



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΥΕΒΙΝΓΕΝ
ΚΕΝΤΡΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ



Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ COP9
SIGNALOSOME ΣΤΗΝ
ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
ΚΑΤΟΠΙΝ ΕΝΤΟΛΗΣ ΤΟΥ
ΓΙΒΒΕΡΙΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ
ΦΥΤΟ *Arabidopsis thaliana*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΥΡΖΙΟΥ ΑΜΑΛΙΑ-ΙΩΑΝΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
SCHWESCHNEIMER CLAUS
ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ

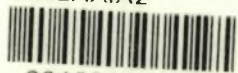
ΛΑΡΙΣΑ 2005



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4648/1
Ημερ. Εισ.: 2-11-2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΜΥΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087867

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα πρώτα από όλα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Κωνσταντίνο Σταθόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε από την αρχή έως και το τέλος αυτής της διπλωματικής εργασίας. Ήταν ο άνθρωπος που με δικό του κόστος με προετοίμασε για την διπλωματική μου εργασία και προσέφερε κάθε είδους βοήθεια κατά τη διάρκειά της. Άλλωστε η ίδια η διπλωματική στηρίχθηκε σε προσωπική γνωριμία του ιδίου. Πολύ σημαντική ήταν η βοήθεια του κυρίου Κ. Σταθόπουλου και στη συγγραφή του κειμένου της διπλωματικής που με τις συμβουλές του τελικά προέκυψε το κείμενο αυτό. Πρέπει να σημειωθεί πως ο κύριος Κ. Σταθόπουλος δεν ήταν δίπλα μας μόνο κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μας ή λίγο πριν και με τον πληθυντικό εννοώ όλους τους φοιτητές της σχολής μας. Ήταν και είναι ένα άτομο με την πόρτα του πάντα ανοιχτή για οποιοδήποτε πρόβλημα, επιστημονικό ή μη, μας απασχολεί. Προσπαθεί πάντα να δώσει ώση στους φοιτητές έτσι ώστε να μπου με αυτοπεποίθηση και εφόδια στην επιστημονική κοινότητα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω εγκάρδια τον κύριο Claus Schwechheimer ηγέτη ερευνητικής ομάδας στο τμήμα Αναπτυξιακής Γενετικής του Κέντρου Μοριακής Βιολογίας Φυτών στο Πανεπιστήμιο Tuebingen όπου πραγματοποιήθηκε η διπλωματική μου εργασία. Εξόδευε επτά ημέρες την εβδομάδα ατελείωτες ώρες στο εργαστήριο έτσι ώστε να μην είναι ούτε μια μέρα μη παραγωγική. Η προσφορά του δεν ήταν μόνο τεχνική. Εξαιρετικά σημαντική ήταν η συμβολή του στο θεωρητικό υπόβαθρο της εργασίας όντας πάντα διαθέσιμος να απαντήσει σε ερωτήσεις κάθε επιπέδου και αντικειμένου (βιοχημικού, αναπτυξιακού, φυσιολογίας, γενετικού). Ο προγραμματισμός του ιδίου και της ομάδας του ήταν εντυπωσιακότατος σε καθημερινή, εβδομαδιαία και μηνιαία βάση και ζηλευτός πιστεύω από πολλές αντίστοιχες ομάδες στην Ελλάδα. Πραγματικά χρήσιμη ήταν και η συμβολή του στη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας όταν ακόμα βρισκόμουν στην Γερμανία όπου της δόθηκε σχεδόν η μορφή που έχετε στα χέρια σας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το Κέντρο Μοριακής Βιολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Tuebingen και τον Διευθυντή του Τμήματος Αναπτυξιακής Γενετικής κύριο Gerd Juergens που δέχτηκε να πραγματοποιήσω την εργασία μου στο τμήμα του. Επίσης ευχαριστώ το Γραφείο Ευρωπαϊκών Προγραμμάτων του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την κυρία Πηνελόπη Δάλλη για την προθυμία της να μας βοηθήσει με τη γραφειοκρατία. Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κύριο Ζήση Μαμούρη

για την συγκατάθεσή του στην εκπόνηση της εργασίας μου στο εξωτερικό .

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Esther Dohmann που με είχε υπό την επίβλεψή της αυτούς τους τρεις μήνες που διήρκεσε η εργασία και τους: Dr. Melina Zourelidou, Dr. Hanbing Li, Dr. Andreas Maier, Luz-Irina Allejandróna Calderón Villalobos, Katja Schwager μέλη της ομάδας του κυρίου C. Schwechheimer και την κυρία Carola Kuhnle, την πολύ συμπαθή και χρήσιμη τεχνικό του εργαστηρίου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	8
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	9
Βιολογικά υλικά.....	9
Αποστείρωση Σπόρων.....	10
Επιλογή Φυτών με τη Βοήθεια Αντιβιοτικού.....	11
Ανοσοαποτύπωση.....	11
Ανοσοφθορισμός (Immunostaining).....	13
Απομόνωση Γενετικού Υλικού.....	15
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	16
Χρώση β-γλουκουρονιδάσης GUS.....	18
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	20
Ανοσοκατακρήνιση SCF ^{SLY1} , CSN ΚΑΙ 26S πρωτεοσώματος.....	20
Ο ρόλος του CSN στην αποικοδόμηση της πρωτεΐνης RGA.....	22
Ο ρόλος του CSN στην αποικοδόμηση της GAI:GFP πρωτεΐνης.....	26
Η σημασία του CSN στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης του GA.....	27
Η σημασία του CSN και των πρωτεϊνών RGA και GAI για την ανάπτυξη των φυτών.....	33
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	37
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	40

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το COP9 signalosome (CSN) είναι ένα συντηρημένο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα οκτώ υπομονάδων και εικάζεται πως ρυθμίζει θετικά την αποικοδόμηση πρωτεϊνών μέσω του 26S πρωτεοσώματος. Το CSN έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με E3 λιγάσες της ουβικιτίνης που περιέχουν πρωτεΐνες cullin σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στα φυτά έχει ήδη δειχθεί η αλληλεπίδραση του CSN με τρία διαφορετικά E3 ένζυμα, το SCFTIR1, το SCFCO11 και το SCFUFO. Στόχος των πειραμάτων ήταν να συνδεθεί η λειτουργία του CSN με την SCFSLY1, μια E3 λιγάση που εμπλέκεται στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνικών μεταγωγικών παραγόντων RGA και GAI downstream του γιββεριλλικού οξέος. Χρησιμοποιώντας την τεχνική του ανοσοφθορισμού και της μικροσκοπίας φθορισμού δείχθηκε ότι οι πρωτεΐνες RGA και GAI συσσωρεύονται σε CSN μεταλλάγματα. Χαρακτηρίστηκαν επίσης διαγονιδιακές γραμμές φυτών που εξέφραζαν τη σεσημασμένη πρωτεΐνη HA-SLY1 για τη μελλοντική συγκατακρήμνιση των CSN-SCFSLY1. Χαρακτηρίστηκε μια γραμμή μάρτυρας για την παρακολούθηση της μεταγωγής του σήματος του γιββεριλλικού οξέος στα φυτά *Arabidopsis thaliana* και την αντίστοιχη συμπεριφορά των CSN μεταλλαγμάτων. Τέλος χαρακτηρίστηκαν γενετικά διασταυρώσεις φυτών που έγιναν με στόχο την δημιουργία τριπλών μεταλλαγμάτων CSN, RGA, GAI με στόχο τη διαλεύκανση των σχέσεων μεταξύ τους όσον αφορά την ανάπτυξη του φυτού.

ABSTRACT

The COP9 Signalosome (CSN) is an evolutionary conserved 8 subunit protein complex with a proposed role as a positive regulator of protein degradation via the ubiquitin proteasome pathway. CSN has been shown to interact with cullin-containing E3 ubiquitin ligases in numerous eukaryotic organisms. In plants, an interaction with three different E3 complexes, namely SCFTIR1, SCFCO11 and SCFUFO has been demonstrated. The aim of the experiments was to link CSN function to SCFSLY1, an E3 complex that mediates the degradation of the gibberellic acid signal transduction proteins RGA and GAI. Using immunostaining and confocal microscopy, it was shown that RGA and GAI accumulate in CSN mutants. Second, I

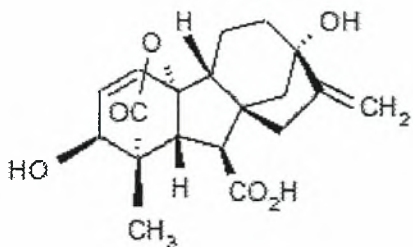
contributed to the characterization of transgenic lines expressing epitope-tagged SLY1 protein for future SCFSLY1-CSN co-immunoprecipitation experiments. Third, I characterized a reporter line for GA signalling in Arabidopsis and examined its behaviour in CSN mutant backgrounds. Finally, I genotyped genetic crosses aiming at the identification of CSN gai rga triple loss-of-function mutants to examine the genetic interaction between CSN, RGA and GAI.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως και σε όλους τους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς έτσι και στα φυτά η αύξηση και ανάπτυξή τους ελέγχεται από ορμόνες. Από το 1880 ακόμα και τις δημοσιεύσεις του Darwin και του γιου του είναι γνωστό πως υπάρχει στενή σχέση μεταξύ κορυφής και του υποκείμενου τμήματος του βλαστού σε ότι αφορά την αύξηση. Επικράτησε η άποψη πως για την επιμήκυνση του βλαστού υπεύθυνη είναι μια ουσία που παράγεται στην κορυφή του κολεόπτιλου και μεταφέρεται μέχρι το κάτω άκρο του φυτού. Αργότερα διαπιστώθηκε πως αυτή η ουσία, που ονόμασαν αυξίνη λόγω των επιδράσεών της στα φυτά, υπάρχει σε όλους τους ανώτερους φυτικούς οργανισμούς και αποτελεί μια φυτική ορμόνη.

Ο όρος ορμόνη χρησιμοποιήθηκε πρώτα από τους φυσιολόγους ζώων. Από τότε όμως που άρχισε να διαφαίνεται πως και τα φυτά χρησιμοποιούν ορμόνες για τον έλεγχο της αύξησης και ανάπτυξής τους χρησιμοποιείται και από τους φυσιολόγους φυτών. Ως φυτικές ορμόνες ορίζονται αντίστοιχα τα οργανικά συστατικά, τα οποία παράγονται σε έναν ιστό και δρουν σε κάποια απόσταση από το σημείο προέλευσής τους. Οι περισσότερες φυτικές ορμόνες είναι οργανικά οξέα και είναι υπεύθυνες για τη διαίρεση, επιμήκυνση και διαφοροποίηση των κυττάρων καθώς και για το σχηματισμό και την αύξηση των οργάνων. Οι κύριες ορμόνες που επηρεάζουν την αύξηση των φυτών είναι οι αυξίνες, οι κυτοκινίνες, το αψιζινικό οξύ, το αιθυλένιο και οι γιββεριλλίνες [1].

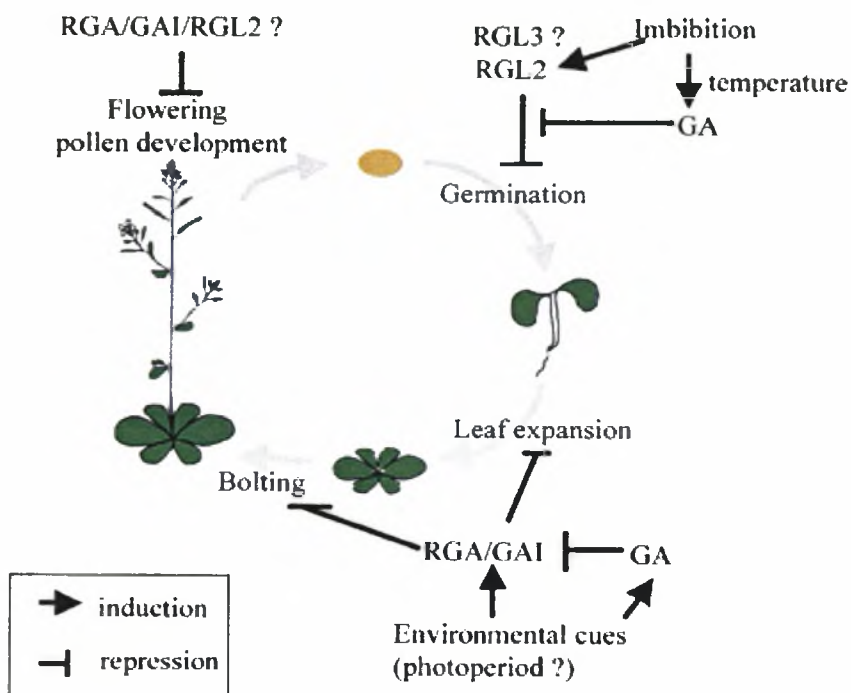
Κύριο αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας ήταν το γιββεριλλικό οξύ (GA ή GA₃). Τα γιββεριλλικά οξέα έχουν 20 ή 19 άτομα άνθρακα οργανωμένα σε δακτυλίους ίδιούς με αυτούς των διτερπενικών οξέων. Η ενεργός μορφή που συναντάται στο μεγαλύτερο ποσοστό των φυτών έχει 19 άτομα άνθρακα και χημική δομή που φαίνεται στην **εικόνα 1** και ονομάζεται GA₃ για λόγους ευκολίας όμως στο εξής θα συμβολίζεται απλά GA. Η φυσιολογική επίδραση του GA στα φυτά είναι η επιμήκυνση του βλαστού τους μέσω της επιμήκυνσης των κυττάρων που τον δομούν και η ώθηση των κυττάρων σε διαίρεση ιδιαίτερα στα μεριστώματα [1]. Επίσης σημαντικές είναι οι επιδράσεις της ορμόνης στη γονιμότητα, τη βλάστηση και την άνθιση [3].



Εικόνα 1: χημική δομή του ενεργού γιββεριλικού οξέος GA₃ έτσι όπως υπάρχει μέσα στα φυτά [6].

Σε φυτά που έχουν λόγω κάποιας μετάλλαξης μικρό μήκος βλαστού, είναι δηλαδή νάνα (καλαμπόκι, μπιζέλι, φασόλι), η προσθήκη ενεργού GA έχει ως αποτέλεσμα τη φυσιολογική αύξηση των φυτών. Βέβαια το μικρό μέγεθος για να είναι αναστρέψιμο με απλή χορήγηση της ορμόνης πρέπει να οφείλεται σε γενετική μετάλλαξη που επιφέρει αδυναμία βιοσύνθεσης ενδογενούς GA, λόγω βλάβης σε κάποιο από τα βιοσυνθετικά ένζυμα, που είναι εύκολο να επιβεβαιωθεί με μια μέτρηση της περιεκτικότητας των φυτών σε GA. Τα φυτά αυτά ονομάζονται αλλιώς και *gal-3*.

Συγκεκριμένα στα παραπάνω φυτά συσσωρεύονται όπως αποδείχτηκε αργότερα κάποιες πρωτεΐνες που ονομάζονται GAI (GA-Insensitive) και RGA (Repressor of GA) οι οποίες είναι αναστολείς του σηματοδοτικού μονοπατιού του GA και αναχαιτίζουν την φυσιολογική αύξηση του βλαστού των φυτών. Στα αγρίου τύπου φυτά το ίδιο το GA με έναν ως τώρα άγνωστο σε μεγάλο βαθμό μηχανισμό προωθεί την αποικοδόμησή τους επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την επιμήκυνση του βλαστού (**εικόνα 2**). Σημαντική απόδειξη των παραπάνω προήλθε από πειράματα κατά τα οποία η τεχνητή αφαίρεση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες GAI και RGA σε *gal-3* φυτά έφερε ως αποτέλεσμα τη φυσιολογική αύξηση των φυτών και ανέτρεψε πλήρως το νάνο φαινότυπο των φυτών [27,24,13,20].



