδικών γονιδίων αναφοράς καθώς δεν έχει καμία συγγένεια με τον υποκινητή αυτών των γονιδίων. Αν οι X και Y πρωτεΐνες φυσικά αλληλεπιδρούν, τότε ένας λειτουργικός GAL4 μεταγραφικός παράγοντας ανασυστάται στο σημείο κοντά στο σημείο του υποκινητή. Η πρόσδεση ενός λειτουργικού GAL4, που παίζει το ρόλο του θετικού ρυθμιστή ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς.

Έτσι, σε μία διεξαγωγή ανάλυσης δύο υβριδίων ζυμομύκητα, ανιχνεύεται η αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μέσω της ενεργοποίησης ενός ή περισσότερων γονιδίων αναφοράς σε απόκριση της συναρμολόγησης του παράγοντα.



Εικόνα 1.4.3 | Επισκόπηση της δοκιμασίας Yeast 2 Hybrid, που ελέγχει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο πρωτεϊνών, οι οποίες χάρην ευκολίας ονομάζονται Bait and Prey. Το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα *Gal4* παράγει μια πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο περιοχές (BD και AD) απαραίτητες για την μεταγραφή των καθοδικών γονιδίων αναφοράς (π.χ *LacZ*). Για την εφαρμογή του συστήματος κατασκευάζονται δύο πρωτεΐνες σύντηξης: *Gal4BD* + Bait και *Gal4AD* + Prey με τη βοήθεια πλασμιδιακών φορέων. Έπειτα μέσω μετασηματισμού οι φορείς εισέρχονται σε δύο διαφορετικά στελέχη μυκήτων διαφορετικού τύπου σύζευξης (α και a). Καμιά από αυτές μεμονωμένη, δεν είναι συνήθως επαρκής για την έναρξη της μεταγραφής (του γονιδίου αναφοράς). Μόνο μετά το mating των δύο στελεχών των μυκήτων και την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών σύντηξης μεταξύ τμήματος της Bait και τμήματος της Prey, ενεργοποιείται η μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς.

1.4.4 | Προσεγγίσεις μεγάλης κλίμακας αλληλεπιδράσεων στο σύστημα Y2H

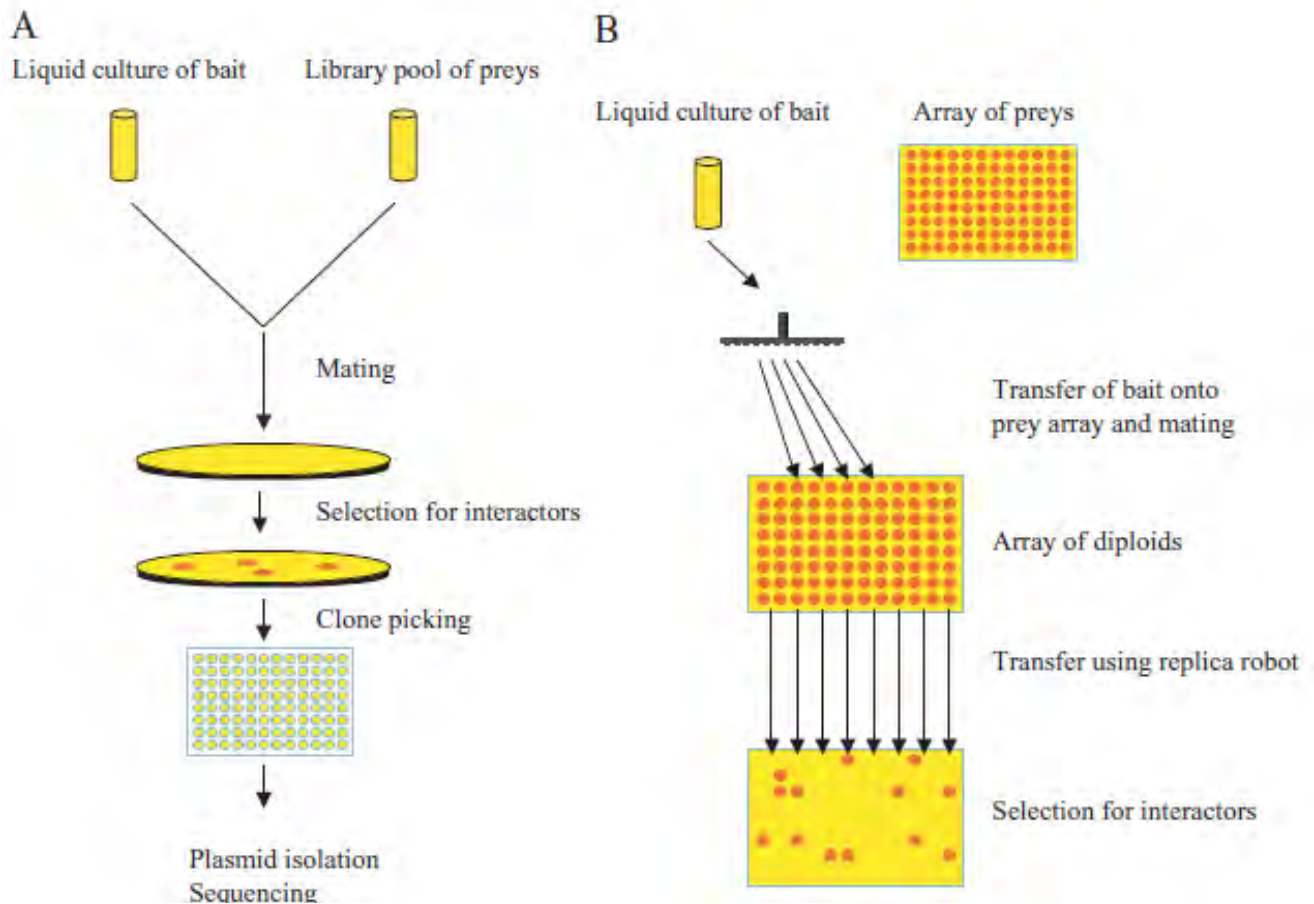
Στα πιο κοινά Y2H συστήματα, η πρωτεΐνη-θήραμα (prey) αντικαθίσταται συνήθως από μία συλλογή άγνωστων πρωτεϊνών-θηραμάτων που προέρχονται από μία cDNA ή γονιδιωματική βιβλιοθήκη (large-scale screening). Με αυτόν τον τρόπο είναι εφικτή η μελέτη αλληλεπίδρασης μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης με ένα σύνολο υποψήφιων αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών. Για τη διερεύνηση μεγάλης κλίμακας πρωτεϊνών (large-scale screening) υπάρχουν δύο προσεγγίσεις: 1) η ανίχνευση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών βιβλιοθήκης (library approach) και 2) η προσέγγιση μήτρας (matrix approach) (Daniel Auerbach & Igor Stagljar 2005).

- Library approach

Στην πρώτη προσέγγιση (εικόνα 1.4.4 A) η υπό μελέτη πρωτεΐνη αποτελεί το δόλωμα (bait) και εκφράζεται σε ένα μετασηματισμένο στέλεχος ζυμομύκητα τύπου α , ενώ παράλληλα μία συλλογή (βιβλιοθήκη) από υποψήφιες αλληλεπιδρώντες πρωτεΐνες (preys), μετασηματίζονται σε στέλεχος ζυμομύκητα τύπου α . Σε ένα επόμενο στάδιο, το μετασηματισμένο στέλεχος ζυμομύκητα που περιέχει την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος αναμιγνύεται με τα στελέχη ζυμομύκητα που έχουν μετασηματιστεί με την βιβλιοθήκη. Έτσι, πραγματοποιείται η σύζευξη μεταξύ μυκήτων διαφορετικών τύπων σύζευξης (α και α) το λεγόμενο yeast mating. Η διαδικασία λαμβάνει μέρος σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα που επιτρέπει την επιβίωση εκείνων των κλώνων που έχουν πραγματοποιήσει επιτυχή σύζευξη και έχουν προσλάβει και τα δύο διαφορετικά πλασμίδια με τα οποία έχουν μετασηματιστεί τα δύο διαφορετικού τύπου στελέχη ζυμομύκητα. Για να προσδιοριστεί η ταυτότητα του πλασμιδίου βιβλιοθήκης άρα και η πρωτεΐνη που αυτό φέρει πρέπει να απομονωθεί από το διπλοειδές κύτταρο ζυμομύκητα και να ενισχυθεί σε ένα βακτηριακό στέλεχος, π.χ. *Escherichia coli*. Σε τελικό στάδιο η υποψήφια αλληλεπιδρούσα περιοχή (prey) αλληλουχείται ώστε να προσδιοριστεί η αλληλουχία (Daniel Auerbach & Igor Stagljar, 2005) (εικόνα 1.4.4 A).

- Matrix approach

Στην προσέγγιση μήτρας χρησιμοποιείται μια συλλογή προσδιορισμένων θηραμάτων (preys), αντί για μία τυχαία συλλογή ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης (ORF) ή θραυσμάτων ORF. Κάθε θήραμα εισάγεται χωριστά σε ζυμομύκητα και τα προϊόντα μετασηματισμού τοποθετούνται σε ειδικές πλάκες. Ένα στέλεχος ζυμομύκητα που φέρει ειδικό δόλωμα (bait) του αντίθετου τύπου σύζευξης στη συνέχεια συνδυάζεται με κάθε στέλεχος που φέρει θηράματα και τα προκύπτοντα διπλοειδή στελέχη αντιγράφονται σε εκλεκτικό μέσο. Εάν ένα συγκεκριμένο διπλοειδές κύτταρο ζυμομύκητα μέσα στη συστοιχία αναπτύσσεται σε μέσο επιλογής, αυτόματα σημαίνει ότι το θήραμά αλληλεπιδρά με το δόλωμα που βρίσκεται υπό διερεύνηση. Σε αντίθεση με την πρώτη προσέγγιση, δεν απαιτείται απομόνωση ή αλληλούχιση πλασμιδίου, καθώς η θέση του αναπτυσσόμενου διπλοειδούς κυττάρου είναι μοναδική για την συγκεκριμένη αλληλεπίδραση (εικόνα 1.4.4 B).



Εικόνα 1.4.4 | Προσεγγίσεις υψηλής απόδοσης, για ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που χρησιμοποιούν το σύστημα Y2Hhybrid. (A) Library screening approach: Ένα στέλεχος ζυμομύκητα που εκφράζει το Bait (υπό μελέτη πρωτεΐνη) αναμειγνύεται με μια συλλογή στελεχών ζυμομύκητα που εκφράζουν τυχαία preys που έχουν προκύψει από cDNA βιβλιοθήκη. Η επώαση σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης επιτρέπει τη σύζευξη/yeast mating των δύο στελεχών και επιλέγονται τα διπλοειδή που εκφράζουν και τις δύο πρωτεΐνες. Τα διπλοειδή μεταφέρονται έπειτα σε εκλεκτικό μέσο για να απομονωθούν εκείνοι οι κλώνοι που περιέχουν αλληλεπιδρώντες πρωτεΐνες. Οι κλώνοι ζυμομυκήτων που εμφανίζουν ανάπτυξη σε εκλεκτικό μέσο συλλέγονται, μεταφέρονται σε πλάκες πολλαπλών σκευών και υφίστανται επεξεργασία για απομόνωση πλασμιδίου και εισαγωγή αλληλουχίας για την ταυτοποίηση του αλληλεπιδρώντος θηράματος (ταυτοποίηση των preys). (B) Matrix or array approach: Μια σειρά από preys παρασκευάζεται με κηλίδωση των ζυμομυκητικών, κλώνων οι οποίοι εκφράζουν γνωστά Preys σε πλάκες. Οι αποικίες συστοιχίζονται και στη συνέχεια και ζευγαρώνονται με ένα στέλεχος ζυμομύκητα που εκφράζει το Bait (πρωτεΐνη υπό μελέτη) (προσαρμοσμένη από Daniel Auerbach & Igor Stagljar, 2005).

1.5 | Σκοπός Εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής διατριβής, είναι η διερεύνηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του γονιδίου *Lotus SHAGGY-Like 1 (LSK1)* στη διαδικασία της φυματιογένεσης στο φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus* μέσω ανάλυσης δύο υβριδίων ζυμομήκητα (Y2H). Μετά την ανακάλυψη της LSK1 ως μια κινάση που εμπλέκεται στα πρώτα στάδια της εγκαθίδρυσης της συμβιωτικής σχέσης, με αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα μετά την πρώτη ώρα της μόλυνσης και την επιβεβαίωση του ρόλου της για την καταστολή της φυματιογένεσης στο *Lotus japonicus* (Garagounis et al. 2018), θέλαμε να ερευνήσουμε το σύνολο των πρωτεϊνών που αυτή αλληλεπιδρά και συνεργάζεται στα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται στην διαδικασία της φυματιογένεσης, μετά τον εμβολιασμό των ριζών με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*, στο χρονικό διάστημα τριών ωρών.

Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων της LSK1 και των υποψήφιων πρωτεϊνών μέσω του συστήματος Y2H, βασίστηκε σε τρία διακριτά βασικά στάδια. Το πρώτο στάδιο ήταν η δημιουργία μίας cDNA βιβλιοθήκης από ιστούς ριζών του φυτού *L. japonicus* που έχουν μολυνθεί με το *M. Loti*, η οποία εισήχθη στο στέλεχος Y187 (MATα), με τη βοήθεια του γραμμικού φορέα pGADT7-Rec, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Το δεύτερο στάδιο ήταν η εισαγωγή της υπό μελέτης πρωτεΐνης, LSK1, στο δεύτερο στέλεχος ζυμομήκητα Y2HGold (MATα), μέσω μετασηματισμού, με τη βοήθεια του πλασμιδιακού φορέα pGBKT7. Το τρίτο διακριτό στάδιο, ήταν η ανάμειξη των δύο μετασηματισμένων στελεχών ζυμομήκητα Y187-[pGADT7-cDNAs ενθέματα βιβλιοθήκης] x Y2HGold-[pGBKT7-LSK1], ώστε να επιτευχθεί η μεταξύ τους σύζευξη (yeast mating) και έτσι η δημιουργία διπλοειδών κυττάρων ζυμομήκητα. Η ανάπτυξη υγιών διπλοειδών αποικιών, σε αυστηρά εκλεκτικά μέσα, υποδεικνύει επιτυχή αλληλεπίδραση μεταξύ της LSK1 και των υποψήφιων αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών του φυτού *L. japonicus* μετά το χρονικό διάστημα τριών ωρών από τη μόλυνση με το *M. Loti*.

2 | ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 | Δημιουργία βιβλιοθήκης- Preys

2.1.1| Χειρισμός σπόρων *L. jaronicus*:

Για να επιτευχθεί η εκβλάστηση των σπερμάτων, ανά 60-70 σπόροι *L. jaronicus*, οικότυπου Gifu B-129, τοποθετήθηκαν σε 10 διαφορετικά δοχεία erpendorf των 1,5ml οι οποίοι εμβαπτίστηκαν σε πυκνό H₂SO₄ για 10 λεπτά, υπό ανάδευση. Ακολούθησε 4-5 φορές έκπλυση των σπόρων με 1ml παγωμένου dH₂O και έπειτα έγινε επιφανειακή απολύμανση με προσθήκη 1 ml BUF I (20% χλωρίνη , 0,1% Tween 20). Οι σπόροι παρέμειναν στο διάλυμα χλωρίνης για 20 λεπτά υπό συνεχή, ήπια, ανάδευση. Έπειτα έγιναν 6-7 πλύσεις με 1ml αποστειρωμένου νερού (ddH₂O) και τελικώς παρέμειναν για 24 ώρες στους 4 °C εμποτισμένοι με 1ml ddH₂O και τυλιγμένοι με αλουμινόχαρτο. Την επόμενη ημέρα ακολούθησε επιστροφή των σπόρων σε τρυβλία Petri (92 mm x 16 mm) με 0,8% water agar (περίπου 60-70 σπόροι σε κάθε τρυβλίο). Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm και οι σπόροι παρέμειναν για ένα βράδυ στους 4°C τυλιγμένοι με αλουμινόχαρτο. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής για αποφυγή επιμολύνσεων. Οι σπόροι την επόμενη μέρα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (16h φως/8h σκοτάδι, 23°C) και τοποθετήθηκαν κάθετα για 2 επιπλέον ημέρες. Έπειτα αφαιρέθηκε το αλουμινόχαρτο από τα τρυβλία και μετά από τρεις ημέρες έγινε μεταφορά των αρτίβλαστων σε τετράγωνα τρυβλία (120 mm x 120 mm) που περιείχαν θρεπτικό Jensen's medium.

