



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΚΑΦΙΔΑ ΜΙΧΑΕΛΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2025

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ
LjSK6 ΣΤΟ ΦΥΤΟ *LOTUS JAPONICUS* ΜΕΣΩ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ
CRISPR/CAS9**

**DEVELOPMENT OF MUTANTS FOR THE KINASE GENE *LjSK6* IN
LOTUS JAPONICUS THROUGH CRISPR/CAS9 METHODOLOGY**

Τριμελής επιτροπή:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: (επιβλέπουσα)	Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
Καρπούζας Δημήτριος:	Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
Βασιλειάδης Σωτήριος:	Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους αυτούς που στάθηκαν δίπλα μου κατά την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας και κυρίως την υπεύθυνη καθηγήτρια μου κυρία Καλλιόπη Παπαδοπούλου που πίστεψε σε εμένα. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω και για όλες τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε σε πειραματικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο καθώς ήταν πάντα διαθέσιμη για οποιαδήποτε απορία και μου έδωσε ώθηση για το επόμενο ακαδημαϊκό μου βήμα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα και όλα τα άτομα που ήταν στο εργαστήριο καθώς αν και «παροδική» με έκαναν να αισθανθώ μέλος της ομάδας τους.

Συγκεκριμένα, ευχαριστώ πολύ την υποψήφια διδάκτορα Τζένη Κουκάρα που ήταν συνέχεια κοντά μου. Εκτίμησα το ότι ενώ μου έδινε τη δυνατότητα να πάρω τις δικιές μου αποφάσεις για να καταλάβω τον πειραματικό σχεδιασμό, με βοηθούσε αδιαλείπτως και ψάχναμε μαζί λύσεις σε όλα τα προβλήματα που προέκυψαν, καθώς και για την ψυχολογική υποστήριξη που μου έδωσε και για τις δεξιότητες που απέκτησα κοντά της.

Επιπλέον, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τα μέλη της επιτροπής μου τον καθηγητή κύριο Καρπούζα Δημήτριο και τον επίκουρο καθηγητή κύριο Βασιλειάδη Σωτήριο για όλη την κατανόηση, τις γνώσεις τους και τη βοήθειά τους κατά την εκπόνηση - παρουσίαση αυτής της διπλωματικής.

Τέλος δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους φίλους μου και την οικογένειά μου που ήταν κοντά μου και με στήριξαν ακούγοντας ότι είχα να τους πω για τη μέρα μου και τη πορεία της εργασίας, χωρίς να τους ενδιαφέρει.

Περίληψη

Το άζωτο αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία για την ανάπτυξη των φυτών, και ορισμένα από αυτά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για τη δέσμευση του αζώτου. Τα ψυχανθή, για παράδειγμα, έχουν την ικανότητα να συνάπτουν ωφέλιμες συμβιωτικές σχέσεις με βακτήρια. Ένα τέτοιο μοντέλο οργανισμός είναι το *Lotus japonicus*, το οποίο συμβιώνει με ριζόβια αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, μέσω ειδικών οργανιδίων, γνωστά ως φυμάτια. Η διαδικασία της φυματιογένεσης αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία ρυθμίζεται αυστηρά σε γονιδιακό επίπεδο. Στη ρύθμιση αυτή συμμετέχουν μονοπάτια γονιδίων, όπου κύριο ρυθμιστικό ρόλο διαδραματίζουν και οι κινάσες. Μία τέτοια πρωτεΐνη είναι η κινάση LjSK6 (*L. japonicus* Shaggy-like kinase), η οποία έχει βρεθεί ότι αυξορρυθμίζεται κατά τα αρχικά στάδια της φυματιογένεσης. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η έκφραση της *LjSK6* στο φυτό *L. japonicus* στον οικότυπο MG-20, κατά τη διάρκεια της φυματιογένεσης σε διάφορα στάδια (1, 3, 7, 14 και 21 ημέρες μετά την έναρξη του εμβολισμού – dpi) με το ριζόβιο MAFF303099. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση του γονιδίου είναι υψηλότερη στα νεαρότερα φυτά, σε σχέση με τα γηραιότερα φυτά, ανεξάρτητα από την παρουσία του ριζοβίου. Αυτό πιθανώς παραπέμπει στην συμμετοχή της LjSK6 στην φυσιολογική ανάπτυξη της ρίζας, καθώς όσο μεγαλώνει ο ριζικός ιστός η έκφραση της *LjSK6* μειώνεται. Επιπλέον, προχωρήσαμε στη δημιουργία μεταλλαγμένων φυτών για τον οικότυπο MG-20 για το γονίδιο *LjSK6*, χρησιμοποιώντας το σύστημα γενετικής τροποποίησης CRISPR/Cas9. Μέσω μοριακής κλωνοποίησης δημιουργήθηκαν φορείς με single guide RNAs και άλλα απαραίτητα γονίδια (πχ. Cas9). Με παροδικό μετασχηματισμό με *R. rhizogenes*, αυτοί οι φορείς χρησιμοποιήθηκαν για τη στόχευση τεσσάρων σημείων του γονιδίου της *LjSK6* στο *L. japonicus* και αξιολογήθηκαν για την αποτελεσματικότητά τους. Στο επόμενο στάδιο, θα γίνει παρατήρηση του φαινοτύπου των μεταλλαγμένων φυτών, καθώς και του αριθμού των φυματίων τους, προκειμένου να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με τη συμμετοχή της LjSK6 στη φυματιογένεση.

Λέξεις κλειδιά: *L. japonicus*, CRISPR/Cas9, LjSK6, Φυματιογένεση, Συμβίωση, Κινάση

Abstract

Nitrogen is one of the most important elements for plant growth, and some plants have developed mechanisms for nitrogen fixation, to fulfil their needs. Legumes can form beneficial symbiotic relationships with bacteria. One such model organism is *Lotus japonicus*, which forms a symbiotic relationship with nitrogen-fixing rhizobia bacteria through specialized organelles, called nodules. Nodule formation is a multifaceted process with strict genetic regulation. This regulation involves gene pathways in which kinases play a key regulatory role. One such protein is the LjSK6 kinase (*L. japonicus* Shaggy-like kinase), which has been found to be upregulated closely after inoculation with a nitrogen fixing bacteria. In this study, was examined the expression of *LjSK6* in MG – 20 ecotype of *L. japonicus* during the stages of nodule formation at 1-, 3-, 7-, 14-, and 21-days post-inoculation (dpi) by the rhizobium MAFF303099. The results indicated that the expression of the LjSK6 gene is higher in young plants, compared to older plants, regardless of the presence of rhizobia. As the root tissue grows, the expression of LjSK6 decreases. This probably points to the involvement of LjSK6 in normal root development. Furthermore, we proceeded to the creation of mutants of the MG-20 genotype for the *LjSK6* gene using the CRISPR/Cas9 genetic modification system. Through molecular cloning, vectors with single guide RNAs and other necessary genes (e.g. Cas9) were generated. By transient transformation through *R. rhizogenes*, these vectors were used to target four sites of the *LjSK6* gene in *L. japonicus* and were evaluated for their editing efficiency. In future experiments, the phenotype of the mutated plants and the number of their nodules will be observed to draw a reliable conclusion regarding the role of LjSK6 in nodule formation.

Keywords: *L. japonicus*, CRISPR/Cas9, LjSK6, Nodulation, Symbiosis, Kinase

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες	III
Περίληψη	IV
Abstract	V
Πίνακας περιεχομένων πινάκων	VII
Πίνακας περιεχομένων εικόνων	VIII
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Τα ψυχανθή και ο οργανισμός μοντέλο <i>Lotus japonicus</i>	1
1.2 Δέσμευση του αζώτου στο έδαφος	2
1.2.α Φυματιογένεση: κυτταρικές προσαρμογές	2
1.2.β Φυματιογένεση: μοριακή – ορμονική προσέγγιση	3
1.2.γ Φυματιογένεση: αυτορρύθμιση - Autoregulation of Nodulation (AON)	5
1.2.δ Διατήρηση φυματίων και γήρανση	5
1.3 Συνθάσες του γλυκογόνου 3 / Shaggy-like kinases (SK)	6
1.4 Σύστημα CRISPR/Cas	7
1.4.α Ιστορική αναδρομή και βασικά συστατικά του CRISPR/Cas9	7
1.4.β CRISPR/Cas ως σύστημα γενετικής τροποποίησης	9
1.4.γ Παραδείγματα εφαρμογών του συστήματος CRISPR/Cas9 στα φυτά	10
1.4.δ Σχεδίαση γενετικής τροποποίησης με βάση το CRISPR/Cas9	11
1.3 Golden Gate – Σύστημα κλωνοποίησης	13
2. Σκοπός	14
3. Υλικά και Μέθοδοι	15
3.1 Πείραμα έκφρασης της σε συνάρτηση με τον χρόνο	15
3.1.α Scarification και αποστείρωση σπόρων	15
3.1.β Εκβλάστηση σπόρων	15
3.1.γ Χειρισμοί φυτών	15
3.1. δ Απομόνωση RNA.....	16
3.1. ε Απομάκρυνση υπολειμμάτων DNA και επιβεβαίωση μέσω PCR.....	17
3.1.ζ Ποσοτικός προσδιορισμός του mRNA LjSK6 – qPCR	19
3.1.η Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	20
3.2 Εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9 στο γονίδιο <i>LjSK6</i> του <i>L. japonicus</i>	21
3.2.α Σχεδίαση και διμερισμός sgRNAs.....	21
3.2.β Κλωνοποίηση με βάση το σύστημα Golden Gate	21
3.2.γ Εισαγωγή πλασμιδίων σε χημειοδεκτικά κύτταρα DH5a	23
3.2.δ Διαγνωστική πέψη των πλασμιδίων Level_2	23
3.2.ε Μετασχηματισμός των <i>R. rhizogenes</i> LBA 9402 με τους φορείς Level_2.....	24
3.2.ζ Παροδικός μετασχηματισμός <i>L. japonicus</i> μέσω Hairy Roots.....	24
3.3 Αξιολόγηση της ικανότητας της μεταλλαξιγένεσης στο γονίδιο <i>LjSK6</i>	25
3.3.α Απομόνωση DNA από φυτά.....	25
3.3.β PCR με την υψηλής πιστότητας πολυμεράση Q5	26
3.3.γ Δοκιμασία ενδονουκλεάσης T7	27
4. Αποτελέσματα - Συζήτηση	28
4.1 Αποτελέσματα πειράματος έκφρασης της <i>LjSK6</i> σε συνάρτηση με τον χρόνο	28
4.1.α Επιβεβαίωση καθαρότητας RNA	28
4.1.β Αποτελέσματα αντίδρασης qPCR – Στατιστική ανάλυση	29

.....Error! Bookmark not defined.	
4.2 Αποτελέσματα παραγωγής φορέων	31
4.2.α Επιλογή gRNAs	31
4.2.β Κατασκευή των κασετών έκφρασης μέσω Golden Gate	32
4.2.γ Μεταφορά του L2 πλασμιδίου στο <i>R. rhizogenes</i>	35
4.2.δ Μεταφορά του T-DNA στο <i>L. japonicus</i>	35
4.2.ε Αποτελέσματα Q5 PCR για το γονίδιο της <i>LjSK6</i>	36
4.2.ζ Αποτελέσματα δοκιμασίας T7 ενδονουκλεάσης I	38
5. Συμπεράσματα – Μελλοντικές ενέργειες	40
6. Βιβλιογραφία	43
7. Παράρτημα	46

Πίνακας περιεχομένων πινάκων

Πίνακας 1: Θρεπτικό Jensen συστατικά και συγκεντρώσεις.	15
Πίνακας 2: Συστατικά του αντιδραστήριου Hoagland	16
Πίνακας 3: Παρασκευή διαλυμάτων για απομόνωση RNA	17
Πίνακας 4: Συστατικά αντίδρασης DNase I	18
Πίνακας 5: Εκκινητές για το γονίδιο της <i>LjUb</i> για αντίδραση PCR	18
Πίνακας 6: Αντιδραστήρια διαγνωστικής PCR	19
Πίνακας 7: Συστατικά και βήματα αντίδρασης qPCR.	20
Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά εκκινητών qPCR.	20
Πίνακας 9: Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των ολιγονουκλεοτιδίων που θα δώσουν τα sgRNAs.	21
Πίνακας 10: Συστατικά αντίδρασης κλωνοποίησης Level_1	22
Πίνακας 11: Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή Level_1	22
Πίνακας 12: Συστατικά αντίδρασης κλωνοποίησης Level_2	23
Πίνακας 13: Βήματα για την αντίδραση PCR Q5 μεταξύ των	26
Πίνακας 14: Αλληλουχίες εκκινητών για το γονίδιο <i>LjSK6</i> για PCR αντίδραση με Q5	26
Πίνακας 15: Συστατικά αντίδρασης της ενδονουκλεάσης T7 I	27
Πίνακας 16: Πρόγραμμα αποδιάταξης και υβριδισμού των προϊόντων της PCR	27
Πίνακας 18: Δομή γονιδιακών κατασκευών	34
Πίνακας 19: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA και χαρακτηριστικά των δειγμάτων.	36

Πίνακας περιεχομένων εικόνων

Εικόνα 1: Χαρακτηριστικά του φυτού <i>L. japonicus</i>	2
Εικόνα 2: Διαδικασίας φυματιογένεσης.....	3
Εικόνα 3: Μοριακή πτυχή της φυματιογένεσης.....	4
Εικόνα 4: Αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης.....	5
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού άμυνας CRISPR/Cas9 -τύπος II.....	8
Εικόνα 6: Μηχανισμός γενετικής τροποποίησης μετά την διπλή ρήξη.....	10
Εικόνα 7: Τα βασικά χαρακτηριστικά και σημεία μίας εφαρμογής CRISPR/Cas9 σε φυτά.....	12
Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση RNA.....	28
Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση μετά την εφαρμογή της DNAase I.....	29
Εικόνα 10: Οι επιλεγμένες αλληλουχίες στόχευσης στο γονίδιο <i>LjSK6</i>	31
Εικόνα 11: Συναρμολόγηση της κασέτας έκφρασης του <i>LjSK6_gRNA1</i> σε φορέα 3F.....	32
Εικόνα 12: Σύνθεση φορέα L2.....	33
Εικόνα 13: Διαγνωστική πέψη L2 φορέων.....	34
Εικόνα 14: Ρίζες μετασχηματισμένου φυτού.....	36
Εικόνα 15: Θέσεις ενίσχυσης PCR, εντός του γονιδίου <i>LjSK6</i>	37
Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση τμημάτων της <i>LjSK6</i> μετά την ενίσχυσή τους με PCR.....	38
Εικόνα 17: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρηση με την πέψη από την ενδονουκλεάση T7 I.....	39

1. Εισαγωγή

1.1 Τα ψυχανθή και ο οργανισμός μοντέλο *Lotus japonicus*

Τα ψυχανθή (*Fabaceae* ή *Leguminosae*) αποτελούν μία οικογένεια φυτών με πάνω από 19.000 είδη και έχουν μεγάλη σημασία στον πρωτογενή τομέα ως ζωοτροφές και λιπάσματα αλλά και ως φυτική πηγή πρωτεΐνης για τον άνθρωπο. Η κατανάλωση ψυχανθών έχει συσχετιστεί με μείωση του διαβήτη τύπου 2, την μείωση της εμφάνισης ορισμένων καρκινικών μορφών, την μείωση της παχυσαρκίας, ενώ έχει βρεθεί ότι ενισχύει το ανοσοποιητικό και καρδιαγγειακό σύστημα. Επιπλέον, τα ψυχανθή αποτελούν την κύρια πηγή για την παραγωγή υποκατάστατων προϊόντων ζωικής προέλευσης, τα οποία έχουν αυξημένη ζήτηση και θέση στην παγκόσμια οικονομία, όπως η σόγια (Yanni et al., 2023). Ακόμα, τα ψυχανθή έχουν την ικανότητα αζωτοδέσμευσης (θα αναλυθεί στην παρακάτω υποενότητα).

Για την μελέτη των μηχανισμών της αζωτοδέσμευσης αξιοποιούνται διάφοροι οργανισμοί - μοντέλα. Ένας από τους πιο μελετημένους είναι το *Lotus japonicus* (*L. japonicus*), όπου χρησιμοποιείται από το 1992 (Handberg & Stougaard, 1992) (Εικόνα 1). Πρόκειται για ένα διπλοειδές (2n), μονοετές ψυχανθές, με μικρό γονιδίωμα περίπου 500MB που κατανέμονται σε έξι ζεύγη χρωμοσωμάτων. Επιπλέον, έχει την δυνατότητα αυτογονιμοποίησης και χρόνο γενεάς 3 - 4 μήνες, ενώ παράγει περίπου 1.000 σπόρους ανά φυτό. Στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται κυρίως δύο οικότυποι του φυτού, ο Miyakojima (MG-20) και ο Gifu, οι οποίοι διαφοροποιούνται μερικώς στο γονιδίωμά τους μέσω μεταστροφών και μεταθέσεων. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό του *L. japonicus* είναι η σχετικά εύκολη γενετική τροποποίηση, τόσο μέσω παροδικού μετασχηματισμού με το *Rhizobium rhizogenes* (γνωστό και ως *Agrobacterium rhizogenes*), όσο και μέσω σταθερού μετασχηματισμού με το *Agrobacterium tumefaciens* (Tabata & Stougaard, 2014). Για τη τροποποίηση της γονιδιακής του έκφρασης, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνολογίες όπως το RNA (RNAi), μεταθετά στοιχεία αλλά και το σύστημα CRISPR-Cas9, το οποίο θα αναλυθεί σε επόμενες ενότητες. Ένα ακόμα προτέρημα για τη χρήση του *L. japonicus* είναι και η ύπαρξη της βάσης δεδομένων Lotus Base (<https://lotus.au.dk/>), όπου διατίθενται πληροφορίες, βιβλιογραφία, βιοπληροφορικά εργαλεία και εκδόσεις των γονιδιωμάτων του. Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει το ότι το φυτό αυτό, μέσω του ριζικού του συστήματος, αναπτύσσει συμβιωτικές σχέσεις με ωφέλιμους και μη ωφέλιμους οργανισμούς, επηρεάζοντας την ποιότητα και την ανάπτυξη του φυτού, θετικά και αρνητικά αντίστοιχα. Αυτές οι συμβιωτικές σχέσεις φαίνεται να επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση (Kelly et al., 2018) και δίνουν στους ερευνητές τη δυνατότητα να τροποποιούν τις συνθήκες και το περιβάλλον του φυτού και να μελετούν τις φαινοτυπικές αποκρίσεις και τις αλλαγές στο μεταγράφωμά του.



Εικόνα 1: Χαρακτηριστικά του φυτού *L. japonicus*.

Στην εικόνα παρουσιάζονται τα άνθη του *L. japonicus* και τα κύρια χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδανικό οργανισμό - μοντέλο (Tabata & Stougaard, 2014).