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου ανάπτυξης του φυτού *Arabidopsis thaliana* και ο ρόλος που παίζουν το GA και οι πρωτεΐνες RGA και GAI ανάμεσα σε άλλους παράγοντες [5,22].

Οι πρωτεΐνες GAI και RGA μοιράζονται 82% ομοιότητα στην αλληλουχία των γονιδίων που τις κωδικοποιούν. Ανήκουν και οι δυο στην ευρύτερη φυτοειδική οικογένεια γονιδίων και κατά επέκταση πρωτεϊνών GRAS (GAI, RGA, SCARECROW) που στο σύνολό τους παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στα φυτά. Χαρακτηριστικό όλων των πρωτεϊνών που τις κατατάσσει σε αυτή την οικογένεια είναι οι αυστηρά συντηρημένες αμινοξικές αλληλουχίες τους στο κέντρο (VHIIID) και στο καρβοξυτελικό τους άκρο (RVER). Η λειτουργικότητά τους μάλλον οφείλεται στις διάφορες αλληλουχίες του αμινοτελικού άκρου [26,27,15,16,8].

Οι πρωτεΐνες GAI και RGA εμπεριέχουν κάποια χαρακτηριστικά μεταγραφικών παραγόντων όπως ομοπολυμερή σερίνης και θρεονίνης, επαναλήψεις επτάδων λευκίνης και πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού NLS (Nuclear localization signals). Πιστεύεται όμως ότι οι GAI και RGA πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με ή/και ενεργοποιούν κάποιους άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για να μεταβιβάσουν το σήμα τους και να επάγουν ή να αναστείλουν τη μεταγραφή κάποιων γονιδίων στόχων, αφού καμία από τις δυο πρωτεΐνες δεν

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ COP9 SIGNALOSOME ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΤΟΥ ΓΙΒΒΕΡΙΑΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ *Arabidopsis thaliana*

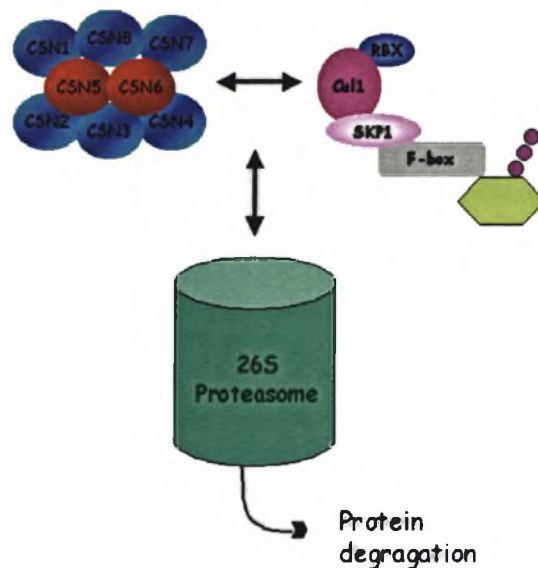
περιέχει περιοχή άμεσης πρόσδεσης με το DNA [2,20,15,16,14,13,8].

Στο αμινοτελικό άκρο των δύο αυτών πρωτεϊνών εντοπίζεται μια επίσης συντηρημένη αλληλουχία αμινοξέων DELLA. Η ικανότητα των πρωτεϊνών αυτών να ενεργοποιούνται και να μετάγουν μια απάντηση στο GA πιστεύεται πως οφείλεται σε αυτή την ακολουθία αφού διαγραφή 51 βάσεων εντός αυτής στην πρωτεΐνη GAI έχει ως αποτέλεσμα φυτά τα οποία δεν ανταποκρίνονται κατάλληλα στο GA (GA insensitive mutants) με την ονομασία *gai-1*. Αυτή η μετάλλαξη λοιπόν είναι υπεύθυνη για το γεγονός ότι το GA δεν δύναται να αναστείλει τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης GAI [4,14,16,13].

202AKRRDNRQFGRLR.....	31
602IKRRDNRQFGRLR.....	31
802EKRRDNRQFGRLR.....	30
.....		
160AKRRDNRQFGRLR.....	63
642IKRRDNRQFGRLR.....	64
802EKRRDNRQFGRLR.....	69
.....		
160AKRRDNRQFGRLR.....	193
642IKRRDNRQFGRLR.....	98
802EKRRDNRQFGRLR.....	209
.....		
202AKRRDNRQFGRLR.....	361
602IKRRDNRQFGRLR.....	137
11694KRRDNRQFGRLR.....	29
802EKRRDNRQFGRLR.....	250
11695KRRDNRQFGRLR.....	49
.....		
802EKRRDNRQFGRLR.....	325
642IKRRDNRQFGRLR.....	372
11694KRRDNRQFGRLR.....	64
802EKRRDNRQFGRLR.....	399
11695KRRDNRQFGRLR.....	59
.....		
202AKRRDNRQFGRLR.....	272
602IKRRDNRQFGRLR.....	218
11694KRRDNRQFGRLR.....	118
802EKRRDNRQFGRLR.....	143
11695KRRDNRQFGRLR.....	149
.....		
160AKRRDNRQFGRLR.....	325
642IKRRDNRQFGRLR.....	263
11694KRRDNRQFGRLR.....	160
802EKRRDNRQFGRLR.....	323
11695KRRDNRQFGRLR.....	194
.....		
160AKRRDNRQFGRLR.....	363
642IKRRDNRQFGRLR.....	309
11694KRRDNRQFGRLR.....	207
802EKRRDNRQFGRLR.....	437
11695KRRDNRQFGRLR.....	344
.....		
802AKRRDNRQFGRLR.....	419
642IKRRDNRQFGRLR.....	327
11694KRRDNRQFGRLR.....	268
802EKRRDNRQFGRLR.....	481
11695KRRDNRQFGRLR.....	290
.....		
802AKRRDNRQFGRLR.....	496
642IKRRDNRQFGRLR.....	400
11694KRRDNRQFGRLR.....	394
802EKRRDNRQFGRLR.....	525
11695KRRDNRQFGRLR.....	335
.....		
802AKRRDNRQFGRLR.....	560
642IKRRDNRQFGRLR.....	450
11694KRRDNRQFGRLR.....	334
802EKRRDNRQFGRLR.....	574
11695KRRDNRQFGRLR.....	384
.....		
802AKRRDNRQFGRLR.....	593
642IKRRDNRQFGRLR.....	506
11694KRRDNRQFGRLR.....	375
802EKRRDNRQFGRLR.....	622
11695KRRDNRQFGRLR.....	426
.....		
802AKRRDNRQFGRLR.....	597
642IKRRDNRQFGRLR.....	532
802EKRRDNRQFGRLR.....	498
11695KRRDNRQFGRLR.....	439

Εικόνα 3: Ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών RGA και GAI (δύο πρώτες σειρές) και άλλων της οικογενείας τους [8].

Ο τρόπος με τον οποίο αναστέλλει τη δραστηριότητα των GAI και RGA το GA είναι απλά η μείωση των επιπέδων τους στα κύτταρα και κατά επέκταση σε ολόκληρο το φυτό. Το ίδιο το GA σηματοδοτεί τη δέσμευση των πρωτεϊνών από το σύμπλεγμα SCF (Skip-Cullin-F-box protein) το οποίο έχει δράση E3 λιγάσης της ουβικιτίνης όπως φαίνεται στο **εικόνα 4**. Τα SCF συμπλέγματα συναντώνται πολύ συχνά και αποτελούν βασικό μοχλό του συστήματος της αποικοδόμησης πρωτεϊνών μέσω του 26S πρωτεοσώματος. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα περίπου 700 διαφορετικά τέτοια συμπλέγματα. Ρόλος του SCF συμπλέγματος είναι να παραλαμβάνει τις σημασμένες με μόρια ουβικιτίνης προς αποικοδόμηση πρωτεΐνες από τα ενζυμικά συστήματα E2, να προσθέτει επιπλέον μόρια ουβικιτίνης και με κάποιο τρόπο να τα παραδίδει στο πρωτεόσωμα όπου και στη συνέχεια αποικοδομούνται [29,22].



Εικόνα 4: Αποικοδόμηση πρωτεϊνών μέσω του συστήματος CSN-SCF-26S Proteasome

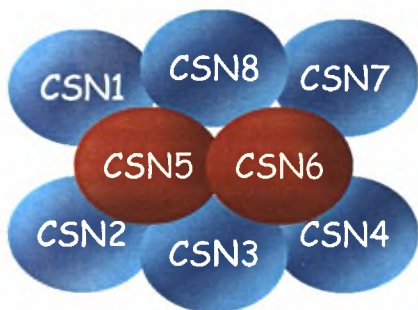
Η πρωτεΐνη cullin είναι υπεύθυνη για την παραλαβή της πρωτεΐνης-υπόστρωμα από τα E2 συμπλέγματα και για την αλληλεπίδραση με το 26S πρωτεόσωμα και μάλλον και το σύμπλεγμα COP9 signalosome (CSN) που μας ενδιαφέρει στο οποίο και θα εντρυφήσουμε αργότερα. Στην αλληλεπίδραση της cullin με τα E2 συμπλέγματα φαίνεται να βοηθά μια άλλη πρωτεΐνη του συμπλέγματος η RING-finger domain protein Rbx1 συνδέοντας το καρβοξυτελικό άκρο της cullin με το E2 σύμπλεγμα [29,17].

Η πρωτεΐνη F-box είναι αυτή που δεσμεύει την πρωτεΐνη-υπόστρωμα που προορίζεται για αποικοδόμηση και συνδέεται με το σύμπλεγμα SCF μέσω της SKIP1 στο αμινοτελικό άκρο της cullin. Είναι αρκετά εξειδικευμένη ως προς τα υποστρώματά της. Σχεδόν για κάθε πρωτεΐνη που αποικοδομείται μέσω του 26S πρωτεοσώματος υπάρχει και μία F-box πρωτεΐνη για αυτό το λόγο και υπάρχουν τόσο πολλά SCF συμπλέγματα. Οι υπόλοιποι συντελεστές του συμπλέγματος παραμένουν σταθεροί.

Η F-box πρωτεΐνη που προσδένει τις πρωτεΐνες GAI και RGA ονομάζεται SLEEPY1 (SLY1) επειδή τα φυτά που δεν την εκφράζουν δεν αναπτύσσονται κανονικά και μοιάζουν σα να κοιμούνται. Η αδυναμία ανάπτυξής τους οφείλεται στο γεγονός ότι ελλείψει της πρωτεΐνης SLY1 δεν σχηματίζεται το σύμπλεγμα SCF^{SLY1} και είναι αδύνατη η πλήρης αποικοδόμηση των πρωτεϊνών GAI και RGA που όπως είπαμε αναστέλλουν την ανάπτυξη των φυτών όταν συσσωρεύονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα κύτταρα. Το παραπάνω δείχθηκε με ένα πείραμα διασταύρωσης *sly1-10* μεταλλαγμάτων (που είναι αυτά τα οποία δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη SLY1) με μεταλλάγματα *rga-24* (που εκφράζουν μη λειτουργικές RGA πρωτεΐνες). Τα διπλά μεταλλάγματα είχαν σχεδόν κανονικό ύψος σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά του οικότυπου Landsberg. Η μετάλλαξη *rga-24* λοιπόν διασώνει το φαινότυπο των *sly1-10* μεταλλαγμάτων, μόνο όμως όσον αφορά στην επιμήκυνση του βλαστού και όχι τη βλάστηση και τη γονιμότητα [3,22].

Πρέπει να σημειώσουμε σε αυτό το σημείο ότι υπάρχουν τρεις οικότυποι αγρίου τύπου φυτών *Arabidopsis thaliana* (Columbia, Landsberg και Wasileukajia). Υπάρχουν κάποιες πολύ μικρές διαφορές μεταξύ τους σε φυσιολογικό επίπεδο, οι οποίες όμως μπορούν να ανιχνευτούν και γονιδιακά. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι δυο πρώτοι οικότυποι.

Το σύμπλεγμα SCF δεν είναι ικανό να οδηγήσει από μόνο του τις πρωτεΐνες στο 26S πρωτεόσωμα. Χρειάζεται να τροποποιηθεί κατάλληλα από ένα άλλο σύμπλεγμα το COP9 signalosome ή εν συντομία CSN. Το σύμπλεγμα αυτό αποτελείται από 8 πρωτεϊνικές υπομονάδες οι οποίες κωδικοποιούνται από 9 γονίδια [9]. Μια από τις πιο σημαντικές υπομονάδες φαίνεται να είναι η CSN5 [9,10,11,12,21]. Η υπομονάδα αυτή έχει προταθεί ότι είναι υπεύθυνη για την τροποποίηση του συμπλέγματος SCF και για αυτό το λόγο καθιστά όλο το σύμπλεγμα μάλλον ιδιαίτερα σημαντικό για την αποικοδομητική διαδικασία. Έχει επίσης δειχθεί με πως η υπομονάδα αυτή προκαλεί μια μετατροπή στην πρωτεΐνη cullin του συμπλέγματος SCF (neddylation-deneddylation) και μέσω αυτής το σύμπλεγμα SCF δύναται να προσδεθεί στο 26S πρωτεόσωμα και να απελευθερώσει μέσα σε αυτό την πρωτεΐνη προς αποικοδόμηση [10,11,21].



Εικόνα 5: σχηματική απεικόνιση του συμπλέγματος COP9 signalosome όπου διακρίνονται οι 8 υπομονάδες

Η υπομονάδα CSN5 κωδικοποιείται από 2 αλληλόμορφα. Μεταλλάξεις στο αλληλόμορφο *CSN5b* δεν επηρεάζουν τον φαινότυπο των φυτών. Αντίθετα μεταλλάξεις στο αλληλόμορφο *CSN5a* προκαλούν στα φυτά που τις φέρουν νανισμό. Συγκρίνοντας λοιπόν το φαινότυπο των μεταλλαγμάτων *csn5a-2* με τους φαινότυπους των μεταλλαγμάτων *gal-3* και *sly1-10* (**εικόνα 6**) γεννήθηκε η πρόθεση να δειχθεί πως η έλλειψη του συμπλέγματος μπορεί να συνδεθεί με το GA και την αποικοδόμηση πρωτεϊνών άρα και με το σύμπλεγμα SCF^{Sly1}.

Προηγούμενα πειράματα είχαν δείξει πως το σύμπλεγμα CSN εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι της αυξίνης για την αποικοδόμηση των παραγόντων IAA [19]. Τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης αυτά έγιναν με τη βοήθεια της σεσημασμένης πρωτεΐνης F-box TIR1 [12,18]. Ανάλογο πείραμα με μεταβλητές το GA και την πρωτεΐνη SLY1 θεωρήθηκε πως

μπορεί να δείξει και πάλι την εμπλοκή του CSN για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών RGA και GAI.



Εικόνα 6: σύγκριση των μεταλλαγμάτων *csn5b-1* και *csn5a-2* με τα μεταλλάγματα *gal-3* και *sly1-10* και με αγρίου τύπου φυτά.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της σειράς πειραμάτων που εκτελέστηκαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας ήταν να δειχτεί ο ρόλος του COP9 signalosome στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών μέσω του 26S πρωτεοσώματος σε απάντηση του σήματος του γιββεριλλικού οξέος. Ένας ακόμα υποκείμενος στόχος των πειραμάτων ήταν να δειχτεί πόσο σημαντικό ρόλο παίζουν στην ανάπτυξη του φυτού οι πρωτεΐνες RGA και GAI και κατά επέκταση το γιββεριλλικό οξύ που ελέγχει τα επίπεδά τους.