2.1.2| Μόλυνση των αρτίβλαστων με *M. loti* και δειγματοληψία:

Μετά το χρονικό διάστημα της παραμονής των αρτίβλαστων (7 ημέρες) σε θρεπτικό Jensen's medium, έγινε η μόλυνση με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* στελέχους R7A. Η καλλιέργεια του ριζοβίου είχε πρωτίστως αναπτυχθεί 2 ημέρες πριν την μόλυνση σε υγρό θρεπτικό YMB (συνθήκες incubator: 28-30°C, 150-200 rpm). Πριν τη μόλυνση των φυτών, η υγρή καλλιέργεια αραιώθηκε με αποστειρωμένο νερό έως ότου φτάσει OD₆₀₀=0.002. Έπειτα έγινε μόλυνση των ριζών με την αραιωμένη καλλιέργεια εντός του τρυβλίου (1 ml/10 αρτίβλαστα/1 τρυβλίο), αφού πρώτα τοποθετήθηκαν αποστειρωμένα διηθητικά χαρτιά ανάμεσα στα αρτίβλαστα και το θρεπτικό. Η χρήση των διηθητικών χαρτιών βοηθάει στην καλύτερη απορρόφηση της της υγρής καλλιέργειας και άρα στην επιτυχή μόλυνση των φυτών από το ριζόβιο.

Για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής εργασίας , μετά το πέρας τριών ωρών έπειτα από τη μόλυνση, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία των ριζών με τη βοήθεια λεπίδας και λαβίδας. Επαρκές τμήμα του ριζικού συστήματος κόπηκε σε δοχεία erpendorf των 1.5ml και τοποθετήθηκε σε υγρό N₂ για μεταφορά στους -80°C, όπου αποθηκεύτηκε μέχρι τους μετέπειτα χειρισμούς.

2.1.3| Απομόνωση και καθαρισμός RNA από δείγματα ριζικού ιστού:

Οι ρίζες των φυτών που είχαν αποθηκευτεί στους -80°C λειοτριβήθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένου εμβόλου. Η διαδικασία της λειοτρίβησης απαιτεί παγωμένο ιστό και άρα τη χρήση υγρού N₂. Έπειτα ακολούθησε η απομόνωση του ολικού RNA με τη χρήση RNA extraction kit (QIAGEN) με τα βήματα που προτείνονται στο πρωτόκολλο. Τα δείγματα RNA υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με DNaseI (Invitrogen™) όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο για εξάλειψη υπολειμματικού DNA.

2.1.4| Σύνθεση cDNA και Long Distance PCR (LD-PCR):

Η σύνθεση single stranded cDNA έγινε με χρήση της “SMART[®] (Switching Mechanism at 5' end of RNA Template) cDNA synthesis technology” (Zhu, Y.Y., et al., 2001). Χρησιμοποιήθηκαν 4 μl (124 ng/μl) ολικού RNA καθαρισμένο με την προηγούμενη μέθοδο, στα οποία προστέθηκε 1μl CDSIII primer (πίνακας 1) και ακολούθησε επώαση στους 72°C για 2min. Έπειτα έγινε προσθήκη 2μl 5X First Strand Buffer, 1μl DTT (100 mM), 1μl dNTP Mix (10 mM), 1μl SMART MMLV Reverse Transcriptase (Vt=12,4 μl) και επώαση στους 42°C για 10 min. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 1μl SMART III-modified oligo (πίνακας 1) και ακολούθησαν διαδοχικές επωάσεις στους 42°C για 1h και στους 75°C για 10min. Τελικώς έγινε προσθήκη 1,4 μl NaOH (25 mM) και επώαση στους 68°C για 30 min. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε το προτεινόμενο από την εταιρεία Mouse Liver Poly A⁺ RNA. Δείγματα που δεν χρησιμοποιήθηκαν για την LD-PCR αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

Στη συνέχεια ακολούθησε δημιουργία double stranded cDNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο 2μl ss cDNA που δημιουργήθηκε με την παραπάνω διαδικασία. Στην αντίδραση της LD-PCR προστέθηκαν επίσης 50 μl 2X Q5 NEB Mix, 2 μl 5' primer (10 μM) και 2 μl 3' primer (10 μM) (πίνακας 2), 10 μl 10X melting solution, 34 μl ddH₂O (Vt=100 μl). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με το παρακάτω θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 98°C για 30sec, έπειτα 98°C για 10sec, 6min+5sec στους 72°C για 24 κύκλους και τέλος 72°C για 5min.

Πίνακας 1 : Οι αλληλουχίες για την σύνθεση ss Cdna.

Σύμβολο	Αλληλουχία
CDSIII primer	5'-ATTCTAGAGCCGAGGCCGCCGACATG-d(T) ₃₀ VN-3'*
SMART III-modified oligo**	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGG-3'

*NOTE: N = A, G, C, or T; V = A, G, or C

**NOTE: αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιείται από SMART MMLV RT

Πίνακας 2: Οι αλληλουχίες των εκκινητών στην LD-PCR για τη δημιουργία ds Cdna.

Εκκινητές	Αλληλουχία
5' PCR Primer	5'-TTCCACCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGG-3'
3' PCR Primer	5'-GTATCGATGCCACCTCTAGAGGCCGAGGCCGCCGACA-3'

Ακολούθησε επιβεβαίωση των παραγόμενων προϊόντων έπειτα από την LD-PCR μέσω ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε 1,2% πηκτή αγαρόζης (agarose/EtBr gel) με μάρτυρα μοριακού βάρους 2-log DNA ladder της εταιρείας New England Biolabs. Η διατήρηση των δειγμάτων μέχρι τον επόμενο χειρισμό έγινε αποθήκευση του ds cDNA στους -20°C .

2.1.5 | Καθαρισμός του ds cDNA :

Στο παρόν στάδιο έγινε καθαρισμός ds cDNA μέσω της χρήσης ειδικών στηλών καθαρισμού, CHROMA SPIN+TE-400 Columns, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα θραυσμάτων ds cDNA. Θραύσματα μοριακού βάρους μικρότερων των 200bp απομακρύνθηκαν με τη χρήση των στηλών, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται από την εταιρεία, Clontech (PT1300-1). Το τελικό ds cDNA ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Qubit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

2.1.6 | Μετασηματισμός του στελέχους Y187(MAT α)- Δημιουργία Prey Strain :

Για τον επιτυχή μετασηματισμό, κύτταρα στελέχους Y187 υποβλήθηκαν σε ειδική επεξεργασία (με διάλυμα 1.1xTE/LiAc) ώστε να γίνουν δεκτικά για τον φορέα κλωνοποίησης pGADT7-Rec μέσω του προτεινόμενου πρωτοκόλλου που βρίσκεται στο εγχειρίδιο “Yeastmaker Yeast Transformation System 2 User Manual (PT1172-1)”. Για τον επιτυχή μετασηματισμό, 600 μl δεκτικών κυττάρων Y187 που μόλις είχαν υποστεί την επεξεργασία, συμμετασηματίστηκαν με 20 μl ds cDNA (συνολικής ποσότητας ~1,2 μg) και 6 μl του φορέα pGADT7-Rec (cloning vector SmaI-linearized, 500ng/μl) ακολουθώντας το library scale protocol του “Yeastmaker Yeast Transformation System 2” ώστε να πραγματοποιηθεί ο ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ των ds cDNA τμημάτων και του φορέα κλωνοποίησης εντός των δεκτικών κυττάρων του στελέχους Y187. Ακολούθως έγινε επαναδιάλυση των κυττάρων σε 15 ml NaCl (0,9% w/v).

Με το πέρας της διαδικασίας του μετασηματισμού 150 μl κυττάρων επιστρώθηκαν σε SD/-Leu αγαρ plates και αφέθηκαν να αναπτυχθούν αποικίες στους 30°C για τις επόμενες 3-4 μέρες. Τελικώς έγινε συγκομιδή των κυττάρων από τα τρυβλία SD/-Leu αγαρ προσθέτοντας Freezing Medium (YPDA, 25% glycerol), δημιουργήθηκαν aliquots που αποθηκεύτηκαν για μελλοντική χρήση στους -80°C .

2.2| Προετοιμασία του στελέχους Y2HGold (MAT a)- Bait Strain

2.2.1| Μετασχηματισμός του Y2HGold (MAT a)-Δημιουργία Bait Strain:

Για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής εργασίας, κύτταρα δεύτερου στελέχους ζυμομύκητα Y2HGold (MAT a) υποβλήθηκαν σε ειδική επεξεργασία (με διάλυμα 1.1xTE/LiAc) ώστε να γίνουν δεκτικά για τον φορέα κλωνοποίησης pGBKT7, ο οποίος είχε πρωτίστως συντηχθεί με την αλληλουχία του γονιδίου της υπό μελέτη πρωτεΐνης, LSK1. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τον μετασχηματισμό αναγράφονται στο πρωτόκολλο του “ Yeastmaker Yeast Transformation System 2 User Manual (PT1172-1)” ,της Clontech, ακολουθώντας αυτήν τη φορά τον μετασχηματισμό μικρής κλίμακας (SMALL Transformation Scale).Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν 3,3 μl pGBKT7-LSK1 (~100 ng), εφόσον είχε προηγηθεί ποσοτικοποίηση του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης με Qubit, από stock γλυκερόλης αποθηκευμένο στους -80 °C, τα οποία αναμείχθηκαν με 50 μl δεκτικών κυττάρων Y2HGold. Καθώς ο φορέας pGBKT7 φέρει το γονίδιο TRP1 , μετά το τέλος της διαδικασίας του μετασχηματισμού τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία με το εκλεκτικό θρεπτικό μέσο SD/-TRP με άγαρ. Τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασία 30⁰C για 3-4 μέρες.

2.2.2| Έλεγχος του στελέχους Y2HGold (MATa)-Bait Strain για αυτοενεργοποίηση:

Η μελέτη της ικανότητας του μετασχηματισμένου στελέχους Y2HGold, που φέρει το ανασυνδυασμένο φορέα με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω (Y2HGold-[pGBKT7-LSK1]), να αυτοενεργοποιείται και να μεταγράφει τα γόνιδια αναφοράς που βρίσκονται καθοδικά, έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο όπως αναγράφεται στο εγχειρίδιο “Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid User Manual” της Clontech. Το πρωτόκολλο αφορά τη δημιουργία μικρής κλίμακας μετασχηματισμού (επακριβώς τα βήματα που αναγράφονται στην 2.2.1 παράγραφο). Στο πέρας του μετασχηματισμού οι καλλιέργειες των κυττάρων υπέστησαν διαδοχικές αραιώσεις (1/10 και 1/100) και 100μl από κάθε αραιώση στρώθηκαν σε τρυβλία τα οποία περιείχαν 3 διαφορετικά θρεπτικά εκλεκτικά μέσα:

- Τρυβλία με SD/-TRP=SDO (Single Dropout)
- Τρυβλία με SD/-TRP/X-a-Gal=SDO/X (Single Dropout με προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος X-a-Gal* (Cat. Nos. 630462 & 630462).
- Τρυβλία με SD/-TRP/X-a-Gal/Aba=SDO/X/A (Single Dropout με προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος X-a-Gal και του αντιβιοτικού Aureobasidin A** (Cat Nos. 630466 & 630499)

Οι αποικίες αφέθηκαν για 3-5 μέρες να αναπτυχθούν στους 30⁰ C και συγκρίθηκαν με τα control***.

*NOTE: working concentration=20 mg/ml

**NOTE: working concentration=200 ng/ml

***NOTE: Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκαν διπλοειδή κύτταρα που είχαν προκύψει έπειτα από το yeast mating Y2HGold-[pGBKT7-53] με Y187-[pGADT7-T] και ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκαν διπλοειδή κύτταρα που είχαν προκύψει έπειτα από το yeast mating Y2HGold-[pGBKT7-Lam] με Y187-[pGADT7-T]. Η διαδικασία δημιουργίας αναγράφεται στην παράγραφο 2.3.1.

2.2.3| Έλεγχος του στελέχους Y2HGold (MAT a)- Bait Strain για τοξικότητα:

Επιπλέον ελέγχθηκε η εισαγωγή και η έκφραση της υπό μελέτης πρωτεΐνης, LSK1, για τοξικότητα στα κύτταρα του στελέχους που μετασχηματίστηκε, Y2HGold. Η διαδικασία απαιτούσε τη δημιουργία δεκτικών κυττάρων Y2HGold σύμφωνα, όπως και προηγουμένως, με τη χρήση του “Yeastmaker Yeast Transformation System 2 User Manual (PT1172-1)”. Ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων έγινε με τον άδειο φορέα κλωνοποίησης, [100ng από pGBKT7 (empty)], και τα αποτελέσματα του συγκρίθηκαν με κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με τον ανασυνδυασμένο φορέα κλωνοποίησης, (100ng από pGBKT7-LSK1). Εν συνεχεία, 100 μl από διαδοχικές αραιώσεις (1/10 και 1/100) στρώθηκαν σε τρυβλία με εκλεκτικό θρεπτικό μέσο SD/-Trp. Μετά την επίστρωση τα τρυβλία αφέθηκαν στους 30°C για 3-5 μέρες και έπειτα μελετήθηκε η ανάπτυξη των αποικιών.

2.3| Yeast Mating

2.3.1| Πειράματα συζεύξεων μαρτύρων (Control matings):

Για την πραγματοποίηση των Control mating έγιναν επιπλέον μετασχηματισμοί στα δύο στελέχη Y2HGold (MAT a) και Y187 (MAT α) σύμφωνα με τα βήματα μετασχηματισμού που αναγράφονται στο εγχειρίδιο “Yeast Protocols Handbook” για τη διαδικασία “Small-scale LiAc Yeast Transformation”, της Clontech. Συγκεκριμένα στο στέλεχος Y2HGold έγιναν δύο διακριτοί μετασχηματισμοί, ο ένας με τη χρήση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pGBKT7-53 (κωδικοποιεί για την Gal4 DNA-BD και την p53 ποντικού) και ο δεύτερος με τη χρήση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pGBKT7-Lam (κωδικοποιεί για την Gal4 DNA-BD και την λαμίνη). Το στέλεχος Y187 υπέστη μετασχηματισμό με τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα pGADT7-T (κωδικοποιεί για την Gal4 AD και το SV40 large T-antigen). Έγινε χρήση μικρής κλίμακας μετασχηματισμού και τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία σε θερμοκρασία 30°C για 3 ημέρες σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα για να ελεγχθεί η ανάπτυξή τους (πίνακας 3).

Πίνακας 3: Στελέχη ζυμομύκητα με το είδος πλασμιδιακού φορέα που μετασχηματίστηκαν και τα θρεπτικά μέσα στα οποία έγινε επίστρωση για μελέτη ανάπτυξης αποικιών.