1.2 Δέσμευση του αζώτου στο έδαφος

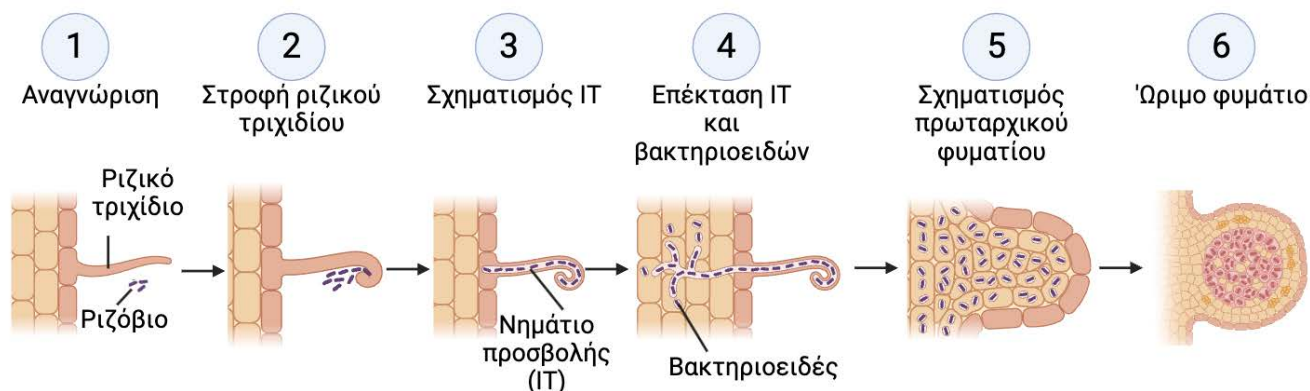
Το άζωτο είναι από τα πιο σημαντικά στοιχεία που χρειάζονται οι οργανισμοί για την κάλυψη των αναγκών τους. Στον ατμοσφαιρικό αέρα το άζωτο βρίσκεται στη μορφή N_2 , η οποία δεν μπορεί να προσληφθεί από τους οργανισμούς. Επομένως, για την αφομοίωση του N_2 από τους οργανισμούς απαραίτητη είναι η αζωτοδέσμευση, δηλαδή η διαδικασία κατά την οποία το άζωτο της ατμόσφαιρας (N_2), μετατρέπεται σε βιοδιαθέσιμες μορφές (NO_3^- , NH_4^+). Η μετατροπή αυτή μπορεί να γίνει τόσο μέσω βιομηχανικών όσο και φυσικών διαδικασιών (Cherkason et al., 2015).

Βιομηχανικά πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας Haber-Bosch, σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Οι υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις της αντίδρασης αυτής έχουν ως αποτέλεσμα ένα υπέρογκο αποτύπωμα άνθρακα, καθώς σε αυτή βασίζεται η παραγωγή λιπασμάτων για την εκτεταμένη γεωργία. Αντίθετα, στους φυσικούς τρόπους αζωτοδέσμευσης συμπεριλαμβάνονται η δέσμευση αζώτου μέσω των αστραπών, των φωτοχημικών αντιδράσεων και κατά 90% της βιολογικής αζωτοδέσμευσης (Taiz et al., 2018). Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, θα εστιάσουμε στην βιολογική αζωτοδέσμευση, η οποία προϋποθέτει την συμβίωση ψυχανθών με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια σε ειδικά διαμορφωμένες δομές στις ρίζες των ψυχανθών, τα φυμάτια.

1.2.α Φυματογένεση: κυτταρικές προσαρμογές

Η συμβίωση ψυχανθών με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, απαιτεί τον σχηματισμό των φυματίων (Εικόνα 2) και εκκινείται μέσω της απελευθέρωσης από τα φυτά δευτερογενών μεταβολιτών, των φλαβονοειδών, ελλείψει βιοδιαθέσιμου αζώτου στο περιβάλλον. Οι ενώσεις αυτές αναγνωρίζονται από τα ριζόβια αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, και ως αποτέλεσμα, τα βακτήρια παράγουν λιποχίτο-ολιγοσακχαριτικές ενώσεις, τους παράγοντες Nod (Nod Factors, NF). Έτσι, επιτυγχάνεται η εξειδίκευση του εκάστοτε ψυχανθούς με συγκεκριμένα είδη και στελέχη αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων. Οι παράγοντες Nod, αναγνωρίζονται από ειδικούς υποδοχείς του φυτού και ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων - στόχων τους, οδηγώντας στη στροφή του ριζικού τριχιδίου και στην έναρξη των κυτταρικών διαιρέσεων. Στη συνέχεια, γίνεται λύση του κυτταρικού τοιχώματος του φυτού και δημιουργείται το νημάτιο προσβολής (Infection Thread, IT). Το IT αναπτύσσεται μέσω της προσάρτησης κυστιδίων και επεκτείνεται μέχρι το κύτταρο του ριζικού τριχιδίου. Με τον τρόπο αυτό, τα ριζόβια εισέρχονται στα κύτταρα της ρίζας. Εκεί

αρχίζει πάλι η διάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος και το IT προσβάλλει τα γειτονικά κύτταρα. Έτσι, αυξάνεται ο αριθμός των φυτικών κυττάρων που έχουν το ριζόβιο, ενώ παράλληλα σχηματίζονται συμβιωσώματα (βακτηριοειδή) και δημιουργείται το πρωταρχικό φυμάτιο (primordium) (Mushtaq et al., 2023). Στο επόμενο στάδιο, το πρωταρχικό φυμάτιο μετατρέπεται σε ώριμο φυμάτιο, καθορισμένο ή ακαθόριστο ανάλογα με το είδος του φυτού (X. Zhang et al., 2024). Χαρακτηριστικά το *L. japonicus* εμφανίζει καθορισμένα φυμάτια, και σε ώριμη μορφή φαίνονται κόκκινα λόγω συσσώρευσης της ψυχανθοαιμοσφαιρίνης. Η ψυχανθοαιμοσφαιρίνη είναι πολύ σημαντική για την αποτελεσματικότητα της αζωτοδέσμευσης, καθώς έχει μεγάλη συγγένεια με το O₂. Στα φυμάτια το O₂ δεν διαχέεται ελεύθερα αλλά μεταφέρεται μέσω της ψυχανθοαιμοσφαιρίνης και έτσι επιτυγχάνεται η μείωση του O₂ μέσα στο φυμάτιο κατά 10⁴ φορές (Taiz et al., 2018). Συνοψίζοντας, κατά την έναρξη της συμβίωσης παρατηρούνται πολλές αλλαγές στον αριθμό, στον κυτταροσκελετό των φυτικών κυττάρων, στην επικοινωνία τους και στη μορφολογία τους.



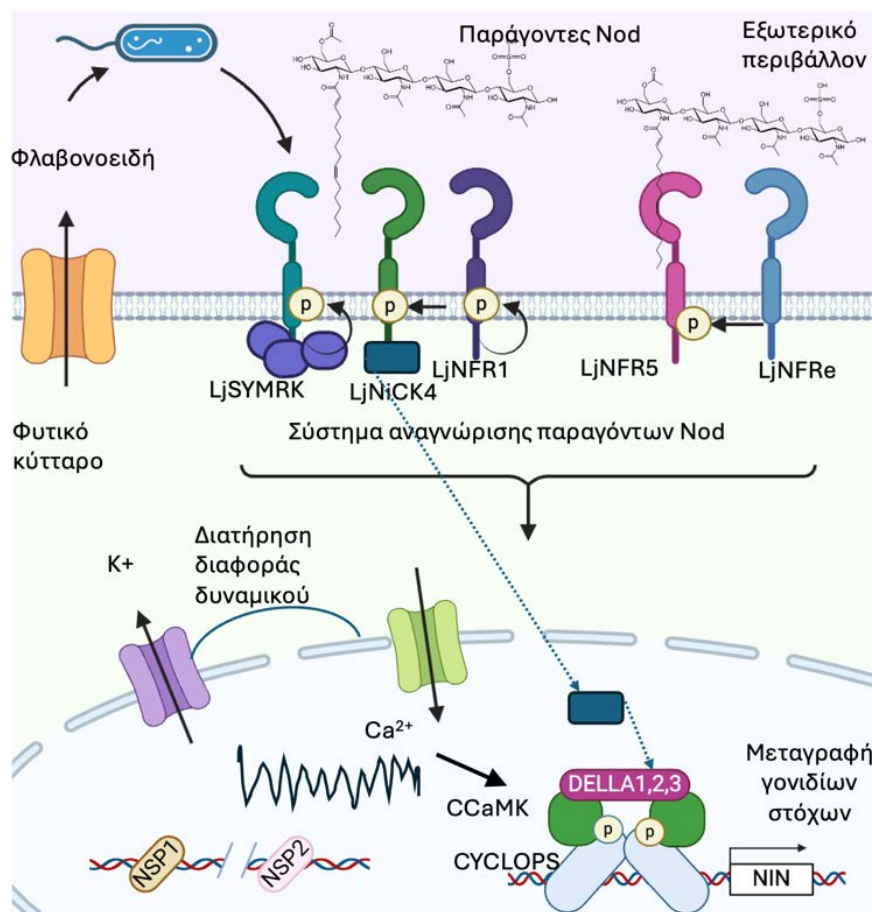
Εικόνα 2: Διαδικασία φυματιογένεσης.

Παρουσιάζονται τα πέντε αρχικά στάδια της φυματιογένεσης, από την αναγνώριση του ριζοβίου, στον σχηματισμό του Νηματίου προσβολής (IT), την σύντηξη της μεμβράνης του κυττάρου του ριζικού τριχιδίου με τα επόμενα κύτταρα και τέλος τον σχηματισμό των συμβιωτικών οργανιδίων (συμβιώσωμα) και τελικά του φυματίου. Δημιουργήθηκε με το Biorender, βάσει των (Mushtaq et al., 2023).

1.2.β Φυματιογένεση: μοριακή – ορμονική προσέγγιση

Το μονοπάτι σηματοδότησης της φυματιογένεσης εκκινείται, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, από το ψυχανθές με τη παραγωγή των φλαβονοειδών, τα οποία αναγνωρίζονται από τα βακτήρια. Ως απάντηση τα βακτήρια παράγουν τους NF, που αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες - υποδοχείς όπως περιγράφεται στην εικόνα 3. Στο *L. japonicus* (Lj), στους πιο σημαντικούς υποδοχείς κατατάσσονται οι LjNFR1 (Nod Factor Receptor), LjNiCK4, LjNFR5, και τελικά μέσω φωσφορυλιώσεων ενεργοποιείται και η LjSYMRK (Symbiotic Receptor Like Kinase). Πρόσφατα βρέθηκε και ο LjNFRε που φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα LjNFR5. Στη συνέχεια, λόγω της ενεργοποίησης των υποδοχέων αυτών μέσω φωσφορυλιώσεων και αυτοφωσφορυλιώσεων μεταφέρονται μέσω διαύλων ιόντα Ca²⁺ στον πυρήνα με μορφή κυμάτων και εξέρχονται ιόντα K⁺ ώστε να διατηρείται μία ισορροπία. Την διακύμανση των ιόντων Ca²⁺ αντιλαμβάνεται η πρωτεΐνη CCaMK, (Calcium / Calmodulin - Dependent Protein Kinase) μέσω της καλμοδουλίνης και μετά ενεργοποιούνται οι πρωτεΐνες DELLA μαζί με τον μεταγραφικό παράγοντα CYCLOPS. Επιπλέον, σε αυτή την αλληλεπίδραση συμμετέχει και η LjNiCK4 που μετά την

φωσφοριλίωσή της εισέρχεται στον πυρήνα. Έτσι, μεταγράφεται ο μεταγραφικός παράγοντας NIN (Nodule Inception) και συντονίζει τη μεταγραφή των γονιδίων της φυματογένεσης, όπως το CLE-Root Signal1 (CLE-RS1) και το CLE-RS2. Παράλληλα, συμμετέχουν και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο NSP1 (Nodulation Signaling Pathway1) και ο NSP2 (Roy et al., 2020). Ωστόσο υπάρχουν πολλά σημεία του μονοπατιού αυτού που δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως.



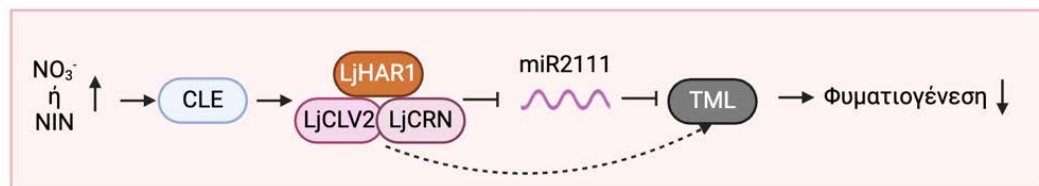
Εικόνα 3: Μοριακή πτυχή της φυματογένεσης.

Στην εικόνα παρουσιάζονται οι κύριοι τελεστές της έναρξης της δημιουργίας φυματίων. Τα φυτικά κύτταρα στη ρίζα παράγουν φλαβονοειδή, τα οποία αναγνωρίζουν τα βακτήρια και εκκρίνουν τους παράγοντες Nod (NF). Οι NF αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς τους και μέσω φωσφορυλιώσεων το σήμα των NF μεταδίδεται στον πυρήνα, τόσο μέσω φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών όσο και μέσω διακυμάνσεων στη συγκέντρωση Ca^{2+} που εμφανίζει μέγιστα και ελάχιστα, ενώ για τη διατήρηση της ισορροπίας το K^{+} εξέρχεται από τον πυρήνα. Το Ca^{2+} ενεργοποιεί την CCaMK και μαζί με τις πρωτεΐνες DELLA και τον μεταγραφικό παράγοντα CYCLOPS ενεργοποιούν το γονίδιο της NIN που έχει καίριο ρόλο στη φυματογένεση. Παράλληλα ενεργοποιούνται και άλλα γονίδια, όπως τα NSP1 και NSP2. Δημιουργήθηκε με Biorender με βάση τους (Roy et al., 2020).

Στο πλαίσιο αυτό, είναι απαραίτητο να αναφερθούμε και στη συνεισφορά των φυτοορμονών κατά τη φυματογένεση. Οι δύο πιο καίριες φυτοορμόνες είναι οι κυτοκινίνες (CK) και οι αυξίνες. Χαρακτηριστικά, η αυξίνη λόγω της συσσώρευσής της, προάγει την έναρξη του σχηματισμού των φυματίων, την ανάπτυξη της πλευρικής ρίζας και στην κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση. Ως αναφορά τις CKs, αυτές είναι απαραίτητες καθώς συμμετέχουν στην επιμήκυνση του IT, στην οργανογένεση και στην αυτορρύθμιση της φυματογένεσης. Η αυξίνη και η CK δεν είναι οι μοναδικές φυτοορμόνες που συμμετέχουν. Παραδειγματικά, το αιθυλένιο, το αψιζικό οξύ και το σαλικιλικό οξύ, έχουν κατασταλτικό ρόλο στη φυματογένεση, ενώ οι στριγκολακτόνες δρουν θετικά. Παράλληλα οι φυτοορμόνες γιββεριλίνη και γιασμονικό οξύ δρουν είτε θετικά είτε αρνητικά, ανάλογα με το στάδιο της φυματογένεσης και τις συγκεντρώσεις τους (H. Liu et al., 2018).

1.2.γ Φυματογένεση: αυτορρύθμιση - Autoregulation of Nodulation (AON)

Η φυματογένεση είναι μία ενεργειακά απαιτητική διαδικασία για το φυτό, καθώς καταναλώνεται το 25% της ενέργειας που παράγεται από την φωτοσύνθεση. Επομένως, είναι απαραίτητο να υπάρχει ρύθμιση στον αριθμό και στη λειτουργικότητα των φυματίων. Για αυτό το λόγο, τα ψυχανθή έχουν αναπτύξει έναν μηχανισμό αυτορρύθμισης, το κύριο μονοπάτι του οποίου παρουσιάζεται παρακάτω. Αρχικά, είτε από την ύπαρξη διαθέσιμου NO_3^- στο έδαφος είτε από ενεργοποίηση του γονιδίου NIN, παράγεται το πεπτιδίο CLE (CLavata3/Embryo-surrounding region related), το οποίο αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα LjHAR1 (Hypernodulation and Aberrant Root 1 ή LjCLV1), που φέρει και επικράτειες κινάσης. Στη συνέχεια η κινάση LjHAR1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες LjCLV2 και LjCRN και καταστέλλεται η μεταγραφή ενός microRNA (miRNA) (Li et al., 2022). Το miR2111, ρυθμίζει αρνητικά την πρωτεΐνη Too Much Love (TML) που είναι αρνητικός ρυθμιστής της φυματογένεσης. Απουσία του miR2111 καταστέλλεται η παραγωγή φυματίων (Tsikou et al., 2018). Άρα, ρυθμίζεται θετικά η φυματογένεση καθώς η δράση του TML μειώνεται (Li et al., 2022) (Εικόνα 4). Τα ονόματα των πρωτεϊνών αφορούν το φυτό *L. japonicus* ενώ υπάρχουν ορθόλογα συντηρημένα γονίδια – πρωτεΐνες και σε άλλα ψυχανθή, υποδεικνύοντας την σημαντικότητα της αυτορρύθμισης της φυματογένεσης και σε εξελικτικό επίπεδο. Αντίθετα στο φυτό *Medicago truncatula* έχει διαπιστωθεί ότι απουσία NO_3^- , παράγεται η πεπτιδική ορμόνη CEP (C-terminally Encoded Peptides) και ενεργοποιεί το CRA2 (Compact Root Architecture 2) το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί τη μεταγραφή του miR2111 και επάγει την φυματογένεση (Zhu et al., 2020). Ωστόσο μέχρι στιγμής αντίστοιχο μονοπάτι στο *L. japonicus* δεν έχει επιβεβαιωθεί.



Εικόνα 4: Αυτορρύθμιση της φυματογένεσης.

Συνοπτική αναπαράσταση των κύριων τελεστών της αυτορρύθμισης της φυματογένεσης. Δημιουργήθηκε με Biorender με βάση τους (Li et al., 2022).

Επομένως, η φυματογένεση είναι μια διαδικασία, κατά την οποία το φυτό - ξενιστής πρέπει να διατηρεί αυστηρό χωροχρονικό έλεγχο στην αρχή της μόλυνσης από τα συμβιωτικά βακτήρια, στο στάδιο των κυτταρικών διαιρέσεων που απαιτούνται για την ανάπτυξη των ώριμων φυματίων αλλά και στον τελικό αριθμό τους. Όπως έχει γίνει αντιληπτό, η φυματογένεση είναι μία πολύ σύνθετη διαδικασία, η οποία ρυθμίζεται σε πολλά επίπεδα και συμμετέχουν πολλές πρωτεΐνες και άλλα σηματοδοτικά μόρια όπως miRNAs. Οποιαδήποτε διαταραχή σε αυτή τη ρύθμιση μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στον αριθμό, τη μορφολογία και την λειτουργικότητα των φυματίων (Roy et al., 2020).