Κατ' επέκταση επιχειρήθηκε να δειχθεί με βιοχημικούς, ανοσολογικούς και γενετικούς τρόπους η συμμετοχή του συμπλέγματος CSN στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών αύξησης RGA και GAI μέσω του 26S πρωτεοσώματος σε απάντηση του GA. Για τη μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων έγιναν πειράματα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Για τα πειράματα που διεξάχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis thaliana* στους γονιδιακούς τόπους που κωδικοποιούν τις υπομονάδες CSN3, CSN5 και CSN8 του COP9 signalosome, τις πρωτεΐνες GAI, RGA και SLY1 όπως και βιοσυνθετικά μεταλλάγματα του GA.

- ⇒ Οι μεταλλάξεις *fus11* της υπομονάδας CSN3, *fus7* και *fus8* της υπομονάδας CSN8 όπως και *sly1-10* της πρωτεΐνης SLY1 έγιναν μέσω του μεταλλαξιγόνου παράγοντα EM σε φυτά οικότυπου Landsberg.
- ⇒ Οι μεταλλάξεις *csn5a-2* της υπομονάδας CSN5 έγιναν με εισαγωγή T-DNA με τη βοήθεια του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* και του πλασμιδίου Ti (tumor inducer) σε φυτά οικότυπου Columbia.
- ⇒ Οι μεταλλάξεις *gai-t6* της πρωτεΐνης GAI έγιναν με τη βοήθεια μεταθετών στοιχείων σε φυτά οικότυπου Landsberg.
- ⇒ Οι μεταλλάξεις *rga-24* της πρωτεΐνης RGA έγιναν με τη βοήθεια ακτινών X σε φυτά οικότυπου Landsberg.

Ως φυτά αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν φυτά *gai-3* τα οποία είναι φέρουν μεταλλάξεις σε ένζυμο της βιοσυνθετικής πορείας του GA και αδυνατούν να το παράγουν. Τα αγρίου τύπου φυτά αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οικότυπου Columbia και Landsberg επειδή ακριβώς και τα μεταλλάγματα είχαν σαν αγρίου τύπου υπόβαθρο (wild type background) και τους δυο οικότυπους. Κατά τις διασταυρώσεις των μεταλλαγμάτων με διαφορετικό υπόβαθρο κληρονομούνταν γονίδια και των δυο οικότυπων δυσχεραίνοντας με αυτόν τον τρόπο τη σύγκριση με ενός οικότυπου αγρίου τύπου φυτά.

Χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες έκφρασης της GA 20 οξειδάσης (GA20ox) φορείς του γονιδίου που την κωδικοποιεί συνδεδεμένο υπό κοινό υποκινητή (35S) με το γονίδιο της β-γλυκουρονιδάσης (GUS) 35S:GA20ox:GUS. Τα φυτά διασταυρώθηκαν με φυτά *fus7* και *fus11* για την μελέτη επίδρασης του COP9 signalosome στην αρνητική επανατροφοδότηση επί της βιοσυνθετικής πορείας του GA.

Χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες ανοσοφθορισμού (immunostaining) φορείς του γονιδίου RGA συνδεδεμένου υπό τον ίδιο υποκινητή με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) *RGA::GFP:RGA* από το εργαστήριο του Tai-ring Sun. Τα φυτά αυτά διασταυρώθηκαν και με φυτά *fus7* και *fus11* για μελέτη της επίδρασης του COP9 signalosome στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης RGA στα κύτταρα και κατά επέκταση της επίδρασης του συμπλέγματος στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μέσω του 26S πρωτεοσώματος.

Για τις μελέτες φθορίζουσας μικροσκοπίας χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα κατασκευάσματα με αυτά του ανοσοφθορισμού μόνο που η πρωτεΐνη που ήταν σημασμένη με την GFP ήταν η GAI και το κατασκεύασμα επομένως ήταν το *35S::GAI:GFP*. Οι σπόροι χορηγήθηκαν από το εργαστήριο του N. Harberd. Και αυτά τα φυτά διασταυρώθηκαν με μεταλλαγμένα *fus7* και *fus11* φυτά για τον ίδιο λόγο όπως και παραπάνω.

Για τις μελέτες συγκατακρήμνισης έγιναν στο εργαστήριο όπου εκτελέστηκαν τα πειράματα δυο κατασκευάσματα όπου γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη SLY1 σημάνθηκαν με αιμογλουτινίνη (HA) υπό κοινό υποκινητή *35S::SLY1:HA* και *35S::HA:SLY1*. Τα πλασμίδια που περιείχαν τα κατασκευάσματα και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη εισαχθήκανε στα φυτά τα οποία ελέγχθηκαν αργότερα για αυτή τους την ιδιότητα αφού αφέθηκαν αρχικά να βλαστήσουν σε πιάτα καναμυκίνης συγκέντρωσης 50mg/L.

ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΣΠΟΡΩΝ *Arabidopsis thaliana*

Σπόροι συλλέχθηκαν σε σωλήνες eppendorf των 1.5mL προς αποστείρωση. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1mL διαλύματος υποχλωρικού ασβεστίου και ακολούθησε ανάδευση για 15 λεπτά της ώρας. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 δευτερόλεπτα και αφαιρέθηκε υπό κενό το υπερκείμενο διάλυμα. Προστέθηκε 1mL αιθανόλη 70% και ακολούθησε καλή ανάδευση. Οι σπόροι, μετά την αφαίρεση της αιθανόλης, πλύθηκαν με αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό 3 με 4 φορές. Οι σπόροι αποθηκεύτηκαν στους 4°C απουσία φωτός για περιορισμένο διάστημα (10 με 20 μέρες).

ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΒΟΗΘΕΙΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ

Τα φυτά επιμολύνθηκαν αρχικά με το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* το οποίο περιείχε το επιθυμητό γονίδιο μέσα σε ένα πλασμίδιο. Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε και ένα γονίδιο αντίστασης σε καναμυκίνη.

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο που περιείχε γονίδιο αντίστασης στην Καναμυκίνη. Το γονίδιο που έπρεπε να μεταφερθεί ήταν ένα σεσημασμένο γονίδιο SLY1 με HA. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε Καναμυκίνη για να αναπτυχθούν. Το αναμενόμενο αποτέλεσμα ήταν να αναπτυχθούν σωστά μόνο τα φυτά τα οποία περιείχαν το πλασμίδιο το οποίο τους προσφέρει αντίσταση στην Καναμυκίνη. Τα υπόλοιπα αναπτύσσονται μέχρι ενός σημείου αλλά δεν αντέχουν την τοξικότητα της Καναμυκίνης και τελικά πεθαίνουν. Επειδή όμως μέσα στο πλασμίδιο υπάρχει και το σεσημασμένο γονίδιο SLY1 τα φυτά τα οποία επιβίωσαν ήταν τα διαγονιδιακά φυτά. Τα διαγονιδιακά φυτά μεταφέρθηκαν στο έδαφος και αναπτύχθηκαν κανονικά.

ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western blot) χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση των 35S::HA:SLY1 και 35S::SLY1:HA φυτών. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν με τη βοήθεια ομογενοποιητή υπό σταθερή θερμοκρασία 4°C. Οι ιστοί συνθλίβονταν για δυο λεπτά της ώρας με τριάντα δευτερόλεπτα διακοπή μετά το πρώτο λεπτό. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διαδικασία ήταν το εξής:

- 50mM Tris/HCl pH 7,5
- 150mM NaCl
- 0,5% Triton
- PMSF, PI, MG132 από 10μL το καθένα ανά 100μL

Όπου ο PMSF είναι ένας αναστολέας πρωτεασών και κατά επέκταση του πρωτεοσώματος και οι PI και MG132 είναι επιπρόσθετοι αναστολείς πρωτεασών.

Τα εκχυλίσματα φυγοκεντρίθηκαν στις 13.200 rpm (10.000g) στους 4°C και το υπερκείμενο αναμίχθηκε με διάλυμα (buffer) 3x Laemmli σε αναλογία 80 όγκοι εκχύλισμα/ 20 όγκοι 3x Laemmli

και ακολούθησε βράσιμο του μίγματος για πέντε λεπτά της ώρας σε υδατόλουτρο.

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκε πηκτική 12%. Η συγκεντρωτική πηκτική είχε την εξής σύσταση:

- 250mM Stacking gel buffer
- 165mM Acrylamide
- 1,65mM TEMED
- 2,50mM APS
- 1140μL dH₂O

Ενώ η διαχωριστική πηκτική είχε σύσταση:

- 250mM Separating gel buffer (1,5M Tris, 0,4% SDS, HCL 32% pH 8,8)
- 400mM Acrylamide
- 1,65mM TEMED
- 2,50mM APS
- 1,4mL dH₂O

Στις πηκτικές εφαρμόστηκε ρεύμα 75V για ενενήντα λεπτά της ώρας μέσα σε διάλυμα SDS-PAGE running buffer σύστασης:

- 25mM Tris
- 192mM Glycine
- 0,04% SDS

Στη συνέχεια με τη βοήθεια συσκευής semi-dry blotter (BIORAD) μεταφέρθηκαν οι πρωτεΐνες από την πηκτική στη μεμβράνη κυτταρίνης μετά από εφαρμογή ρεύματος 18V για δυο ώρες σε διάλυμα semi-dry blot buffer σύστασης:

- 25mM Tris/HCL pH 8,3
- 192mM Glycine
- 20% Methanol
- 0,4% SDS

Οι μεμβράνες στη συνέχεια επώαστηκαν για μια ώρα σε διάλυμα καζεΐνης σύστασης:

- 1x TBS buffer (50mM Tris/HCL, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂ x 6H₂O)
- 0,2% Casein (AppliChem)
- 0,1% Tween 20
- προσθήκη Millipore H₂O μέχρι τον όγκο των 900mL

Ακολούθησαν αλληπάλλληλα πλυσίματα με 1x TBST (TBS με 1% Tween) και 1x TBS για δέκα λεπτά της ώρας κάθε φορά σε θερμοκρασία δωματίου.

Το πρώτο αντίσωμα (mouse antiHA purified-SIGMA) ενάντια του επιτόπιου HA προστέθηκε σε αναλογία 1:200 μέσα σε διάλυμα καζεΐνης και επώαστηκε στους 4°C για δώδεκα με δεκατέσσερις ώρες περίπου. Ακολούθησαν πλυσίματα όπως περιγράφηκαν παραπάνω και προστέθηκε το δεύτερο αντίσωμα ενάντια στο πρώτο (goat antimouse alkaline phosphatase purified-SIGMA) σε αναλογία 1:5.000 μέσα σε διάλυμα καζεΐνης και επώαστηκε στους 4°C για δώδεκα με δεκατέσσερις ώρες περίπου.

Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα για την εμφάνιση των πρωτεϊνών με τη βοήθεια της καταλυτικής αντίδρασης της αλκαλικής φωσφατάσης, η οποία δίνει χαρακτηριστικό μελανό χρώμα μόλις έρθει σε επαφή με το υπόστρωμά της, σύστασης:

- 10mL AP buffer (100mM Tris/HCl pH 9,5, 100mM NaCl, 5mL MgCl₂ 1M
- 33μL BCIP (50mg σε 1mL 100% DMF)
- 66μL NBT (50mg σε 1mL 70% DMF)

Για να διακοπεί η αντίδραση ακολουθεί πλύσιμο με νερό του δικτύου.

ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ (IMMUNOSTAINING)

Για την τεχνική του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν φυτά ηλικίας πέντε ημερών. Μεταφέρθηκαν σε πλάκα εικοσιτεσσάρων πηγαδιών και τα μισά φυτά επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο GM για μια ώρα σύστασης:

- 0,5g/L MES/KOH pH 5,4 (AppliChem)
- 4,3g/L Murashige & Skoog (DUCHEFA BIOCHEMIE) το οποίο είναι ένα πολυβιταμινούχο θρεπτικό παρασκεύασμα με όλα τα απαραίτητα συστατικά για την σωστή ανάπτυξη των φυτών
- 10g/L Saccharose

Τα άλλα μισά επώαστηκαν για το ίδιο χρονικό διάστημα με 100μM GA/CHX 100μM (CycloHexamide). Το CHX αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση επιτρέποντας την μελέτη της συμπεριφοράς των πρωτεϊνών που έχουν παραχθεί μέχρι τη στιγμή έναρξης της επώασης.

Ακολούθησε επώαση των δυο ομάδων φυτών με παραφορμαλδεϋδη (PFA) σε διάλυμα MTSB (Microtubule Stabilizing Buffer) με στόχο την σταθεροποίηση πρωτεϊνών και συστατικών των κυττάρων που φυσιολογικά κινούνται μέσα σε αυτά (π.χ. πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού). Το διάλυμα MTSB ήταν σύστασης:

- 50mM Pipes/KOH pH 6,9-7,0 (SIGMA)
- 5mM EGTA (SIGMA)
- 5mM MgSO₄ (SIGMA)

Ακολούθησε πλύσιμο με MTSB για τέσσερις φορές από δέκα λεπτά της ώρας και τέσσερις φορές με PBS, δυο για δέκα και δυο για πέντε λεπτά της ώρας αντίστοιχα. Το διάλυμα PBS είχε σύσταση:

- 125mM Na₂HPO₄
- 18mM KH₂PO₄
- 1,39M NaCl
- 27mM KCl

Τα φυτά μετά από αυτή τη διεργασία τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες με προσοχή έτσι ώστε να παραμείνουν άθικτες οι ρίζες τους και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για δώδεκα με δεκατέσσερις ώρες.

Στη συνέχεια η περιοχή όπου κείτονταν τα φυτά περικυκλώθηκε με στυλό λίπους (Pap-Pen) έτσι ώστε να μπορέσει να συγκρατήσει τα διαλύματα με τα οποία θα επεξεργαστούν τα φυτά αργότερα. Τα φυτά επανυδατώθηκαν με προσθήκη διαλύματος MTSB για δέκα λεπτά της ώρας και στη συνέχεια επώαστηκαν με μίγμα 2% Driselase cocktail (SIGMA) (20mg/mL) σε διάλυμα MTSB για σαράντα λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία 37°C. Με τη δράση των ενζύμων που περιέχει το μίγμα και έχουν απομονωθεί από μύκητες διανοίγονται μικροσκοπικές οπές στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων της ρίζας. Ακολουθεί πολλαπλό πλύσιμο των φυτών με διάλυμα PBS.

Επόμενος στόχος είναι η διάνοιξη οπών στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων της ρίζας με τη βοήθεια σάπωνα. Τα φυτά επώαστηκαν με 10% DMSO/ 3% NP40 σε διάλυμα MTSB για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε πολλαπλό πλύσιμο με διάλυμα PBS και επεξεργασία για δυο ώρες στους 37°C με 5% BSA (Albumin Fragment IV-SIGMA) 50mg/mL σε διάλυμα PBS. Σκοπός ήταν να καταληφθούν οι κενές θέσεις του κυττάρου από μη ειδικές για το αντίσωμα, που θα προστεθεί,

πρωτεΐνες έτσι ακριβώς όπως απαιτεί και η τεχνική του western blot με το διάλυμα καζεΐνης.

Ακολούθησε προσθήκη του πρώτου αντισώματος ενάντια στο επιτόπιο της πρωτεΐνης RGA (α RGA purified) και σε κάποιες περιπτώσεις (π.χ. στα φυτά RGA::GFP:RGA) της πρωτεΐνης GFP (α GFP purified) με αναλογία 1:200 σε διάλυμα 5% BSA/ PBS. Τα φυτά επώαστηκαν με το διάλυμα του αντισώματος για δυο ώρες στους 37°C και κατόπιν για δώδεκα με δεκατέσσερις ώρες στους 4°C.