Στέλεχος ζυμομύκητα	Είδος πλασμιδιακού φορέα	Θρεπτικό μέσο επίστρωσης
Y2HGold _{MATa}	pGBKT7-53	SD/-Trp με άγαρ
Y2HGold _{MATa}	pGBKT7-Lam	SD/-Trp με άγαρ
Y187 _{MATα}	pGADT7-T	SD/-Leu με άγαρ

Έπειτα ακολούθησε η διαδικασία mating μικρής κλίμακας (small-scale mating procedure): Για το θετικό control mating συλλέχθηκε μία φρέσκια αποικία 2-3 mm του μετασχηματισμένου στελέχους Y2HGold-[pGBKT7-53], η οποία αναμείχθηκε σε δοχείο erpendorf των 1,5ml, με μία φρέσκια αποικία του μετασχηματισμένου στελέχους Y187-[pGADT7-T], με προσθήκη 500 μl 2X YPDA (240 μg/ml) και έπειτα από vortex, έγινε επώαση 20 h στους 30 °C στα 200 rpm. Αυτούσια διαδικασία ακολούθηθηκε για το αρνητικό control mating, μεταξύ των μετασχηματισμένων στελεχών Y2HGold-[pGBKT7-Lam] και Y187-[pGADT7-T].

Μετά το πέρας των 20h έγινε παρατήρηση σε μικροσκόπιο (40x) και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές αραιώσεις (1/10, 1/100, 1/1000) των καλλιιεργειών (mated cultures).

Ακολούθως, 100μl των αραιωμένων καλλιιεργειών επιστρώθηκαν και αφέθηκαν να αναπτυχθούν στους 30°C, για 3-5 ημέρες, σε τρυβλία που περιείχαν 4 διαφορετικά εκλεκτικά μέσα:

- Τρυβλία με SD/-Trp=SDO (Single Dropout)
- Τρυβλία με SD/-Leu=SDO (Single Dropout)
- Τρυβλία με SD/-Leu/-Trp =DDO (Double Dropout)
- Τρυβλία με SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp=QDO (Quadruple Dropout)

2.3.2 | Σύζευξη:

Y2HGold-[pGBKT7-LSK1] x Y187-[pGADT7-cDNA ενθέματα βιβλιοθήκης]

Κύτταρα Y2HGold-[pGBKT7-LSK1]/Bait strain αναμείχθηκαν με κύτταρα Y187-[pGADT7-cDNA ενθέματα βιβλιοθήκης]/Prey strain ώστε να επιτευχθεί το yeast mating, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναγράφεται στο εγχειρίδιο της Clontech, “Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual”. Για τις ανάγκες του πρωτοκόλλου έγινε μέτρηση της πυκνότητας των κυττάρων Y2HGold-[pGBKT7-LSK1] έπειτα από αραιώση 1/100 της καλλιέργειας ενώ ταυτόχρονα έγινε και τιτλοδότηση των κυττάρων της βιβλιοθήκης (Y187 [pGADT7-cDNAs ενθέματα βιβλιοθήκης]). Η τιτλοδότηση των κυττάρων της βιβλιοθήκης έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Clontech, όπως αναγράφεται στο “Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid User Manual”. Μετά το mating η καλλιέργεια επώαστηκε στους 30 °C για 20h, με ήπια ανάδευση (30-50 rpm). Μετά από 20h ακολούθησε η παρατήρηση της καλλιέργειας σε μικροσκόπιο (40x) και επίστρωση της καλλιέργειας του mating σε τρυβλία (200μl ανά τρυβλίο) που περιείχαν εκλεκτικό θρεπτικό μέσο DDO/X/A τα οποία επώαστηκαν στους 30°C για 3-5 ημέρες.

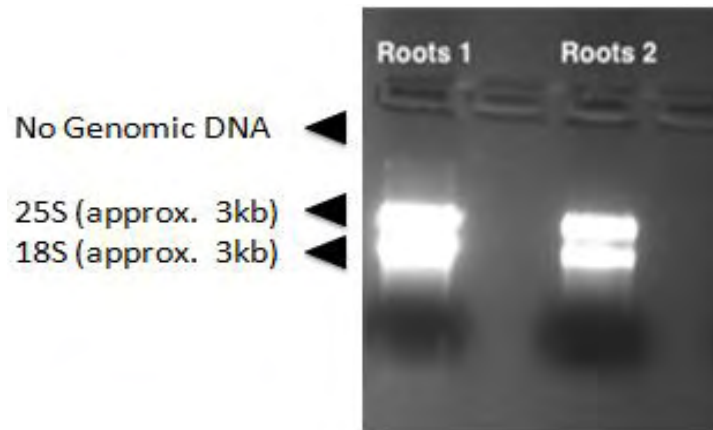
Ταυτόχρονα για να μελετηθεί η απόδοση του mating συνέβησαν τέσσερις διαδοχικές αραιώσεις (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) της καλλιέργειας του mating, από τις οποίες 100μl στρώθηκαν σε τρυβλία με εκλεκτικά θρεπτικά μέσα SD/-Trp, SD/-Leu και SD/-Leu/-Trp, και επώαστηκαν στους 30°C για 3-5 ημέρες.

Την διαδικασία του yeast mating ακολούθησε και 2^η ετεροχρονισμένη επανάληψη. Στην δεύτερη επανάληψη η επίστρωση της καλλιέργειας του mating έγινε σε τρυβλία που περιείχαν το εκλεκτικό θρεπτικό μέσο SD/-His/-Leu/-Trp με καναμυκίνη (50mg/ml).

3 | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

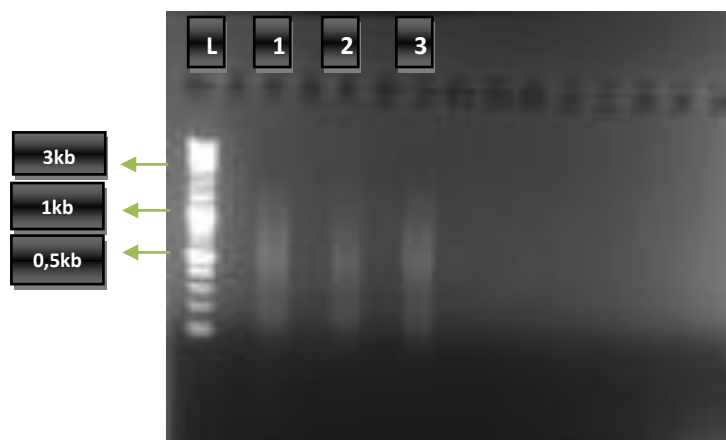
3.1| Αποτελέσματα σύνθεσης ds cDNA από ριζικούς ιστούς *L. japonicus*:

Αμέσως μετά το πέρας 3h που έγινε η μόλυνση με το *M. loti* σε αρτίβλαστα ηλικίας 11 ημερών πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία των ριζικών ιστών. Στους ριζικούς ιστούς έγινε απομόνωση του ολικού RNA και ειδική επεξεργασία με DNaseI (παράγραφος 2.3.1). Έπειτα τυχαία δείγματα επιλέχθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε 1,2% agarose 1X TAE gel για επιβεβαίωση.



Εικόνα 3.1.1: Ηλεκτροφόρηση. Τα 2 δείγματα που επιλέχθηκαν και έγινε η επιβεβαίωση απομόνωσης και καθαρισμού από υπολειμματικά τμήματα γενωμικού DNA, έπειτα από απομόνωση ολικού RNA από ριζικούς ιστούς. Απεικονίζονται οι αντίστοιχες κυτοσολικές ριβοσωμικές ζώνες 25S και 18S (η 5S ζώνη κυτοσολικού rRna δεν φαίνεται).

Επακολούθησε σύνθεση ss cDNA από τους ριζικούς ιστούς και ενίσχυση του δίκλωνου ds DNA μέσω LD-PCR με τα βήματα που αναγράφονται στην παράγραφο 2.1.4. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε 0,8% agarose 1X TAE gel για επιβεβαίωση (εικόνα 3.1.2). Τα 3 δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν δεν εμφανίζουν διακριτές ζώνες καθώς είναι αποτέλεσμα ενίσχυσης όλων των μεταγράφων του κυτοσολίου, καθένα από τα οποία περιέχει διαφορετικό μοριακό βάρος.



Εικόνα 3.1.2: Ηλεκτροφόρηση .Τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε LD-PCR για ενίσχυση των ds cDNA. Χρήση 2-Log DNA Ladder (0.1–10.0 kb)

Το gel ηλεκτροφόρησης σε κάθε ένα από τα τρία δείγματα έδειξε σύνθεση προϊόντων πολλαπλών μοριακών βαρών. Στο παρόν στάδιο έγινε καθαρισμός ds cDNA μέσω της χρήσης ειδικών στηλών καθαρισμού, CHROMA SPIN+TE-400 Columns, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα θραυσμάτων ds cDNA (παράγραφος 2.1.5). Θραύσματα μοριακού βάρους μικρότερων των 200bp απομακρύνθηκαν με τη χρήση των στηλών. Έπειτα συλλέχθηκαν μαζί και τα τρία δείγματα και έγινε ανοσοκατακρίμνηση με CH₃COONa (3M pH 4.8) και επαναδιάλυση με ισοπροπανόλη σε τελικό όγκο V_t=21 μl. Το τελικό ds cDNA ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Qubit (Invitrogen): 60ng/μl δηλαδή 1,2μg ds cDNA σε συνολικό όγκο 21μl.

3.2 | Έλεγχος βιβλιοθήκης-Library Strain:

Στο επόμενο στάδιο η ολική ποσότητα ds cDNA εισήχθη στο στέλεχος ζυμομύκητα Y187 μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, με τη διαδικασία του μετασχηματισμού, όπως αναγράφεται στην παράγραφο 2.1.6. Έτσι τα κύτταρα του μύκητα που προσέλαβαν τυχαία τμήματα ds cDNA (Y187 [pGADT7-cDNA ενθέματα βιβλιοθήκης]) αποτέλεσαν το Library Strain. Κρίθηκε αναγκαία η αξιολόγηση της βιβλιοθήκης οπότε ακολουθήθηκαν δύο ξεχωριστοί τρόποι μελέτης.

1) Μέτρηση κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρόμετρου: Η αραιωμένη ποσότητα καλλιέργειας (1/100), έδειξε ότι ο Μέσος Όρος των κυττάρων των τεσσάρων τετραγώνων ήταν περίπου 203 κύτταρα (δλδ. 203 Y187-[pGADT7-cDNA ενθέματα βιβλιοθήκης]). Λαμβάνοντας υπόψη τον όγκο των τεσσάρων γωνιακών 16αδων: $0,1 \times 1 \times 1 = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$, υπολογίστηκε η συγκέντρωση τους: $203/10^{-4} \text{ ml} = 203 \times 10^4 \text{ κύτταρα /ml}$. Τέλος επειδή το δείγμα υπέστη αραιώση αραιώση 1/100, υπολογίστηκε ότι η αρχική συγκέντρωσή τους είναι: $203 \times 10^2 \times 10^4 = 2,03 \times 10^8 \text{ κύτταρα /ml}$

2) Τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης, όπου έγιναν αραιώσεις της συμπυκνωμένης αρχικής καλλιέργειας 1/100 και 1/10.000. Η αραιώση 1/100 (dilution A) στρώθηκε σε 2 τρυβλία SD/-Leu ενώ, η αραιώση 1/10.000 σε 10 τρυβλία SD/-Leu. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 3 ημέρες στους 30°C. Στις παρακάτω εικόνες απεικονίζονται δύο από τα τρυβλία που έγινε επίστρωση αραιωμένης καλλιέργειας (1/10.000). Η επίστρωση έγινε σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο SD/-Leu, καθώς το Y187 καθίσταται αυξότοφο μετά τον μετασχηματισμό (ο pGADT7 κωδικοποιεί γονίδιο για παραγωγή λευκίνης).



Εικόνα 3.2.1: Αποτελέσματα τιτλοδότησης βιβλιοθήκης. Απεικονίζονται αποικίες 3 ημερών μετασχηματισμένου στελέχους ζυμομύκητα Y187-[pGADT7-cDNA ενθέματα βιβλιοθήκης]. Το μέγεθος των αποικιών δύναται να ποικίλλει ανάλογα με το μέγεθος του ενθέματος.

Όλα τα τρυβλία που είχαν το Dilution B είχαν κατά μέσο όρο 200 αποικίες το καθένα.

Έπειτα υπολογίστηκαν:

$$\text{cfu/ml} = \frac{\text{Number of colonies}}{\text{plating volume (ml)} \times \text{dilution factor}} = \frac{200}{0,05\text{ml} \times 10^{-4}} = 4 \times 10^7$$

Το aliquot (1ml) της βιβλιοθήκης περιέχει $> 2 \times 10^7$ αποικίες όπως συνιστά το πρωτόκολλο.

3.3 | Έλεγχος αυτοενεργοποίησης & τοξικότητας της LSK1:

Προκειμένου να συνεχιστούν τα πειράματα του yeast mating της LSK1 με την cDNA βιβλιοθήκη έπρεπε να επιβεβαιωθεί ότι η LSK1 δεν προκαλεί αυτοενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς απουσία του Y187 [pGADT7-cDNAs ενθέματα βιβλιοθήκης]/Prey Library. Για το λόγο αυτό κύτταρα Y2HGold μετασηματίστηκαν με τον φορέα pGBKT7-LSK1 και η καλλιέργεια στρώθηκε σε τρυβλία με τα εκλεκτικά θρεπτικά μέσα SD/-Trp, SD/-Trp/X και SD/-Trp/X/A (βλέπε παράγραφο 2.2.2).

Επιπλέον έπρεπε να ελεγχθεί ότι η εισαγωγή της LSK1 δεν προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα Y2H Gold που μετασηματίζονται με τον φορέα pGBKT7-LSK1. Όστε να δημιουργηθεί το Bait Strain (Y2H Gold [pGBKT7-LSK1]). Για αυτόν τον λόγο κύτταρα Y2H Gold μετασηματίστηκαν με τον φορέα pGBKT7-LSK1 και η ανάπτυξή τους συγκρίθηκε με κύτταρα Y2H Gold που είχαν μετασηματιστεί με τον άδειο φορέα pGBKT7-empty. Εν συνεχεία η καλλιέργεια στρώθηκε σε τρυβλία SD/-Trp (βλέπε παράγραφο 2.2.3).

Για εξοικονόμηση χρόνου και υλικών οι δύο δοκιμές έγιναν παράλληλα και ο μετασηματισμός του Y2H Gold με τον φορέα pGBKT7-LSK1 έγινε μία φορά. Και για τα δύο πειράματα στρώθηκαν αραιώσεις 1/10 και 1/100 από την καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

- Για τον έλεγχο τοξικότητας:

α) pGBKT7-empty



β) pGBKT7-LSK1

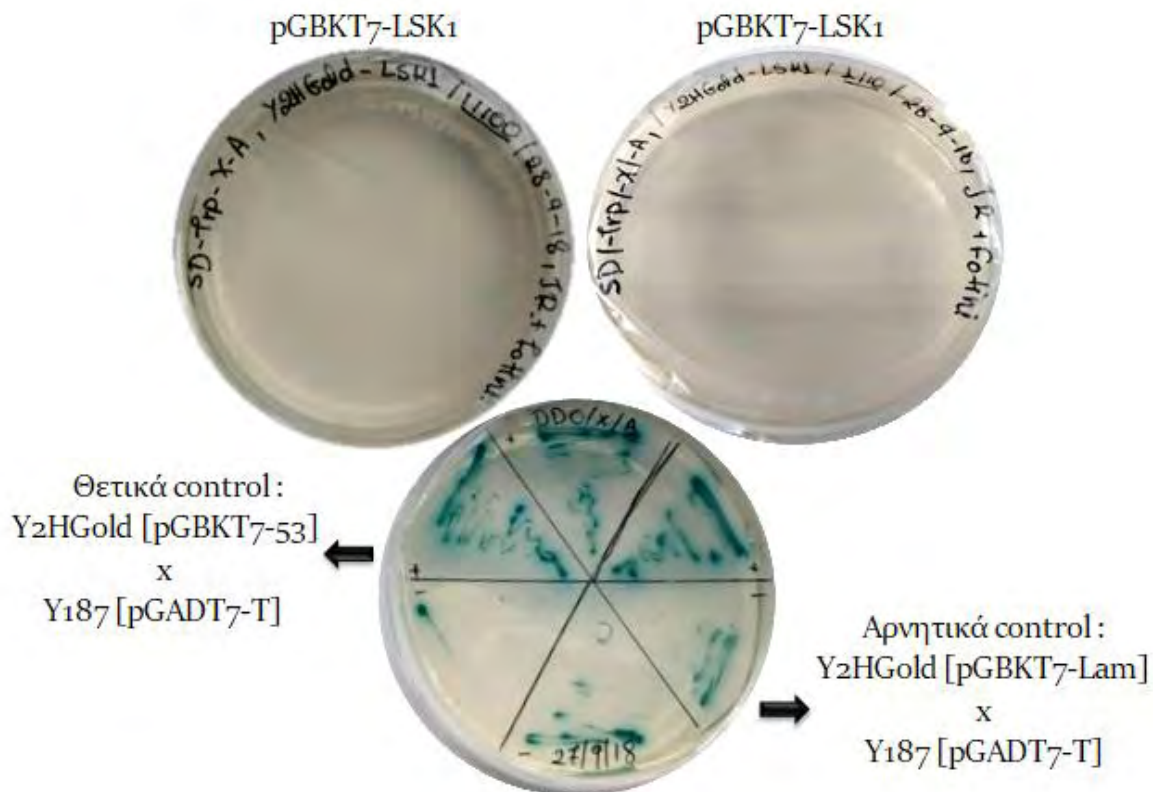


Εικόνα 3.3.1: Ενδεικτικά αποτελέσματα ελέγχου τοξικότητας. Στην εικόνα **α** απεικονίζονται αναπτυγμένες αποικίες Y2HGold που μετασηματίστηκαν με τον άδειο φορέα, ενώ στην εικόνα **β** αναπτύχθηκαν μετασηματισμένες αποικίες Y2HGold με τον ανασυνδυασμένο φορέα.