1.2.δ Διατήρηση φυματίων και γήρανση

Κατά τη φυσιολογική λειτουργία των φυματίων, παρατηρείται έντονη ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών μεταξύ των βακτηριοειδών και των φυτικών κυττάρων. Η ρύθμιση της διαδικασίας αυτής γίνεται μέσω μεταφορέων και ενζύμων. Χαρακτηριστικά συμμετέχουν ο μη ειδικός μεταφορέας της σουκρόζης (MtwSWEET11), μεταφορείς θειικών (LjSST1), κιτρικού οξέος (LjMATE1), αμινοξέων και άλλα ένζυμα

καθοδικά των μονοπατιών. Από την άλλη, το άζωτο που έχει δεσμευτεί στο βακτηριοειδές, εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα γρήγορα και μεταβολίζεται σε αμινοξέα. Επιπλέον, για την καλύτερη λειτουργία των φυματίων είναι απαραίτητη η διατήρηση χαμηλών συγκεντρώσεων O_2 . Αυτό διασφαλίζεται μέσω της δράσης των ψυχανθοαιμοσφαιρινών, που μεταφέρουν το οξυγόνο στα φυμάτιο. Διαφορετικά το O_2 δεν διαχέεται στα φυμάτια, λόγω των αδιαπέραστων τοιχωμάτων τους (Wang et al., 2017a).

Ωστόσο, όσο καλά οργανωμένα και να είναι τα φυμάτια, όπως και όλες οι κυτταρικές δομές υπόκεινται σε γήρανση. Η γήρανση, μπορεί να οφείλεται στην ανάπτυξη του φυτού ή σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Στα αναπτυξιακά σήματα ανήκουν οι ελεύθερες μορφές οξυγόνου (ROS), οι οποίες συσσωρεύονται και προκαλούν βλάβες και stress στα φυμάτια. Από την άλλη, περιβαλλοντικά ερεθίσματα γήρανσης είναι η ξηρασία, το παρατεταμένο σκοτάδι και η πολύ αυξημένη ποσότητα βιοδιαθέσιμου αζώτου στο χώμα. Ένα χαρακτηριστικό σημάδι της γήρανσης των φυματίων είναι η αλλαγή στο χρώμα τους από ροζ σε πράσινο, καθώς καταστρέφονται οι ψυχανθοαιμοσφαιρίνες (Wang et al., 2017a).

Το συμπέρασμα από αυτή την ενότητα είναι ότι η φυματιογένεση και η ρύθμισή της τόσο κατά τη παραγωγή των φυματίων αλλά και κατά την ανάπτυξη και διατήρησή τους, είναι μία ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει πληθώρα ρυθμιστικών στοιχείων όπως μεταβολικών σημάτων, φυτοορμονών, miRNA, πρωτεϊνών κυτταρικών λειτουργιών καθώς η ρύθμιση μεταξύ τους.

1.3 Συνθάσες του γλυκογόνου 3 / Shaggy-like kinases (SK)

Μια από τις οικογένειες πρωτεϊνών που έχουν αρχίσει να διερευνώνται για το ρόλο τους στην ανάπτυξη των φυτών είναι και οι SKs (EC: 2.7.1.11), καθώς συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Πρόκειται για κινάσες σερίνης (Ser)/ θρεονίνης (Thr), οι οποίες έχουν διατηρηθεί εξελικτικά και σε ζώα και σε φυτά, με μικρές αλλαγές στην πρωτεϊνική αλληλουχία τους και εμφανίζοντας πολλές ισομορφές στον κάθε οργανισμό. Στα φυτά, αναγνωρίστηκε πρώτα ο υποδοχέας βρασσινोοστεροειδών στο *Arabidopsis thaliana* (Brassinosteroid Insensitive 2) και έπειτα βρέθηκαν συνολικά 10 SKs, στο *Oryza sativa* υπάρχουν 9, στο *Triticum aestivum* 22 (Zolkiewicz & Gruszka, 2022) και στο *L. japonicus* 6 (Garagounis et al., 2019), ενώ εντοπίστηκαν και σε άλλα φυτά.

Συγκεκριμένα, στο *L. japonicus* είχαν αρχικά εντοπιστεί 2 SKs (Kameshita, 2005) και μετά αναγνωρίστηκαν με βάση την αλληλουχία τους και άλλες 4. Μάλιστα, από πειραματικά δεδομένα, οι πρωτεΐνες LjSK1 και LjSK6 συσχετίστηκαν με τη διαδικασία της φυματιογένεσης, καθώς η συμβίωση του *L. japonicus* με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* (M. loti) R7A οδήγησε στην αύξηση της έκφρασης τους κατά περίπου 3 φορές (Garagounis et al., 2019). Οι ερευνητές συνέχισαν με τη μελέτη της LjSK1 εφαρμόζοντας την τεχνική της αναστολής μέσω RNA (RNAi), όπου χρησιμοποιούνται μικρά μόρια RNA και οδηγούν στην αναστολή της μεταγραφής του RNA του γονιδίου-στόχου. Έτσι, με τη σίγαση του *LjSK1* κατά ~80% διαπιστώθηκε ότι η μείωση της παραγόμενης LjSK1, οδηγεί σε στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των φυματίων μετά από τον εμβολιασμό με *M. loti* σε σχέση με φυτά που παράγουν τη φυσιολογική LjSK1. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και μία μεταλλαγμένη σειρά LORE1 που προκλήθηκε μέσω τυχαίας μεταλλαξιογένεσης με τη χρήση μεταθετών στοιχείων. Συγκεκριμένα η σειρά Isk1-1 είχε μεταθετό στοιχείο στο 12^ο εξόνιο του γονιδίου *LjSK1*, μείωσε την έκφραση της *LjSK1* και εμφάνισε τον ίδιο φαινότυπο με το

πείραμα του RNAi, που αναφέρθηκε προηγουμένως. Ενδιαφέρον είχε και το γεγονός, ότι η μείωση της *LjSK1* οδήγησε σε διαταραχή γονιδίων που συμμετέχουν στη φυματογένεση, όπως του NIN (Garagounis et al., 2019). Σε νέα πειράματα, οι ερευνητές προχώρησαν σε μελέτες μεταλλαξιγένεσης της *LjSK1* όπου και διαπίστωσαν την ύπαρξη συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων που επηρεάζουν την καταλυτική ικανότητα της *LjSK1*. Όταν η ενεργότητα του ενζύμου αυξάνεται τότε το μήκος ρίζας και οι πλευρικές ρίζες μειώνονται κατά 30% (Solonou et al., 2021). Τέλος για την *LjSK1* πρόσφατα χαρακτηρίστηκε η δομή της πρωτεΐνης και ένας αναστολέας του ενζύμου, η λουπεόλη (Solonou et al., 2024).

Όπως προαναφέρθηκε, κατά την συμβίωση του *L. japonicus* με το *M. loti* αυξορρυθμίζεται και η *LjSK6* όπως ακριβώς συμβαίνει και με την *LjSK1*. Οι δύο πρωτεΐνες έχουν ομοιότητα και σε νουκλεοτιδικό αλλά και δομικό επίπεδο καθώς έχουν 82 % ομολογία και έχουν κατά πολύ μεγαλύτερο αμινοτελικό άκρο σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των *LjSK* πρωτεϊνών. Ωστόσο, η *LjSK6* και η *LjSK1* φαίνεται να μην αλληλοεπιδρούνε στη φυματογένεση, καθώς η σίγαση της *LjSK1*, ενώ δημιούργησε διακριτό φαινότυπο αύξησης της φυματογένεσης, δεν προκάλεσε καμία στατιστικά σημαντική αλλαγή στα επίπεδα της *LjSK6* (Garagounis et al., 2019). Με βάση τα παραπάνω, η παραγωγή μεταλλαγμάτων της *LjSK6* για τη μελέτη της λειτουργίας της θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον, τόσο λόγω της αυξορρυθμίσής της *LjSK6* κατά την φυματογένεση όσο και για την ομοιότητά της με την *LjSK1*. Συχνά ομοιότητα στη δομή δύο πρωτεϊνών, συνεπάγεται και παρόμοια λειτουργία. Σήμερα, ο πιο ευρέως εφαρμόσιμος τρόπος σίγασης για τη μελέτη του ρόλου ενός γονιδίου είναι μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης με το σύστημα CRISPR/Cas9 όπου θα αναλυθεί παρακάτω.

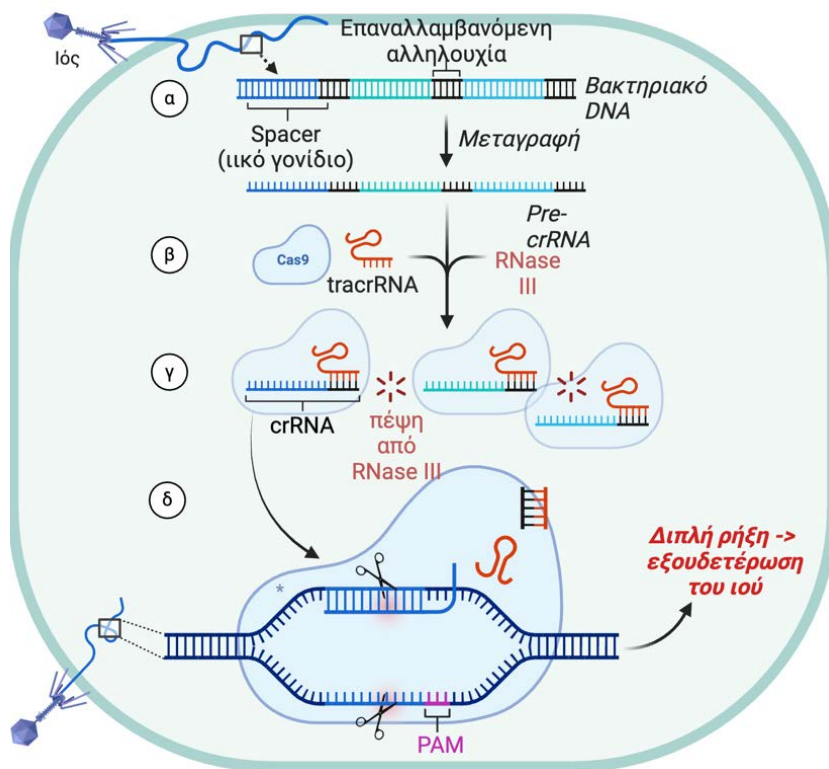
1.4 Σύστημα CRISPR/Cas

1.4.α Ιστορική αναδρομή και βασικά συστατικά του CRISPR/Cas9

Το CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), αποτελεί έναν μηχανισμό της προσαρμοστικής ανοσίας των βακτηρίων έναντι ιών και βρέθηκε για πρώτη φορά το 1987 (Ishino et al., 1987). Το σύστημα αυτό αποτελείται από την πρωτεΐνη Cas (CRISPR associated) και νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Συγκεκριμένα, διαθέτει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (29 νουκλεοτιδίων – repeats) που διακόπτονταν από μη επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (32 νουκλεοτιδίων – spacer) (Jansen et al., 2002).

Η λειτουργία του συστήματος CRISPR/Cas9 στη φύση ξεκινά με τη πρώτη μόλυνση του βακτηρίου από τον ιό. Το γενετικό υλικό του ιού κόβεται σε κομμάτια και κάποια από αυτά ενσωματώνονται στο DNA του βακτηρίου ανάμεσα από τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Mojica et al., 2000). Έτσι, το βακτηριακό DNA που περιέχει τα spacers και τα repeats, μεταγράφεται ως ένα RNA (pre-RNA). Στη συνέχεια το pre-RNA κόβεται από την RNAase III σε μικρότερα τμήματα που έχουν το spacer ή guide RNA (gRNA) και το repeat, δημιουργώντας το crRNA (crisprRNA). Μετά, στο crRNA προσδένεται το tracrRNA (trans activating CRISPR RNA) μέσω των συμπληρωματικών αλληλουχιών που διαθέτουν. Στο σύμπλοκο αυτό προστίθεται και η Cas9. Στην επόμενη μόλυνση από τον ίδιο ιό, το γονιδιώμα του αναγνωρίζεται το σύμπλοκο Cas9:crRNA:tracrRNA (βάση της συμπληρωματικότητας του ιικού γονιδιώματος με το crRNA) και δημιουργείται μία διπλή ρήξη. Το σημείο της ρήξης είναι τρεις νουκλεοτιδικές βάσεις πριν την

αλληλουχία PAM (Protospacer Adjacent Motif). Η πέψη του ιικού γονιδιώματος από την Cas9 οδηγεί τελικά στην εξουδετέρωση του ιού (Doudna & Charpentier, 2014) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού άμυνας CRISPR/Cas9 -τύπος II.

α) αρχική μόλυνση από βακτηριοφάγο και ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του στη συστοιχία CRISPR.

β) παραγωγή του pre-crRNA.

γ) δημιουργία συμπλόκων Cas9:tracrRNA-sgRNA.

δ) αναγνώριση DNA ξενιστή και δράση ενδονουκλεάσης που δημιουργεί διπλή ρήξη.

Δημιουργήθηκε με Biorender βάση των (Jansen et al., 2002) και (Mojica et al., 2000)

Η Cas9, μια ιδιαίτερα σημαντική πρωτεΐνη για αυτόν τον μηχανισμό, αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στο *Streptococcus pyogenes*, και όπως προαναφέρθηκε είναι υπεύθυνη για την εκτέλεση της διπλής ρήξης στο DNA και η PAM της είναι η 5'-NGG-3' (Jansen et al., 2002). Η Cas9 περιέχει δύο περιοχές: την περιοχή αναγνώρισης (recognition – REC) που αναγνωρίζει το RNA και την αλληλουχία PAM και την περιοχή της ενδονουκλεάσης (Nuclease - NUC). Η NUC αποτελείται από τις επικράτειες RuvC και HNH που δημιουργούν την δίκλωνη ρήξη, καθώς κάθε επικράτεια πέπτει έναν κλώνο του DNA. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση μεταξύ των περιοχών REC και NUC είναι σημαντική για τη λειτουργία της Cas9 και ρυθμίζεται μέσα από μία έλικα-γέφυρα πλούσια σε αργινίνη και από την αλληλουχία η οποία πρέπει να έχει έρθει σε γραμμική διαμόρφωση (Babu et al., 2021). Η συνεργασία μεταξύ RNA, DNA και της πρωτεΐνης Cas9, με τα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν, δίνει στο σύστημα αυτό μεγάλη ακρίβεια στην αναγνώριση του DNA, αυξάνοντας την εξειδίκευσή του ώστε να μην στοχεύει το βακτηριακό DNA αλλά να πέπτει μόνο ιικό DNA που είναι συμπληρωματικό προς το crRNA.

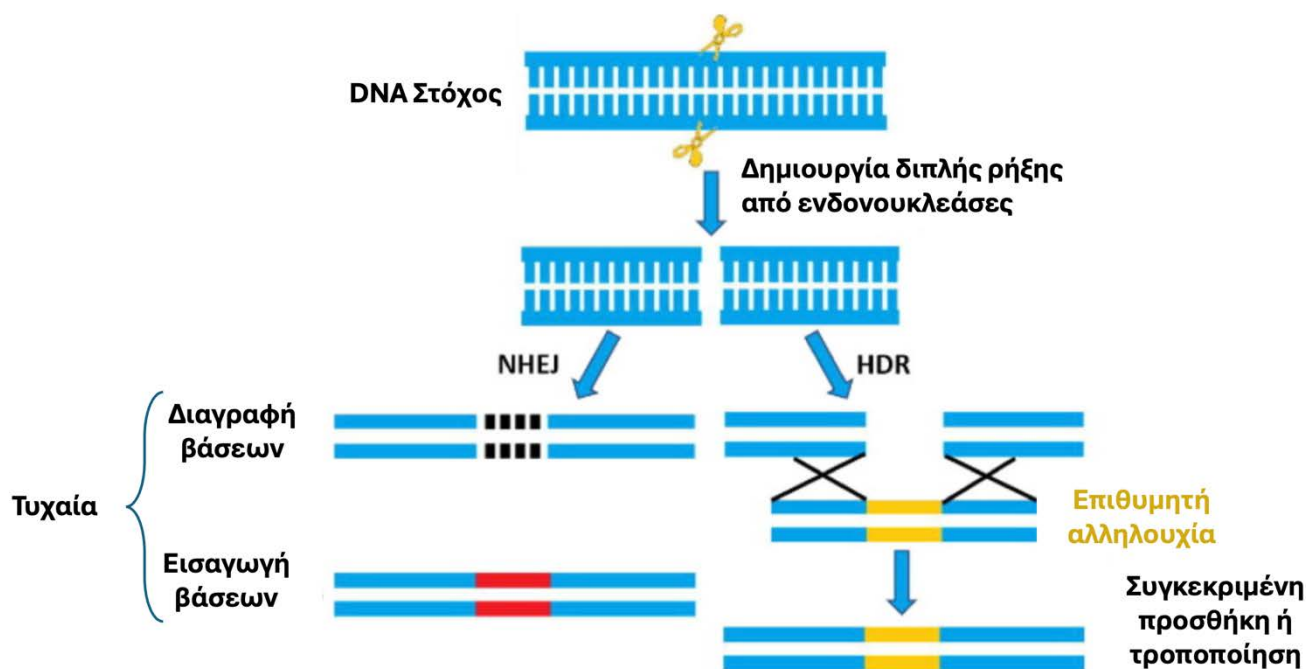
1.4.β CRISPR/Cas ως σύστημα γενετικής τροποποίησης

Η πρώτη αναφορά του CRISPR/Cas9 ως σύστημα γενετικής τροποποίησης ήταν το 2014 από τις Doudna and Charpentier οι οποίες τιμήθηκαν με Nobel το 2020 (Doudna & Charpentier, 2014). Το σύστημα CRISPR/Cas9 αποτελείται από τέσσερα βασικά συστατικά: την πρωτεΐνη Cas9, το sgRNA, την αλληλουχία PAM και το DNA - στόχο. Στη φύση, το gRNA περιλαμβάνει τα δύο συστατικά που αναφέραμε νωρίτερα, το crRNA και το tracrRNA. Ωστόσο, στα συστήματα γενετικής τροποποίησης, το sgRNA είναι ένα ενιαίο RNA που περιέχει την αλληλουχία και των δύο, το crRNA και το tracrRNA. Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του CRISPR/Cas9 είναι ότι η μόνη αλλαγή που απαιτείται αφορά τα 18-24 νουκλεοτίδια, τα οποία αντιστοιχούν ακριβώς στο τμήμα του γονιδιώματος που θα τροποποιηθεί. Η υπόλοιπη αλληλουχία του sgRNA, παραμένει σταθερή (scaffold). Αυτό το χαρακτηριστικό, έχει μειώσει σημαντικά το κόστος και τη δυσκολία που είχαν τα προηγούμενα συστήματα γενετικής τροποποίησης (like zinc finger nucleases and TALENs), τα οποία βασίζονται σε πρωτεϊνική αναγνώριση του γονιδίου - στόχου και έπρεπε να σχεδιάζονται κάθε φορά από την αρχή (Khan, 2019).