Μετά από πολλαπλά πλυσίματα με PBS 0,01% Triton και PBS προστέθηκε το δεύτερο αντίσωμα (α rabbit FITC purified), το οποίο φέρει φθορίζουσα ομάδα, σε διάλυμα 5% BSA/ PBS και η επώαση διήρκεσε περίπου τέσσερις ώρες στους 37°C. Τα φυτά πλύθηκαν και πάλι επανειλημμένα με PBS και τελικά με dH₂O. Για τη ασφαλή αποθήκευσή τους και τη διαφύλαξη του φαινομένου του φθορισμού για όσο το δυνατό μεγαλύτερο διάστημα προστέθηκε στις αντικειμενοφόρους πλάκες DABCO (25mg/mL) σε διάλυμα glycerin:PBS (9:1) αφού το pH ρυθμίστηκε στα 8,5 με KOH. Με αυτόν τον τρόπο οι πλάκες διατηρήθηκαν μέρες μέχρι να μελετηθούν με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Από ενήλικα φυτά *Arabidopsis thaliana* αφαιρέθηκαν νεοσχηματισμένοι ιστοί εμβλαδού περίπου 2-3mm² και συνθλίφθηκαν με έμβολο σε ξεχωριστά erpendorf. Στη συνέχεια προστέθηκαν 300μL διαλύματος εκχύλισης DNA (DNA extraction buffer) σύστασης:

- 200mM Tris
- 250mM NaCl
- 25mM EDTA
- 0,5% SDS
- dH₂O

και ακολούθησε επώαση στους 65°C για είκοσι λεπτά της ώρας σε υδατόλουτρο.

Μετά την προσθήκη φαινόλης:χλωροφόρμιου τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για τρία λεπτά της ώρας με 13.200 rpm και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα erpendorf όπου προστέθηκε και ένας όγκος ισοπροπανόλης. Μετά από δώδεκα λεπτά φυγοκέντριση στις 13.200 rpm (10.000g) το ίζημα πλύθηκε με 100% αιθανόλη και αφέθηκε να στεγνώσει στο απαγωγό αέριας

ροής (air flow lamina clean bench). Τα στεγνά ιζήματα διαλύθηκαν σε περίπου 200μL dH₂O.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Για να διαπιστωθεί ο γενότυπος των φυτών ως προς τα γονίδια CSN/GAI/RGA μετά από τις διασταυρώσεις που διενεργήθηκαν και να συνδεθεί με το φαινότυπό τους χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR. Για κάθε γονιδιακό τόπο εκτελέστηκαν δύο αντιδράσεις, μια για το αγρίου τύπου και μια για το μεταλλαγμένο γονίδιο με ξεχωριστά ζεύγη primers.

- ⇒ Για το αγρίου τύπου γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα CSN5, **CSN5a**, χρησιμοποιήθηκαν οι primers:
CSN FW4 (CAT TTG CAA ACA GGT ATG TAT AA)
INVITROGEN
CSN RV2 (TTC AAA CAT AAA TGT GAA AAA CAA AAT C)
Biomers.net
που ενισχύουν ένα τμήμα DNA μήκους **1,6kb**

- ⇒ Για το μεταλλαγμένο αντίστοιχο γονίδιο, **csn5a-2**, χρησιμοποιήθηκαν οι primers:
CSN FW4 (CAT TTG CAA ACA GGT ATG TAT AA)
INVITROGEN
LbB1 (CAG CGT GGA CCG CTT GCT GCA ACT CTC TCA)
INVITROGEN
που ενισχύουν ένα τμήμα DNA μήκους **0,8kb**

- ⇒ Για το αγρίου τύπου γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη GAI, **GAI**, χρησιμοποιήθηκαν οι primers:
GAI 300 (CTA GAT CCG ACA TTG AAG GA)
INVITROGEN
GAI 302 (AGC ATC AAG ATC AGC TAA AG)
INVITROGEN
που ενισχύουν ένα τμήμα DNA μήκους **1kb**

- ⇒ Για το μεταλλαγμένο αντίστοιχο γονίδιο, **gai-t6**, χρησιμοποιήθηκαν οι primers:
GAI 300 (CTA GAT CCG ACA TTG AAG GA)
INVITROGEN
GAI 304 (TCG GTA CGG GAT TTT CGC AT)
INVITROGEN
που ενισχύουν τμήμα DNA μήκους **0,720kb**

- ⇒ Για το αγρίου τύπου γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RGA, **RGA**, χρησιμοποιήθηκαν οι primers:
RGA GENO FW (AAG AGA GAT CAT CAC CAA TTC CAA)
INVITROGEN
RGA GENO RV (CCA CAA ATC TCC GGC GAA GGA AGA AC)
INVITROGEN
που ενισχύουν ένα τμήμα DNA μήκους **0,5kb**
- ⇒ Για το μεταλλαγμένο αντίστοιχο γονίδιο, **rga-24**, χρησιμοποιήθηκαν οι primers:
RGA 219 (GTT GAT AGA CAT TTT CAA TGA)
INVITROGEN
RGA 212 (GGT GAT TTT CAC GGT GGT TG)
INVITROGEN
που ενισχύουν ένα τμήμα DNA μήκους **4kb**

Η κάθε αντίδραση, ανεξάρτητα από το ποιο γονίδιο είχε σκοπό να ανιχνεύσει, είχε σύσταση:

- 5μL genomic DNA
- 2,5μL dNTPs mixture
- 2,5μL 10x buffer (200mM Tris/HCl pH8,4, 500mM KCl, 25mM MgCl₂)
- 0,5μL primer fw (20pmol/μL)
- 0,5μL primer rv (20pmol/μL)
- 0,5μL Taq Polymerase
- 13,5μL dH₂O

Για την αντίδραση ανίχνευσης και ενίσχυσης του τμήματος του μεταλλαγμένου γονιδίου της πρωτεΐνης RGA χρησιμοποιήθηκε 1μL ενζύμου Taq polymerase λόγω του μεγάλου μήκους του.

Για όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα ενίσχυσης με 35 επαναλήψεις:

- 94⁰C για 5 min
- 58⁰C για 1 min
- 72⁰C για 2,5 min

Για την αντίδραση ανίχνευσης και ενίσχυσης του τμήματος του μεταλλαγμένου γονιδίου της πρωτεΐνης RGA αυξήθηκε ο χρόνος επιμήκυνσης στα 5 min για κάθε κύκλο και η θερμοκρασία πρόσδεσης των primers στις μήτρες μειώθηκε στους 55°C λόγω του μεγάλου μήκους του.

Όλες οι αντιδράσεις επαναλήφθηκαν τουλάχιστο επτά φορές για να βεβαιωθεί η πιστότητα των αποτελεσμάτων τους. Τα προϊόντα των PCR αναμιγνύονταν με 10μL loading buffer και 10μL του μίγματος εισάγονταν στις εσοχές της πηκτής αγαρόζης 4% με προσθήκη 2μL βρομιούχου αιθιδίου ανά 75mL ρευστής αγαρόζης και 10μL ανά 1,5-2L διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Το διάλυμα που χρησιμοποιούνταν για την πηκτική αλλά και κατά την ηλεκτροφόρηση ήταν 1x TAE που φτιάχνονταν από διάλυμα 50x TAE σύστασης:

- 2M Tris
- 50mM EDTA pH 8,0
- 5,71% Acetic acid

Στις πηκτές εφαρμόζονταν ρεύμα 100V για εικοσιπέντε λεπτά της ώρας περίπου.

ΧΡΩΣΗ Β-ΓΛΟΥΚΟΥΡΟΝΙΔΑΣΗΣ (GUS)

Η τεχνική της χρώσης των ιστών μέσω του ενζύμου β-γλουκουρονιδάση (GUS) χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του πρωτεϊνικού συμπλέγματος COP9 signalosome στην αρνητική επανατροφοδότηση που ασκούν τα επίπεδα της πρωτεΐνης GAI πάνω στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του GA.

Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν φυτά με γενότυπο GA20ox:GUS ομόζυγα και διασταυρώσεις αυτών με φυτά με γενότυπο *fus7* και *fus11* ετερόζυγα. Η τεχνική βασίζεται στην καταλυτική ικανότητα του ενζύμου β-γλουκουρονιδάση να υδρολύει την ένωση X-Gluc σε 5-bromo-4-chloro-indonyl. Η τελευταία οξειδώνεται από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο και διμερίζεται σχηματίζοντας μόρια με έντονο χαρακτηριστικό μπλε χρώμα.

Τα φυτά αρχικά επώαστηκαν με επτάνιο για δεκαπέντε λεπτά της ώρας με σκοπό να σταθεροποιηθούν τα κυτταρικά τους περιεχόμενα και να θανατωθούν. Στη συνέχεια προστέθηκε για δώδεκα με δεκατέσσερις ώρες στους 37°C διάλυμα χρώσης με σύσταση:

- 100mM σιδηροκυανιούχο κάλιο
- 100mM σιδηροκυανικό κάλιο
- 10% Triton X-100
- 0,5M sodium phosphate buffer pH 7,2
- 2mM X-Gluc

Οι ενώσεις σιδηροκυανιούχο κάλιο και σιδηροκυανικό κάλιο χρησιμοποιήθηκαν για να περιορίσουν την υπερβολική οξειδωση των διμερών που οδηγεί σε εκτοπισμένους κρυστάλλους με παραπλανητικό εντοπισμό μέσα στο κύτταρο.

Η αντίδραση διεκόπη με απλή αφαίρεση του διαλύματος και επαναλαμβανόμενη πλύση των φυτών με 100% αιθανόλη. Οι πλύσεις συνεχίστηκαν για διάστημα δυο έως τριών ημερών έως ότου απομακρυνθεί όσο το δυνατό μεγαλύτερο ποσοστό χλωροφύλλης από τα φυτά με σκοπό να είναι πιο ευδιάκριτη η χρώση GUS. Η διατήρηση των φυτών σε αυτό το διάστημα έγινε μέσα σε αιθανόλη στους 4°C.

Πριν την παρατήρηση των ιστών με τη βοήθεια μικροσκοπίου τα φυτά υποβλήθηκαν σε πλύσεις σταδιακής μείωσης της συγκέντρωσης της αιθανόλης (70%, 50%, 25%) με τελική πλύση τους το dH₂O. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και πριν τοποθετηθεί η καλυπτρίδα προστέθηκαν δυο με τρεις σταγόνες chloral hydrate με σκοπό τη διατήρησή τους για μεγάλο διάστημα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ SCF^{SLY1}, CSN ΚΑΙ 26S ΠΡΩΤΕΟΣΩΜΑΤΟΣ

Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε ως αρχικός έλεγχος ενός πειράματος ανοσοσυγκατακρήμνισης των συμπλεγμάτων πρωτεϊνών SCF^{SLY1}, CSN και ενδεχομένως και του 26S πρωτεοσώματος. Η βασική ιδέα ήταν ότι αν τα τρία αυτά συμπλέγματα συνεργάζονται για την ειδικευμένη αποικοδόμηση κάποιων πρωτεϊνών τότε θα αλληλεπιδρούν σε κάποιες χρονικές στιγμές και θα συνδέονται στιγμιαία. Έτσι ανιχνεύοντας μια πρωτεΐνη με ανοσολογικό τρόπο θα μπορούσαμε να κατακρημνίσουμε μαζί της όλες εκείνες τις πρωτεΐνες που σχετίζονται και συνδέονται με αυτήν κατά την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που εξετάζουμε και μαζί και το σύμπλεγμα CSN που πιστεύουμε πως παίζει ενεργό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία. Το πείραμα αυτό έχει γίνει με επιτυχία για την ορμόνη αυξίνη και την αποικοδόμηση των μεταγραφικών παραγόντων IAA μέσω της F-box πρωτεΐνης TIR1.

Για το λόγο αυτό, όπως και προαναφέρθηκε παραπάνω, δημιουργήθηκαν σειρές φυτών οι οποίες εμπεριείχαν σεσημασμένες με HA πρωτεΐνες SLY1 έτσι ώστε να είναι εύκολος ο εντοπισμός τους με ένα αντίσωμα ενάντια στο επιτόπιο HA. Επιλέχθηκε να σημειωθεί η πρωτεΐνη SLY1 γιατί μόνο μέσω αυτής θα ήταν δυνατός ο εντοπισμός του συγκεκριμένου SCF συμπλέγματος που δεσμεύει και αποικοδομεί τις πρωτεΐνες RGA και GAI και όχι ενός άλλου που είναι υπεύθυνο για τη δέσμευση και αποικοδόμηση κάποιων άλλων πρωτεϊνών. Άλλωστε από ότι είναι γνωστό μέχρι σήμερα η μόνη πρωτεΐνη η οποία μεταβάλλεται για να επιτευχθεί η διαφορική δέσμευση των υποστρωμάτων και στη συνέχεια η αποικοδόμησή τους από το σύστημα είναι η F-box πρωτεΐνη. Όλα τα υπόλοιπα μέρη του συστήματος παραμένουν σταθερά.

Όπως φαίνεται στην εικόνα χρησιμοποιήθηκαν ένας θετικός και ένας αρνητικός μάρτυρας για την επικύρωση της βεβαιότητας των αποτελεσμάτων. Ο θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχτεί η ικανότητα του αντισώματος να δεσμεύεται στο επιτόπιο HA. Ο αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχτεί ότι η πρόσδεση του αντισώματος στο επιτόπιο είναι ειδική. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μια πρωτεΐνη του φυτού του καπνού, 14-3-3:HA, που μου χορηγήθηκε ευγενικά από ερευνητική ομάδα του ιδίου κέντρου έρευνας. Ως αρνητικός μάρτυρας

χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα πρωτεϊνών φυτού αγρίου τύπου οικότυπου Columbia.

Η υπό μελέτη πρωτεΐνη είχε μέγεθος 25kDa. Όπως φαίνεται όμως και στη φωτογραφία της μεμβράνης μετά από western blot σε αυτό το μέγεθος δεν υπάρχει καθαρό και διακριτό σήμα. Παρόλα αυτά ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας αλλά και δυο ισχυρές μα μη ειδικές μπάντες επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε δεσμεύεται ειδικά πάνω στον επίτοπο HA. Δεν δίνει σήμα κατά όλο το μήκος της διαδρομής του εκχυλίσματος αγρίου τύπου φυτών αλλά δίνει ένα πολύ ισχυρό σήμα στη διαδρομή του θετικού μάρτυρα γύρω στα 100kDa όπου και βρίσκεται πράγματι θεωρητικά η πρωτεΐνη 14-3-3:HA που χρησιμοποιήθηκε. Τα ισχυρά σήματα που φαίνονται σε όλες τις διαδρομές όπου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα φυτών *Arabidopsis thaliana* προκύπτουν από μια μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος που όμως δεν παρατηρείται στο φυτό του καπνού. Αυτό το μη ειδικό σήμα είναι ικανό να βεβαιώσει πως πράγματι το εκχύλισμά προέρχεται από το φυτό που μελετάται και είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες όχι όμως την επιθυμητή.



Εικόνα 7: μεμβράνη western blot της πρωτεΐνης SLY1:HA με θετικό μάρτυρα την πρωτεΐνη 14-3-3:HA του φυτού του καπνού και αρνητικό μάρτυρα εκχύλισμα πρωτεϊνών αγρίου τύπου *Arabidopsis thaliana* οικότυπου Columbia. Η πρωτεΐνη δεν δίνει σήμα με αυτή την τεχνική στα 25kDa όπου και θα την περίμενε θεωρητικά κανείς.