Τα αποτελέσματα αρχικά δείχνουν ανάπτυξη αποικιών στο εκλεκτικό μέσο SD/-Trp εφόσον τα κύτταρα μετά τον μετασχηματισμό τους με τον φορέα pGBKT7 καθίστανται αυξότροφα σε θρεπτικά μέσα με έλλειψη τρυπτοφάνης. Αυτό συμβαίνει γιατί ο συγκεκριμένος φορέας φέρει γονίδιο που κωδικοποιεί για τρυπτοφάνη. Επίσης φαίνεται ότι η LSK1 δεν προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα της ζύμης εφόσον υπάρχει ανάπτυξη αποικιών ίδιου μεγέθους (εικόνα 3.3.1β).

- Για τον έλεγχο αυτοενεργοποίησης:

Για τις ανάγκες της παρούσας εργαστηριακής άσκησης χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά γονίδια αναφοράς. Στην διαδικασία ελέγχου αυτοενεργοποίησης αξιοποιήθηκαν το γονίδιο αναφοράς *MEL1* το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο α-γαλακτοσιδάση και το γονίδιο αναφοράς *AUR1-C*. Όταν το γονίδιο *MEL1* εκφράζεται, παράγεται η α-γαλακτοσιδάση η οποία διασπά το χρωμογόνο υπόστρωμα X-α-Gal όταν αυτό έχει προστεθεί στο θρεπτικό μέσο, ενώ όταν εκφράζεται το γονίδιο *AUR1-C*, παράγεται το ένζυμο IPCI (Inositol Phosphoryl Ceramide Synthase), το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Aureobasidin -A. Οι καλλιέργειες επιστρώθηκαν σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο SD/-Trp/X-a-Gal/Aba (βλεπε παράγραφο 2.2.2). Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά εικόνες 3 ημέρες μετά την διαδικασία ελέγχου καθώς επίσης και εικόνα του θετικού και αρνητικού control για επιβεβαίωση. Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη μπλε αποικιών (ως απόκριση στο γονίδιο αναφοράς *MEL1*) αλλά ούτε ανάπτυξη λευκών αποικιών (ως απόκριση στο γονίδιο *AUR1-C*) στις δύο πάνω εικόνες, γεγονός που επιβεβαίωσε ότι μετά από τον μετασχηματισμό δεν ενεργοποιήθηκαν τα γονίδια αναφοράς. Στα θετικά control φάνηκε συνεχής ανάπτυξη μπλε αποικιών, ενώ στα αρνητικά control δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών.



Εικόνα 3.3.2: Ενδεικτικά αποτελέσματα ελέγχου αυτοενεργοποίησης. Ως θετικά και αρνητικά control χρησιμοποιήθηκαν διπλοειδή κύτταρα που προέκυψαν έπειτα control matings (Li & Fields, 1993; Iwabuchi *et al.*, 1993) τα οποία πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο και τα αποτελέσματα αναγράφονται παρακάτω.

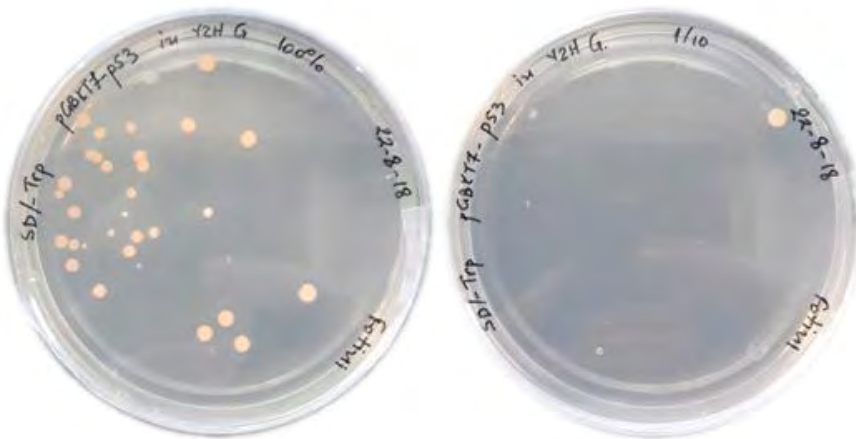
3.4| Αποτελέσματα ανεξάρτητων μετασηματισμών: α) Y2HGold με τους φορείς pGBKT7-lam & pGBKT7-p53 και β) Y187 με τον φορέα pGADT7-T:

Για τα control matings ήταν απαραίτητοι οι παρακάτω μετασηματισμοί:

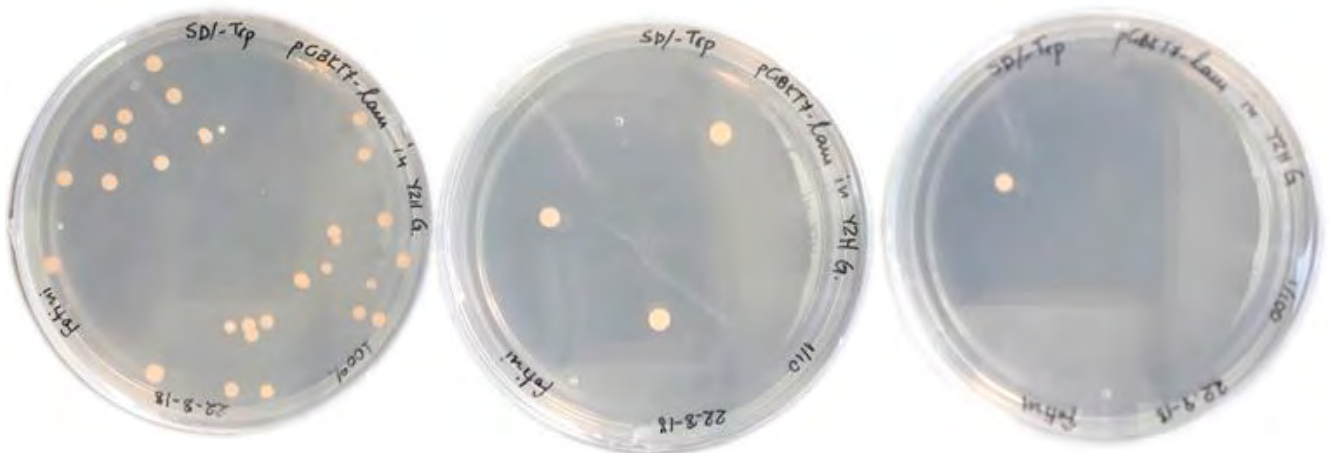
- Y2HGold με pGBKT7-53
- Y2HGold με pGBKT7-Lam
- Y187 με pGADT7-T

Ως αρνητικά control χρησιμοποιήθηκαν δεκτικά κύτταρα Y187 και Y2HGold χωρίς προσθήκη πλασμιδίων. Η διαδικασία αναγράφεται στην παράγραφο 2.3.1. και τα επιτυχή αποτελέσματα φαίνονται στις παρακάτω εικόνες:

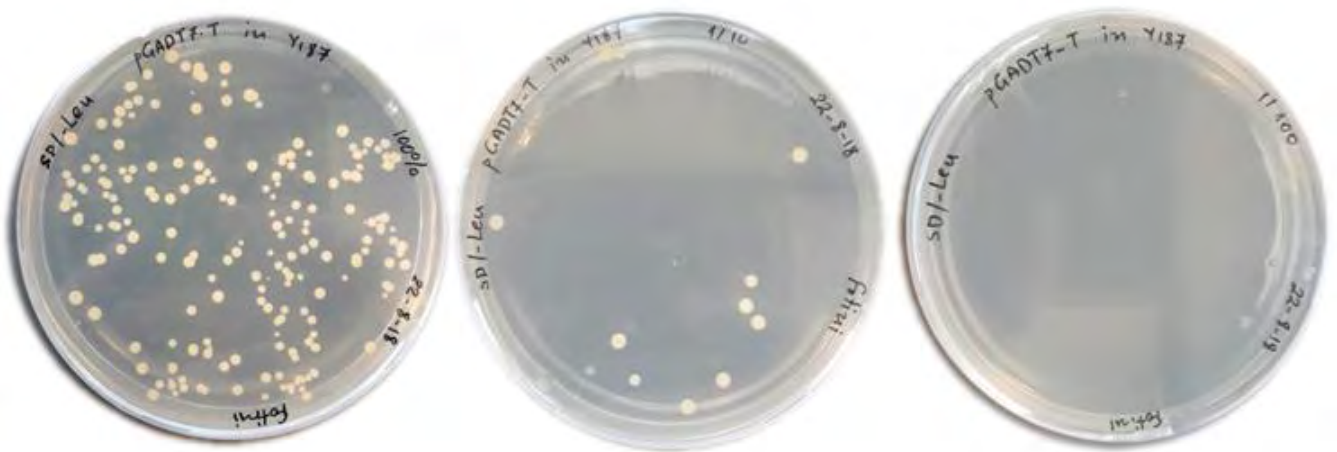
1) Y2HGold με pGBKT7-53 → Αυξότροφοι σε θρεπτικό με έλλειψη τρυπτοφάνης.



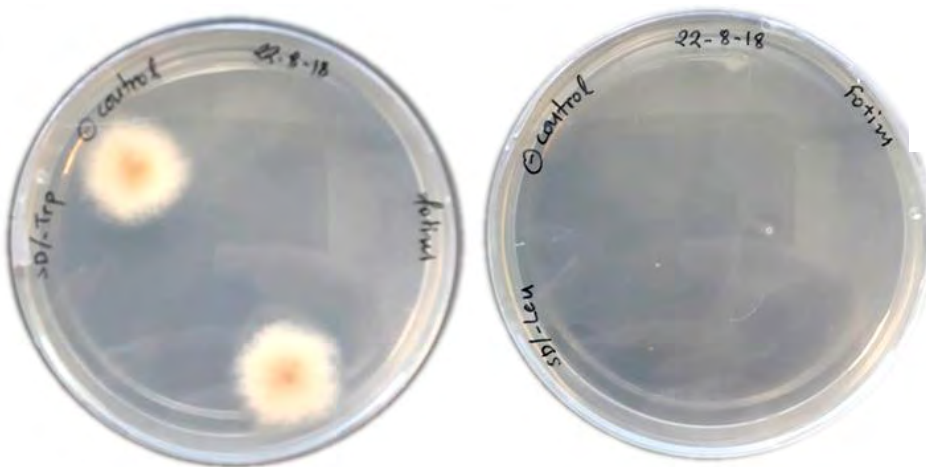
2) Y2HGold με pGBKT7-Lam → Αυξότροφοι σε θρεπτικό με έλλειψη τρυπτοφάνης.



3) Y187 με pGADT7-T → Αυξότροφοι σε θρεπτικό με έλλειψη λευκίνης.



4) Negative controls*



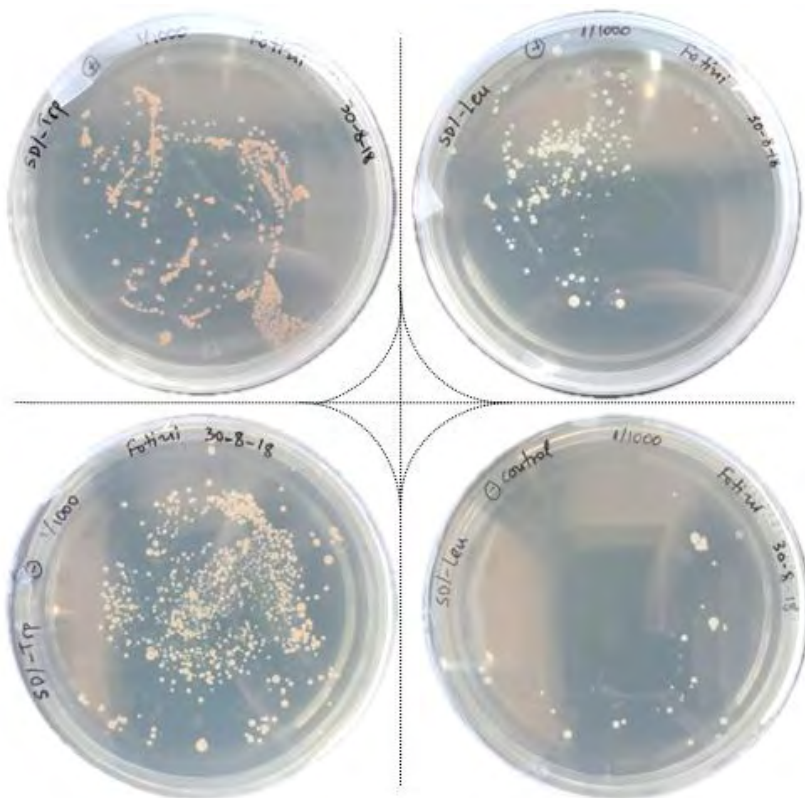
*Note: Επιμόλυνση τρυβλίου με άλλο είδος μύκητα.