Το βασικό στοιχείο που επιτρέπει την γενετική τροποποίηση μέσω CRISPR/Cas9 είναι η αναγνώριση της αλληλουχίας - στόχου και η δημιουργία της δίκλωνης ρήξης. Στη συνέχεια, όταν το κύτταρο επιδιορθώνει τη βλάβη αυτή, χρησιμοποιεί δύο μηχανισμούς οι οποίοι εισάγουν μεταλλάξεις στη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Συγκεκριμένα, τον μηχανισμό της μη ομόλογης ένωσης άκρων (Non Homologous End Joining - NHEJ) και τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Homology-Directed Repair – HDR). Ο NHEJ δημιουργεί μεταλλάξεις όπως αφαίρεση ή προσθήκη νουκλεοτιδίων, και μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στο αναγνωριστικό πλαίσιο της πρωτεΐνης - στόχου, για παράδειγμα να δημιουργηθεί ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης και έτσι να γίνει σίγαση του γονιδίου-στόχου (Miyaoka et al., 2016). Μέσω του μηχανισμού HDR, όταν το σύστημα CRISPR/Cas9 χρησιμοποιείται μαζί με ένα κομμάτι DNA που έχει συμπληρωματικές άκρες με την περιοχή γύρω από τη δίκλωνη ρήξη, μπορεί να γίνει ένθεση του νέου DNA. Αυτό οδηγεί, για παράδειγμα, στην εισαγωγή ενός νέου γονιδίου στο γενετικό υλικό του οργανισμού - στόχου ή στη σίγαση ενός υπάρχοντος γονιδίου-στόχου (Xu & Li, 2020). Η διαδικασία αυτή παρουσιάζεται συνοπτικά στην εικόνα 6.

Σταδιακά το σύστημα άρχισε να εμπλουτίζεται και άρχισαν να ανακαλύπτονται όλο και περισσότερα στοιχεία για αυτόν τον αμυντικό μηχανισμό των βακτηρίων και των αρχαίων. Σήμερα, χρησιμοποιούνται 12 Cas πρωτεΐνες. Το αποτέλεσμα του κάθε CRISPR/Cas συστήματος διαφέρει και η λειτουργία του ορίζεται μέσω της Cas πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, υπάρχουν 2 κατηγορίες CRISPR/Cas, η κλάση I στην οποία ανήκουν οι τύποι I, III και IV και η κλάση II, στην οποία ανήκουν οι τύποι II, V και VI. Οι τύποι έχουν διαφορετικές δυνατότητες αναγνώρισης και κοπής νουκλεϊκών οξέων. Από τη μία οι τύποι I, II, V αναγνωρίζουν και κόβουν το DNA, από την άλλη ο τύπος VI επεξεργάζεται το RNA. Βέβαια υπάρχει και ο τύπος III, που επεξεργάζεται και το RNA και το DNA (Babu et al., 2021; Z. Liu et al., 2020). Σήμερα οι εφαρμογές του CRISPR βασίζονται κυρίως στο σύστημα τύπου II, το οποίο βρέθηκε πρώτο και έχει περιγραφεί παραπάνω. Ωστόσο, πρέπει αναφερθεί η ύπαρξη διαφορετικών συστημάτων CRISPR/Cas τα οποία μπορούν να έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη μεταγραφή των γονιδίων - στόχων. Η πρωτεΐνη Cas μπορεί να είναι τροποποιημένη και να δημιουργεί από μόνη της μεταλλάξεις αντί να κόβει το DNA ή μπορεί να είναι συνδεδεμένη με κάποιον τελεστή, που ενεργοποιεί την μεταγραφή (CRISPR activation) ή

που καταστέλλει την μεταγραφή (CRISPR inhibition) των γονιδίων - στόχων. Επιπλέον, η ρύθμιση μπορεί να γίνεται στο επίπεδο του DNA και των ιστονών (Babu et al., 2021; Z. Liu et al., 2020).



Εικόνα 6: Μηχανισμός γενετικής τροποποίησης μετά την διπλή ρήξη.

Με τη διπλή ρήξη εκκινείται ο NHEJ ή ο HDR, εφόσον υπάρχει ομόλογο τμήμα DNA κοντά στο σημείο της ρήξης. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μεταλλάξεων ή η εισαγωγή τμήματος DNA (Xu and Li 2020).

Συνοψίζοντας, το σύστημα CRISPR/Cas, με τις διαφορετικές κατηγορίες και τύπους του, αποτελεί έναν εξαιρετικά ευέλικτο και ισχυρό μηχανισμό που όχι μόνο επιτρέπει την ακριβή επεξεργασία του γενετικού υλικού, αλλά και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, προσφέροντας τεράστιες δυνατότητες για την έρευνα και τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

1.4.γ Παραδείγματα εφαρμογών του συστήματος CRISPR/Cas9 στα φυτά

Η γενετική τροποποίηση μέσω του CRISPR/Cas9 στην περιβαλλοντική βιοτεχνολογία βρίθει εφαρμογών. Χαρακτηριστικά, έχει χρησιμοποιηθεί για την εύρεση της λειτουργίας γονιδίων που σχετίζονται με βιολογικές διαδικασίες των οργανισμών και με την ικανότητα προσαρμογής τους σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Αυτό γίνεται με την τροποποίηση γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα, βελτιώνουν την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, προσδίδουν ανθεκτικότητα των φυτών στην ξηρασία και έτσι θωρακίζουν τα φυτά απέναντι σε ασθένειες και την κλιματική αλλαγή (Z. Liu et al., 2020). Επιπλέον, το CRISPR/Cas9 χρησιμοποιείται στα φυτά για τη μελέτη του ρόλου των γονιδίων στα φυτά-μοντέλα. Για παράδειγμα, γενετική τροποποίηση έχει γίνει με επιτυχία και στο *L. japonicus* όπου οι ερευνητές με επιτυχία τροποποίησαν τα τρία γονίδια των ψυχανθοαιμοσφαιρινών (*LjLb1*, *LjLb2*, and *LjLb3*) και παρατήρησαν διαφορές στην φυματογένεση και ανώριμα φυμάτια (Wang et al., 2019). Τέλος, το σύστημα CRISPR/Cas έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε πολλούς οργανισμούς, ωστόσο εγείρονται προβληματισμοί σε σχέση με τη βιοασφάλειά του, τη πιθανότητα της στόχευσης αλληλουχιών εκτός του προβλεπόμενου στόχου και τον τρόπο που θα εισέρχεται στα κύτταρα. Σε αυτά έρχονται να βοηθήσουν η σχεδίαση

καλύτερων sgRNAs μέσω της τεχνητής νοημοσύνης και της μηχανικής μάθησης (Z. Liu et al., 2020) αλλά και η εφαρμογή μίας δοκιμασμένης μεθοδολογίας.

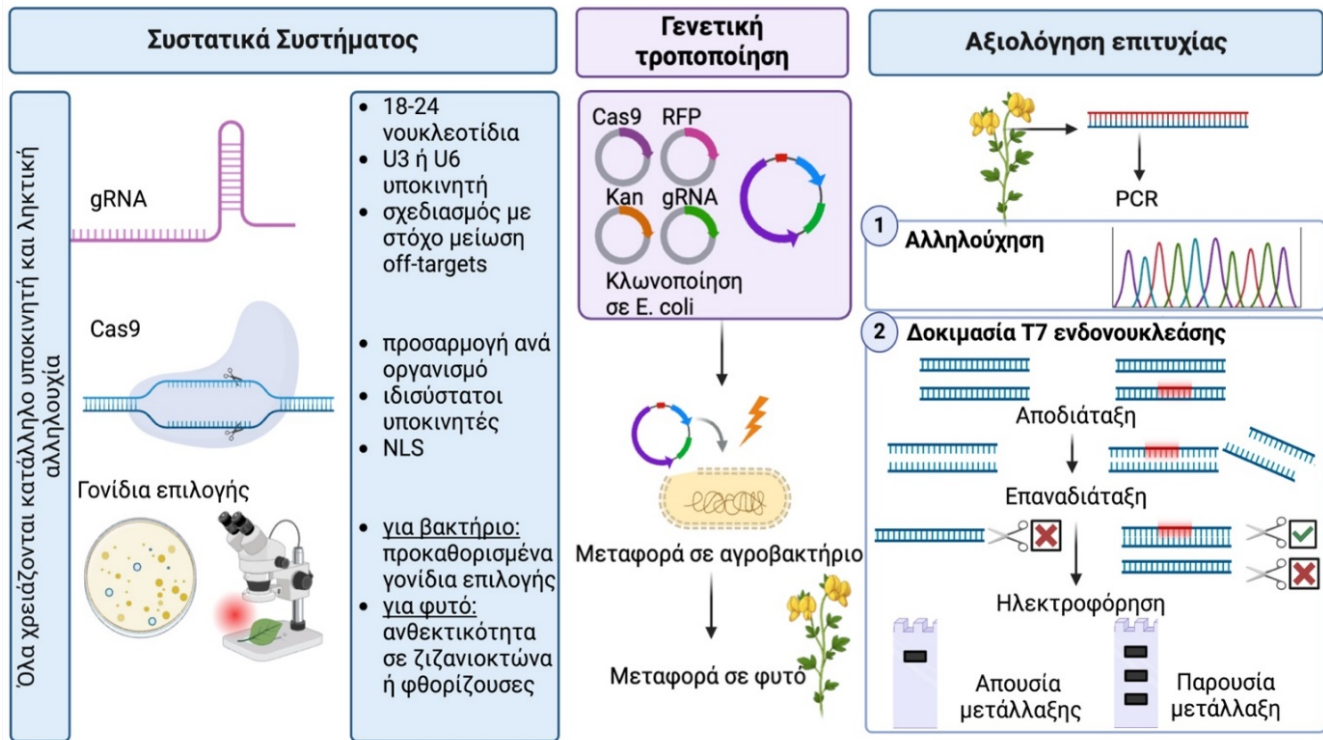
1.4.δ Σχεδίαση γενετικής τροποποίησης με βάση το CRISPR/Cas9

Για τον σχεδιασμό της κατασκευής που φέρει τον μηχανισμό CRISPR/Cas9 χρειάζονται: το γονίδιο ή τα γονίδια που θα δώσουν τα sgRNAs, το γονίδιο για την Cas9, γονίδια - δείκτες για τα βακτήρια, γονίδια - δείκτες για το φυτό και γονίδιο επιλογής. Για όλα αυτά τα γονίδια πρέπει να σχεδιαστούν οι υποκινητές τους και οι καταληκτικές αλληλουχίες τους ανάλογα με το εκάστοτε σύστημα έκφρασης (Εικόνα 7).

Η επιλογή της θέσης στόχευσης και συνάμα η επιλογή του sgRNA, είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη καθώς υπάρχουν πολλές παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψιν, ώστε να περιοριστούν οι πιθανότητες για μη επιθυμητές στοχεύσεις (off-targets). Σε αυτό, μεγάλη σημασία έχει και το μέγεθος του sgRNA, πρέπει να έχει αλληλουχία αναγνώρισης από 18 έως 24 νουκλεοτίδια. Μικρότερες αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν συσχετιστεί με αύξηση των off-targets. Επιπλέον, είναι απαραίτητο μετά την αλληλουχία αναγνώρισης να υπάρχει μόνο στην αλληλουχία - στόχο και όχι στο sgRNA η κατάλληλη αλληλουχία PAM (Liang et al., 2016). Βέβαια, έχουν σημασία και πιο τεχνικά χαρακτηριστικά των sgRNAs, η περιεκτικότητα σε γουανίνη/κυτοσίνη (G/C%) που πρέπει να κυμαίνεται από 50-70% και να μην δημιουργούνται λούπες ανάμεσα στην αλληλουχία αναγνώρισης και στην αλληλουχία scaffold. Ακόμα, είναι σημαντικό το sgRNA να μην περιέχει πάνω από 4 συνεχόμενες θυμίνες (T) καθώς είναι το σήμα τερματισμού της RNA πολυμεράσης III (το ένζυμο που μεταγράφει το γονίδιο του sgRNA) και το sgRNA δεν θα μπορέσει να μεταγραφεί. Συνήθως για την μεταγραφή των RNA, χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές, ο U3 ή ο U6 και ανάλογα προτείνεται το sgRNA να ξεκινάει από A ή G αντίστοιχα. Τέλος, πάντα πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον 2 sgRNA, και να στοχεύουν σε διάφορα σημεία του γονιδίου - στόχου, έτσι το σύστημα να έχει περισσότερες πιθανότητες δημιουργίας μεταλλάξεων στο στόχο (Wang et al., 2017b). Σήμερα, υπάρχουν προγράμματα που μας επιτρέπουν τον αυτόματο έλεγχο των προαναφερθέντων χαρακτηριστικών.

Ένα άλλο σημείο που χρήζει προσοχής, είναι η επιλογή της Cas9. Στις περισσότερες εφαρμογές χρησιμοποιείται η spCas9. Για την Cas9, για πολλούς οργανισμούς έχουν δημιουργηθεί βελτιστοποιημένες αλληλουχίες, ώστε να εκφράζεται και να λειτουργεί πιο αποτελεσματικά στους οργανισμούς αυτούς. Για παράδειγμα, στο *L. japonicus* έχει βρεθεί ότι η αποτελεσματικότερη Cas9, είναι αυτή που έχει βελτιστοποιηθεί για να λειτουργεί στο *Arabidopsis thaliana*. Όπως και με το sgRNA, έτσι και με την Cas9 έχει μεγάλη σημασία ο υποκινητής από τον οποίο θα μεταγράφεται και συνήθως χρησιμοποιούνται ενδογενείς ιδιοσύστατα ενεργοί υποκινητές. Τέτοια παραδείγματα είναι ο υποκινητής του γονιδίου *LjUb* (ουβικιτίνη), ο 35S (από τον ιό του μωσαϊκού του κουνουπιδιού) και οι παραλλαγές του (2x35S, 2x35SΩ, 35SPDK). Επιπλέον, η Cas9 για να λειτουργήσει, πρέπει να βρίσκεται εντός του πυρήνα, οπότε είναι απαραίτητο στην αρχή και στο τέλος της πρωτεΐνης να υπάρχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal - NLS) κατάλληλο για τον εκάστοτε οργανισμό στόχο (Kiryushkin et al., 2021).

Ένα από τα κρίσιμα σημεία επιτυχίας του συστήματος CRISPR είναι να γίνει η μεταφορά του στον πυρήνα του οργανισμού - στόχου. Στα φυτά, η μεταφορά του συστήματος γίνεται διαμέσου βακτηρίων, όπως το



Εικόνα 7: Τα βασικά χαρακτηριστικά και σημεία μίας εφαρμογής CRISPR/Cas9 σε φυτά.

Τα τρία βασικά συστατικά είναι το gRNA, η Cas9 και τα γονίδια επιλογής. Αφού επιλεχθούν οι κατάλληλοι υποκινητές, αλληλουχίες εντοπισμού και τερματικές αλληλουχίες, συνδυάζονται μέσω κλωνοποίησης σε φορείς και μεταφέρονται σε *E. coli* όπου γίνεται η πρώτη επιλογή με βάση αντιβιοτικό ή χρώμα. Στη συνέχεια, από τα επιλεγμένα κύτταρα, απομονώνεται το πλασμίδιο και με ηλεκτροδιάτρηση περνάει σε βακτήρια (πχ *R. rhizogenes*). Μετά, με τη διαμόλυνση του φυτού από τα βακτήρια, μέσω της περιοχής T-DNA ενσωματώνεται στο φυτικό γονιδίωμα. Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του συστήματος στη δημιουργία μεταλλάξεων, αρχικά απομονώνεται το γενετικό υλικό των φυτών και μπορούν να εφαρμοστούν δύο προσεγγίσεις. 1) Να γίνει αλληλούχηση NGS ή κατά Sanger και να συγκριθεί η φυσιολογική με την υποψήφια μεταλλαγμένη αλληλουχία. 2) Να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της ενδονουκλεάσης T7 I, που αναγνωρίζει λάθη στη δομή του DNA (τα οποία προέρχονται από την ύπαρξη μη συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων) και δημιουργεί δίκλωνες ρήξεις. Ανάλογα με το μοτίβο ζώνωσης, φαίνεται αν υπάρχει μετάλλαξη ή όχι. Δημιουργήθηκε με Biorender με βάση τους (Kiryushkin et al., 2021), (Wang et al., 2017b), (Hooykaas & Hooykaas, 2021) και (Sentmanat et al., 2018).

R. rhizogenes. Στη συνέχεια, η κατασκευή που περιέχει το σύστημα CRISPR/Cas9 μεταφέρεται από το *R. rhizogenes* στο DNA του φυτού, μέσω της περιοχής T-DNA. Η περιοχή του T-DNA ορίζεται από την ύπαρξη δεξιού και αριστερού συνοριακού. Το βακτήριο εισέρχεται στο φυτό μέσω κάποιου τραύματος, ή τομής και η μεταφορά του T-DNA βασίζεται στα γονίδια Vir. Τα γονίδια αυτά τα φέρει το *R. rhizogenes* στο πλασμίδιο του (Ri) (Kiryushkin et al., 2021). Κάποια από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα στελέχη είναι: LBA 9400, LBA 9402 (Hooykaas & Hooykaas, 2021), K599 και A4 (ATCC43057). Επιπλέον, για να μπορεί να γίνεται αναγνώριση των μετασχηματισμένων βακτηριακών και φυτικών κυττάρων, που έχουν λάβει το πλασμίδιο ή T-DNA αντίστοιχα, χρειάζονται δείκτες επιλογής. Στα βακτήρια χρησιμοποιούνται γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (όπως καναμυκίνη, καρβενικιλίνη, σπεκτινομυκίνη και άλλα) ή γονίδια που δίνουν χρώμα (ορατό με το μάτι πχ Xgal). Από την άλλη, στα φυτά χρησιμοποιούνται γονίδια φθορίζουσών πρωτεϊνών ως γονίδια επιλογής, όπως το GFP (Green Fluorescent Protein) ή το RFP (Red

Fluorescent Protein), όπως η turboRFP (tRFP) ή η mCherry. Ακόμα, χρησιμοποιούνται και γονίδια ανθεκτικότητας έναντι γεωργικών φαρμάκων, με ένα τέτοιο γονίδιο είναι και το Bialaphos (Bar), το από τον *Streptomyces hygroscopicus*, που προσδίδει ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα. Με τον τρόπο αυτό, τα μη μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα δεν επιβιώνουν και γίνεται έτσι η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Τέλος, για την αξιολόγηση της ικανότητας της μεταλλαξιγένεσης ακολουθούνται δύο τακτικές στις οποίες είναι απαραίτητη η λήψη DNA και η ενίσχυση των περιοχών στόχευσης του CRISPR. Η πρώτη είναι η αλληλούχηση, όπου από το απομονωμένο DNA αλληλουχείται στοχευμένα στο τμήμα που αναμένεται η μετάλλαξη, με Next Generation Sequencing με μεγάλο βάθος (Malekshoar et al., 2023). Μία πιο συνηθισμένη προσέγγιση είναι η ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος και η αλληλούχηση του κατά Sanger. Μετά, συγκρίνεται με τη φυσιολογική αλληλουχία και διαπιστώνεται η ύπαρξη ή όχι μεταλλάξεων και το ποσοστό επιτυχούς μεταλλαξιγένεσης. Εκτός από κάποια μορφή αλληλούχησης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η ενδονουκλεάση T7 I (T7EI), ένα ένζυμο που αναγνωρίζει τη δομή του DNA και πέπτει το DNA στα σημεία που δεν έχει συμπληρωματικές βάσεις. Έτσι αν στην περιοχή - στόχο που έχει ενισχυθεί με PCR (Polymerase Chain Reaction) γίνει θερμική αποδιάταξη, κατά την επαναδιάταξη δημιουργούνται ζεύγη μη συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων που διαταράσσουν τη δομή της διπλής έλικας. Οι μη συμπληρωματικές βάσεις αναγνωρίζονται από την T7EI και πέπτονται. Το αποτέλεσμα των πέψεων φαίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση και γίνεται η εκτίμηση της επιτυχίας του συστήματος. Ωστόσο, για την αναγνώριση των μεταλλάξεων και της ακριβούς αλληλουχίας που τροποποιείται, η αλληλούχηση κατά Sanger θεωρείται απαραίτητη για την καταγραφή των μεταλλάξεων (Sentmanat et al., 2018a).