Έχοντας βεβαιώσει λοιπόν ότι η τεχνική δούλεψε σωστά και μετά από πολλαπλές επαναλήψεις του πειράματος μπορεί με αρκετή ασφάλεια να βγει το συμπέρασμα ότι η σεσημασμένη πρωτεΐνη που εισήχθη στα φυτά δεν εκφράζεται ή εκφράζεται σε πολύ χαμηλά και μη ανιχνεύσιμα επίπεδα. Είναι άλλωστε πολύ συχνό φαινόμενο τα φυτά να αμύνονται και να μην αφήνουν να εκφραστούν γονίδια εισαγόμενων πλασμιδίων που θεωρούνται γενετικά υλικά εισβολέων και εμποδίζονται με την τεχνική των RNAi. Και τα δυο ενδεχόμενα δεν μπορούν να αποτελέσουν βάση για τη συνέχεια του πειράματος, δηλαδή τη συγκατακρήμνιση.

Πρέπει να σημειωθεί πως το πείραμα έγινε με φυτά που έφεραν την ομάδα σήμανσης μπροστά και πίσω από το μόριο. Θεωρήθηκε πιθανό η ομάδα σήμανσης να καθιστά μη λειτουργική την πρωτεΐνη και αυτή να αποικοδομείται ραγδαία με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ανίχνευσή της. Τα αποτελέσματα ήταν ακριβώς τα ίδια και στις δυο περιπτώσεις. Για τη μεμβράνη της εικόνας έχει χρησιμοποιηθεί εκχύλισμα από φυτά που φέρουν πλασμίδιο με το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SLY1:HA.

Για την επίλυση του προβλήματος θα ήταν εύλογη η χρήση ενός επαγόμενου πλασμιδίου υπερέκφρασης, DEX για παράδειγμα, που με την προσθήκη της ουσίας επαγωγής στο θρεπτικό μέσο για συγκεκριμένη χρονική περίοδο θα εκφράζονται υπεράριθμες πρωτεΐνες SLY1:HA ή HA:SLY1. Έτσι ακόμα και η εντεταμένη αποικοδόμηση των ενδεχομένως μη λειτουργικών πρωτεϊνών δε θα επηρεάζει σημαντικά και απαγορευτικά για το πείραμα τη συγκέντρωσή τους.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ CSN ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ RGA

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το GA σηματοδοτεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών RGA και GAI μέσω του συστήματος του 26S πρωτεοσώματος και των συμπλεγμάτων SCF και CSN. Έχει παρατηρηθεί επίσης σε αντίστοιχα πειράματα ανοσοφθορισμού που έγιναν σε βιοσυνθετικά μεταλλάγματα *gal-3* αλλά και σε μεταλλάγματα *sly1-10*, όπου οι πρωτεΐνες δε δύνανται να αποικοδομηθούν, ότι αυτές συγκεντρώνονται και δίνουν ένα πολύ ισχυρό σήμα στον πυρήνα των κυττάρων της ρίζας. Το γεγονός ότι συγκεντρώνονται στον πυρήνα των κυττάρων έρχεται να εξηγήσει κατά κύριο λόγο το γεγονός ότι διαθέτουν, και οι RGA και οι GAI αλλά και άλλα μέλη των οικογενειών τους, περιοχές εντοπισμού τους στον πυρήνα

(NLS) όπως προαναφέρθηκε. Αντίθετα σε φυτά αγρίου τύπου οι πρωτεΐνες αποικοδομούνται κανονικά και το σήμα είναι συγκεχυμένο έως και ανύπαρκτο.

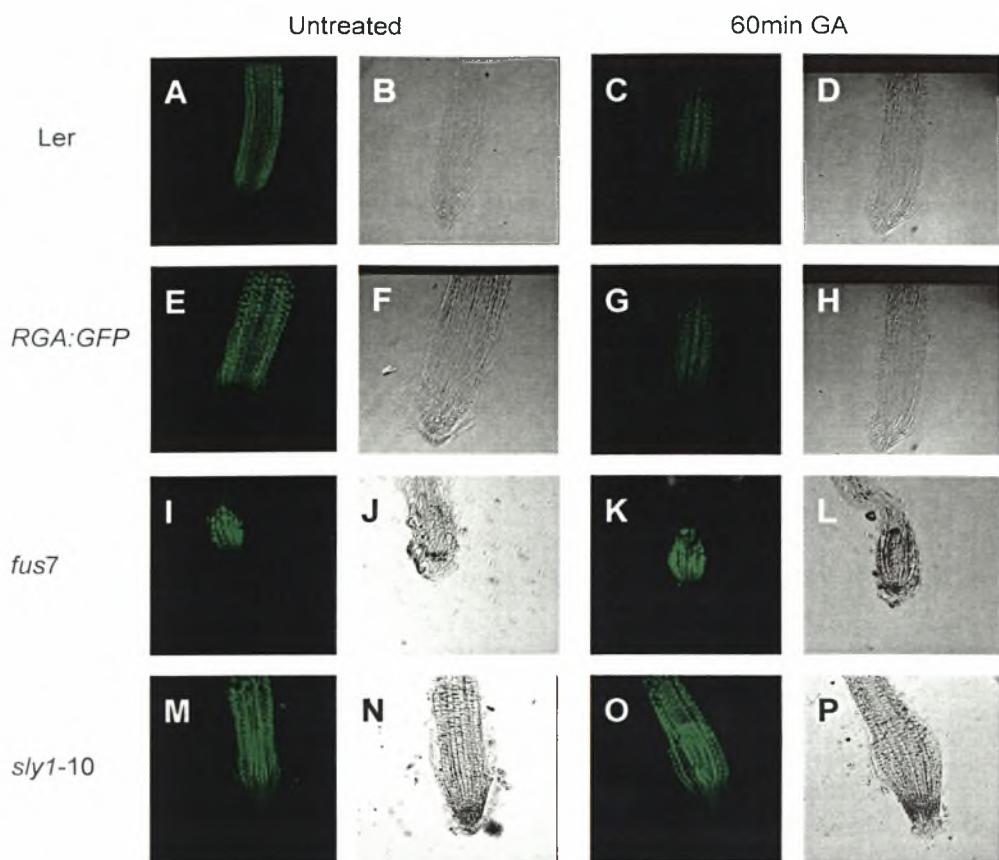
Σε βιοσυνθετικά μεταλλάγματα έχει παρατηρηθεί πως η προσθήκη GA μετά από κάποιο χρονικό διάστημα επάγει την αποικοδόμηση των RGA και GAI. Αντίθετα αντίστοιχη επώαση σε μεταλλάγματα *sly1-10* δεν επιφέρει κανένα αποτέλεσμα. Το ίδιο ήταν ο σκοπός να δειχθεί και για την περίπτωση των μεταλλαγμάτων *csn5a-2*. Ότι δηλαδή το σύμπλεγμα CSN παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών RGA και GAI και σε περίπτωση απουσίας του οι πρωτεΐνες συσσωρεύονται και δεν αποικοδομούνται έστω και μετά από εκτεταμένη επώαση με GA. Απόρροια των θετικών αποτελεσμάτων του πειράματος είναι και το συμπέρασμα ότι το σύμπλεγμα CSN βρίσκεται downstream του σήματος του GA.

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες και ως προς το αναμενόμενο σήμα και την εγκυρότητά του αλλά και ως προς την ειδική ή μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Τα φυτά αγρίου τύπου οικότυπου Landsberg χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες αφού οι πρωτεΐνες σε αυτά τα φυτά αποικοδομούνται κανονικά και δε συσσωρεύονται ώστε να δώσουν συγκεκριμένο και ισχυρό σήμα στον πυρήνα. Τα φυτά *sly1-10* χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες αφού δεν έχουν τη δυνατότητα να αποικοδομήσουν τις πρωτεΐνες και αυτές συσσωρεύονται στον πυρήνα των κυττάρων ακόμα και μετά από επώασή τους με GA για μια ώρα. Τα φυτά RGA:GFP χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η εξειδίκευση του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε για το επιτόπιο της πρωτεΐνης RGA. Σε αυτά τα φυτά εκτός από το αντίσωμα ενάντια στην πρωτεΐνη RGA χρησιμοποιήθηκε σε μια ομάδα από αυτά και το αντίσωμα ενάντια στην πρωτεΐνη σήμανσης GFP με πανομοιότυπο εντοπισμό της σεσημασμένης πρωτεΐνης RGA:GFP γεγονός που επιβεβαίωσε την πιστότητα του αντισώματος. Στην εικόνα φαίνονται μόνο τα φυτά RGA:GFP στα οποία χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι στο επιτόπιο της πρωτεΐνης RGA [28].

Στην εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού (confocal) φαίνονται άκρες ριζών από φυτά μάρτυρες και από μετάλλαγμα του συμπλέγματος CSN, *fus7*, με ή χωρίς επώασή τους με GA για μία ώρα. Οι μάρτυρες συμπεριφέρονται κανονικά, όπως είχε παρατηρηθεί και σε προηγούμενα πειράματα. Το γεγονός αυτό βεβαιώνει πως τεχνικά το πείραμα έχει εκτελεστεί σωστά. Επίσης οι εικόνες των μαρτύρων βοήθησαν στη σωστή ρύθμιση του μικροσκοπίου όσον αφορά την ένταση της δέσμης του laser και τον αποκλεισμό του «θορύβου».

Όπως φαίνεται στην εικόνα στην περίπτωση του μεταλλάγματος *fus7* η πρωτεΐνη RGA συσσωρεύεται στον πυρήνα των κυττάρων και δεν εξαφανίζεται μετά από επώαση των φυτών με GA για μια ώρα. Η πρωτεΐνη δηλαδή δεν αποικοδομείται υπό κανονικές συνθήκες λόγω έλλειψης του συμπλέγματος CSN και το φαινόμενο δεν είναι αναστρέψιμο μετά από επώαση με GA, όπως και στην περίπτωση του μεταλλάγματος *sly1-10*. Με αυτόν τον τρόπο αποδεικνύεται η σημασία του συμπλέγματος για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Όταν το σύμπλεγμα απουσιάζει ο μηχανισμός αποικοδόμησης αναστέλλεται ολοκληρωτικά με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των πρωτεϊνών RGA αλλά και όλων των υπολοίπων, κατά πάσα πιθανότητα, που χρησιμοποιούν αυτή την οδό για να αποικοδομηθούν και να ελέγξουν τα επίπεδά τους μέσα στο κύτταρο.

Από την επώαση των φυτών με GA συμπεραίνουμε αν τα αποτελέσματα και οι επιδράσεις των μεταλλάξεων είναι αντιστρεπτές. Αντιστρεπτές είναι οι επιδράσεις των μεταλλάξεων όταν αυτές αφορούν αδυναμία σύνθεσης GA. Στην περίπτωση που μελετήθηκε όμως το GA παράγεται κανονικά. Το πρόβλημα στη μετάδοση του σήματος εντοπίζεται μετά από το στάδιο της μετάδοσης του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι πρωτεΐνες δεσμεύονται με εντολή του GA από το κατάλληλο SCF^{Sly1} σύμπλεγμα αλλά δεν υπάρχει το σύμπλεγμα CSN με το οποίο πρέπει να αλληλεπιδράσουν για να συνδεθούν με το 26S πρωτεόσωμα και τελικά να αποικοδομηθούν. Επιβεβαιώνεται λοιπόν με το πείραμα της επώασης με GA πως το σύμπλεγμα CSN λειτουργεί downstream του σήματος του GA και είναι απαραίτητο για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών στόχων. Όπως διακρίνεται και στην εικόνα οι πρωτεΐνες στις ρίζες των μεταλλαγμάτων *fus7* παραμένουν συσσωρευμένες στον πυρήνα των κυττάρων.



Εικόνα 8: φωτογραφίες ανοσοφθορισμού από μικροσκόπιο φθορισμού. Στις εικόνες **A,B** φαίνεται ο αρνητικός μάρτυρας αγρίου τύπου, όπου το σήμα της πρωτεΐνης RGA είναι πολύ αχνό έως δυσδιάκριτο, πράγμα που σημαίνει πως η πρωτεΐνη αποικοδομείται κανονικά και στις εικόνες **C,D** μετά από επώασή του με GA για 60 λεπτά της ώρας, όπου δεν διακρίνεται κανένα σήμα και η πρωτεΐνη έχει αποικοδομηθεί στοπ σύνολό της.

Στις εικόνες **E,F** διακρίνεται ο μάρτυρας RGA:GFP και στις **G,H** μετά από επώασή του με GA για 60 λεπτά της ώρας, όπου ισχύουν τα ίδια με τα αγρίου τύπου φυτά.

Στις εικόνες **I,K** διακρίνεται το μετάλλαγμα *fus7* και η συσσώρευση των πρωτεϊνών RGA στους πυρήνες των κυττάρων ακόμα και μετά την επώασή τους με GA για 60 λεπτά της ώρας (**K,L**) γεγονός που αποδεικνύει την τη σημασία του συμπλέγματος CSN για τη σωστή λειτουργία του μηχανισμού αποικοδόμησης μέσω του 26S πρωτεοσώματος.

Στις εικόνες **M,N** φαίνεται ο θετικός μάρτυρας το μετάλλαγμα *sly1-10* και η αυξημένη συσσώρευση των πρωτεϊνών RGA στον πυρήνα των κυττάρων της ρίζας ακόμα και μετά από επώαση των φυτών με GA για 60 λεπτά της ώρας (**O,P**)

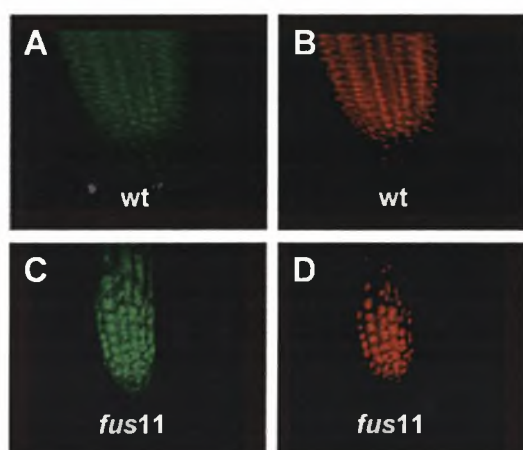
Με το πείραμα του ανοσοφθορισμού, συμπερασματικά, επειτεύχθη ο έντονος εντοπισμός των πρωτεϊνών RGA στον πυρήνα των κυττάρων της άκρης της ρίζας των μεταλλαγμάτων *fus7*, φυτά τα οποία αδυνατούν να σχηματίσουν ένα ολοκληρωμένο και κατά συνέπεια λειτουργικό σύμπλεγμα CSN. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα πως το σύμπλεγμα αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό για την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης RGA σε απάντηση του GA και ότι η διαδικασία αποικοδόμησης τουλάχιστο σε συντριπτικό βαθμό δεν πραγματοποιείται απουσία του συμπλέγματος.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ CSN ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ GAI:GFP ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Με το προηγούμενο πείραμα μελετήθηκε ο εντοπισμός της πρωτεΐνης RGA σε φυτικά κύτταρα απουσία του συμπλέγματος CSN. Το αντίστοιχο έπρεπε να δειχθεί και για την πρωτεΐνη GAI. Επιλέχθηκε όμως να μην επαναληφθεί απλά το πείραμα αλλάζοντας μόνο το αντίσωμα. Προτιμήθηκε να γίνει ένα *in vivo* πείραμα με φυτά που έφεραν τεχνητά την σεσημασμένη πρωτεΐνη GAI::GFP. Είναι σαφώς προτιμότερο να παρατηρεί κανείς τη συμπεριφορά των βιομορίων *in vitro* και να την επιβεβαιώνει με ένα πείραμα *in vivo*. Υπάρχουν πολλές περιπτώσεις που τα μόρια έχουν διαφορετική συμπεριφορά *in vivo*. Επίσης σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι εκτελώντας ένα πείραμα *in vivo* μας δίνεται δυνατότητα να παρακολουθήσουμε τη συμπεριφορά της πρωτεΐνης που ίσως να επηρεάζεται από τη διαδικασία ακινητοποίησης των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε για το προηγούμενο πείραμα. Στα πλεονεκτήματα της προηγούμενης μεθόδου κατατάσσεται όμως το γεγονός ότι ο ανοσοφθορισμός μπορεί να γίνει σε μικρό χρονικό διάστημα και απευθείας στα φυτά ενώ τα *in vivo* πειράματα προϋποθέτουν την χρονοβόρα διαδικασία των διασταυρώσεων.