3.5| Αποτελέσματα συζεύξεων μαρτύρων (Control Matings):

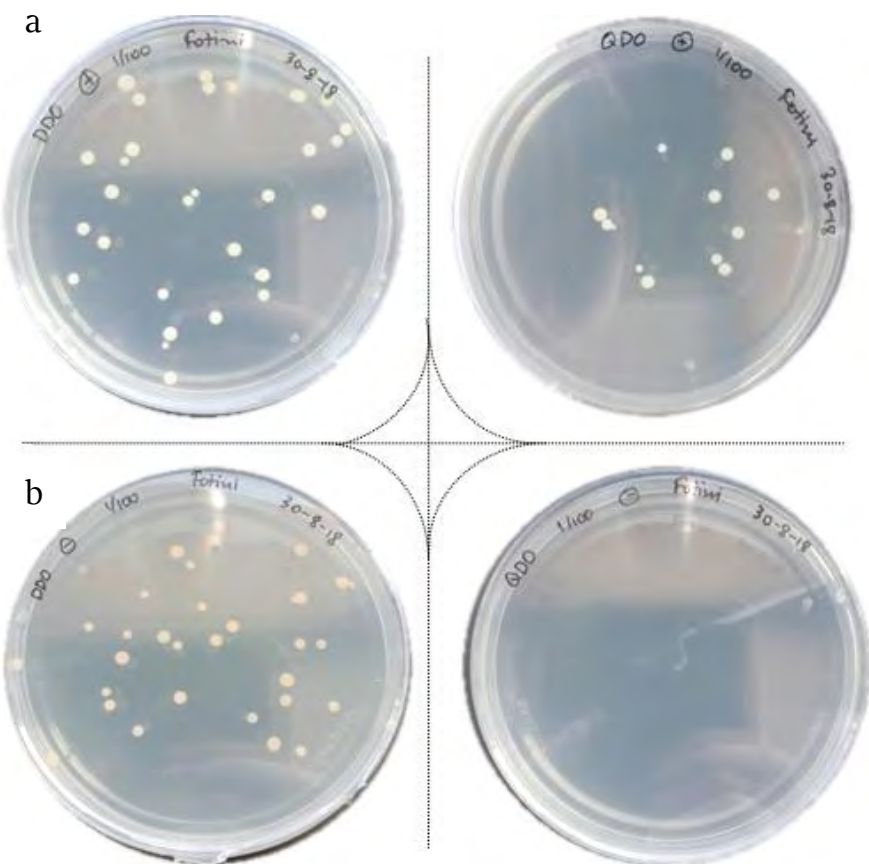
Έπειτα από τους επιτυχείς μετασχηματισμούς ακολούθησαν τα control matings και μετά το πέρας 3 ημερών μελετήθηκε η ανάπτυξή τους (βλέπε παράγραφο 2.3.1).

Για τα SDO (SD/-Trp ή SD/-Leu), απεικονίζονται τα τρυβλία με αραιώση 1/1000, για τα τρυβλία DDO (SD/-Trp/-Leu), απεικονίζονται τα τρυβλία με αραιώση 1/100 και για τα QDO (SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu), απεικονίζονται τα τρυβλία με αραιώση 1/100. Οι επιτυχείς μετασχηματισμοί του στελέχους Y2HGold, τόσο με τον pGBKT7-53 όσο και με τον pGBKT7-lam, φαίνονται στα τρυβλία SD/-Trp, ενώ του στελέχους Y187 με τον pGADT7-t φαίνεται στα τρυβλία SD/-Leu. Επιπλέον η ανάπτυξη αποικιών στα DDO τρυβλία δηλώνει την ταυτόχρονη παρουσία και των δύο πλασμιδίων εντός των αποικιών. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της p53 και του T-antigen επιβεβαιώθηκε στα τρυβλία QDO, ενώ αποδείχτηκε η απουσία αλληλεπίδρασης μεταξύ της λαμίνης και του T-antigen λόγω απουσίας αποικιών στα QDO τρυβλίων (δηλαδή η αδυναμία των διπλοειδών κυττάρων να μεταγράψουν τα γονίδια αναφοράς και να επιβιώσουν απουσία ιστιδίνης και αδενίνης).

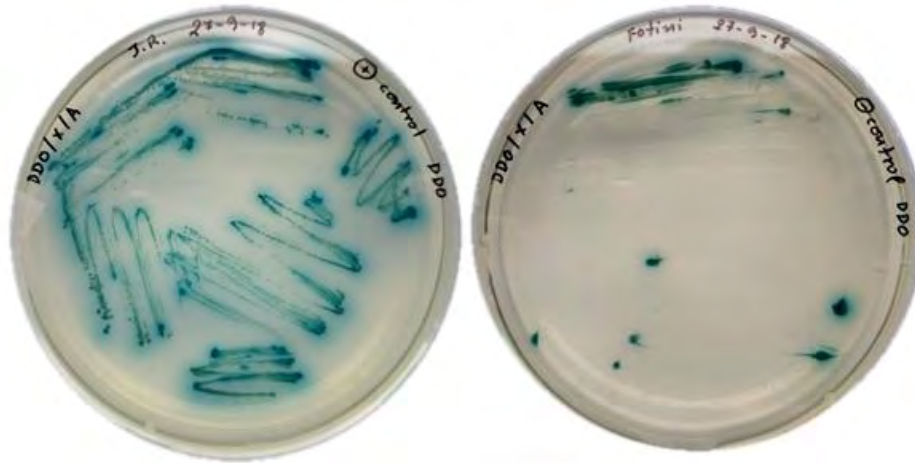
1) Αποτελέσματα επιτυχών μετασχηματισμών των control matings:



2) a) Positive Control: Y2HGold-[pGBKT7-p53] x Y187-[pGADT7-Tantigen]
 b) Negative Control: Y2HGold-[pGBKT7-Lam] x Y187-[pGADT7-Tantigen]



Έπειτα έγινε streaking των αποικιών που εμφανίζονται στα DDO τρυβλία (από stock γλυκερόλης) για το θετικό και το αρνητικό control σε DDO/X/A.



Παρατηρήθηκε ότι στο θετικό control εμφανίζονται πολλές και έντονες μπλε αποικίες ενώ στο αρνητικό λίγες μπλε. Η ύπαρξη μπλε αποικιών στο αρνητικό control οφείλεται πιθανώς στο γεγονός ότι τα κύτταρα που είναι πολύ συγκεντρωμένα σε ένα σημείο μπορούν να επιβιώσουν παρά την παρουσία του αντιβιοτικού και να χρωματιστούν μπλε καθώς το X-α-gal δεν είναι και τόσο επιλεκτικός δείκτης. Η διαφορά μεταξύ των δύο τρυβλίων ως προς την ανάπτυξη αποικιών, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το σύστημα Y2H μπορεί να ανιχνεύσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών.

Για το θετικό control πρέπει θεωρητικά να υπάρχει ίσος αριθμός ανάπτυξης αποικιών παρόμοιο αριθμό αποικιών στα DDO τρυβλία και στα QDO τρυβλία ωστόσο παρατηρήθηκε μία μικρή απόκλιση. Η διαφορά αυτή σημειώνεται και στο αρχικό πρωτόκολλο και αντιστοιχεί στο ποσοστό 10-20%. Για το αρνητικό control πρέπει να εμφανίζονται αποικίες μόνο στα DDO τρυβλία γιατί QDO έχει έλλειψη ιστιδίνης και αδενίνης που αποτελούν επίσης γονίδια αναφοράς στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας 4: Αντιπροσωπευτικός πίνακας αποτελεσμάτων που υποδεικνύει ανάπτυξη των μυκήτων όπως αποδείχτηκαν από τις συζεύξεις μαρτύρων.

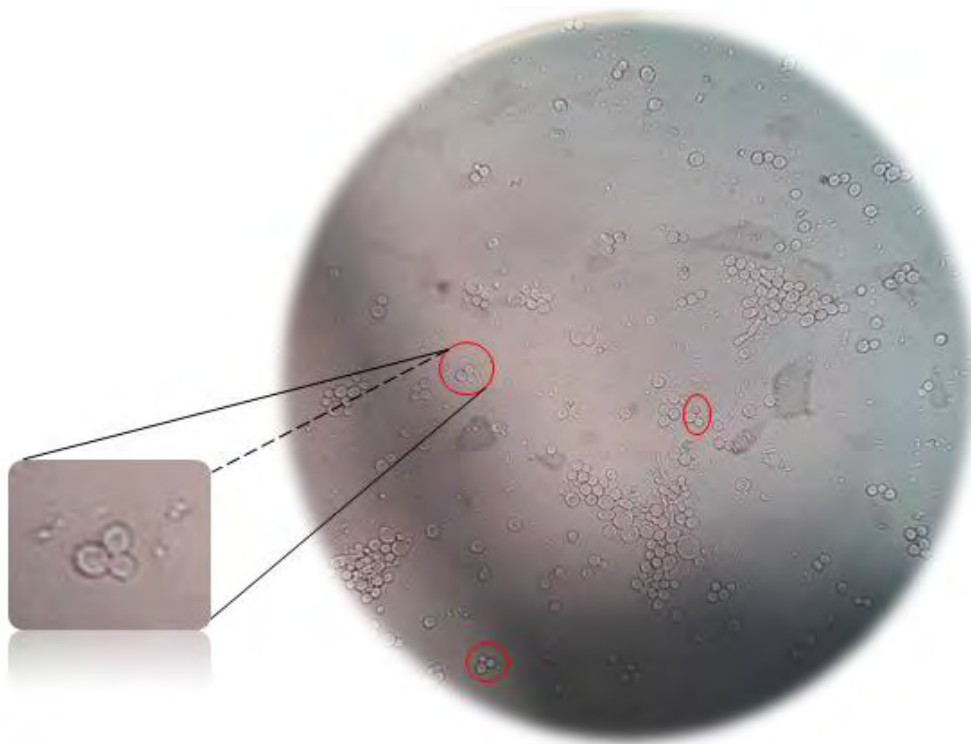
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ	ΕΚΛΕΚΤΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ			
	SD/-Leu	SD/-Trp	SD/-Trp/-Leu (DDO)	SD/-His/-Ade/-Trp/-Leu (QDO)
pGBKT7-p53	-	+	-	-
pGBKT7-lam	-	+	-	-
pGADT7-Tantigen	+	-	-	-
pGBKT7-p53 x pGADT7-Tantigen	+	+	+	+
pGBKT7-lam x pGADT7-Tantigen	+	+	+	-

3.6 | Αποτελέσματα 1^{ης} επανάληψης mating:

Y2HGold-[pGBKT7-LSK1] x Y187-[pGADT7-cDNAs ενθέματα βιβλιοθήκης]

Εφόσον πραγματοποιήθηκαν επιτυχώς τα πειράματα ελέγχου, σε αυτό το στάδιο τέθηκε σε εφαρμογή το 1^ο mating των δύο μετασηματισμένων στελεχών ζυμομύκητα (Y2HGold-[pGBKT7-LSK1] x Y187-[pGADT7-cDNAs ενθέματα βιβλιοθήκης]), για να εξακριβωθούν τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ της υπό μελέτης πρωτεΐνης LSK-1 και των πρωτεϊνών στο *L.jaronicus*. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν αναγράφονται στην παράγραφο 2.3.2.

Για να επιτευχθεί το mating πρωτίστως μετρήθηκε η κυτταρική πυκνότητα του bait strain (Y2HGold-[pGBKT7-LSK1]) με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου. Τα αποτελέσματα της μέτρησης έδειξαν κυτταρική πυκνότητα ίση με $3.15 \times 10^8 > 1 \times 10^8$, σύμφωνα με το πρωτόκολλο ήταν ικανοποιητικά, οπότε συνεχίστηκε η διαδικασία του 1^{ου} mating. Έπειτα από 20h παρατηρήθηκε η καλλιέργεια στο μικροσκόπιο (40x). Ενώ η επώαση των μυκήτων για το mating απαιτεί πολύ ήπια ανάδευση (30-50 rpm) για το χρονικό διάστημα 20-24h όπως αναγράφεται και στο πρωτόκολλο, το πρώτο μισάωρο ης διαδικασίας αφέθηκε, σε υψηλότερη ανάδευση (200rpm). Το αποτέλεσμα του mating μετά από 20h επώασης της καλλιέργειας φαίνεται στην εικόνα 3.6.1.



Εικόνα 3.6.1: Οπτική απεικόνιση αποτελέσματος του mating έπειτα από 22h. Παρατηρείται η τυπική μορφολογία, “Mickey Mouse”, των ζυγωτών των μυκήτων κάτω από το μικροσκόπιο (40x).

Η φαινοτυπική μορφολογία “Mickey Mouse” είναι αποτέλεσμα ύπαρξης ζυγωτών κυττάρων. Συνεπώς μετά το τέλος της διαδικασίας ακολούθησε επίστρωση της mating καλλιέργειας σε τρυβλία που περιείχαν το εκλεκτικό θρεπτικό DDO/X/A, ώστε να αναπτυχθούν κύτταρα μυκήτων που είχαν αφενός προσλάβει και τους δύο πλασμιδιακούς φορείς αλλά και αφετέρου αναπτύσσονταν παρουσία του αντιβιοτικού και κατανάλωναν το χρωμογόνο υπόστρωμα ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης του Bait με το Prey.

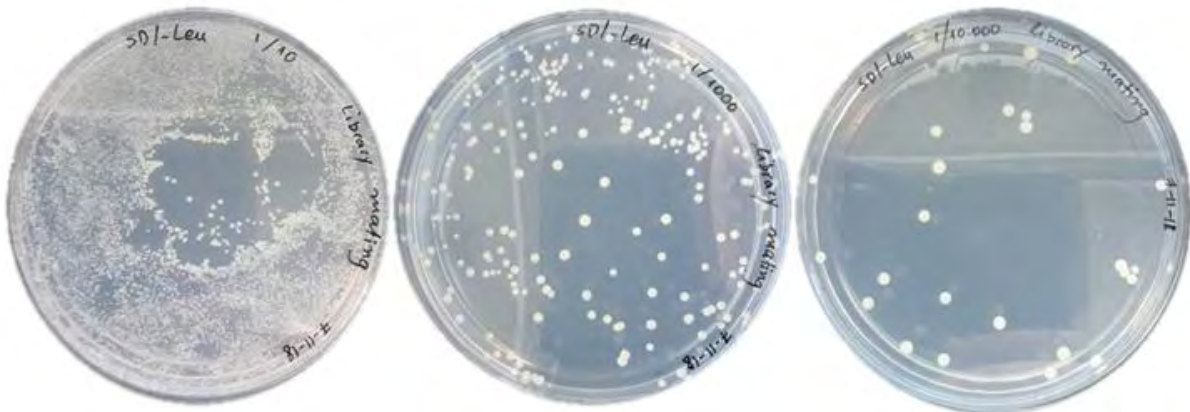
Έπειτα από 5 ημέρες επώασης στους 30°C συλλέχθηκαν συνολικά **183** μεμονομένες αποικίες οι οποίες μεταφέρθηκαν σε ένα πιο αυστηρό εκλεκτικό θρεπτικό TDO/X/A και αφέθηκαν και πάλι να αναπτυχθούν στις ίδιες συνθήκες ενώ συνέχισε μεταφορά τους σε ένα πιο αυστηρό θρεπτικό QDO/A.

Η μεταφορά των αποικιών από ένα θρεπτικό μέσο σε ένα άλλο πιο αυστηρό μέσο ανάπτυξης επιβεβαιώνει τη σύνδεση μεταξύ του bait και του prey. Ο λόγος που η αρχική καλλιέργεια στρώθηκε σε ένα πιο ήπιο μέσο ανάπτυξης ήταν για να ανιχνευτούν ακόμα και οι ασθενείς αλληλεπιδράσεις της υπό μελέτης πρωτεΐνης, LSK1, χωρίς να υποστούν καταπόνηση οι μύκητες. Ο αριθμός των αποικιών έπειτα από μεταφορά στα αυστηρά εκλεκτικά μέσα μειώθηκε στις **115**. Η μείωση των αποικιών όσο αυξάνεται η αυστηρότητα του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης αποτελεί αναμενόμενο αποτέλεσμα καθώς κατά αυτόν τον τρόπο οι ψευδώς θετικές αλληλεπιδράσεις δεν ευνοούνται προς ανάπτυξη.