1.3 Golden Gate – Σύστημα κλωνοποίησης

Όλες οι κασέτες και τα γονίδια που είναι απαραίτητα για την χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 πρέπει να συνδυαστούν και να κλωνοποιηθούν τελικά σε έναν φορέα για να μεταφερθούν στον οργανισμό - στόχο. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται συστήματα κλωνοποίησης, όπως το Golden Gate. Αυτή η τεχνική βασίζεται στη χρήση περιοριστικών ενζύμων τύπου II. Δηλαδή, ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν αλληλουχίες – στόχους, αλλά η θέση πέψης είναι εξωτερικά, αφήνοντας κολλώδη άκρα (sticky ends ή fusion sites) τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Η επιθυμητή σειρά των αλληλουχιών στον τελικό φορέα πρέπει να σχεδιάζεται προσεκτικά από την αρχή, καθώς δεν είναι δυνατόν να αλλάξει στη πορεία. Ένα προτέρημα του συστήματος της μοριακής κλωνοποίησης - Golden Gate, είναι ότι σχεδιάζεται με τέτοιο τρόπο ώστε μετά από κάθε πέψη, να απομακρύνεται η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου και μετά την ένωση να μην μπορούν να κοπούν ξανά τα ενωμένα τμήματα DNA (Marillonnet & Grütznier, 2020). Το χαρακτηριστικό αυτό κάνει εφικτή την δημιουργία σύνθετων φορέων σε μία μόνο αντίδραση. Το σύστημα Golden Gate είναι ένα γραμμικό σύστημα όπου αποτελείται από τρία επίπεδα κατασκευών. Το πρώτο είναι το επίπεδο 0 (level_0 ή L0) που περιλαμβάνει απλές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες όπως υποκινητές (όχι γονίδια). Στη συνέχεια, είναι το επίπεδο 1 (level_1 ή L1) όπου σε κάθε κατασκευή υπάρχει ένα γονίδιο (υποκινητής - αλληλουχία γονιδίου - τερματική αλληλουχία) και το επίπεδο 2 (level_2 ή L2), όπου έχει πολλά γονίδια μαζί. Άρα, το Golden Gate προσφέρει ευελιξία και οικονομία χρόνου στην κατασκευή σύνθετων φορέων, δίνοντας έτσι νέες δυνατότητες για έρευνα και εφαρμογές στη γενετική μηχανική (Bird et al., 2022).

2. Σκοπός

Η έρευνα στον τομέα της βιολογικής αζωτοδέσμευσης, που πραγματοποιείται μέσω υποχρεωτικής συμβίωσης των ριζοβίων (π.χ. *M. japonicum* MAFF303099) και των ψυχανθών (π.χ. *L. japonicus*), είναι εκτεταμένη λόγω της οικονομικής και οικολογικής της σημασίας. Το πρώτο βήμα για την αξιοποίηση και την εφαρμογή της βιολογικής αζωτοδέσμευσης είναι να γνωρίζουμε σε βάθος τον μηχανισμό της φυματιογένεσης. Αυτό περιλαμβάνει την εύρεση και τη μελέτη του ρόλου των γονιδίων που συμμετέχουν στη φυματιογένεση. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται οργανισμοί-μοντέλα, όπως το *L. japonicus*. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στα γονίδια που συμμετέχουν και επηρεάζουν τη φυματιογένεση περιλαμβάνονται και οι συνθάσες του γλυκογόνου 3, ή Shaggy-like kinases (SK). Στο *L. japonicus* η οικογένεια των SKs, αποτελείται από έξι πρωτεΐνες, LjSK1 - 6. Η LjSK6 έχει συσχετιστεί με τα πρώτα στάδια της φυματιογένεσης, χωρίς όμως να έχει διερευνηθεί περεταίρω. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εξακρίβωση της συμμετοχής της LjSK6 στη φυματιογένεση. Αυτό θα διερευνηθεί μέσω της μελέτης της έκφρασης της *LjSK6* ανά στάδιο της φυματιογένεσης και με τη παρασκευή μεταλλαγμάτων του *L. japonicus* για το γονίδιο *LjSK6*, μέσω της τεχνολογίας CRISPR/Ca9. Μετά την επιτυχή μεταλαξίγνεση με το σύστημα CRISPR/Ca9, για τη στόχευση του γονιδίου *LjSK6*, ο επόμενος στόχος είναι η φαινοτυπική ανάλυση των μεταλλαγμάτων. Αν στα φυτά που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη LjSK6, παρατηρηθεί διαφορά στον φαινότυπο της φυματιογένεσης, θα μπορέσει αργότερα να εξαχθεί συμπέρασμα για την δράση της LjSK6 στη διαδικασία αυτή.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Πείραμα έκφρασης της σε συνάρτηση με τον χρόνο

3.1.α Scarification και αποστείρωση σπόρων

Το Scarification στοχεύει στη προσομοίωση της φυσικής φθοράς που δέχεται ο σπόρος στο περιβάλλον, για να επιταχυνθεί η διαδικασία της εκβλάστησης. Για το σκοπό αυτό, χωρίζονται τα σποράκια του φυτού *L. japonicus* (οικότυπος MG-20) σε erpendorf των 2 ml και στη συνέχεια στον απαγωγό προστίθενται 1,5 ml πυκνού θειικού οξέος H_2SO_4 . Αναδεύονται ήπια σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 15 - 18 min. Έπειτα, αφαιρείται το H_2SO_4 και τα σποράκια ξεπλένονται με παγωμένο ddH₂O πέντε φορές. Ακολουθεί η αποστείρωση με 1,5 ml διαλύματος χλωρίνης (2 ml χλωρίνη, 8 ml ddH₂O και 0,1% Tween) σε κάθε erpendorf. Μετά από 16 - 18 min σε RT υπό ήπια ανάδευση, σε αποστειρωμένες συνθήκες, γίνονται 7 - 8 πλύσεις με αποστειρωμένο ddH₂O για να απομακρυνθεί τελείως η χλωρίνη και μετά προστίθενται 1,5 ml ddH₂O και τα erpendorf επωάζονται στους 4 °C στο σκοτάδι για 1-2 μέρες.

3.1.β Εκβλάστηση σπόρων

Κάτω από στείρες συνθήκες, οι σπόροι τοποθετούνται ανά 20 σε τρυβλία. Τα τρυβλία περιέχουν το θρεπτικό Jensen (**Πίνακας 1**). Στη συνέχεια, κάθε τρυβλίο περιβάλλεται με parafilm, για να μην χαθεί η υγρασία και τοποθετείται υπό κλίση στο σκοτάδι για 4 μέρες στους 22 °C. Μετά, τα τρυβλία επωάζονται για 1 εβδομάδα υπό κλίση σε φωτοπερίοδο 16 ωρών φως και 8 ώρες σκοτάδι (16/8h) στους 22 °C.

Πίνακας 1: Θρεπτικό Jensen συστατικά και συγκεντρώσεις.

	Συστατικά	Συγκέντρωση g/L
Solution I (1ml)	CaHPO ₄	100
	K ₂ HPO ₄	20
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	20
	NaCl	20
Solution II (2,5μl)	Na ₂ MoO ₄ ·4H ₂ O	40
Solution III (2,5μl)	CuSO ₄ ·7H ₂ O	35
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	610
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	98
	H ₃ BO ₃	127
Solution IV (25μl)		8 gr
dH₂O		Μέχρι 1 L
Fe citrate		0,01
KNO₃		-

3.1.γ Χειρισμοί φυτών

Φυτά εννέα ημερών, που πέρασαν την παραπάνω διαδικασία και είναι στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο, επιλέγονται και τοποθετούνται ανά 3 σε αποστειρωμένα δοχεία τύπου Magenta με άμμο και βερμικουλίτη (αδρανές υλικό που συγκρατεί την υγρασία) σε αναλογία 3:1. Επίσης, προστίθενται 40 ml θρεπτικού

Hoagland χωρίς άζωτο. Τα Magenta έχουν την ικανότητα να επιτρέπουν την δίοδο μόνο του O₂ και όχι του H₂O ή βακτηρίων και μυκήτων, επομένως οι συνθήκες παραμένουν αποστειρωμένες. Οι συγκεντρώσεις αζώτου και λοιπών συστατικών του αντιδραστηρίου Hoagland παρατίθενται στον πίνακα 2. Όλη η διαδικασία έγινε σε στείρες συνθήκες.

Πίνακας 2: Συστατικά του αντιδραστηρίου Hoagland.

HOGLAND SOLUTION 0.5mM KNO₃		Διάλυμα ιχνοστοιχείων	
Stock	Final concentration	H₃BO₃	2,86 g/L
MgSO₄ (1M)	2ml/L	MnCL₂ 4H₂O	1,81 g/L
KH₂PO₄ (1M)	1ml/L	ZnCL₂	0,11 g/L
FeEDTA (100mM)	1ml/L	CuCL₂ H₂O	0,05 g/L
KNO₃ (2M)	250μl/L	H₂MoO₄	0,02 g/L
CaCl₂ (0,5M)	5ml/L		
Microelement s	1ml/L		

Μετά από 8 ημέρες, γίνεται ο εμβολιασμός (0 dpi) των φυτών με το *Mesorhizobium japonicum* Martínez-Hidalgo et al. 2016 MAFF-303099 που φέρει και την φθορίζουσα DsRed. Παλαιότερα το βακτήριο αυτό είχε ταξινομηθεί ως *M. loti* αλλά το 2016 αναθεωρήθηκε η ταξινόμησή του (Martínez-Hidalgo et al., 2016). Κάθε φυτό λαμβάνει 1 ml καλλιέργειας ριζόβιου (OD₆₀₀= 0,02). Στα δείγματα αναφοράς προστίθεται 1 ml αποστειρωμένου ddH₂O ανά φυτό. Στη συνέχεια, ακολουθούν οι δειγματοληψίες τις ημέρες 1, 3, 7, 14 και 21 μετά τον εμβολιασμό (dpi). Για κάθε συνθήκη και χρονική στιγμή (με ή χωρίς ριζόβιο) υπάρχουν 5 βιολογικές επαναλήψεις, κάθε μία έχει τρία φυτά, τα οποία βρίσκονται στο ίδιο Magenta. Να σημειωθεί ότι για την χρονική στιγμή 7 dpi, κάθε βιολογική επανάληψη προκύπτει από την συνένωση φυτών από 4 magenta, άρα 12 φυτά συνολικά, για να υπάρχει αρκετός ιστός για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης στα πρωταρχικά φυμάτια (nodule primordia).

Σε όλες τις δειγματοληψίες, η διαδικασία περιλαμβάνει τον διαχωρισμό των φυτών σε ρίζα και σε βλαστό. Επιπλέον, στις 7 dpi, 14 dpi και 21 dpi τα πρωταρχικά και ώριμα φυμάτια διαχωρίζονται από το ριζικό σύστημα με τη βοήθεια στερεοσκοπίου. Οι ρίζες και τα φυμάτια φυλάσσονται σε eppendorf των 2 ml, που περιέχει και μία μεταλλική μπίλια, ενώ οι βλαστοί σε αλουμινόχαρτο, σε υγρό άζωτο. Με το πέρας της δειγματοληψίας, οι ιστοί αποθηκεύονται στους - 80 °C μέχρι τη διαδικασία απομόνωσης του RNA.

3.1. δ Απομόνωση RNA

Αρχικά, οι φυτικοί ιστοί πρέπει να κονιορτοποιηθούν, αυτή η διαδικασία γίνεται στο Tissue lyaser System (Qiagen) για τις ρίζες των φυτών με μικρό ριζικό σύστημα, ενώ όταν ο ριζικός ιστός είναι πιο μεγάλος, τότε η κονιορτοποίηση γίνεται χειροκίνητα με υγρό άζωτο, γουδί και γουδοχέρι. Τα δείγματα όπου το βάρος τους μετά την κονιορτοποίηση ξεπερνούν τα 200 mg, χωρίζονται σε δείγματα εργασίας (~ 100 mg) και η υπόλοιπη ποσότητα αποθηκεύεται για πιθανή μελλοντική χρήση (stock).

Στη συνέχεια, στα δείγματα εργασίας προστίθενται 300 µl από το διάλυμα cell lysis solution (Πίνακας 3), ομογενοποιούνται με Vortex για 10-20 sec και ακολουθεί 5 min επώαση σε RT υπό ανάδευση. Μετά, τοποθετούνται και 100 µl DNA – protein precipitation solution (πίνακας 3), ακολουθεί ήπια ανάδευση, επώαση για 10 min στον πάγο και φυγοκέντριση στα 14.000 rpm στους 4 °C για 20 min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο errendorf, και γίνεται μία φυγοκέντριση 14.000 rpm στους 4 °C για 5 min και πάλι απομονώνεται το υπερκείμενο σε νέο errendorf. Ύστερα, προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης, τα δείγματα ομογενοποιούνται με ήπια ανάδευση, επωάζονται για 15 min στον πάγο και φυγοκεντρούνται στα 14.000 rpm στους 4 °C για 5 min. Απορρίπτεται η ισοπροπανόλη και προστίθεται παγωμένη αιθανόλη 75% (300 µl) για τον καθαρισμό του RNA. Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 14.000 rpm στους 4 °C για 1 min, αφαίρεση της αιθανόλης και μιας δεύτερης φυγοκέντρωσης στα 14.000 rpm στους 4 °C για 30 sec για να απορριφθεί όλη η ποσότητα αιθανόλης. Μετά, τα errendorfs παραμένουν ανοιχτά για 7 λεπτά σε RT και για 20 λεπτά στον πάγο για να εξατμιστεί η υπολειπόμενη αιθανόλη. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 15 µl ddH₂O. Τέλος, πρέπει να διευκρινιστεί η ποσότητα του RNA που απομονώθηκε και η καθαρότητά του με το μηχάνημα Q3000 UV spectrophotometer (Quawell). Τα δείγματα RNA αποθηκεύονται στην κατάψυξη, στους -20 °C.

Πίνακας 3: Παρασκευή διαλυμάτων για απομόνωση RNA

Cell lysis			DNA – protein precipitation		
Final concentration of reagents	Volume to final concentration	Stock solution	Final concentration of reagents	Volume to final concentration	Stock solution
2% w/v SDS	2 ml	10% w/v	4 M NaCl	8 ml	5 M
68 mM sodium citrate	1.36 ml	0.5 M	16 mM sodium citrate	320 µl	0.5 M
132 mM citric acid	1.32 ml	1 M	32 mM citric acid	320 µl	1 M
1 mM EDTA	20 µl	0.5 M			
ddH ₂ O	Up to 10 µl		ddH ₂ O	Up to 10 µl	

3.1. ε Απομάκρυνση υπολειμμάτων DNA και επιβεβαίωση μέσω PCR

Η DNAάση I είναι μία ενδονουκλεάση, η οποία στοχεύει όλα τα μόρια DNA, μονόκλωνα ή δίκλωνα (dsDNA και ssDNA) και διασπά τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, καταστρέφοντας την τρισδιάστατη δομή του. Έτσι, η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται για την αύξηση της καθαρότητας του RNA, ώστε τα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR να είναι πιο ακριβή και να μην υπάρχουν προσμίξεις από DNA, που θα επηρεάσουν τα επόμενα στάδια της ανάλυσης.

Για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του DNA από τα δείγματα, χρησιμοποιείται η DNAase I. Σε 30 µl RNA συγκέντρωσης 10 ng/µl προστίθενται 6 µl Master Mix σε κάθε δείγμα. Το Master Mix περιέχει 10X

buffer A και DNase I, όπως περιγράφεται στον πίνακα 4. Ακολουθεί επώαση 1 h, στους 37 °C, στη θερμοκρασία όπου έχει τη μέγιστη ενεργότητα η DNase I.

Πίνακας 4: Συστατικά αντίδρασης DNase I

Συστατικά αντίδρασης	Ποσότητες	
10X buffer A	3 μl	Master Mix
DNase I	3 μl	6 μl/ δείγμα
Δείγμα RNA (10ng/μl)	30 μl	
Συνολικός όγκος:	36 μl	

Για να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης της DNase I, τα δείγματα υποβάλλονται και σε μία διαγνωστική PCR αντίδραση. Έτσι, σε περίπτωση που υπάρχουν υπολείμματα γονιδιωματικού DNA, θα αναγνωρίζονται από την DNA πολυμεράση και θα ενισχύονται. Το αποτέλεσμα αξιολογείται μετά από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA με τη βοήθεια της θερμοανθεκτικής πολυμεράσης Taq, η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, το DNA αποδιατάσσεται με αύξηση της θερμοκρασίας, δημιουργώντας δύο μονόκλωνα τμήματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή συμπληρωματικών DNA. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές, δημιουργώντας πάνω από 1 δισεκατομμύριο αντίγραφα του αρχικού τμήματος DNA. Ο θερμοκυκλοποιητής (PCR thermal cycler) επιτρέπει την ακριβή αλλαγή θερμοκρασίας μέσα σε λίγα sec, καθιστώντας την τεχνική ακόμα πιο αυτοματοποιημένη και γρήγορη.

Για τη πραγματοποίηση της PCR είναι απαραίτητα τα εξής: το DNA - στόχος, τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), η πολυμεράση για τη σύνθεση του νέου DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα A buffer για τη ρύθμιση του pH και δύο εκκινητές ένας πρόσθιος (Forward - F) κι ένας οπίσθιος (Reverse - R) (Πίνακας 5). Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA εκατέρωθεν της περιοχής ενίσχυσης, οι οποίες υβρίζονται ώστε να επιτρέπεται η πρόσδεση της DNA πολυμεράσης για την εκκίνηση της μεταγραφής.