Με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού παρατηρήθηκαν οι ιστοί της άκρης της ρίζας φυτών που έφεραν τη σεσημασμένη πρωτεΐνη GAI::GFP. Τα αποτελέσματα ήταν πανομοιότυπα με αυτά του πειράματος ανοσοφθορισμού. Η πρωτεΐνη απουσία του CSN συμπλέγματος συσσωρεύεται στον πυρήνα των κυττάρων αφού δεν μπορεί να αποικοδομηθεί. Στην εικόνα φαίνονται κύτταρα ριζών φυτών αγρίου τύπου και φυτών με μη λειτουργικό CSN

σύμπλεγμα. Οι πυρήνες των κυττάρων έχουν επισημανθεί κόκκινοι με χρώση propidium iodide (PI) για να είναι πιο εύκολη η παρατήρησή τους (εικόνα 9).



Εικόνα 9: φωτογραφίες κυττάρων της ρίζας με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού.

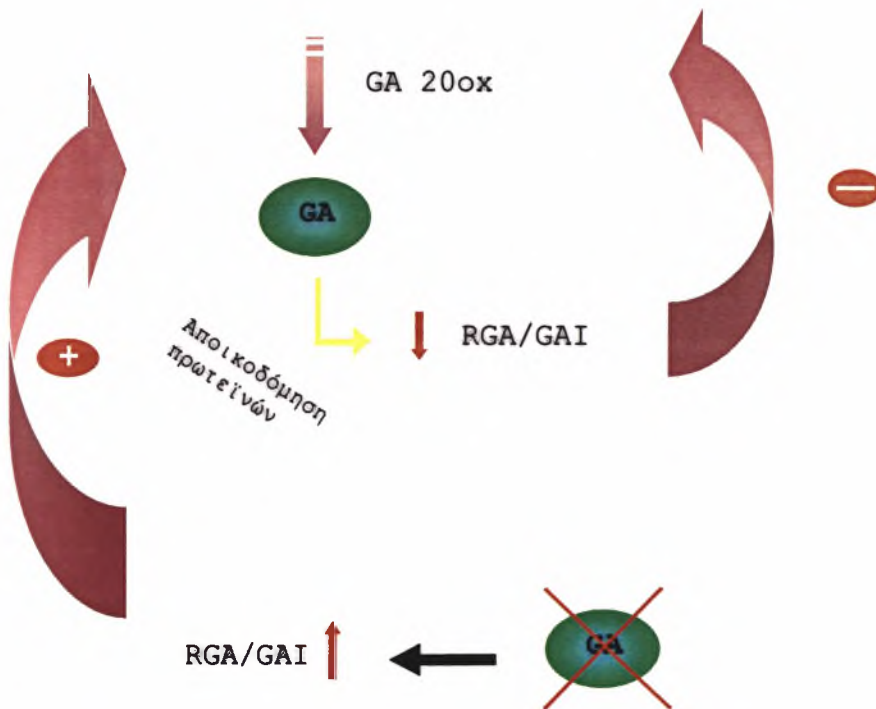
Στην εικόνα A και B φαίνονται άκρες ριζών φυτών αγρίου τύπου. Το σήμα της σεσημασμένης πρωτεΐνης GAI::GFP στην εικόνα **A** είναι σχετικά αχνό. Οι πρωτεΐνες δε δείχνουν να είναι συσσωρευμένες στον πυρήνα. Στην εικόνα B φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων.

Στις εικόνες C και D φαίνονται άκρες ριζών φυτών *fus11* τα οποία στερούνται λειτουργικού CSN συμπλέγματος. Η πρωτεΐνη GAI::GFP φαίνεται να συσσωρεύεται στους πυρήνες στην εικόνα **C** αφού δεν δύναται να αποικοδομηθεί. Στην εικόνα D φαίνονται μόνο οι πυρήνες των κυττάρων.

Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ CSN ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ GA

Το GA ρυθμίζει τα επίπεδα των πρωτεϊνών RGA και GAI μέσω του μηχανισμού που περιγράφηκε και με αυτόν τον τρόπο ελέγχει την αύξηση και ανάπτυξη του φυτού, όπως την αύξηση του βλαστού του. Δίνει σήμα στο σύμπλεγμα SCF^{SLY1} να δεσμεύσει τις πρωτεΐνες RGA και GAI και να τις οδηγήσει μέσω του συμπλέγματος CSN στο 26S πρωτεόσωμα όπου και αποικοδομούνται. Αυτή η δράση επιτρέπει τελικά την αύξηση του μήκους του βλαστού. Ο βλαστός όμως δεν αυξάνει ες αεί. Κάποιο άλλο σήμα είναι υπεύθυνο για την διακοπή της αύξησης

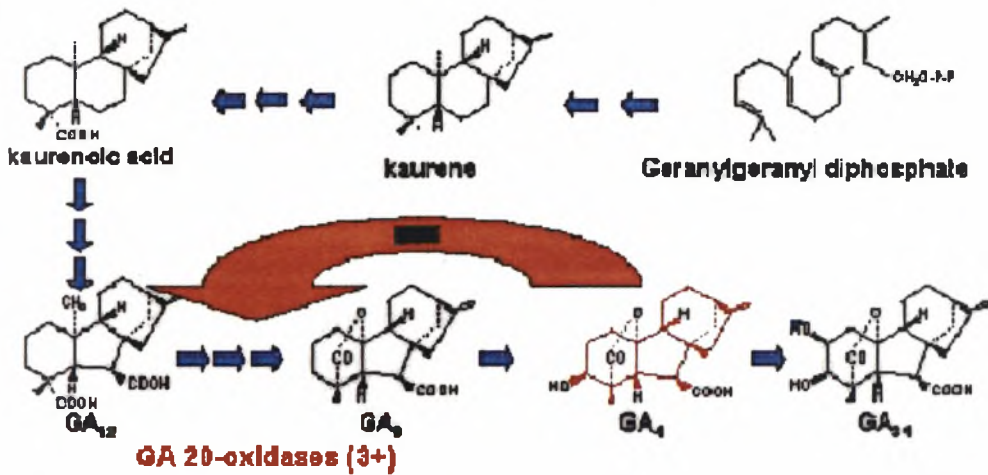
του βλαστού δηλαδή τη διακοπή της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών αυτών και την επαναφορά των επιπέδων τους σε αυτά που ήταν πριν την αύξηση. Το σήμα αυτό δεν έχει να κάνει με κάποια άλλη ουσία αλλά με τα χαμηλά επίπεδα του ίδιου του GA. Μάλιστα τα επίπεδα του GA ρυθμίζονται από τη συγκέντρωση του ενεργού GA και πρωτίστως της πρωτεΐνης GAI. Η αύξηση δηλαδή του βλαστού ρυθμίζεται από ένα τέλειο σύστημα αρνητικής επανατροφοδότησης. Όταν τα επίπεδα των πρωτεϊνών RGA και GAI είναι υψηλά στο φυτό τότε παράγεται περισσότερο ενεργό GA και επάγει την αποικοδόμησή τους, η οποία φυσικά οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα GAI που με τη σειρά τους αναστέλλουν την περαιτέρω παραγωγή GA.



Εικόνα 10: σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού αρνητικής επανατροφοδότησης στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του GA με τη βοήθεια του οποίου ρυθμίζεται και η αύξηση του μήκους του βλαστού των φυτών.

Αν και δεν είναι ξεκάθαρο ακόμα πώς λειτουργεί ακριβώς σε μοριακό επίπεδο αλληλεπιδράσεων αυτός ο μηχανισμός

αρνητικής επανατροφοδότησης μόριο κλειδί θεωρείται πως αποτελεί ένα ένζυμο του βιοσυνθετικού μονοπατιού του GA, η GA20 οξειδάση (GA20ox). Η αυξημένη ή μη παραγωγή του GA φαίνεται να εξαρτάται από το κομβικό σημείο της αυξημένης ή αντίστοιχα μη έκφρασης του ενζύμου GA20ox. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι πρωτεΐνες RGA και GAI περιλαμβάνουν μέσα στο μόριό τους χαρακτηριστικές περιοχές μεταγραφικών παραγόντων. Αυτό ενισχύει περισσότερο την υπόθεση ότι μπορεί η πρωτεΐνη GAI να επηρεάζει έμμεσα (αφού δεν υπάρχει περιοχή πρόσδεσης με το DNA) τη μεταγραφή του γονιδίου της GA20ox.



Εικόνα 11: σχηματική απεικόνιση του βιοσυνθετικού μονοπατιού του GA και των σημείων-στόχων της αρνητικής επανατροφοδότησης από τα επίπεδα ενεργού GA τα οποία συμπίπτουν με αυτά των επιπέδων της πρωτεΐνης GAI [7].

Στόχος του πειράματος χρώσης GUS ήταν να δειχθεί ότι απουσία του συμπλέγματος CSN τα επίπεδα της πρωτεΐνης GAI αυξάνονται και επάγουν την υπερέκφραση της GA20ox επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο θετικά την παραγωγή GA. Αρχικά έπρεπε να ελεγχθεί το γενετικό κατασκεύασμα ως προς

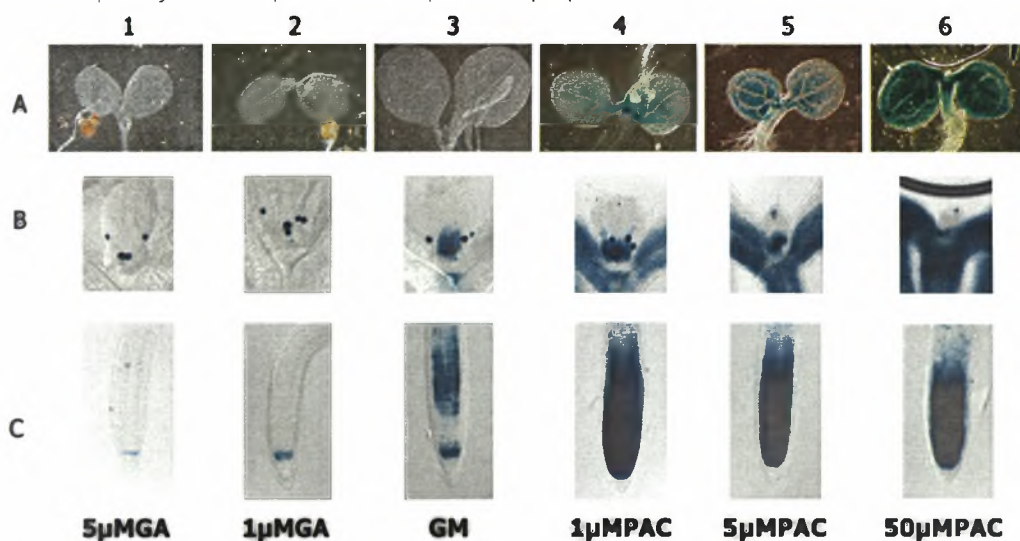
την ικανότητά του να κάνει εμφανή την έκφραση του ενζύμου GA20ox στους ιστούς τόσο ποιοτικά όσο και, όσο το δυνατό, ποσοτικά μέσω του χρώματος που δίνει το ένζυμο GUS μετά την πρόσθεση του κατάλληλου υποστρώματος. Χρησιμοποιήθηκαν για αυτό το λόγο φυτά με το σεσημασμένο γονίδιο GA20ox::GUS σε αγρίου τύπου background. Μελετήθηκε η συμπεριφορά του γονιδίου και το χρώμα των ιστών που την υποδήλωνε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις GA (0μM, 1μM, 5μM, 50μM) και σε διαφορετικές συνθήκες στέρησης του ενδογενούς GA μέσω αναστολής του βιοσυνθετικού μονοπατιού στο σημείο της κορενικής οξειδάσης (kaurene oxidase) με τη βοήθεια του αναστολέα PAC (0μM, 1μM, 5μM, 50μM).

Το αναμενόμενο αποτέλεσμα ήταν να παρατηρηθεί αύξηση της έντασης του χρώματος με την αύξηση της συγκέντρωσης του αναστολέα PAC και μείωση της έντασης του χρώματος με την αύξηση της συγκέντρωσης του GA. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αναστολέα του βιοσυνθετικού μονοπατιού του GA τόσο ισχυρότερα αναστέλλεται η παραγωγή του και τα επίπεδά του μειώνονται. Έτσι αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης GA και μέσω αυτής επάγεται η έκφραση της GA20 οξειδάσης με αποτέλεσμα να αυξάνεται και η ένταση του χρώματος που προκύπτει από την υπερέκφραση της GUS αφού τα γονίδια των δυο ενζύμων είναι συνδεδεμένα υπό τον ίδιο υποκινητή. Στην αντίθετη περίπτωση, αυτή δηλαδή της χορήγησης επιπλέον GA στα φυτά, επάγεται ο μηχανισμός αποικοδόμησης των πρωτεϊνών RGA και GAI, λόγω των αυξημένων επιπέδων του GA, με αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης των GA20ox::GUS και επομένως τη μείωση της έντασης του χρώματος (βλ. **Εικόνα 10, 11**).

Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 12** το φαινόμενο είναι ιδιαίτερα έντονο. Υπάρχει μια διαβάθμιση της έκφρασης της GA20ox που είναι ανάλογη με τις συνθήκες στις οποίες υποβλήθηκαν τα φυτά. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν φυτά τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε απλό θρεπτικό μέσο. Η χρώση των φυτών που αναπτύχθηκαν σε συγκέντρωση 50μM GA είναι πανομοιότυπη με αυτή των 5μM GA και οι εικόνες τους δεν παρατίθενται. Παρατηρώντας τις στήλες από την πρώτη έως την τελευταία (1-6) μειώνεται η συγκέντρωση GA στην οποία εκτίθενται τα φυτά είτε αυτή είναι εξωγενής είτε ενδογενής. Όσο μειώνεται η συγκέντρωση του GA τόσο αυξάνεται και η ένταση του χρώματος δηλαδή ο ρυθμός έκφρασης της GA20ox και κατά επέκταση του ενζύμου GUS. Στην πρώτη σειρά εικόνων (A) διακρίνεται η περιοχή ενδιαμέσων των κοτυληδόνων, στη δεύτερη σειρά εικόνων (B) παρατίθεται λεπτομέρεια του μεριστώματος από όπου εκφύονται τα νέα φύλλα ενδιαμέσων των

κοτυληδόνων σε μεγαλύτερη μεγέθυνση και στην τελευταία σειρά εικόνων (C) διακρίνεται η άκρη της ρίζας.

Με το πείραμα αυτό επιβεβαιώθηκε στην πράξη η λειτουργικότητα του κατασκευάσματος και κρίθηκε πως είναι ικανό να αντικαταστήσει την τεχνική της αντίστροφης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT PCR). Άλλωστε η τεχνική της RT PCR έχει μεγάλο κόστος και χρειάζεται πολύ περισσότερο χρόνο από μια χρώση GUS για όλους αυτούς τους συνδυασμούς συνθηκών που μελετήθηκαν.