3.7 | Έλεγχος απόδοσης της 1^{ης} επανάληψης του mating:

Προκειμένου να εξακριβωθεί η απόδοση του mating πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές αραιώσεις της αρχικής καλλιέργειας του mating και επιστροφή τους σε τρία εκλεκτικά θρεπτικά μέσα (βλέπε παράγραφο 2.3.2). Παρακάτω απεικονίζονται ενδεικτικά κάποιες από τις αραιώσεις:

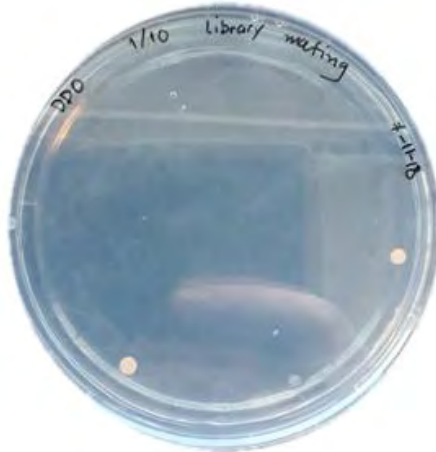
- 1) Για τον έλεγχο βιωσιμότητας του prey library (SD/-Leu) → περιοριστικό στέλεχος:



- 2) Για τον έλεγχο βιωσιμότητας του bait (SD/-Trp):



3) Για τον έλεγχο βιωσιμότητας των διπλοειδών ζυγωτών κυττάρων (SD/-Leu/-Trp)= DDO:



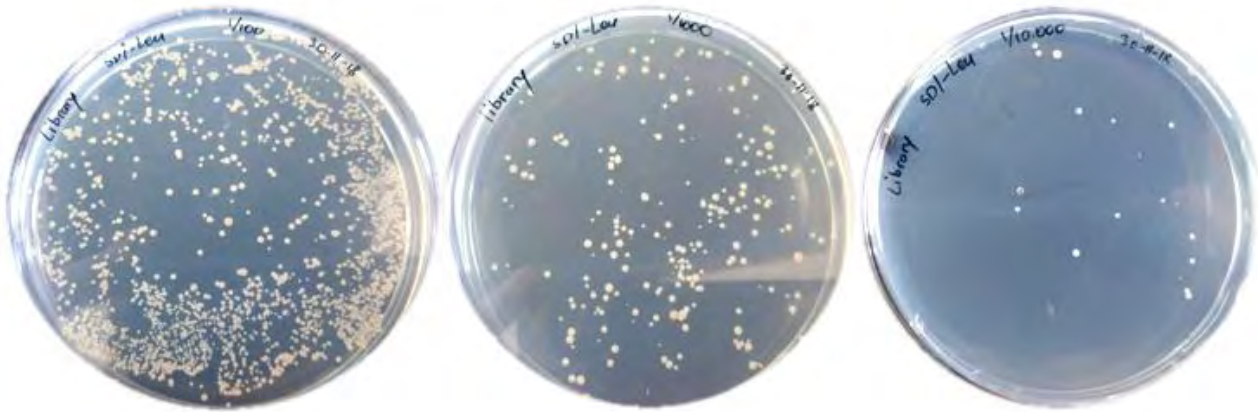
Η απόδοση του mating είναι αποτέλεσμα της βιωσιμότητας των διπλοειδών κυττάρων στα DDO τρυβλία (με αραιώση 1/1000) προς τη βιωσιμότητα των κυττάρων του limiting partner, δηλαδή εκείνου του μετασηματισμένου στελέχους μύκητα που ανέπτυξε λιγότερες αποικίες στο εκλεκτικό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (Y2HGold σε SD/-Leu ή του Y187 σε SD/-Trp). Με βάση τα αποτελέσματα όπως απεικονίζονται και στις παραπάνω εικόνες το περιοριστικό στέλεχος (limiting partner) ήταν το στέλεχος Y2HGold, καθώς στο τρυβλίο με τη μεγαλύτερη αραιώση (1/10000) εμφάνισε μικρότερο αριθμό ανάπτυξης αποικιών συγκριτικά με το στέλεχος Y187 στο αντίστοιχο τρυβλίο. Επιπροσθέτως για τον αριθμό βιωσιμότητας των διπλοειδών κυττάρων μελετάται εκείνο το τρυβλίο DDO με αραιώση 1/1000. Όμως τα αποτελέσματα του mating δεν εμφάνισαν καμία ανάπτυξη στο τρυβλίο (1/1000), παρά μόνο την ανάπτυξη 2 αποικιών στο τρυβλίο με αραιώση 1/10. Παρόλα αυτά οι αποικίες από τα 55 τρυβλία με εκλεκτικό θρεπτικό μέσο DDO/X/A συλλέχτηκαν όπως αναφέρθηκε παραπάνω και καταμετρήθηκαν αν και η απόδοση του mating ήταν αρκετά μικρή. Έπειτα πραγματοποιήθηκε και 2^η επανάληψη.

3.8 | Έλεγχος απόδοσης της 2^{ης} επανάληψης του mating:

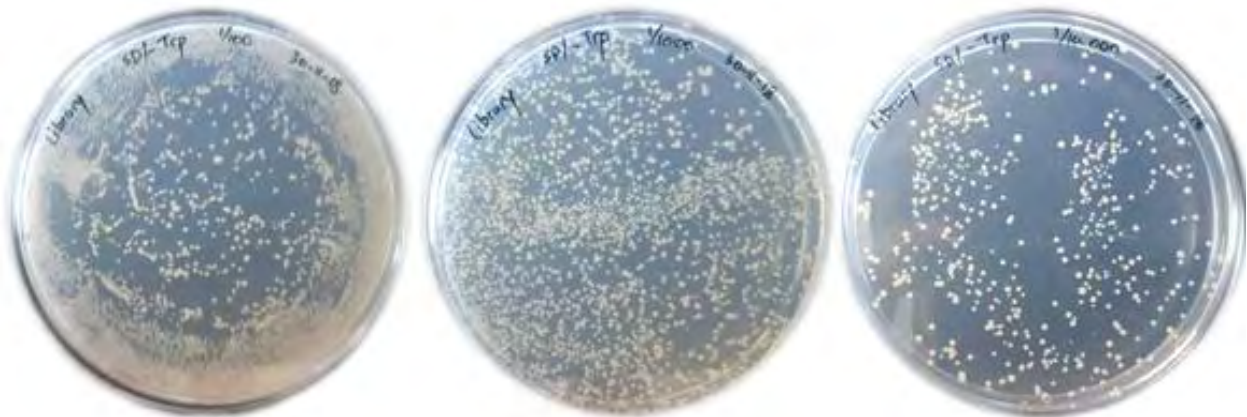
Η δεύτερη επανάληψη του mating πραγματοποιήθηκε ακριβώς με τα ίδια βήματα που έγινε και η πρώτη επανάληψη, με τη διαφορά ότι τα κύτταρα της καλλιέργειας του mating έμειναν για επώαση 24 αντί για 22h (εφόσον η φαινοτυπική μορφολογία των mickey mouse κάτω από το μικροσκόπιο ήταν καλύτερα ορατή). Τα κύτταρα της καλλιέργειας του mating στρώθηκαν σε εκλεκτικό μέσο TDO/Kan για να αναπτυχθούν (SD/-Trp/-Leu/-His με προσθήκη του αντιβιοτικού καναμυκίνη για να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις).

Οι απαραίτητες επιστρώσεις για τον υπολογισμό της απόδοσης έγιναν και πάλι σε τρυβλία SD/-Leu, SD/-Trp, SD/-Trp/-Leu και αποτελέσματα της απόδοσης φαίνονται στις παρακάτω εικόνες:

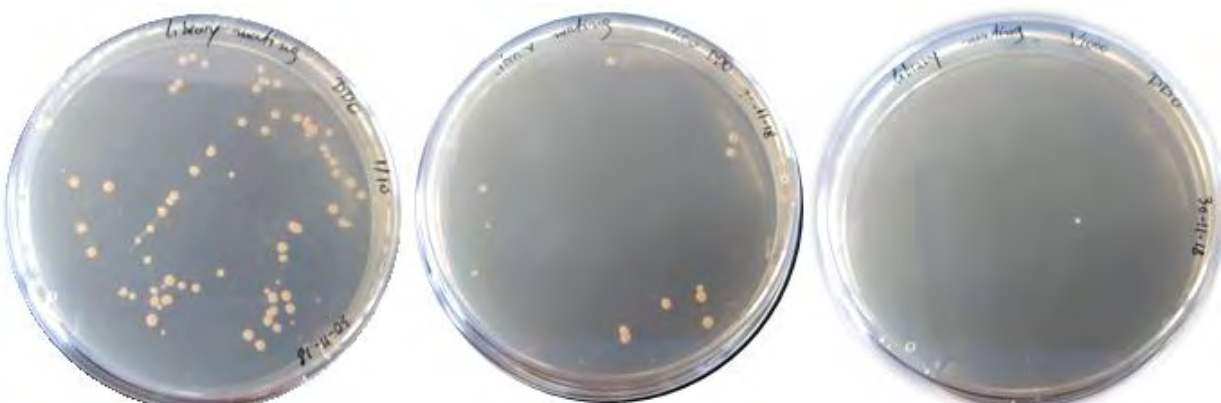
1) Για τον έλεγχο βιωσιμότητας του prey library (SD/-Leu): → περιοριστικό στέλεχος



2) Για τον έλεγχο βιωσιμότητας του bait (SD/-Trp) :



3) Για τον έλεγχο βιωσιμότητας των διπλοειδών ζυγωτών κυττάρων (SD/-Leu/-Trp)= DDO:



Ο αριθμός της απόδοσης της δεύτερης επανάληψης του mating ήταν μεγαλύτερος καθώς υπήρξε ανάπτυξη περισσότερων αποικιών στα DDO τρυβλία. Επιπλέον συγκρίνοντας πάλι τα τρυβλία SD/-Trp και SD/-Leu με αραιώση 1/10000 περιοριστικό στέλεχος αποτέλεσε και πάλι το στέλεχος Y2HGGold, καθώς εμφάνισε μικρότερο αριθμό ανάπτυξης αποικιών συγκριτικά με το στέλεχος

Υ187 στο αντίστοιχο τρυβλίο. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα ο αριθμός αποικιών των διπλοειδών κυττάρων είναι ίσος με 1 στην αρύωση 1/1000 στα DDO. Έτσι υπολογίστηκε η απόδοση σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Mating Efficiency} = \frac{\text{Number of diploids}}{\text{Number of limiting partner}} \times 100 = \frac{1 \times 10000}{18 \times 10^5} = 0,55\%$$

Συνολικά στα 55 τρυβλία με θρεπτικό μέσο TDO/kan συλλέχτηκαν **1089** αποικίες και μετά τη μεταφορά τους σε ένα πιο εκλεκτικό μέσο QDO/A καταμετρήθηκαν σε περίπου **1000** αποικίες.

4 | Συμπεράσματα – Συζήτηση

Για τη μελέτη αλληλεπίδρασης της LSK1 με άλλες πρωτεΐνες πραγματοποιήθηκε η ανάλυση δύο υβριδίων ζυμομύκητα (Y2H). Η χρήση του συστήματος απαιτούσε το μετασχηματισμό δύο διαφορετικών στελεχών μύκητα και έπειτα τη σύζευξη τους (yeast mating).

Για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής, ένα στέλεχος τύπου **a**, το Y2HGold μετασχηματίστηκε επιτυχώς με τον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7, συντηγμένο με την υπό μελέτη πρωτεΐνη LSK1. Ακολούθησαν πειράματα ελέγχου κυτταροτοξικότητας και αυτοενεργοποίησης των μετασχηματισμένων κυττάρων με την LSK1, για να διερευνηθεί αν η μελέτη αλληλεπιδράσεων της LSK1 είναι εφικτή μέσω του συστήματος Y2H. Τα πειράματα ελέγχου για τοξικότητα έγιναν με το μετασχηματισμό των κυττάρων Y2HGold με τον φορέα pGBKT7 συντηγμένο με τη LSK1, χρησιμοποιώντας ως control μετασχηματισμένα κύτταρα Y2HGold που είχαν μετασχηματιστεί με τον άδειο φορέα pGBKT7. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η LSK1 δεν προκαλεί μεταβολές στο μεταβολισμό των μετασχηματισμένων κυττάρων, καθώς δεν επηρέασε τη μορφολογία ούτε και το μέγεθος των κυττάρων, πάντα συγκρινόμενων με εκείνων που μετασχηματίστηκαν με τον άδειο φορέα. Για τον έλεγχο της αυτοενεργοποίησης της LSK1 διεξήχθησαν πειράματα για να ελεγχθεί αν η εισαγωγή της LSK1 με το pGBKT7 (που φέρει την DNA Binding Domain του GAL4) είναι ικανή να ενεργοποιήσει τα γονίδια αναφοράς που βρίσκονται καθοδικά της αλληλουχίας που δεσμεύεται ο GAL4 και η πρόσδεσή του ενεργοποιεί τη μεταγραφή τους. Για το λόγο αυτό αξιοποιήθηκαν 2 γονίδια αναφοράς, *AUR-C* και *MEL1*. Η έκφραση του *AUR-C* παράγει πρωτεΐνη που προσδίδει στον μύκητα ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό aureobasidin A, ενώ η έκφραση του *MEL1* παράγει την α-γαλακτοσιδάση που διασπά το χρωμογόνο υπόστρωμα X-a-gal. Έτσι, ακολούθησε μετασχηματισμός του Y2HGold με τον pGBKT7-LSK1 και επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία SD/-Trp/X/A (ο pGBKT7 κωδικοποιεί γονίδιο *Trp*). Στα τρυβλία δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών, που σήμαινε ότι τα κύτταρα δεν ήταν ικανά να αναπτυχθούν στο συγκεκριμένο εκλεκτικό θρεπτικό μέσο και άρα δεν εξέφραζαν τα γονίδια αναφοράς. Ως αρνητικά και θετικά control για επιβεβαίωση ότι η LSK1 δεν προκαλεί αυτοενεργοποίηση, χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία στα οποία είχε γίνει επίστρωση διπλοειδών κυττάρων έπειτα από συζεύξεις μαρτύρων όπως πρότεινε το πρωτόκολλο.

Σε ένα επόμενο στάδιο ακολούθησε μετασχηματισμός του δεύτερου στελέχους μύκητα Y187, τύπου **a**, με μία βιβλιοθήκη. Η βιβλιοθήκη αποτελούνταν από ds cDNAs που είχαν προκύψει από απομόνωση RNAs ριζικών ιστών αρτίβλαστων, ηλικίας 11 ημερών του *L. Japronicus*. Πρωτίστως τα αρτίβλαστα είχαν μολυνθεί με το ριζόβιο *M. loti*, και οι ιστοί των ριζών συλλέχθηκαν έπειτα από 3 ώρες που είχε γίνει η μόλυνση. Η εισαγωγή της ds cDNAs βιβλιοθήκης στα κύτταρα του στελέχους Y187 έγινε μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού με τη βοήθεια του πλασμιδιακού φορέα pGADT7, ο οποίος φέρει γονίδιο βιοσύνθεσης λευκίνης. Έτσι η κυτταρική πυκνότητα μετρήθηκε έπειτα από επίστρωση των μετασχηματισμένων κυττάρων (Y187-[pGADT7 -cDNA ενθέματα βιβλιοθήκης]) σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο SD/-Leu. Η μέτρηση των αποικιών έδειξε πυκνότητα κυττάρων 4×10^7 κύτταρα/ml.

Έπειτα διεξήχθησαν επιτυχώς τα πειράματα των συζεύξεων μαρτύρων (control matings) βάσει βιβλιογραφίας. Το θετικό control mating ήταν αποτέλεσμα σύζευξης Y187-[pGADT7 -T] x

Y2HGold-[pGBKT7-53] ενώ το αρνητικό control mating αποτέλεσε η σύζευξη Y187-[pGADT7 -T] x Y2HGold-[pGBKT7-Lam].