Στα πλαίσια της διαγνωστικής PCR χρησιμοποιούνται εκκινητές (Πίνακας 6) που ενισχύουν το ιδιοσύστατο γονίδιο LjUb, που πάντα εκφράζεται σε όλα τα φυτά *Lotus japonicus* και κωδικοποιεί την ουβικιτίνη (απαραίτητη πρωτεΐνη για την αποικοδόμηση πρωτεϊνών και την βέλτιστη λειτουργία των κυττάρων). Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχούς απομάκρυνσης του DNA, προστίθενται 3 μl EDTA και τα δείγματα επωάζονται στους 65 °C για 10 λεπτά. Έτσι, σταματάει η λειτουργία του ενζύμου DNase I.

Πίνακας 5: Εκκινητές για το γονίδιο της LjUb για αντίδραση PCR

Όνομα	Αλληλουχία 5'→3'
LjUBI_gen_F	ATGCAGATCTTTTGTGAAGAC
LjUBI_gen_R	ACCACCACGGAAGACGGAG

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια διαγνωστικής PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
dH ₂ O	15,92
A buffer	2
dNTPs	0,4
Forward primer LjUB	0,8
Reverse primer LjUB	0,8
Πολυμεράση KapaTaq	0,08
DNAse-treated RNA	1

3.1.ζ Ποσοτικός προσδιορισμός του mRNA LjSK6 – qPCR

Για να εκτιμηθεί η έκφραση του mRNA ενός γονιδίου πρέπει να μετατραπεί σε cDNA και να εφαρμοστεί ποσοτική PCR (qPCR). Η qPCR είναι μία παραλλαγή της PCR, όπου προστίθεται μία χρωστική (πχ SYBER Green, Luna) που φθορίζει όταν συνδέεται σε δίκλωνο DNA. Έτσι είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση των αρχικών αντιγράφων του mRNA, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, αν η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης είναι 100% ($PCR_{eff}=2$) τότε τα μόρια DNA διπλασιάζονται σε κάθε κύκλο και έτσι διπλασιάζεται και ο εκπεμπόμενος φθορισμός. Επομένως, ο φθορισμός είναι ανάλογος του αριθμού των αντιγράφων και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί ο αρχικός αριθμός μεταγράφων του mRNA. Για να γίνει η ποσοτικοποίηση, τίθεται ένα κατώτατο όριο φθορισμού (Threshold) κάτω από το οποίο ο φθορισμός θεωρείται αμελητέος. Μόλις ένα δείγμα ξεπεράσει το Threshold, ο κύκλος της qPCR ορίζεται ως κύκλος της ποσοτικοποίησης C_q. Όσα περισσότερα αρχικά μεταγράφα mRNA υπάρχουν στο δείγμα, τόσο μικρότερο θα είναι το C_q. Η ποσοτικοποίηση μπορεί να είναι απόλυτη ή να γίνεται σε σύγκριση με το γονίδιο – ενδιαφέροντος ή με κάποιο γονίδιο - αναφοράς (ιδιοσύστατο γονίδιο – housekeeping gene) (Pfaffl, 2001).

Για να διερευνηθεί η συμμετοχή της πρωτεΐνης LjSK6 κατά τα στάδια της φυματογένεσης, τόσο για τα δείγματα με το ριζόβιο όσο και για τα φυτά απουσία ριζοβίου, γίνονται αντιδράσεις qPCR με τη χρωστική Luna της εταιρείας NEB (New England Biolabs). Εκτός από την DNA πολυμεράση, το kit αυτό περιέχει και την RNA εξαρτώμενη DNA πολυμεράση ή αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία χρησιμοποιεί ως μήτρα μόρια RNA και συνθέτει cDNA. Έτσι, η μετατροπή του RNA σε DNA και η ενίσχυση του DNA γίνεται σε διαφορετικά στάδια της ίδιας αντίδρασης (Πίνακας 7). Για να αυξηθεί η αξιοπιστία της αντίδρασης, παρασκευάζεται ένα Master Mix, που περιέχει Luna buffer για ρύθμιση του pH, enzyme mix με αντίστροφη μεταγραφάση και DNA πολυμεράση, εκκινητές για κάθε γονίδιο - στόχο και Luna ddH₂O για την ολοκλήρωση της αντίδρασης (Πίνακας 7). Παράλληλα, πρέπει να χρησιμοποιηθεί RNA χωρίς προσμείξεις DNA (DNAse-treated RNA). Στο τέλος των αντιδράσεων qPCR κατασκευάζεται καμπύλη τήξης για την ανίχνευση της εξειδικευμένης ενίσχυσης των προϊόντων. Στη παρούσα εργασία, χρησιμοποιείται συγκριτική ανάλυση και ως γονίδιο - αναφοράς ορίζεται το *LjUb*. Οι εκκινητές για το γονίδιο της *LjSK6* υπήρχαν διαθέσιμοι στο εργαστήριο (Πίνακας 8). Κατά τη στατιστική ανάλυση αρχικά βρίσκουμε τη διαφορά των C_q μεταξύ των δύο τεχνικών επαναλήψεων και απομακρύνουμε τα δείγματα

που έχουν διαφορά κύκλων μεγαλύτερη του 0,5. Θεωρώντας την PCR_{Eff} ίση με 2, εφαρμόζουμε τον τύπο $2^{\Delta Cq}$ (relative expression units) για τα δείγματα *LjSK6* και της *LjUb*. Στο επόμενο βήμα, διαιρούμε τα $2^{\Delta Cq}$ του γονιδίου - αναφοράς προς το $2^{\Delta Cq}$ του γονιδίου - ενδιαφέροντος. Τέλος, υπολογίζεται ο μέσος όρος των τεχνικών επαναλήψεων. Αυτός αποτελεί την έκφραση του γονιδίου *LjSK6*, μετά την κανονικοποίηση της με βάση το γονίδιο - αναφοράς.

Πίνακας 7: Συστατικά και βήματα αντίδρασης qPCR.

Συστατικά	Ποσότητα (μl)		Βήματα	Θερμοκρασία / χρόνος	Διαδικασία
Luna ddH ₂ O	2,7		1	55 °C/ 10 min	Σύνθεση cDNA
Luna buffer 2X	5	Master	2	95 °C/ 1min	Αρχική αποδιάταξη
Enzyme mix 20X	0,5	Mix =	3 x	95 °C/ 10 sec	Αποδιάταξη
Forward primer (10μM)	0,4	9	4 x	60 °C/ 30 sec	Σύνθεση DNA
Reverse primer (10μM)	0,4	μl/δείγμα	5	90°C → 65°C	Καμπύλη τήξης
DNase-treated RNA	1 (<500ng)				

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά εκκινητών qPCR.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
qRT_LSK6_F	ACCAACCAGAGAAGAAATAAAGTGC
qRT_LSK6_R	CATCCAAAGCAGAGCATCGTAG

3.1.η Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας το περιβάλλον προγραμματισμού R, όπου αρχικά εξετάζεται αν τα ζεύγη των ομάδων που αναλύονται ακολουθούν την κανονική κατανομή και αν έχουν παρόμοια διακύμανση. Για την αναγνώριση στατιστικά σημαντικών διαφορών στην έκφραση της *LjSK6*, μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν απουσία ριζοβίου MAFF303099 με τα φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία ριζοβίου MAFF303099, πραγματοποιείται Student's t-test στο Microsoft Excel. Η στάθμη της στατιστικής σημαντικότητας για τη διαφορά στην έκφραση της *LjSK6* ορίζεται σε $p \leq 0,05$. Επιπλέον, για την εύρεση στατιστικά σημαντικών διαφορών ανάμεσα στην έκφραση του γονιδίου *LjSK6* μεταξύ των ημερών δειγματοληψίας, χρησιμοποιείται η μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) ($\alpha < 0,05$). Με την ανάλυση αυτή εξετάζεται αν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων των δειγμάτων, χωρίς να διευκρινίζονται οι ομάδες στις οποίες εντοπίζεται η διαφορά. Για τη πληροφορία αυτή, ακολουθείτε η στατιστική μέθοδος ανάλυσης Post Hoc, με τη διόρθωση Bonferroni. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης συνοψίζονται στο Διάγραμμα 1 (4.1.β Αποτελέσματα αντίδρασης qPCR – Στατιστική ανάλυση).

3.2 Εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9 στο γονίδιο *LjSK6* του *L. japonicus*

3.2.α Σχεδίαση και διμερισμός sgRNAs

Η αλληλουχία του γονιδίου *LjSK6* βρέθηκε από τη βάση δεδομένων Lotus base με κωδικό Lj1g3v2611330.1, το γονίδιο διαθέτει 13 εξόνια και έχει συνολική αλληλουχία 5.530 bp. Η στόχευση του γονιδίου *LjSK6* διενεργήθηκε μέσω των προγραμμάτων CRISPRdirect, όπου εστιάζει στα off-target effects, και CRISPR-P 2.0, όπου εμβαθύνει στην απόδοση της στόχευσης ενώ μας ενημερώνει για τους γενετικούς τόπους των off-target στοχεύσεων. Στις προεπιλογές του συστήματος χρησιμοποιείται ο υποκινητής U6 για την snoRNA pol και η SpCas9. Οι εκκινητές κατασκευάστηκαν από την εταιρία Eurofins (Πίνακας 9) και προστέθηκε το προτεινόμενο αποστειρωμένο ddH₂O μέχρι τα 100 pmol/μl και αραιώνονται μέχρι τα 10 pmol/μl. Στη συνέχεια, για την δημιουργία των δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων, τοποθετούνται 9 μl Forward εκκινητή (F), 9 μl Reverse εκκινητή (R) και 2 μl T4 DNA ligase. Στον θερμοκυκλοποιητή πραγματοποιείται επώαση στους 95 °C για 5 min, μετά στους 25 °C για 20 min και οι επωάσεις επαναλήφθηκαν δύο φορές. Τέλος, οι δίκλωνοι εκκινητές διατηρούνται στους -20 °C.

Πίνακας 9: Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των ολιγονουκλεοτιδίων που θα δώσουν τα sgRNAs.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Tm	GC%	On target	Off target	Στόχος_ <i>LjSK6</i>
LjSK6_gRNA1_F	TTCTGTCGAGATGGACAACCAAAG	67	48	0.4144	0.648	Εξόνιο 3
LjSK6_gRNA1_R	AACCTTTGGTTGTCCATCTCGAC	67	48			
LjSK6_gRNA2_F	TTCTGACATATCATACATATGCTCG	62	38	0.5055	0.382	Εξόνιο 8
LjSK6_gRNA2_R	AACCGAGCATATGTATGATATGTC	62	38			
LjSK6_gRNA3_F	TTCTGCTCAGATTAAAGCACACCCG	70	50	0.6435	0.688	Εξόνιο 10
LjSK6_gRNA3_R	AACCGGGTGTGCTTTAATCTGAGC	70	50			
LjSK6_gRNA4_F	TTCTGAGCTGCTAACCTTGTGCCA	71	52	0.7031	0.471	Εξόνιο 10
LjSK6_gRNA4_R	AAC TGGCACAAGGTTAGCAGCTC	70	52			

Παρουσιάζονται οι εκκινητές που θα δώσουν τα sgRNAs, φαίνονται τα ονόματά τους, οι αλληλουχίες τους, η θερμοκρασία τήξης, το περιεχόμενο τους σε γουανίνη και κυτοσίνη επί τοις εκατό και το που στοχεύουν το γονίδιο. Με **μωβ** χρωματίστηκαν τα μη συμπληρωματικά άκρα και με πορτοκαλί η G που προστέθηκε για την αύξηση της μεταγραφής (για αυτό κάποια gRNAs έχουν 24 και άλλα 23 nts).

3.2.β Κλωνοποίηση με βάση το σύστημα Golden Gate

Επίπεδο_1 (Level 1): Για την συναρμολόγηση των κατασκευών που θα περιέχουν τα sgRNAs, αξιοποιείται το σύστημα Golden Gate (Marillonnet & Grütznier, 2020) και συγκεκριμένα το περιοριστικό ένζυμο τύπου II: Sapl (Πίνακας 10). Τα LjSK6_gRNA1 και LjSK6_gRNA2 τοποθετούνται σε sgRNA acceptor τύπου F3 ενώ τα LjSK6_gRNA3 και LjSK6_gRNA4 σε sgRNA acceptor τύπου 4F. Η μοναδική διαφορά μεταξύ των φορέων F3 και F4 είναι τα κολλώδη άκρα τους, που θα χρησιμεύσουν αργότερα κατά την κατασκευή των φορέων Level_2. Και οι δύο φορείς είναι διαθέσιμοι από το εργαστήριο. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η αντίδραση στον θερμοκυκλοποιητή, σύμφωνα με τον Πίνακας 11 και μετά τα πλασμίδια εισάγονται σε χημειοδεκτικά DH5a κύτταρα. Η επιλογή γίνεται με αντιβιοτικό Carbenicillin (Carb) 100 ng/μl που υπάρχει στο τρυβλίο μαζί με LB. Το LB (Lysogeny Broth) παρασκευάζεται με 10 gr

πεπτόνη, 10 gr NaCl, 5 gr εκχύλισμα ζυμομύκητα και 1 L dH₂O και αποστειρώνεται στους 121 °C για 20 min.

Πίνακας 10: Συστατικά αντίδρασης κλωνοποίησης Level_1

Συστατικά αντίδρασης	Ποσότητες
ds Oligo gRNA	1 µl
gRNA φορέας 3F ή 4F	50 ng
SapI 10 U/µl	1 µl
T4 DNA ligase 400 U/ µl	0,25 µl
Cutsmart buffer 10X	1 µl
T4 DNA ligase buffer 10X	1 µl
ddH ₂ O	Μέχρι τα 10 µl

Πίνακας 11: Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή Level_1

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	Διαδικασία
1	37	5	Πέψη Sap I
2	16	5	Δράση T4 λιγάσης
3	Επανάληψη 59 φορές βημάτων 1+2		Αύξηση πιθανότητας ενσωμάτωσης
4	37	10	Ευθυγράμμιση του φορέα
5	80	20	Απενεργοποίηση ενζύμων
6	16	∞	Διατήρηση

Επίπεδο_2 (Level_2): Για τη συναρμολόγηση του τελικού φορέα, χρησιμοποιούνται κασέτες που υπάρχουν διαθέσιμες στο εργαστήριο. Συγκεκριμένα, η 1F για το γονίδιο της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης tRFP, 2R για το γονίδιο της Cas, 5R για το γονίδιο Bar που προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι του ζιζανιοκτόνου Glufosinate και τέλος μία τελική αλληλουχία EL5, για να μπορεί το άκρο της κατασκευής να είναι συμπληρωματικό με τον φορέα pAMG4723 (Πίνακας 12). Επιπλέον, σε κάθε τελικό φορέα εισάγονται δύο LjSK6_gRNAs ένα που να είναι σε φορέα 3F και ένα σε φορέα 4F. Συνδυάστηκαν το LjSK6_gRNA1 με το LjSK6_gRNA4, δίνοντας το L2_LjSK6_gRNA1+4 και το LjSK6_gRNA2 με το LjSK6_gRNA3, δίνοντας το L2_LjSK6_gRNA2+3. Το ένζυμο που αξιοποιήθηκε για την απομόνωση των κασετών από τα αρχικά πλασμίδια και την ευθυγράμμιση του φορέα pAMG4723 είναι το BbsI και η ένωση των συμπληρωματικών άκρων γίνεται με την T4 DNA λιγάση. Η αντίδραση πραγματοποιείται στον θερμοκυκλοποιητή, με το ίδιο πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για το L1 (Πίνακας 11). Αυτό είναι εφικτό καθώς στον αρχικό σχεδιασμό κάθε φορά που γίνεται μία πέψη, η θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου χάνεται από την αλληλουχία. Οπότε σε κάθε κύκλο αυξάνεται ο αριθμός των σωστά κατασκευασμένων πλασμιδίων. Μετά την αντίδραση στον θερμοκυκλοποιητή, τα πλασμίδια εισάγονται σε DH5a κύτταρα και επιλέγονται οι άσπρες αποικίες καθώς ο φορέας pAMG4723 είχε το CRed, ένα τεχνητό βακτηριακό οπερόνιο υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση της κανθαξανθίνης, προσδίδοντας κόκκινο χρώμα στις αποικίες που είχαν τον μη ανασυνδυασμένο φορέα. Η επιλογή των βακτηρίων που έχουν

προσλάβει πλασμίδιο γίνεται με αντιβιοτικό Kanamycin (Kan) 50 ng/μl που υπάρχει στο τρυβλίο μαζί με το LB.

Πίνακας 12: Συστατικά αντίδρασης κλωνοποίησης Level_2

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Αντιδραστήρια	Ποσότητες	
Φορέας: vector pAMG4723	100 ng	Bar gene (5R)	80 ng	ddH ₂ O
tRFP cassette (1F)	100 ng	End linker pICH41800 (EL5)	2 ng	μέχρι τα
Cas9 cassette (2R)	228 ng	BbsI 10 U/ μl	1 μl	15 μl
LjSK6_gRNA με τον 3F (3F)	40 ng	T4 DNA ligase 400U/ μl	0,5 μl	
LjSK6_gRNA με τον 4F (4F)	40 ng	T4 DNA ligase buffer	1,5 μl	

3.2.γ Εισαγωγή πλασμιδίων σε χημειοδεκτικά κύτταρα DH5a

Αρχικά μεταφέρονται από τους - 80 °C στον πάγο *Escherichia coli* DH5a χημειοδεκτικά κύτταρα. Σε 40 μl DH5a κυττάρων μεταφέρονται 5 μl από την αντίδραση κλωνοποίησης και αναδεύονται ήπια με την πιπέτα. Ακολουθεί επώαση 20 min στον πάγο, 55 sec στους 42 °C και ξανά στον πάγο για 5 min. Για τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων μετά το heat sock, στα κύτταρα προστίθεται 1 mL θρεπτικό LB. Στη συνέχεια, επωάζονται υπό ανάδευση στους 37 °C για 45 min. Με το πέρας της επώασης, ακολουθεί φυγοκέντριση στα 10.000 g για 30 sec. Απορρίπτονται τα 800 μl υπερκείμενου και στα 200 μl που απέμειναν κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται μέσω ανάδευσης. Ωστόσο, όταν το πλασμίδιο που θα εισαχθεί είναι μεγάλο (φορείς επιπέδου 2), το πρωτόκολλο ελαφρώς τροποποιείται. Αρχικά, χρησιμοποιούνται 80 μl DH5a κυττάρων, 10 μl από την αντίδραση κλωνοποίησης και ο χρόνος της επώασης στους 37°C αυξάνεται από 45 min σε 90 min. Τέλος, και στις δύο περιπτώσεις τα DH5a κύτταρα τοποθετούνται κάτω από φλόγα σε τρυβλίο petri με LB και κατάλληλο αντιβιοτικό (πχ. Kan 50 μg/μl) και επωάστηκαν στους 37 °C για τουλάχιστον 16 ώρες. Για την απομόνωση του πλασμιδίου χρησιμοποιείται το Macherey-Nagel™ NucleoSpin Plasmid QuickPure™ Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.2.δ Διαγνωστική πέψη των πλασμιδίων Level_2

Μετά την παρασκευή των πλασμιδίων είναι δόκιμο να ελεγχθεί αν έχουν τα ενθέματα με την σειρά που τα σχεδιάσαμε. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το περιοριστικό ένζυμο τύπου II, XmnI. Τα περιοριστικά ένζυμα τύπου II, αναγνωρίζουν αντιπαράλληλες, μη παλινδρομικές αλληλουχίες 5-6 νουκλεοτιδικών βάσεων και πέπτουν εντός της αλληλουχίας αναγνώρισης. Στην αντίδραση χρησιμοποιούνται 0,7 μl πλασμιδίου από κάθε δείγμα και παρασκευάζεται το Master Mix που περιέχει 0,3 μl του ενζύμου XmnI (από τη NEB), 1 μl Cutsmart ρυθμιστικού διαλύματος και 8 μl ddH₂O ανά δείγμα. Ακολουθεί Vortex και σύντομη φυγοκέντριση του Master Mix και τοποθετούνται 9,3 μl σε κάθε δείγμα. Μετά από 90 min επώαση στους 37 °C ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% για 30 min στα 120 Volt. Σε κάθε δείγμα είχε προστεθεί και 1 μl loading dye (5 ml γλυκερόλη, 200 μl 50X TAE -Tris base, acetic acid και EDTA-, 0,025 gr μπλε της βρομοφαινόλης και 4,8 ml ddH₂O). Οι προβλεπόμενες ζώνες υπολογίζονται με το πρόγραμμα Snap Gene. Για την περεταίρω επιβεβαίωση της αναμενόμενης θέσης, προσανατολισμού της αλληλουχίας των sgRNAs στον φορέα, γίνεται αλληλούχηση κατά Sanger από την εταιρία Eurofins.