Εικόνα 12: φωτογραφίες φυτών *GA20ox::GUS* σε αγρίου τύπου background με τη βοήθεια σπεκτροσκοπίου μετά από χρώση GUS.

Σειρά A κοτυληδόνες

Σειρά B ενδιάμεσα κοτυληδόνων, περιοχή όπου εκφύονται τα πρώτα φύλλα (μεγαλύτερη μεγέθυνση)

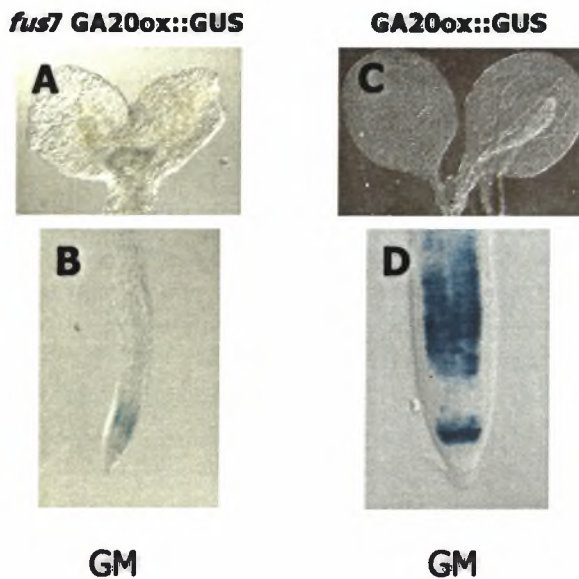
Σειρά C άκρες ριζών

Από τη στήλη 1 έως τη στήλη 6 μειώνεται σταδιακά η συγκέντρωση εξωγενούς και έπειτα ενδογενούς GA. Παρατηρείται αύξηση της έντασης του χρώματος αντίστροφως ανάλογη με αυτή της συγκέντρωσης του GA.

Αφού βεβαιώθηκε πως η τεχνική είναι αξιόπιστη αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της συμπεριφοράς του μηχανισμού αρνητικής επανατροφοδότησης απουσία του συμπλέγματος CSN. Η υπόθεση υποστήριζε πως η χρώση των ιστών σε τέτοια φυτά θα έπρεπε να είναι ιδιαίτερα έντονη αφού οι πρωτεΐνες RGA και GAI δε δύνανται να αποικοδομηθούν και συνεπώς η *GA20ox* και το ένζυμο GUS θα

υπερεκφραζόταν. Για το πείραμα αυτό διασταυρώθηκαν φυτά GA20ox::GUS σε αγρίου τύπου background με φυτά *fus7* επίσης σε αγρίου τύπου background. Η πρώτη γενιά των διασταυρώσεων έδωσε φυτά *fus7* GA20ox::GUS τα οποία αναπτύχθηκαν σε απλό θρεπτικό μέσο και χρωματίστηκαν.

Όπως φαίνεται στην **εικόνα 13** η χρώση των μεταλλαγμάτων είναι εξαιρετικά αχνή έως και ανύπαρκτη σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά του προηγούμενου πειράματος μάρτυρα όσον αφορά τη συγκέντρωση του GA. Το πείραμα αξίζει να σημειωθεί πως εκτελέστηκε σε συνθήκες πανομοιότυπες με αυτές του πειράματος μάρτυρα και επαναλήφθηκε τρεις φορές. Το ενδεχόμενο πειραματικού σφάλματος θεωρείται μάλλον απίθανο. Μια εύλογη εξήγηση του αποτελέσματος μπορεί να είναι το γεγονός ότι οι σειρές της πρώτης γενιάς της διασταύρωσης που εξετάστηκαν δεν φέρουν τον ίδιο μεγάλο αριθμό αντιγράφων του γονιδίου GA20ox::GUS με αποτέλεσμα την αχνή χρώση των ιστών. Πιθανό είναι όμως και το ενδεχόμενο το σύμπλεγμα CSN να μην επηρεάζει απουσία του την αρνητική επανατροφοδότηση του βιοσυνθετικού μονοπατιού του GA.



Εικόνα 13: φωτογραφίες φυτών *fus7* GA20ox::GUS σε σύγκριση με φυτά GA20ox::GUS μετά από χρώση GUS. Η ανάπτυξη όλων των φυτών έγινε σε απλό θρεπτικό μέσο.

- A) κοτυληδόνες φυτού *fus7* GA20ox::GUS
- B) άκρη ρίζας φυτού *fus7* GA20ox::GUS
- C) κοτυληδόνες φυτού GA20ox::GUS
- D) άκρη ρίζας φυτού GA20ox::GUS

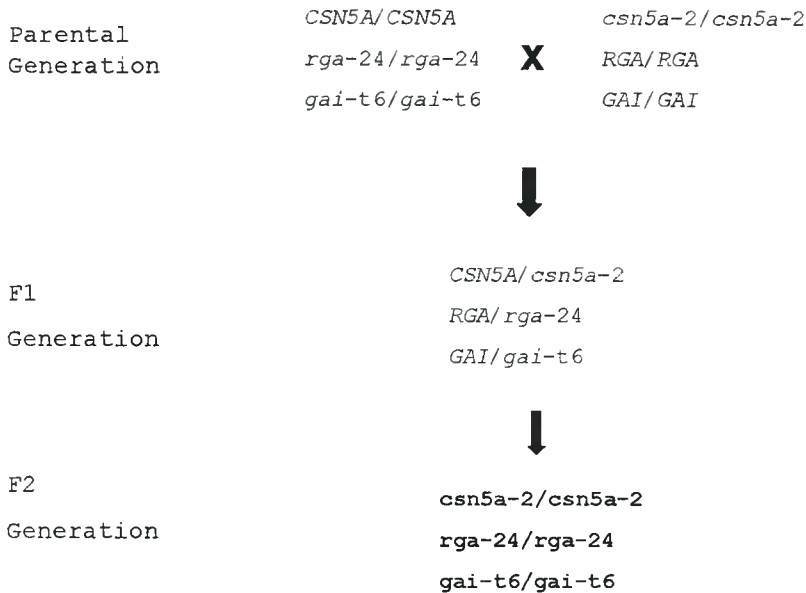
Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ορισμένες περιοχές όπου παρατηρείται χρώση, αυτή παραμένει αρκετά ισχυρή, ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις GA. Το γεγονός αυτό καθιστά τις συγκεκριμένες περιοχές μάλλον εξαιρετικά σημαντικές για την πιθανή διαφοροποίηση και αύξηση των γύρω ιστών. Οι περιοχές αυτές εντοπίζονται στα σημεία από όπου εκφύονται τα νέα φύλλα και περίπου στο πολλαπλασιαστικό μέρος του μεριστώματος της άκρης της ρίζας. Σημαντική παρατήρηση επίσης αποτελεί η έλλειψη χρώσης στις αγγειώσεις των κοτυληδόνων.

Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ CSN ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RGA ΚΑΙ GAI ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Σκοπός αυτού του μέρους του πειράματος ήταν να αφαιρεθούν (να ακυρωθεί η λειτουργία) τα γονίδια της υπομονάδας CSN5 και των πρωτεϊνών RGA και GAI σε διάφορους συνδυασμούς έτσι ώστε να είναι δυνατή, μέσω της παρακολούθησης της αναπτυξιακής συμπεριφοράς των φυτών, η εκτίμηση της σημασίας του κάθε παράγοντα και η συνεισφορά του στο μηχανισμό ανάπτυξης. Η υπόθεση υποστήριζε πως τα φυτά δίχως λειτουργικό σύμπλεγμα CSN αλλά με άθικτες τις πρωτεΐνες RGA και GAI θα έπρεπε να είναι εξαιρετικά υποανάπτυκτα και όσο αφαιρούνται λειτουργικά αντίγραφα των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες αυτές το μήκος του βλαστού να μεγαλώνει. Η υπόθεση αυτή βασίστηκε στα αποτελέσματα του πειράματος που προηγήθηκε με βιοσυνθετικά μεταλλάγματα *gai-3* και αφαίρεση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες RGA και GAI ξεχωριστά ή σε συνδυασμό. Μάλιστα η επίδραση της RGA θεωρήθηκε κατά πολλούς σημαντικότερη αφού ο φαινότυπος του βιοσυνθετικού μεταλλάγματος διασώζεται σχεδόν στο ακέραιο απουσία του ενώ η GAI αντίστοιχα δεν δύναται να επηρεάσει τόσο ισχυρά το φαινότυπο των φυτών αυτών. Κατά πάσα πιθανότητα θα μπορούσε να ισχύει κάτι αντίστοιχο και για το παρόν πείραμα.

Τα μεταλλάγματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα δεν χορηγήθηκαν αυτούσια από την εταιρεία. Πραγματοποιήθηκε μια σειρά διασταυρώσεων μεταξύ φυτών με γενότυπο CSN/CSN *rga-24/rga-24 gai-t6/gai-t6* και φυτών με γενότυπο *csn5a-2/csn5a-2 RGA/RGA GAI/GAI*. Η πρώτη γενιά φυτών F1 είχε εξολοκλήρου τον γενότυπο CSN/*csn5a-2 RGA/rga-24*

GAI/gai-t6. Τα φυτά αυτής της γενιάς F1 αφέθηκαν να αυτοαναπαραχθούν με σκοπό να δώσουν φυτά όλων των συνδυασμών συμπεριλαμβανομένων αυτών του ενδιαφέροντος του πειράματος και κυρίως τριπλών μεταλλάγματων *csn5a-2/csn5a-2 rga-24/rga-24 gai-t6/gai-t6*. Τα τελευταία σύμφωνα με την υπόθεση πρέπει να έχουν φαινότυπο πανομοιότυπο με αυτόν των αγρίου τύπου φυτών.



Εικόνα 14: διάγραμμα διασταυρώσεων που προηγήθηκαν των φυτών τα οποία τελικά χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα της γενετικής ανάλυσης για να διερευνηθεί ο ρόλος του συμπλέγματος CSN στο μηχανισμό αποικοδόμησης των πρωτεϊνών RGA και GAI και τη σημασία τους στην ανάπτυξη των φυτών.

Τα φυτά *Arabidopsis thaliana* συμπεριφέρονται σύμφωνα με το νόμο του Mendel κατά την κληρονομίση του γενετικού υλικού. Για να αυξηθούν λοιπόν οι πιθανότητες εύρεσης ενός τριπλού μεταλλάγματος από το 1/64 αναπτύχθηκαν περίπου 250 φυτά. Από το σύνολο των φυτών επιλέχθηκαν 41 φυτά με βάση το φαινότυπό τους, δηλαδή φυτά νάνα, μεσαίου ύψους και μερικά που έμοιαζαν με αγρίου τύπου φυτά. Αρχικά η πιθανότητα τα τριπλά μεταλλάγματα να έχουν παρόμοιο φαινότυπο με τα αγρίου τύπου φυτά υπολογίζονταν να είναι μικρή. Για αυτό το λόγο επιλέχθηκαν λίγα φυτά με μεγάλο ύψος.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα φυτά των διαφόρων διασταυρώσεων ανήκαν σε διαφορετικούς οικότυπους. Οι δύο

αυτοί οικότυποι παρουσιάζουν διαφορές όσον αφορά το μήκος των βλαστών τους. Τα φυτά οικότυπου Columbia συνήθως έχουν μεγαλύτερο μήκος βλαστού από τα Landsberg. Έτσι μετά από δύο γενεές διασταυρώσεων των δύο τύπων ενδέχεται δύο φυτά με τον ίδιο γενότυπο όσον αφορά το σύμπλεγμα CSN και τις πρωτεΐνες RGA και GAI να έχουν αρκετά διαφορετικό μήκος βλαστού επειδή το υπόλοιπο γονιδίωμα είναι διαφορετικού τύπου.

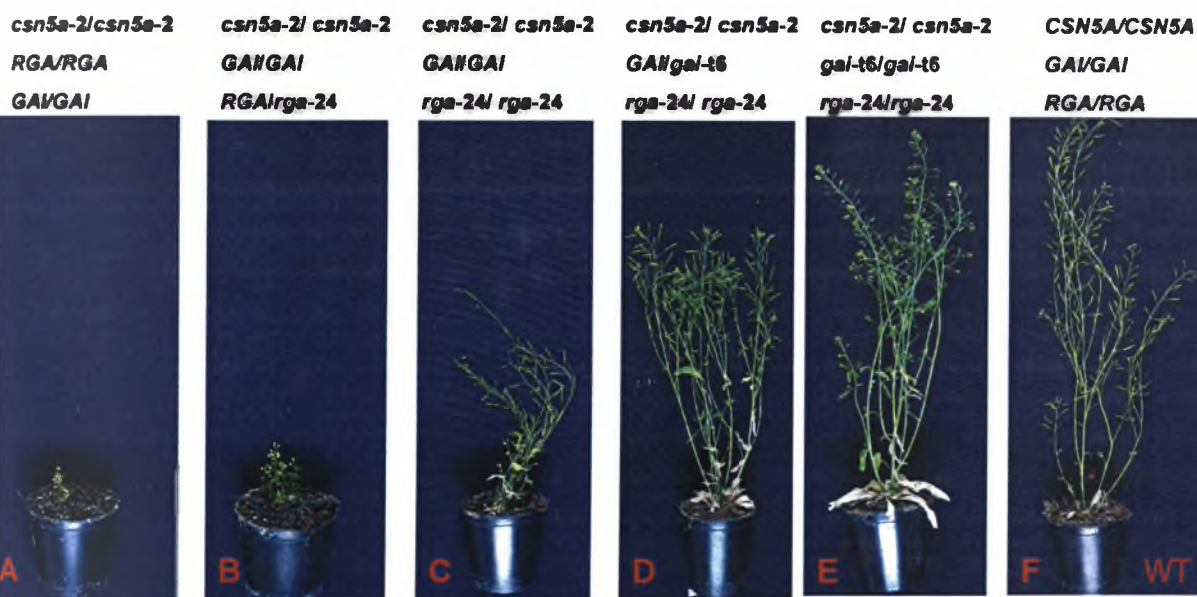
Για να διαπιστωθεί ο γενότυπος των φυτών που επιλέχθηκαν ως προς τους γονιδιακούς τόπους που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες CSN5, RGA και GAI χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR. Για κάθε γονιδιακό τόπο εκτελέστηκαν δυο αντιδράσεις, η μια για την ενίσχυση του αγρίου τύπου γονιδίου και η άλλη για το μεταλλαγμένο. Με αυτόν τον τρόπο διαπιστώθηκε αν τα φυτά ήταν ομόζυγα για το αγρίου τύπου γονίδιο, ετερόζυγα ή ομόζυγα για το μεταλλαγμένο γονίδιο του κάθε έναν από τους γονιδιακούς τόπους. Οι αντιδράσεις εκτελέστηκαν 4-5 φορές και με γενετικό υλικό δυο διαφορετικών απομονώσεων.