Τελικώς, έγιναν 2 ετεροχρονισμένες επαναλήψεις του mating μεταξύ Y187-[pGADT7-cdna ενθέματα βιβλιοθήκης] x Y2HGold-[pGBKT7-LSK1] για να ανιχνευτούν οι τυχόν αλληλεπιδράσεις. Από την πρώτη επανάληψη συλλέχθηκαν 183 αποικίες (χαρακτηρίστηκε με μικρή απόδοση) ενώ η δεύτερη επανάληψη έδειξε ποσοστό απόδοσης 0,55 % και συλλέχθηκαν 1089 αποικίες. Σε επόμενο στάδιο ακολούθησε μεταφορά των αποικιών σε αυστηρότερα εκλεκτικά θρεπτικά μέσα που θα ευνοούσε την ανάπτυξη εκείνων των αποικιών που η LSK1 αλληλεπιδρά σίγουρα με την τυχαία πρωτεΐνη και ενεργοποιείται η μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς. Έτσι η μεταφορά των αποικιών της πρώτης επανάληψης από DDO/X/A έγινε σε TDO/X/A και έπειτα σε QDO/A. Έτσι οι επιβιώσες αποικίες μειώθηκαν στις 115. Αντίστοιχα για την δεύτερη επανάληψη του mating έγινε επίστρωση σε αρχικά τρυβλία TDO/kan και έπειτα σε τρυβλία με QDO/A, που και πάλι ο αριθμός των αποικιών μειώθηκε στις 1000. Το αποτέλεσμα των μειωμένων αποικιών που επιβιώνουν, οφείλεται σε αρχικώς ψευδώς θετικές αποικίες που κατάφεραν να επιβιώσουν.

Στο πρωτόκολλο επισημαίνεται ότι η διαδικασία του mating, βάσει του συστήματος Y2H φέρει αποτελέσματα απόδοσης 2-5%. Οι δύο επαναλήψεις του mating αν και είχαν μικρότερη απόδοση από ότι προτείνεται στο πρωτόκολλο, παρόλα αυτά εμφάνισαν ανάπτυξη αποικιών στα εκλεκτικά θρεπτικά μέσα. Η απόδοση της αποτελεσματικότητας του mating πιθανώς να επηρεάστηκε από παράγοντες όπως:

- 1) την αναδίπλωση που υφίσταται στο κυτταρικό χώρο η υπό μελέτη πρωτεΐνη, LSK1, στο στέλεχος Y2HGold, που επιλέχτηκε να μετασχηματιστεί. Η LSK1 είναι μία φυτική πρωτεΐνη και ένα από τα μειονεκτήματα της εφαρμογής του Y2H συστήματος, είναι ότι δεν μπορεί να πιστοποιηθεί η σωστή αναδίπλωση αλλά και, η σταθερότητα της αναδίπλωσης της LSK1 εντός του κυττάρου ξενιστή.
- 2) την αρχή της μεθόδου του Y2H συστήματος, η οποία βασίζεται στη δημιουργία χιμαιρικών πρωτεϊνών, και συγκεκριμένα, στην παρούσα διπλωματική η LSK1 συντήχθηκε με την περιοχή δέσμευσης στο DNA του παράγοντα GAL4 (LSK1+BD_{GAL4}) ενώ παράλληλα τα ενθέματα της cDNA βιβλιοθήκης, καθένα από τα οποία συντήχθηκαν με την ενεργό μεταγραφικά περιοχή του παράγοντα GAL4 (cDNA ενθέματα βιβλιοθήκης+AD_{GAL4}). Η συνθετική σύντηξη πρωτεϊνών συνήθως δημιουργεί έναν πιθανό κίνδυνο μετατροπής της φυσιολογικής διαρρύθμισης των πρωτεϊνών που μελετώνται, γεγονός που ίσως επηρεάζει την ενεργότητα των πρωτεϊνών ή ακόμα και την ικανότητα να αλληλεπιδρούν.
- 3) την προσπάθεια εφαρμογής και εξέτασης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στους μύκητες που φυσιολογικά συμβαίνουν σε φυτικά κύτταρα. Η αλλαγή του περιβάλλοντος είναι πιθανό να αλλάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών και άρα να επηρεάζει το βαθμό των αλληλεπιδράσεων του δημιουργεί η LSK1. Επιπλέον, αρκετές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις εξαρτώνται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που δεν λαμβάνουν χώρα στα κύτταρα των μυκήτων, ή διαφέρουν. Σε αυτού του είδους τις τροποποιήσεις περιλαμβάνεται και η φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων των GSK3-like πρωτεϊνών, που όπως έχει ήδη αναφερθεί αποτελεί για πολλές σημαντική προϋπόθεση για την επίτευξη της αλληλεπίδρασης.

Τελικώς, τα συνολικά αποτελέσματα υποδεικνύουν πιθανές αλληλεπιδράσεις που δημιουργεί η LSK1 με τις πρωτεΐνες του *L. Japronicus*, μέσω εφαρμογής του συστήματος Y2H. Καθώς όμως η υπό μελέτη πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια των GSK3-like κινασών με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης, και ο ρόλος της ακόμα δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για το είδος και το σύνολο των αλληλεπιδράσεων που αυτή δημιουργεί.

Μελλοντικά Πειράματα:

- Κάθε συζευγμένη αποικία που αναπτύσσεται σε τριπλή ή τετραπλή επιλογή αντιπροσωπεύει την συνύπαρξη ενός cDNA κλώνου, το προϊόν της οποίας μπορεί ν' αλληλεπιδράσει με την LSK1, ωστόσο διαφορετικές αποικίες μπορούν να περιέχουν τον ίδιο κλώνο cDNA και άρα πάνω από μία αποικία από τις αποικίες που συλλέχθηκαν να αντιπροσωπεύουν την ίδια αλληλεπίδραση. Για την μοναδικότητα των αλληλεπιδράσεων πρέπει να ακολουθήσει PCR colony, ώστε να εξαλειφθούν τα πολλαπλά αντίγραφα κάθε πρωτεΐνης που μπορεί ν' αλληλεπιδρά με την LSK1.
- Σε ένα επόμενο στάδιο πρέπει να γίνει απομόνωση των πλασμιδίων από τα διπλοειδή κύτταρα των μυκήτων και να μετασχηματίσουν βακτηριακά στελέχη π.χ. *E.coli* για να ακολουθήσει η απομόνωσή τους.
- Είναι απαραίτητο να ακολουθήσει επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης μέσα στον μύκητα, οπότε θα πρέπει να γίνει συν-μετασχηματισμός της LSK1 με το αντίστοιχο AD/cDNA ένθεμα βιβλιοθήκης σε Y2HGold κύτταρα.
- Τελικώς, μετά την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης τα cDNA ενθέματα θα είναι έτοιμα να σταλούν για αλληλούχιση και ταυτοποίηση.

5 | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ali, A., Hoeflich, K. P., Woodgett, J. R., Gsk-, B. S. U., Zeste-white, D. D. S., Xgsk-, F. X., & Gsk-, I. V. M. (2001). Glycogen Synthase Kinase-3 : Properties , Functions , and Regulation.
2. Alon, L. T., Pietrokovski, S., Barkan, S., Avrahami, L., Kaidanovich-Beilin, O., Woodgett, J. R., ... Eldar-Finkelman, H. (2011). Selective loss of glycogen synthase kinase-3 α in birds reveals distinct roles for GSK-3 isozymes in tau phosphorylation. *FEBS Letters*, 585(8), 1158–1162. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.025>
3. Auerbach, D., & Stagljar, I. (n.d.). Protein – Protein Interaction Networks, 19–32.
4. Bax, B., Carter, P. S., Lewis, C., Guy, A. R., Bridges, A., Tanner, R., ... Reith, A. D. (2001). The structure of phosphorylated GSK-3 β complexed with a peptide, FRATtide, that inhibits β -catenin phosphorylation. *Structure*, 9(12), 1143–1152. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00679-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00679-7)
5. Bendixen C., Gangloff S., Rothstein R., A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions, *Nucleic Acids Research*, Vol. 22 (9): 1778-1779, 1994.
6. Bond, J. (2003). *Essential Fungal Genetics. D. MOORE AND L. N. FRAZER. Springer. 2002. 357 pages. ISBN 0 387 95367 1. Price. Genetical Research (Vol. 81).* <https://doi.org/10.1017/S0016672303216165>
7. Briones, E. R. and Mao, S. J. T. 1982. Association between polipoproteins A-I and A-II as evidenced by immunochemical approach. *Experientia* 38: 908–910.
8. Bruckner A., Polge C., Lentze N., Auerbach D., Schlattner U., Yeast Two-Hybrid, a powerful tool for systems biology, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 10: 2763-2788, 2009.
9. Caetano-anolus, G., & Gresshoff, P. M. (1991). PLANT GENETIC CONTROL OF NODULATION. *Annual Review of Microbiology*, 45(1), 345-382
10. Champion, A., Henry, Y., & Kreis, M. (2002). Expression Profiling of the Whole Arabidopsis Shaggy-Like Kinase Multigene Family by Real-Time Reverse, 130(October), 577-590. <https://doi.org/10.1104/pp.009175>.In
11. Chen, M., Chory, J. and Fankhauser, C. (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.* 38, 87–117
12. Chinnusamy, V., Schumaker, K., & Zhu, J. (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and speci ® city in abiotic stress signalling in plants, 55(395), 225-236. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh005>
13. Cohen, P., & Frame, S. (2001). TIMELINE: The renaissance of GSK3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(10), 769–776. <https://doi.org/10.1038/35096075>
14. Doble, B. W. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science*, 116(7), 1175–1186. <https://doi.org/10.1242/jcs.00384>
15. Dornelas, M. C., Lejeune, B., Dron, M., & Kreis, M. (1998). The Arabidopsis SHAGGY-related protein kinase (ASK) gene family: Structure, organization and evolution. *Gene*, 212(2), 249–257. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00147-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00147-4)
16. Dro, W. (2006). Two-hybrid protein – protein interaction analysis in Arabidopsis protoplasts : establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors, 890–900. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02731.x>
17. Etheridge, N., Chen, Y., & Schaller, G. E. (2005). Dissecting the ethylene pathway of Arabidopsis, 3(4).
18. Fan, L., Zhao, Z., & Assmann, S. M. (2004). Guard cells : a dynamic signaling model, (Figure 1). <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.07.009>
19. Fields, S. and Song, O. 1989. A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature* 340: 245–246.

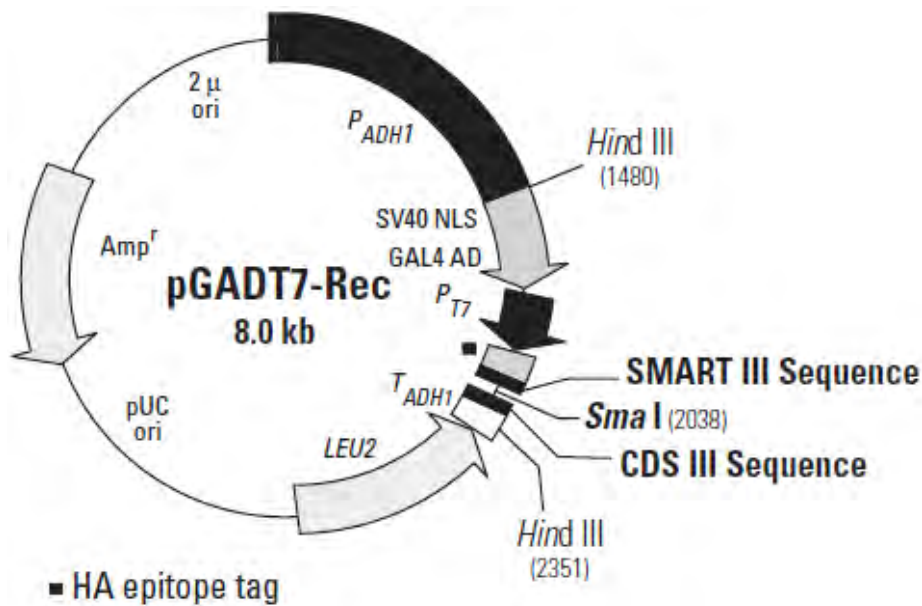
20. Forde, J. E., & Dale, T. C. (2007). Review Glycogen synthase kinase 3 : A key regulator of cellular fate, *64*, 1930-1944. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7045-7>
21. Frieden, C. 1971. Protein-protein interaction and enzymatic activity. *Annu. Rev. Biochem.* *40*: 653-696.
22. Fumiko, M., Koichi, I., Yumiko, S., & C., F. S. (2002). Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3β. *Journal of Neurochemistry*, *81*(5), 1073-1083. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00918.x>
23. Garagounis, C., Tsikou, D., Plitsi, P. K., Psarrakou, I. S., Avramidou, M., Stedel, C., ... Papadopoulou, K. K. (2018). Lotus Shaggy-like Kinase 1 is required to suppress nodulation in Lotus japonicus. *The Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/tpj.14207>
24. Giniger, E., Varnum, S., & Ptashne, M. (1985). Specific DNA Binding of GAL4 , A Positive Regulatory Protein of Yeast, *44*(April).
25. Graham, P. H., & Vance, C. P. (2014). Legumes : Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, *131*(March), 872-877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004.872>
26. Hartigan, J. A., Xiong, W., & Johnson, G. V. W. (2001). Glycogen Synthase Kinase 3 Is Tyrosine Phosphorylated by PYK2, *489*, 485-489. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4986>
27. Hawthorne, D. C. (1966). GALACTOSE PATHWAY ENZYMES I N YEAST¹ and PELROY A key feature of the bacterial systems which appears to be absent in the yeast, (September 1956), 911-916.
28. He, J., Gendron, J. M., Yang, Y., Li, J., & Wang, Z. (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1 , a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis, *99*(15), 10185-10190.
29. Herridge, D. F., Peoples, M. B., & Boddey, R. M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>
30. Herskowitz, I. R. A., & Of, T. (1988). Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *52*(4), 536-553.
31. Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S. E., Totty, N. F., & Woodgett, J. R. (1993). Modulation of the glycogen, *12*(2), 803-808.
32. Jaillais, Y., Hothorn, M., Belkhadir, Y., Dabi, T., Nimchuk, Z. L., Meyerowitz, E. M., & Chory, J. (2011). Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor, 232-237. <https://doi.org/10.1101/gad.2001911.possess>
33. Jonak, C., Beisteiner, D., Beyerly, J., & Hirt, H. (2000). Wound-Induced Expression and Activation of WIG , a Novel Glycogen Synthase Kinase 3, *12*(August), 1467-1475.
34. Jonak, C., Hirt, H., & Jonak, C. (2002). Glycogen synthase kinase 3 / SHAGGY-like kinases in plants : an emerging family with novel functions, *7*(10), 457-461.
35. Kaidanovich-beilin, O., & Woodgett, J. R. (2011). GSK-3 : functional insights from cell biology and animal models, *4*(November), 1-25. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00040>
36. Kameshita, I., Nishida, T., Nakamura, S., Sugiyama, Y., Sueyoshi, N., Umehara, Y., ... Tajima, S. (2005). Expression cloning of a variety of novel protein kinases in Lotus japonicus. *Journal of Biochemistry*, *137*(1), 33-39. <https://doi.org/10.1093/jb/mv1007>
37. Keegan, L., Gill, G., & Ptashne, M. (1986). Separation of DNA Binding from the Function of a Eukaryotic Regulatory Protein.
38. Kim, T., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Sun, Y., Wang, Z. (2010). NIH Public Access, *11*(10), 1254-1260. <https://doi.org/10.1038/ncb1970.Brassinosteroid>
39. Klotz, I. M., & Darnall, D. W. (1970). Quaternary structure of proteins.
40. Koroleva, O. A., Tomlinson, M., Parinyapong, P., Sakvarelidze, L., Leader, D., Shaw, P., & Doonan, J. H. (2004). CycD1 , a Putative G1 Cyclin from *Antirrhinum majus* , Accelerates the Cell Cycle in Cultured Tobacco BY-2 Cells by Enhancing Both G1 / S Entry and Progression through S and G2 Phases, *16*(September), 2364-2379. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023754.teristics>