3.2.ε Μετασχηματισμός των *R. rhizogenes* LBA 9402 με τους φορείς Level_2

Η μεταφορά των πλασμιδίων Level_2 σε αγροβακτήρια, γίνεται με ηλεκτροδιάτρηση. Αρχικά, σε 50 µl LBA 9402 προστίθεται 1 µl πλασμιδίου (10 ng/µl) και μετά από ήπια ανάδευση με την πιπέτα και κάτω από φλόγα μεταφέρονται τα κύτταρα σε μία παγωμένη κυβέτα. Όταν δεν υπάρχουν φυσαλίδες (απομακρύνονται με μικρά χτυπήματα της κυβέτας στον πάγκο) τοποθετείται η κυβέτα στο μηχάνημα ηλεκτροδιάτρησης της Biorad και δίνεται ηλεκτρικός παλμός κατάλληλος για τα βακτήρια. Μετά τη μεταφορά του παλμού, προστίθεται 1 ml του θρεπτικού YMB (Yeast Mannitol Broth: 10 gr μανιτόλη, 0,5 gr K₂HPO₄, 0,2 gr MgSO₄·7H₂O, 0,1 gr NaCl, 1gr εκχύλισμα ζυμομύκητα), γίνεται ήπια ανάδευση και όση ποσότητα μπορεί να απομακρυνθεί από τη κυβέτα τοποθετείται σε erpendorf στους 28 °C. Μετά από 3 ώρες επώασης τα κύτταρα συμπυκνώνονται με φυγοκέντριση στα 10.000g για 30 sec, 500 µl του υπερκείμενου απορρίπτονται και τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται στο YMB που είχε μείνει. Τέλος, τα κύτταρα επώαστηκαν για 2-3 μέρες σε τρυβλία με YMB Kan (τελική συγκέντρωση 50 µg/ml) και Rifampicin (Rif) (τελική συγκέντρωση 25 µg/ml). Από κάθε τρυβλίο απομονώθηκαν τρεις αποικίες και έγιναν υγρές καλλιέργειες σε θρεπτικό YMB ή LB παρουσία των αντιβιοτικών Kan (τελική συγκέντρωση 50 µg/ml) και Rif (τελική συγκέντρωση 25 µg/ml) και επώαστηκαν για 2-3 μέρες στους 28 °C. Τέλος, από αυτές τις υγρές μεταφέρθηκε 1ml σε τρυβλία με YMB ή LB παρουσία των αντιβιοτικών Kan και Rif και δημιουργήθηκε ένα στρώμα βακτηρίων που θα χρησιμοποιηθεί για τα hairy roots (βλέπε 3.2.ζ).

Το στέλεχος *R. rhizogenes* LBA 9402 φέρει το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Rif. Από την άλλη, το πλασμίδιο που σχεδιάστηκε έχει γονίδιο - ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό Kan. Έτσι με την εισαγωγή του πλασμιδίου στα LBA 9402, δημιουργούνται στελέχη LBA 9402 με ανθεκτικότητα και στα δύο αντιβιοτικά (Kan και Rif). Επιπλέον, πρέπει να αναφερθεί και ότι το στέλεχος LBA 9402, διαθέτει ήδη το πλασμίδιο pRi1855 το οποίο έχει τις πρωτεΐνες Vir (virulence) που είναι απαραίτητες αργότερα για τη μεταφορά της περιοχής του T-DNA στο φυτό.

3.2.ζ Παροδικός μετασχηματισμός *L. japonicus* μέσω Hairy Roots

Αρχικά, 350 σποράκια δέχονται την διαδικασία του scarification, της αποστείρωσης και της εκβλάστησης, όπως περιγράφονται στις παραγράφους 3.1.α και 3.1.β με τη διαφορά ότι αντί για Jensen τα φουσκωμένα σποράκια τοποθετούνται σε τρυβλίο που έχει διηθητικό χαρτί και 3 ml αποστειρωμένο ddH₂O. Μετά από 7 συνολικά ημέρες υγιή φυτά επιλέγονται για τη διαδικασία του hairy root κατά την οποία, τους αφαιρείται η ρίζα (τομή κάτω από της κοτυληδόνες) ενώ εκτίθενται σε εναιώρημα μετασχηματισμένων *R. rhizogenes*. Τα φυτά μεταφέρονται σε τρυβλία με ½ MS (2,2 gr Murashige and Skoog salt, 10 gr σουκρόζη, pH=5.6, 8 gr βακτηριολογικού άγαρ ανά λίτρο), όπου και παραμένουν για 2 μέρες στο σκοτάδι και στη συνέχεια εκτίθενται για 3 μέρες σε φωτοπερίοδο 16 ωρών φως και 8 ώρες σκοτάδι (16/8h). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για 30 φυτά *L. japonicus* με *R. rhizogenes* που φέρουν το πλασμίδιο L2_LjSK6_gRNA1+4 και 30 με το L2_LjSK6_gRNA2+3. Επιπλέον, 30 φυτά διαμολύνονται με *R. rhizogenes* που είχαν το πλασμίδιο Control. Το πλασμίδιο αυτό, είναι διαθέσιμο από το εργαστήριο και έχει ακριβώς την ίδια δομή με τα άλλα L2 πλασμίδια. Η μόνη διαφορά είναι ότι δεν φέρει τις κασέτες με τα δύο gRNAs και άρα δεν μπορεί να οδηγήσει σε μετάλλαξη μέσω του μηχανισμού CRISPR/Cas9. Μετά από 7 ημέρες, τα φυτά μεταφέρονται σε τρυβλία με Ceftazidime (Ceft) 300 µl/ml για την αναστολή της ανάπτυξης του *R. rhizogenes*. 21 ημέρες μετά τον μετασχηματισμό απομονώνονται τα φυτά και

παρατηρούνται στο στερεοσκόπιο (DsRed fluorescence filter από το Leica StereomicroscopeMZ 10 F) για την ύπαρξη της κόκκινης φθορίζουσας tRFP. Το σήμα του φθορισμού μας εξασφαλίζει ότι η περιοχή T-DNA έχει ενσωματωθεί στο φυτό και εκφράζονται τα γονίδια που φέρει. Κάτω από το στερεοσκόπιο κόβονται οι ρίζες που δεν είναι μετασχηματισμένες (δεν φθορίζουν).

3.3 Αξιολόγηση της ικανότητας της μεταλλαξιγένεσης στο γονίδιο *LjSK6*

3.3.α Απομόνωση DNA από φυτά

Το πρώτο βήμα για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των sgRNAs είναι η απομόνωση του γενετικού υλικού του τροποποιημένου φυτού, για να μπορέσει στη συνέχεια να γίνει ενίσχυση της αλληλουχίας - στόχου και ανάλυση μεταλλάξεων.

Η απομόνωση γίνεται μέσω των:

- Buffer CTAB, απορρυπαντική ουσία για τη διάλυση των μεμβρανών με σύσταση 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2% w/v CTAB, 1% PVP.
- Χλωροφορμίου, στοχεύοντας στη δημιουργία 3 φάσεων και τη συγκέντρωση του DNA στην υδάτινη φάση (άνω φάση).
- Ισοπροπανόλη, για την κατακρήμνιση του DNA.
- Αιθανόλη 70% για την αφαίρεση αλάτων και άρα για καλύτερο καθαρισμό του DNA.

Ακολουθεί η διάσπασή του ιστού με τη χρήση του Tissue Lyser System (Qiagen) για 30 sec. Μετά, τα δείγματα επιστρέφονται στο υγρό N₂ και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Στη συνέχεια, θερμαίνεται το διάλυμα CTAB στο υδατόλουτρο στους 65°C, για 15 min. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 300 μl CTAB. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με Vortex για 30 sec και επώαση για 20 min στο υδατόλουτρο στους 65 °C. Ύστερα, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5 min στα 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και μετά γίνεται προθήκη διαλύματος 350 μl χλωροφορμίου σε κάθε δείγμα. Έπειτα, Vortex και φυγοκέντρωση για 5 min στα 13.000 rpm σε RT. Έτσι, δημιουργούνται 3 φάσης και η άνω φάση μεταφέρεται σε νέο eppendorf. Στη συνέχεια, προστίθεται ισοπροπανόλη (-20°C) σε ποσότητα 1 επί του όγκου της άνω φάσης που απομονώθηκε. Ακολουθεί ήπια ανάδευση, επώαση για 10 min στους -20°C και φυγοκέντρωση για 15 min στα 13.000 rpm σε RT. Με το πέρας της, το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται 500 μl αιθανόλης 70% (-20°C). Τα δείγματα αναδεύονται ήπια και φυγοκεντρούνται για 15 min στα 13.000 rpm σε RT. Στο σημείο αυτό, προετοιμάζεται το heat block στους 50°C. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα υπολείμματα αιθανόλης απομακρύνονται μέσω επώασης στο heat block στους 50°C, για 15 min με ανοιχτά eppendorf. Παράλληλα, προετοιμάζεται το διάλυμα επαναδιαλυτοποίησης που έχει την εξής σύσταση: στα 50 μl ddH₂O περιέχεται 1 μl RNAάσης A. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 15 μl ddH₂O - RNAάσης A. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10 min και έντονη ανάδευση με Vortex για 5 sec. Τέλος, υπολογίζεται η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε και η καθαρότητά του με το μηχάνημα Q3000 UV spectrophotometer (Quawell).

3.3.β PCR με την υψηλής πιστότητας πολυμεράση Q5

Χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές για δύο σημεία του γονιδίου *LjSK6*. Για κάθε περιοχή υπάρχει ένας Forward (F) και ένας Reverse (R) εκκινητής. Η PCR πραγματοποιείται με την Q5® High-Fidelity DNA polymerase από την NEB. Για την PCR αρχικά σε pcr-tubes τοποθετείται 1 μl δείγματος DNA (συγκέντρωσης 50 ng/μl) και παρασκευάζεται ένα Master Mix στον πάγο, με σκοπό την μείωση του πειραματικού σφάλματος. Το Master Mix περιέχει ανά δείγμα: 7,5μl 5X Q5 Reaction Buffer, 5 μl ddH₂O και από 0,75 μl του F και του R εκκινητή (10 pmol/μl). Η αντίδραση έχει τελικό όγκο 15 μl. Επιπλέον, για τον έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης χρησιμοποιείται και ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου (μόνο με ddH₂O).

Μετά την προσθήκη του Master Mix στα tubes με το DNA, ακολουθεί ήπια ανάδευση και μία σύντομη φυγοκέντρωση και στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή με το παρακάτω πρόγραμμα για 31 κύκλους (30 επαναλήψεις των βημάτων 2,3 και 4):

Πίνακας 13: Βήματα για την αντίδραση PCR Q5 μεταξύ των

Βήμα	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επανάληψη	Διαδικασία
1	98 °C	30 sec	0	Πρώτη αποδιάταξη δίκλωνου DNA
2	98 °C	10 sec	30	Αποδιάταξη
3	60 ή 61*	30 sec	30	Υβριδοποίηση εκκινητών
4	72 °C	12 ή 25 **sec	30	Στάδιο πολυμερισμού
5	72 °C	2 min	0	Τελικός πολυμερισμός
6	4 °C	∞	0	Διατήρηση

* ανάλογα με τους εκκινητές. Για το ζεύγος 1 είναι 60 °C και για το ζεύγος 2 είναι 61 °C

** ανάλογα με τους εκκινητές. Για το ζεύγος 1 είναι 12 sec και για το ζεύγος 2 είναι 25 sec.

Πίνακας 14: Αλληλουχίες εκκινητών για το γονίδιο *LjSK6* για PCR αντίδραση με Q5

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (nts)	Tm (°C)	Θερμοκρασία υβριδισμού (°C)
Q5_ <i>LjSK6</i> _1F	CGGTGGCTAGAATAGATAAG	20	59	60
Q5_ <i>LjSK6</i> _1R	ATGTATGAGATTGTCTGAGC	20	59	
Q5_ <i>LjSK6</i> _2F	TGAAAGTGTGTGATTTTGGG	20	60	61
Q5_ <i>LjSK6</i> _2R	CCAATGCTTCAAGAGGCACC	20	67	

Το προϊόν της αντίδρασης για το ζεύγος εκκινητών 1 είναι 597 bp και για το ζεύγος εκκινητών 2 είναι 1216 bp. Τέλος, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης 1% στα 110Volt για 35 min.

3.3.γ Δοκιμασία ενδονουκλεάσης T7

Η δοκιμή με ενδονουκλεάση T7 I (T7EI) χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ύπαρξης μεταλλάξεων στα προϊόντα της PCR. Για το σκοπό αυτό η κάθε αντίδραση PCR μοιράζεται σε δύο pcr-tubes και προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες αντιδραστηρίων όπως φαίνονται στον πίνακα 15. Αρχικά, γίνεται η αποδιάταξη των προϊόντων της PCR και ο υβριδισμός (Πίνακας 16). Στη συνέχεια, προστίθενται 0,7μl T7EI (4U/μl). Οι αντιδράσεις επωάζονται στους 37°C για 30 min. Μετά την επώαση, τοποθετείται 1 μl 0,5M EDTA (pH=8) για να σταματήσει η αντίδραση, καθώς το EDTA είναι χηλικός παράγοντας και δεσμεύει τα ιόντα που είναι απαραίτητα για την δράση της T7EI. Για την αξιολόγηση της δημιουργίας μεταλλάξεων για κάθε gRNA, οι αντιδράσεις T7EI υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης (2%).

Πίνακας 15: Συστατικά αντίδρασης της ενδονουκλεάσης T7 I

Συστατικά	Ποσότητες
Προϊόν PCR	6 μl
10X NEBuffer 2	2 μl
ddH ₂ O	μέχρι τα 19 μl (11μl)

Πίνακας 16: Πρόγραμμα αποδιάταξης και υβριδιασμού των προϊόντων της PCR

Βήμα	Θερμοκρασία (T) σε °C	Ρυθμός αλλαγής T	Χρόνος
Αποδιάταξη	95	0	5 min
Υβριδισμός	95→85	- 0,2 °C/sec	50 sec
	85→25	- 0,1 °C/sec	10 min
Διατήρηση	4	0	Μέχρι να γίνει η πέψη με την ενδονουκλεάση T7 I

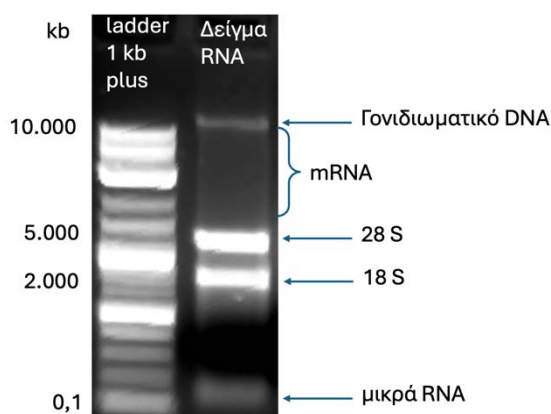
4. Αποτελέσματα - Συζήτηση

4.1 Αποτελέσματα πειράματος έκφρασης της *LjSK6* σε συνάρτηση με τον χρόνο

Στο πείραμα μελετήθηκε ο τρόπος με τον οποίο εξελίσσεται η έκφραση του γονιδίου *LjSK6* κατά την διάρκεια της φυματογένεσης, όταν το φυτό *L. japonicus* συμβιώνει με το βακτήριο *M. japonicum* MAFF303099. Για τον σκοπό αυτό, έπρεπε να εκβλαστώσουν τα φυτά, αργότερα να εμβολιαστούν με ριζόβιο και μετά να γίνουνται δειγματοληψίες και ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου. Με την μέθοδο της RT-qPCR, αρχικά το RNA που απομονώθηκε μετατράπηκε στο cDNA και, στη συνέχεια, ποσοτικοποιήθηκε η έκφραση της *LjSK6*, σε σχέση με το ιδιοσύστατο γονίδιο - αναφοράς της ουβικουιλίνης. Σκοπός της παραπάνω διαδικασίας είναι να εντοπίσουμε χωρικά και χρονικά την έκφραση της *LjSK6* σε φυτά αγρίου τύπου κατά τη διάρκεια της φυματογένεσης. Αυτό γίνεται με την ανάλυση των δειγμάτων από τη ρίζα, τον βλαστό και τα φυμάτια μετά τον εμβολιασμό των *L. japonicus*. Εάν γνωρίζουμε τότε και που στο φυτό αγρίου τύπου εκφράζεται το γονίδιο *LjSK6*, τότε θα ξέρουμε σε ποιο στάδιο της φυματογένεσης θα πρέπει να μελετήσουμε την αντίστοιχη έκφραση της *LjSK6*, στα μεταλλάγματα ανά τα διαφορετικά στάδια της φυματογένεσης. Ωστόσο, λόγω περιορισμένου χρόνου, μέχρι στιγμής έχει ολοκληρωθεί η ανάλυση της έκφρασης της *LjSK6* των ιστών της ρίζας, ενώ είναι σε εξέλιξη και η ανάλυση των φυματίων και του βλαστού.