Μετά από τη διαπίστωση του γενότυπου των φυτών έγινε μια σύνδεση αυτού με το φαινότυπό τους. Λόγω του γεγονότος ότι τα φυτά διέφεραν ως προς τον οικότυπό τους η σύγκριση ήταν αρκετά δύσκολη. Για το λόγο αυτό τα φυτά διαχωρίστηκαν και πάλι ως προς τον οικότυπό τους έτσι ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ ομοίων. Ανάμεσα στα φυτά τύπου Columbia υπήρχαν φυτά τα οποία επιβεβαίωναν την αρχική υπόθεση (εικόνα 16). Φυτά με γενότυπο *csn5a-2/csn5a-2* σε συνδυασμό με *RGA/rga-24* *GAI/GAI* (B) είχαν ύψος σχεδόν σαν αυτό των μονών μεταλλαγμάτων *csn5a-2/csn5a-2* (A). Αντίστοιχα φυτά με ένα αντίγραφο *RGA* λιγότερο δηλαδή *rga-24/rga-24* *GAI/GAI* (C) έχουν ελαφρώς μεγαλύτερο ύψος. Όταν απουσιάζει και ένα αντίγραφο *GAI* (*rga-24/rga-24* *GAI/gai-t6*) τότε το ύψος αυξάνει ακόμα περισσότερο (D) και απουσία όλων των αντιγράφων των δύο γονιδίων *RGA* και *GAI* (*rga-24/rga-24* *gai-t6/gai-t6*) τότε το ύψος των φυτών (E) είναι σχεδόν πανομοιότυπο με αυτό των αγρίου τύπου φυτών (F) στα οποία βέβαια το σύμπλεγμα CSN είναι παρόν.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει πως το σύμπλεγμα CSN είναι εξαιρετικά σημαντικό και απαραίτητο για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μέσω του 26S πρωτεοσώματος. Απουσία του οι πρωτεΐνες αυτές δεν αποικοδομούνται, συσσωρεύονται στο εσωτερικό των κυττάρων και αναστέλλουν την ανάπτυξη και αύξηση των φυτών. Μια εξίσου σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι αν από τα φυτά που τους λείπει το σύμπλεγμα CSN αφαιρεθούν και τα γονίδια των

πρωτεϊνών RGA και GAI τότε το ύψος των φυτών είναι φυσιολογικό, ο φαινότυπος του *csn5a-2/csn5a-2* μεταλλάγματος διασώζεται πλήρως. Μάλιστα το ύψος των φυτών είναι αντιστρόφως ανάλογο των λειτουργικών αντιγράφων που έχει το φυτό. Όσο περισσότερα λειτουργικά αντίγραφα των πρωτεϊνών έχει το γονιδίωμα του φυτού τόσο μικρότερο είναι το μήκος του βλαστού του και αντίστροφα.

Συνδυάζοντας λοιπόν τις δυο παραπάνω παρατηρήσεις προκύπτει πως η σημασία των πρωτεϊνών RGA και GAI είναι τελικά ίσως και η μεγαλύτερη από όλες τις άλλες πρωτεΐνες οι οποίες παίρνουν μέρος σε μονοπάτια ανάπτυξης και αύξησης των φυτών. Είναι φανερό πως ενώ λείπει το σύμπλεγμα CSN και καμία πρωτεΐνη δεν δύναται να αποικοδομηθεί από το σύστημα του 26S πρωτεοσώματος, μόλις απομακρύνονται οι πρωτεΐνες RGA και GAI τα φυτά αναπτύσσονται κανονικά. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες, οι οποίες προφανώς συσσωρεύονται, δεν επηρεάζουν, εμφανώς τουλάχιστο, την ανάπτυξη των φυτών.



Εικόνα 15: φωτογραφίες μεταλλαγμένων φυτών.

Στην εικόνα A διακρίνεται μονό μετάλλαγμα *csn5a-2/csn5a-2* που χρησιμεύει ως μάρτυρας για τη σύγκριση του μήκους του βλαστού.

Στην εικόνα F φαίνεται ένα αγρίου τύπου φυτό που επίσης χρησιμεύει σαν μάρτυρας για τον ίδιο λόγο.

Από την εικόνα B μέχρι την εικόνα E φαίνονται τριπλά ομόζυγα ή ετερόζυγα μεταλλάγματα απουσία πάντα του συμπλέγματος CSN. Όσο

περισσότερα αντίγραφα απουσιάζουν τόσο μεγαλύτερο είναι το μήκος του βλαστού των φυτών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν να δειχθεί ότι το σύμπλεγμα CSN παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των παραγόντων ελέγχου της ανάπτυξης των φυτών που ρυθμίζονται από το γιββεριλλικό οξύ. Εκτελέστηκαν για αυτό το λόγο πειράματα που χρησιμοποιούσαν βιοχημικές, ανοσολογικές και γενετικές μεθόδους έτσι ώστε να μελετηθεί η ίδια παράμετρος από διαφορετικές απόψεις. Φωτίζοντας τον ίδιο παράγοντα από διαφορετικές γωνίες μπορεί κανείς να βγάλει πιο σίγουρα και πειστικά αποτελέσματα για κάποιο φαινόμενο.

Μέσω της βιοχημικής οδού, δηλαδή αυτή της ανοσοκατακρήμνισης, επιχειρήθηκε να δειχθεί πως το σύμπλεγμα CSN αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα SCF^{SLY1} σε απάντηση του GA για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών RGA και GAI. Το πρώτο βήμα του πειράματος ήταν η ανίχνευση της σεσημασμένης πρωτεΐνης SLY1::HA με τη βοήθεια της οποίας θα εκτελούνταν η κατακρήμνιση. Η πρωτεΐνη βρέθηκε πως δεν εκφράζονταν στα φυτά τα οποία μελετήθηκαν (εικόνα 7). Έτσι αποφασίστηκε να κατασκευαστούν φυτά των οποίων οι φορείς του σεσημασμένου γονιδίου να είναι επαγόμενης έκφρασης με σκοπό να είναι εφικτή η υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε επιθυμητή χρονική στιγμή και σε μεγάλες ποσότητες.

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε να μελετηθεί ο ρόλος του συμπλέγματος CSN στην αρνητική επανατροφοδότηση του βιοσυνθετικού μονοπατιού του GA. Κατασκευάστηκαν φυτά τα οποία έφεραν σεσημασμένα γονίδια-στόχους της αρνητικής επανατροφοδότησης, GA20ox::GUS, και ελέγχθηκε η λειτουργικότητα του συστήματος παρακολούθησης της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών. Το σύστημα κρίθηκε πως δύναται να δώσει αξιόπιστες πληροφορίες για το μοντέλο έκφρασης του ενζύμου GA20ox και ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρατήρηση της επίδρασης του συμπλέγματος CSN στον μηχανισμό της αρνητικής επανατροφοδότησης του βιοσυνθετικού μονοπατιού του GA (εικόνα 12). Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού έδειξαν πως το σύμπλεγμα CSN δε φαίνεται να παίζει αποφασιστικό ρόλο όσον αφορά το μονοπάτι σύνθεσης

του GA αφού δεν επηρεάζει κατά κάποιο τρόπο την έκφραση του ενζύμου GA20ox (**εικόνα 13**).

Σημαντικό κομμάτι των πειραμάτων αποτέλεσε ο εντοπισμός των πρωτεϊνών RGA και GAI σε φυτά στα οποία απουσίαζε το σύμπλεγμα CSN. Με την τεχνική του ανοσοφθορισμού εντοπίστηκε συσσωρευμένη στον πυρήνα η πρωτεΐνη RGA απουσία του CSN συμπλέγματος. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η πρωτεΐνη παραμένει συσσωρευμένη και δεν αποικοδομείται μετά από επώαση των φυτών με GA για μια ώρα. Το συμπέρασμα από την εκτίμηση των αποτελεσμάτων είναι ότι το CSN σύμπλεγμα είναι απαραίτητο για την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης RGA και ότι δευτερευόντως βρίσκεται downstream του σήματος του GA.

Το ίδιο πείραμα εκτελέστηκε για την πρωτεΐνη GAI χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά απλά μια σεσημασμένη μορφή της πρωτεΐνης, GAI::GFP, και όχι την τεχνική του ανοσοφθορισμού. Μετά από απλή παρατήρηση των ιστών των ριζών διαπιστώθηκε και για την πρωτεΐνη GAI::GFP πως απουσία του συμπλέγματος CSN συσσωρεύεται στον πυρήνα των κυττάρων (**εικόνα 9**). Και με αυτόν τον τρόπο αποδείχτηκε ο σημαντικός ρόλος που φαίνεται να παίζει το σύμπλεγμα CSN στο μηχανισμό αποικοδόμησης πρωτεϊνών μέσω του 26S πρωτεοσώματος.

Η γενετική ανάλυση που έγινε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας αποτελεί μάλλον και την πιο τρανή απόδειξη ότι το COP9 signalosome είναι απαραίτητο για την επιτυχή αποικοδόμηση των πρωτεϊνών RGA και GAI αλλά και όλων των υπολοίπων. Παράλληλα όμως με αυτό δείχθηκε και η πολύ μεγάλη σημασία των ίδιων των πρωτεϊνών RGA και GAI για την ανάπτυξη των φυτών. Παρατηρήθηκε πως τα φυτά απουσία του CSN αδυνατούν να αποικοδομήσουν τις πρωτεΐνες RGA και GAI. Η ανάπτυξή τους αναστέλλεται και ο φαινότυπός τους χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά μικρού μήκους βλαστό. Όταν οι πρωτεΐνες RGA και GAI απομακρύνονται γενετικά η ανάπτυξη των φυτών σταδιακά τείνει στο κανονικό με αποκορύφωμα την πλήρη ανάκαμψη απουσία όλων των αντιγράφων των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες RGA και GAI. Το γεγονός αυτό αποτελεί τρανή απόδειξη της εξαιρετικής σημασίας των δυο αυτών πρωτεϊνών για την ανάπτυξη των φυτών (**εικόνα 15**).

Συνοψίζοντας καταλήγει κανείς στο συμπέρασμα πως το CSN σύμπλεγμα είναι απαραίτητο για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μέσω του συστήματος του 26S πρωτεοσώματος. Δεν επηρεάζει όμως το μονοπάτι σύνθεσης του GA. Τέλος οι πιο

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ COP9 SIGNALOSOME ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΤΟΥ
ΓΙΒΒΕΡΙΑΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ *Arabidopsis thaliana*

σημαντικές και αποφασιστικές πρωτεΐνες για την ανάπτυξη των
φυτών φαίνεται να είναι οι RGA και GAI.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Στυλιανός Σ. Καράταγλης. Φυσιολογία Φυτών. Art of Text, Θεσσαλονίκη (1994)
2. Tai-ping Sun. *Gibberellin signal transduction*. Current Opinion in Plant Biology (2000), 3:374-380
3. Karen M. McGinnis, Stephen G. Thomas, Jonathan D. Soule, Lucia C. Strader, Janice M. Zale, Tai-ping Sun, Camille M. Steber. *The Arabidopsis SLEEPY1 Gene Encodes a Putative F-box Subunit of an SCF E3 Ubiquitin Ligase*. The Plant Cell (2003), 15:1120-1130
4. Alyssa Dill, Stephen G. Thomas, Jianhong Hu, Camille M. Steber, Tai-ping Sun. *The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 Targets Gibberellin Signaling Repressors for Gibberellin-Induced Degradation*. The Plant Cell (2004), 16:1392-1405
5. Sorcheng Lee, Hui Cheng, Kathryn E. King, Weefuen Wang, Yawen He, Alamgir Hussain, Jane Lo, Nicholas P. Harberd, Jinrong Peng. *Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition*. GENES & DEVELOPMENT (2002), 16:646-658
6. [http://www.yelori.com/products/Gibberellic acid.shtml](http://www.yelori.com/products/Gibberellic%20acid.shtml)
7. <http://www.csiro.com>
8. Aron L. Silverstone, Charles N. Ciampaglio, and Tai-ping Sun. *The Arabidopsis RGA Gene Encodes a Transcriptional Regulator Repressing the Gibberellin Signal Transduction Pathway*. Plant Cell (1998), 10: 155-170.
9. Claus Schwechheimer, Xing-Wang Deng. *COP9 signalosome revisited: A novel mediator or protein degradation*. Trends in Cell Biology (2001), 11: 420 - 426.
10. Claus Schwechheimer, Giovanna Serino, Xing-Wang Deng. *Multiple ubiquitin ligase-mediated processes require COP9 signalosome and AXR1 function*. Plant Cell (2002), 14:2553 - 2563.
11. Xiping Wang, Dingming Kang, Suhua Feng, Giovanna Serino, Claus Schwechheimer, Ning Wei. *CSN1 N-terminal-dependent activity is required for Arabidopsis development but not for Rub1/Nedd8 deconjugation of cullins: A structure-function study of CSN1 subunit of COP9 Signalosome*. Molecular Biology of the Cell (2002), 13: 646 - 655.
12. Claus Schwechheimer, Giovanna Serino, Judy Callis, William L. Crosby, Svetlana Lyapina, Raymond J. Deshaies, William M. Gray, Mark Estelle, Xing-Wang Deng. *Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin-response*. Science (2001), 292: 1379 - 1382.

13. Alyssa Dill, Tai-ping Sun. *Synergistic Derepression of Gibberellin Signaling by Removing RGA and GAI Function in Arabidopsis thaliana*. Genetics (2001), 159:777-785
14. Jinrong Peng, Pierre Carol, Donald E. Richards, Kathryn E. King, Rachel J. Cowling, George P. Murphy, Nicholas P. Harberd. *The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses*. GENES & DEVELOPMENT (1997), 11:3194-3205.
15. Aron L. Silverstone, Charles N. Ciampaglio, Tai-ping Sun. *The Arabidopsis RGA Gene Encodes a Transcriptional Regulator Repressing the Gibberellin Signal Transduction Pathway*. The Plant Cell (1998), 10:155-169.
16. Jinrong Peng, Donald E. Richards, Thomas Moritz, Hiroshi Ezura, Pierre Carol, Nicholas P. Harberd. *Molecular and physiological characterization of Arabidopsis GAI alleles obtained in targeted Ds-tagging experiments*. Plants (2002), 214:591-596
17. Claus Schwechheimer, Luz Irina A. Calderon Villalobos. *Cullin-containing E3 ubiquitin ligases in plant development*. Current Opinion in Plant Biology (2004), 7:677-686.
18. Nihal Dharmasiri, Sunethra Dharmasiri, Mark Estelle. *The F-box protein TIR1 is an auxin receptor*. Ανέκδοτο κείμενο (2005).
19. Xiangdong Fu, Nicholas P. Harberd. *Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response*. Nature (2003), 421:740-743.
20. Kathryn E. King, Thomas Moritz, Nicholas P. Harberd. *Gibberellins Are Not Required for Normal Stem Growth in Arabidopsis thaliana in the Absence of GAI and RGA*. Genetics (2001), 159:767-776
21. A.G. Von Arnim, *On again-off again: COP9 signalosome turns the key on protein degradation*. Curr. Opin. Plant Biol. 6 (2003), 520-529
22. Bethke, P.C., and Jones, R.L.. *Gibberellin signaling*. Curr. Opin. Plant Biol. 1 (1998), 440-446
23. Hedden, P., and Proebsting, W.M. *Genetic analysis of gibberellin biosynthesis*. Plant Physiol. 119 (1999), 365-370
24. Koornneef, M., Elgersma, A., Hanhart, C.J., van Loenen, M.E.P., van Rijn, L., Zeevaart, J.A.D.. *A gibberellin insensitive mutant of Arabidopsis thaliana*. Physiol. Plant. 65 (1985), 33-39
25. Phillips, A.L., Ward, D.A., Uknes, S., Appleford, N.E.J., Lange, T., Huttly, A., Gaskin, P., Graebe, J.E., Hedden, P. *Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from Arabidopsis*. Plant Physiol. 108 (1995), 1049-1057

26. Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., Benfey, P.N.. *The GRAS gene family in Arabidopsis: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes.* Plant J. **18** (1999), 111-119
27. Silverstone, A.L., Mak, P.Y.A., Martínez, E.C., Sun, T.-p.. *The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in Arabidopsis thaliana.* Genetics **146** (1997), 1087-1099
28. Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H., Galbraith, D.W.. *Green-fluorescent protein as a vital marker in plant cells.* Plant J. **8** (1995), 777-784
29. J. Smalle, R. Vierstra, *The UB 26S proteasome proteolytic pathway,* Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **55** (2004), 555-590