41. Lesort, M., Jope, R. S., & Johnson, G. V. W. (1999). Insulin Transiently Increases Tau Phosphorylation : Involvement of Glycogen Synthase Kinase-3^α and Fyn Tyrosine Kinase.
42. Li, J., & Nam, K. H. (2002). Regulation of Brassinosteroid Signaling by a GSK3/SHAGGY-Like Kinase, 295, 1299-1300/ doi: 10.1126/science.1065769
43. Li, J., Nam, K. H., Vafeados, D., & Chory, J. (2001). BIN2 , a New Brassinosteroid-Insensitive Locus in Arabidopsis 1, 127(September), 14-22.
44. Lochhead, P. A., Kinstrie, R., Sibbet, G., Rawjee, T., Morrice, N., & Cleghon, V. (2006). A Chaperone-Dependent GSK3^β Transitional Intermediate Mediates Activation-Loop Autophosphorylation *Short Article*, 627-633. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.009>
45. Ma, J., & Ptashne, M. (1987). The CarboxyTerminal 30 Amino Acids of GAL4 Are Recognized by GAL80, 50, 137-142.
46. Mahadevant, S., & Struhl, K. (1990). Tc , an Unusual Promoter Element Required for Constitutive Transcription of the Yeast HIS3 Gene, 10(9), 4447-4455.
47. Make Your Own “Mate & Plate” Library System User Manual (PT4085-1), Clontech
48. Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual (PT4084-1), Clontech
49. Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198, 249-266.
50. Patel, P., & Woodgett, J. R. (2017). *Glycogen Synthase Kinase 3 : A Kinase for All Pathways ? Protein Kinases in Development and Disease* (1st ed., Vol. 123). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.11.011>
51. Pay, A., Jonak, C., & Bogrev, L. (1992). The MsKfamily of alfalfa protein kinase genes encodes and shows differential expression patterns in plant organs and development, 3(June), 847-856.
52. Pe, M., Ponce, R., & Micol, L. (2002). The UCU1 Arabidopsis Gene Encodes a SHAGGY / GSK3-like Kinase Required for Cell Expansion along the Proximodistal Axis, 173, 161-173. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0543>
53. Phizicky, E. M., & Fields, S. (1995). Protein-Protein Interactions : Methods for Detection and Analysis, 59(1), 94-123.
54. Qiu, A., Wu, J., Lei, Y., Cai, Y., Wang, S., Liu, Z., & Guan, D. (2018). CaSK23 , a Putative GSK3 / SHAGGY-Like Kinase of Capsicum annuum , Acts as a Negative Regulator of Pepper ’ s Response to *Ralstonia solanacearum* Attack, 21-23. <https://doi.org/10.3390/ijms19092698>
55. Rivas, J. D. Las, & Fontanillo, C. (2010). Protein - Protein Interactions Essentials : Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000807>
56. Rolland, F., & Sheen, J. (2005). Sugar sensing and signalling networks in plants, 269-271.
57. Rowland, O., Ludwig, A. A., Merrick, C. J., Baillieux, F., Tracy, F. E., Yoshioka, H., ... Jones, J. D. G. (2005). Functional Analysis of Avr9 / Cf-9 Rapidly Elicited Genes Identifies a Protein Kinase , ACIK1 , That Is Essential for Full Cf-9 - Dependent Disease Resistance in Tomato, 17(January), 295-310. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026013.2>
58. Ruel, L., Bourouis, M., Heitzler, P., Pantesco, V., & Simpson, P. (1993). Drosophila shaggy kinase and rat glycogen synthase kinase-3 have conserved activities and act downstream of Notch. *Nature*, 362(6420), 557-560. <https://doi.org/10.1038/362557a0>
59. Saidi, Y., Hearn, T. J., & Coates, J. C. (2012). Function and evolution of “green” GSK3/Shaggy-like kinases. *Trends in Plant Science*, 17(1), 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.10.002>
60. Tchieu, J. H., Fana, F., Fink, J. L., Harper, J., Nair, T. M., Niedner, R. H., ... Gribskov, M. (2003). The PlantsP and PlantsT Functional Genomics Databases, 31(1), 342-344. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg023>
61. Teige, M., Scheickl, E., Eulgem, T., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L., Carolina, N. (2004). The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in Arabidopsis, 15, 141-152.

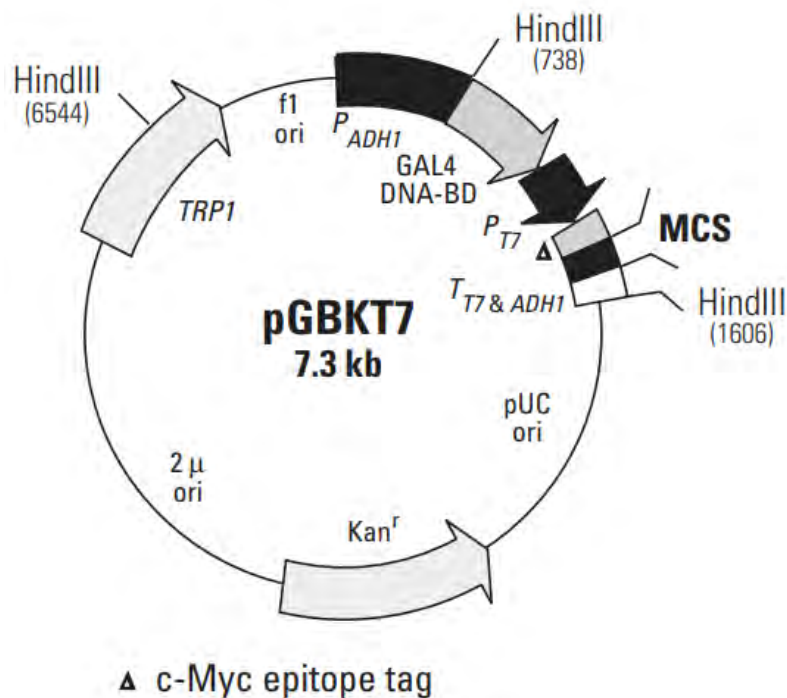
62. Ter Haar, E. (2006). The Crystal Structures of Glycogen Synthase Kinase 3. *Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) and Its Inhibitors: Drug Discovery and Development*, 105, 61–82. <https://doi.org/10.1002/0470052171.ch4>
63. Tsikou, D., Yan, Z., Holt, D. B., Abel, N. B., Reid, D. E., Madsen, L. H., Markmann, K. (2018). Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA, 6907(August), 1–8.
64. Wang, L., Yang, Z., Zhang, B., Yu, D., Liu, J., Gong, Q., Li, F. (2018). Genome-wide characterization and phylogenetic analysis of GSK gene family in three species of cotton : evidence for a role of some GSKs in fiber development and responses to stress, 1–21.
65. Woodgett, J. R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *The EMBO Journal*, 9(8), 2431–2438. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07419.x>
66. Woodgett, J. R., & Cohen, P. (1984). Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 788(3), 339–347. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(84\)90047-5](https://doi.org/10.1016/0167-4838(84)90047-5)
67. Wood-Kaczmar, A., Kraus, M., Ishiguro, K., Philpott, K. L., & Gordon-Weeks, P. R. (2009). An alternatively spliced form of glycogen synthase kinase-3 β is targeted to growing neurites and growth cones. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 42(3), 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.07.002>
68. Wrzaczek, M., Rozhon, W., & Jonak, C. (2007). A Proteasome-regulated Glycogen Synthase Kinase-3 Modulates Disease Response in Plants, 282(8), 5249–5255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610135200>
69. Xiao, W. (2005). *Yeast Protocols*, 313(July). <https://doi.org/10.1385/1592599583>
70. Yoo, M., Albert, V. A., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2006). 3 / SHAGGY-like kinase genes in plants, 14, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-3>
71. Youn, J., & Kim, T. (2014). Functional Insights of Plant GSK3-like Kinases : Multi-Taskers in Diverse Cellular Signal Transduction Pathways. *Molecular Plant*, 8(4), 552–565. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.006>
72. Zhao, J., Peng, P., Schmitz, R. J., Decker, A. D., Tax, F. E., & Li, J. (2002). Two Putative BIN2 Substrates Are Nuclear Components of Brassinosteroid Signaling 1, 130(November), 1221–1229. <https://doi.org/10.1104/pp.102.010918.pass>
73. Zhou, J., & Martin, G. B. (1995). The Tomato Gene Phil Encodes a Serine / Threonine Kinase That Is Phosphorylated by Pto and Is Involved in the Hypersensitive Response, 83, 925–935.

6 | ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

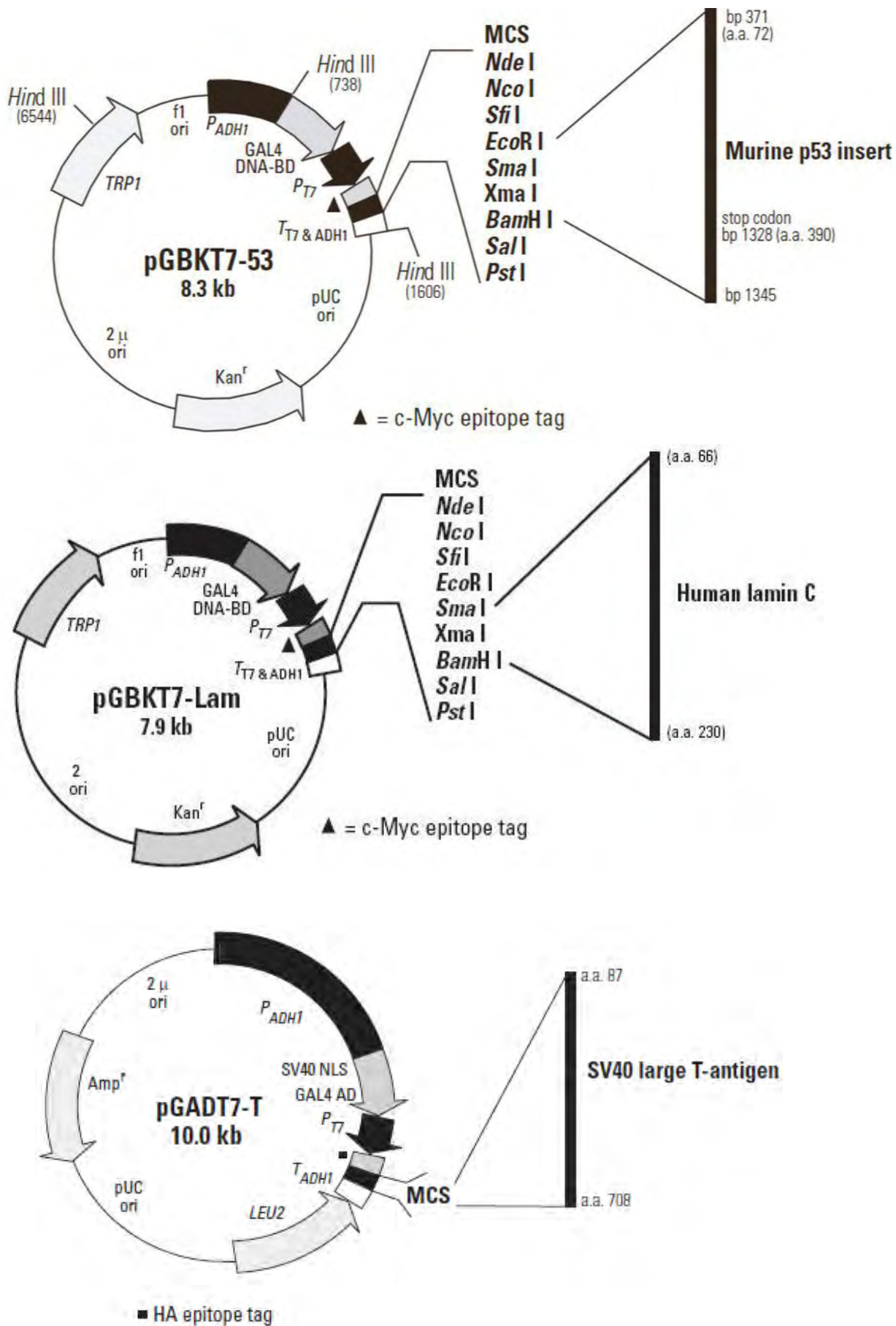
- Οι χάρτες των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό των στελεχών ζυμομύκητα.



Εικόνα 6.1| Χάρτης περιορισμού και περιοχές κλωνοποίησης του pGADT7-Rec. Εμφανίζεται μια μοναδική θέση περιορισμού (SmaI) με έντονους χαρακτήρες. Για τις ανάγκες τις παρούσας πτυχιακής χρησιμοποιήθηκε ο γραμμικός φορέας έπειτα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού SmaI (Mate & Plate" -Cat. Ap. 630490-). Η γραμμική μορφή του φορέα χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό του στελέχους 187 (MAT α) μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Διακρίνεται επίσης η περιοχή GAL4 AD καθώς και το γονίδιο *LEU2* που κωδικοποιεί για παραγωγή λευκίνης και καθιστά το μετασχηματισμένο στέλεχος αυξότροφο απουσία λευκίνης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.



Εικόνα 6.2| Χάρτης περιορισμού και περιοχές κλωνοποίησης του pGBKT7. Ο pGBKT7 ανασυνδυάστηκε με την υπό μελέτη πρωτεΐνη, LSK1, και έπειτα εισήχθη στο στέλεχος Y2HGGold (MAT α). Διακρίνεται η περιοχή DNA-BD του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 καθώς και το γονίδιο *TRP1* που κωδικοποιεί για παραγωγή τρυπτοφάνης και καθιστά το μετασχηματισμένο στέλεχος αυξότροφο απουσία της (PT3248-5 Cat. No. 630489-630443).



Εικόνα 6.3 | Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τις συζεύξεις μαρτύρων (control matings).

Πίνακας 6.1 | Πληροφορίες στελεχών ζυμομυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα πτυχιακή εργασία. Οι φαινότυποι και οι γενότυποι των Y2HGold και T187.

Strain	Genotype ^a	Reporters	Transformation Markers	Reference
Y2HGold ^{b, d}	<i>MATα</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2 :: GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-His3</i> , <i>GAL2_{UAS}-Gal2_{TATA}-Ade2</i> , <i>URA3 :: MEL1_{UAS}-Mel1_{TATA}</i> , <i>AUR1-C MEL1</i>	<i>AbA</i> , <i>HIS3</i> , <i>ADE2</i> , <i>MEL1</i>	<i>trp1</i> , <i>leu2</i>	Nguyen, unpublished
Y187 ^c	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>met-</i> , <i>URA3 :: GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-LacZ</i> , <i>MEL1</i>	<i>MEL1</i> , <i>LacZ</i>	<i>trp1</i> , <i>leu2</i>	Harper et al., 1993

^a Οι ανοδικές αλληλουχίες ενεργοποίησης *GAL1*, *GAL2* και *MEL1* (UASs) που αναγνωρίζονται και δεσμεύονται από τον *GAL4* BD. Οι μεταλλάξεις *trp1*, *his3*, *gal4* και *gal80* είναι ελλείψεις. Το *leu2-3*, 112 είναι μια διπλή μετάλλαξη.

^b Το στέλεχος Y2HGold είναι παράγωγο του στελέχους PJ69-2A (James et al., 1996). Απουσία *GAL4*, το Y2HGold δεν αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο με έλλειψη αδενίνης.

^c Η ενσωμάτωση του γονιδίου αναφοράς *LacZ* στο γονιδίωμα του ζυμομύκητα έγινε μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού.

^d Η ενσωμάτωση του γονιδίου αναφοράς *AUR1-C* στο γονιδίωμα του ζυμομύκητα έγινε μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού.

Πίνακας 6.2 | Πληροφορίες στελεχών ζυμομυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα πτυχιακή εργασία. Φαινοτυπική ανάπτυξη μυκήτων σε θρεπτικά εκλεκτικά μέσα.

Strain	SD/-Ade	SD/-His	SD/-Leu	SD/-Trp	SD/-Ura
Y2HGold	-	-	-	-	+
Y187	-	-	-	-	+
Y2HGold [pGBKT7-53]	-	-	-	+	+
Y187 [pGADT7-T]	-	-	+	-	+
Control Diploid ¹	+	+	+	+	+

Diploid strain : Y2HGold-[pGBKT7-53] x Y187-[pGADT7-T].