4.1.α Επιβεβαίωση καθαρότητας RNA

Πριν προχωρήσουμε σε περαιτέρω επεξεργασία του RNA για την απομάκρυνση προσμίξεων DNA, καθώς το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε δεν κάνει καλό διαχωρισμό μεταξύ τους, αξιολογήθηκε η ποιότητα του RNA. Η διερεύνηση αυτή έγινε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% με βρωμιούχο αιθύδιο και το αποτέλεσμα περιγράφεται στην εικόνα 8. Γενικά, το RNA είχε καλή ποιότητα καθώς φαινόταν τα RNA της μικρής και της μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος (18S και 28 S αντίστοιχα). Τα δείγματα που είχαν αυτή τη ζώνωση χρησιμοποιήθηκαν για τα επόμενα βήματα.



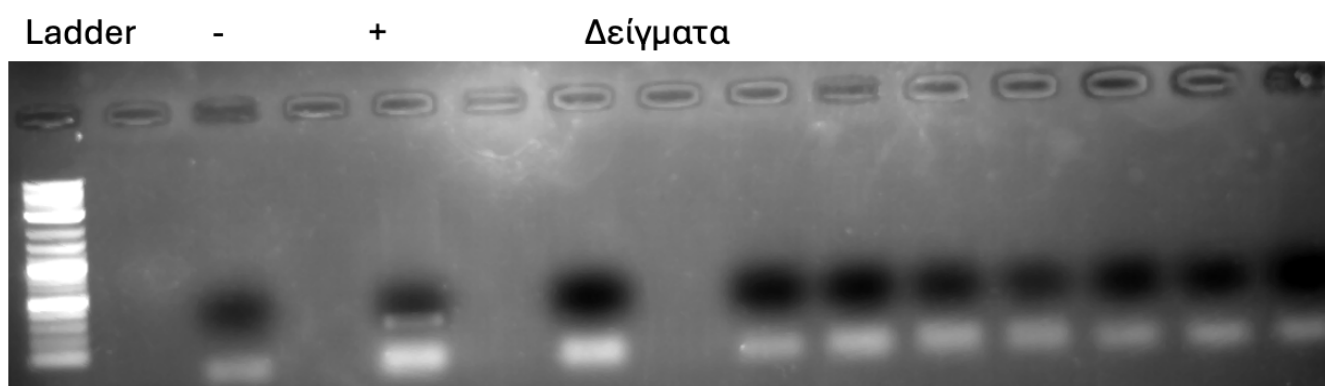
Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση RNA

Η εικόνα αποτελεί ένα δείγμα RNA με τις επιθυμητές ζώνες που ορίζονται από τον δείκτη βάσεων ladder 1kb plus. Φαίνονται οι δύο ζώνες από την μικρή και μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος, το γονιδιωματικό DNA, μικρά RNA και ένα φάσμα από mRNA με ποικίλο μέγεθος.

Για να διαπιστωθεί ότι, μετά τη δράση της DNάσης, στα δείγματα υπήρχε μόνο RNA και το DNA είχε απομακρυνθεί, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Στην πρώτη θέση, τοποθετήθηκε 3μl ladder, ακολουθούμενο από τους μάρτυρες. Το αρνητικό δείγμα ελέγχου, ο οποίος περιείχε μόνο ddH₂O και το Master Mix αλλά όχι νουκλεϊκά οξέα. Το θετικό δείγμα ελέγχου, περιλάμβανε όλα τα απαραίτητα συστατικά για την αντίδραση PCR με γονιδιωματικό DNA ως μήτρα, για να διασφαλιστεί η επιτυχία της αντίδρασης. Έτσι, η απουσία ενίσχυσης σήματος στα δείγματα RNA που είχαν επεξεργαστεί με DNάση, θα οφείλεται στην πλήρη εξάλειψη του DNA και όχι σε αποτυχία της αντίδρασης PCR. Στη συνέχεια, όλα τα δείγματα αναμείχθηκαν με gel loading dye και υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση με τάση 120V για 30 λεπτά. Στην εικόνα 9, ο αρνητικός μάρτυρας παρουσίασε μόνο μία ζώνη κάτω των 100 bp, η οποία ήταν προϊόν διμερισμού των εκκινητών. Η απουσία ζώνης ενίσχυσης, εξασφαλίζει την απουσία επιμόλυνσης στα δείγματα. Ο θετικός μάρτυρας εμφάνισε μια κύρια ζώνη στα 200 bp αποδεικνύοντας την επιτυχία της PCR. Όλα τα δείγματα RNA που είχαν υποβληθεί σε επεξεργασία με DNάση I, εμφάνισαν μόνο ζώνες κάτω των 100 bp, που οφείλονται στα διμερή εκκινητών, χωρίς να παραχθεί οποιοδήποτε PCR προϊόν. Άρα, η επεξεργασία με DNάση ήταν αποτελεσματική.

4.1.β Αποτελέσματα αντίδρασης qPCR – Στατιστική ανάλυση

Με την απομάκρυνση των υπολειμμάτων DNA μέσω της αντίδρασης της DNAase I, προχωρήσαμε στη δημιουργία cDNA από το RNA και στην ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης, συζευγμένες σε μία αντίδραση. Για την αντίδραση αυτή έγιναν δύο τεχνικές επαναλήψεις για κάθε δείγμα, τόσο για το γονίδιο – ενδιαφέροντος (*LjSK6*), όσο και για το γονίδιο – αναφοράς (*LjUb*). Το *LjUb* είναι ένα ενδογενές ιδιοσύστατο γονίδιο που η έκφρασή του δεν μεταβάλλεται στις συνθήκες που μελετώνται και κωδικοποιεί για την ουβικιτίνη που συμμετέχει στην απομάκρυνση μέσω καταστροφή των πρωτεϊνών που δεν έχουν αναδιπλωθεί σωστά ή δεν χρειάζονται πλέον στο κύτταρο. Επιπλέον, ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων ότι τα αρνητικά δείγματα ελέγχου της αντίδρασης δεν είχαν ζώνες ενίσχυσης και ότι στα υπό διερεύνηση δείγματα υπήρχε μία κύρια ζώνη ενίσχυσης. Μετά προχωρήσαμε στην ανάλυση των αποτελεσμάτων. Αρχικά, εξετάστηκε η διαφορά των C_q των τεχνικών επαναλήψεων και όταν υπήρχε



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση μετά την εφαρμογή της DNAase I.

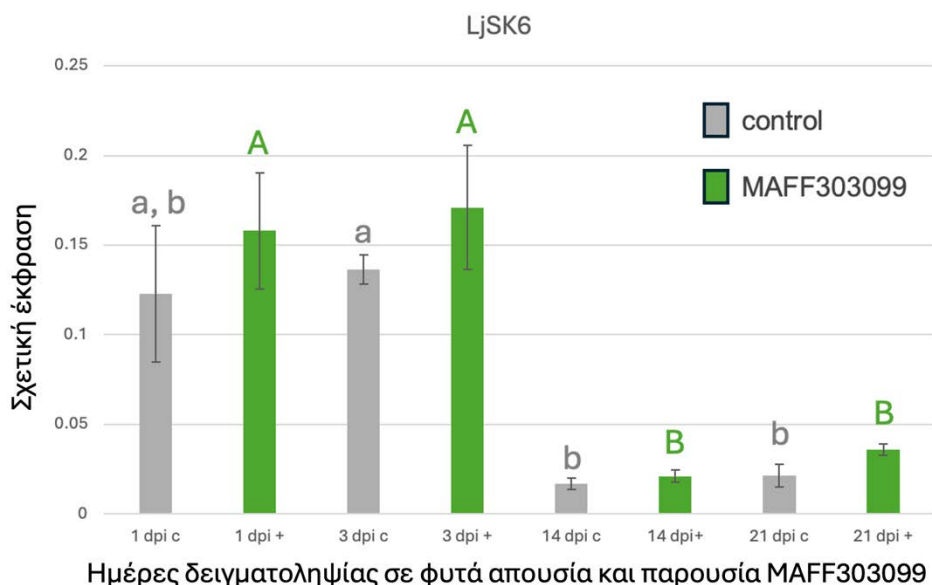
M: μάρτυρας μεγέθους (Ladder) 1 kb Plus DNA. Μετά τον μάρτυρα είναι το αρνητικό δείγμα ελέγχου που δεν εμφανίζει ζώνη ενίσχυσης (-), μετά το θετικό δείγμα ελέγχου που έχει DNA και εμφανίζει ζώνη ενίσχυσης (+). Και μετά βρίσκονται τα υποδιερεύνηση δείγματα RNA τα οποία ελέγχουμε για την επιτυχή απομάκρυνση του DNA. Σε αυτά δεν υπάρχει κάποια ζώνη ενίσχυσης και η αντίδραση της DNAase I, θεωρείται επιτυχημένη.

διαφορά μεγαλύτερη του μισού κύκλου (0,5) τότε τα δείγματα απορρίπτονταν από τη μελέτη. Για τον λόγο αυτό, τα δείγματα RNA των 7 dpi δεν χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική ανάλυση, επειδή είχαν μείνει λιγότερα από τρία δείγματα από τα φυτά που μεγάλωσαν απουσία ριζοβίου. Ελλείψει χρόνου, η αντίδραση δεν μπορούσε να επαναληφθεί. Άρα η στατιστική ανάλυση για την 7 dpi, δεν ήταν δυνατή.

Αφού υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τεχνικών επαναλήψεων της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *LjUb* σε σχέση με την *LjSK6* επιβεβαιώθηκε ότι τα δείγματα δεν παρέκκλιναν σημαντικά από την κανονική κατανομή. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν t-tests για τα δείγματα απουσία και παρουσία MAFF303099 για την κάθε ημέρα ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα από τα t-tests, δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση *LjSK6* στο *L. japonicus* παρουσία ή απουσία MAFF303099. Ωστόσο, την ημέρα 21 dpi, υπήρχε μία τάση ($p=0.09$) αύξησης της έκφρασης της *LjSK6*. Γενικότερα, από το διάγραμμα 1 μπορούμε να παρατηρήσουμε μία τάση η *LjSK6* να εκφράζεται περισσότερο στα φυτά με το ριζόβιο, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστική σημαντικότητα. Παρόλα αυτά, πρέπει να λάβουμε υπόψη μας ότι ο αριθμός των δειγμάτων ανά συνθήκη, ημέρα και χρονική στιγμή που μελετήθηκε είναι μικρός και ενδεχομένως επηρεάζει την ανάλυση.

Τέλος, έγινε σύγκριση στην έκφραση του γονιδίου ανά ημέρα δειγματοληψίας για τα χωρίς το ριζόβιο και για τα φυτά με MAFF303099 ξεχωριστά. Για τα φυτά που μεγάλωσαν απουσία του ριζοβίου, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA: single factor), η οποία και έδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, χωρίς να διευκρινίζεται ποιες ημέρες εμφανίζουν στατιστική σημαντικότητα μεταξύ τους. Έτσι, προχωρήσαμε σε ανάλυση Post – hoc test με την διόρθωση Bonferroni και βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ημέρες μετά τον εμβολιασμό (dpi) τόσο στα φυτά χωρίς όσο και στα φυτά με το ριζόβιο MAFF303099. Τα αποτελέσματα όλων των στατιστικών αναλύσεων παρουσιάζονται στο διάγραμμα 1. Παρατηρούμε, ότι κατά τα αρχικά στάδια η έκφραση του γονιδίου *LjSK6* είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα φυτά των 14 dpi και 21dpi, ανεξάρτητα από την παρουσία του MAFF303099. Συνεπώς, τα νεαρότερα φυτά εκφράζουν την *LjSK6* σε μεγαλύτερα επίπεδα σε σχέση με τα γηραιότερα φυτά. Αυτή η μείωση της έκφρασης, είναι πιθανό να σχετίζεται με τα αναπτυξιακά στάδια του φυτού και όχι τόσο με την φυματογένεση, αφού δεν εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των φυτών παρουσία και απουσία ριζοβίου, αλλά εμφανίζεται διαφορά στην έκφραση της *LjSK6* στη ρίζα, ανάμεσα στα φυτά διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων.

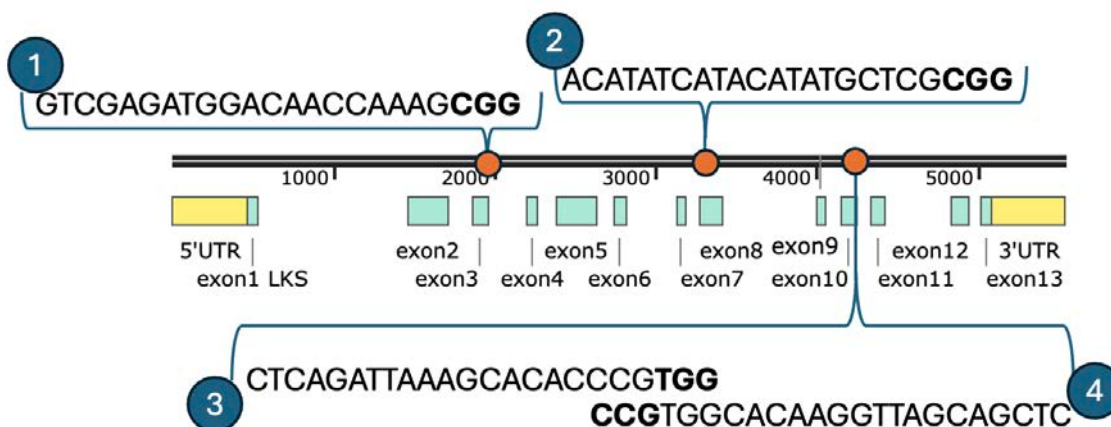
Διάγραμμα 1: Έκφραση της *LjSK6* ανά τις ημέρες μετά τον εμβολισμό με ριζόβιο.



4.2 Αποτελέσματα παραγωγής φορέων

4.2.α Επιλογή gRNAs

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η αλληλουχία του γονιδίου *LjSK6* αποκτήθηκε από τη βάση δεδομένων Lotus base με κωδικό Lj1g3v2611330.1 και αποτελείται από 13 εξόνια. Το συνολικό μήκος της είναι 5.530 bp. Η επιλογή των καλύτερων sgRNAs ήταν δύσκολη, λόγω της ομολογίας της *LjSK6* με την *LjSK1* καθώς οι μοναδικές αλληλουχίες, που να συνοδεύεται από την PAM και να έχει όλα τα



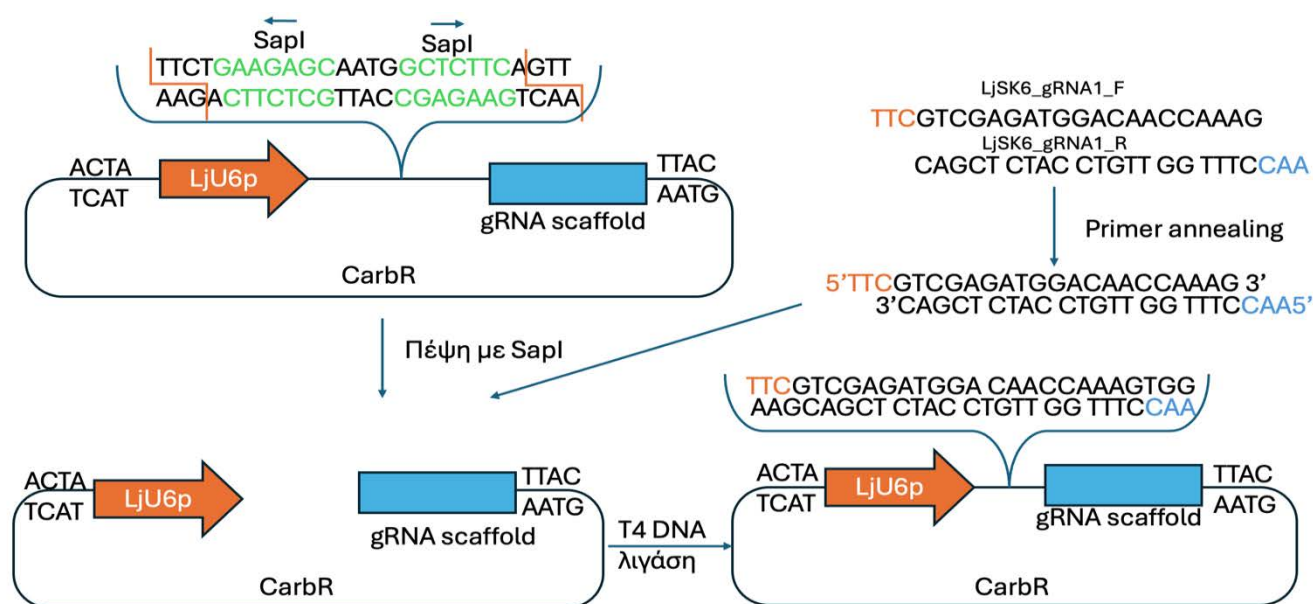
*Εικόνα 10: Οι επιλεγμένες αλληλουχίες στόχευσης στο γονίδιο *LjSK6*.*

Στην εικόνα φαίνεται η δομή του γονιδίου *LjSK6* οι αμετάφραστες περιοχές του, τα εξόνια με πράσινο χρώμα και οι περιοχές αναγνώρισης της *Cas9* συμβολίζονται με πορτοκαλί κύκλο. Με μαύρη έντονη γραφή απεικονίζεται η αλληλουχία PAM.

επιθυμητά χαρακτηριστικά των sgRNAs, ήταν ελάχιστες. Δηλαδή τα sgRNAs να έχουν G-C% μεταξύ 50-70%, να έχουν μήκος 18-24 νουκλεοτίδια καθώς και να μην δημιουργούνται λούπες στη δομή τους και να βρίσκονται σε εξόνια. Μία μετάλλαξη που δημιουργεί για παράδειγμα ένα κωδικόνιο λήξης και δεν επιτρέπει την μετάφραση του mRNA της LjSK6, συνήθως θα δημιουργήσει μεγαλύτερο πρόβλημα αν υπάρχει στα πρώτα εξόνια παρά στο τελευταίο. Για το λόγο αυτό, προτιμήθηκαν τα gRNAs, που στόχευαν σε πιο αρχικά εξόνια και όχι στο εξόνιο 13, παρόλο που είχε τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Συνδυάζοντας τα παραπάνω, επιλέχθηκαν οι καλύτερες αλληλουχίες σε αρχικά εξόνια. Για την έκφραση των sgRNA έχει επιλεγεί ο υποκινητής U6, καθώς σε αυτόν προσδένεται ισχυρά η RNA pol III (που θα μεταγράψει το sgRNA), έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε άλλες ερευνητικές εργασίες. Για να είναι δυνατή η μεταγραφή από τον U6 υποκινητή το sgRNA πρέπει να ξεκινάει G. Στη περίπτωση που δεν υπήρχε, προστέθηκε στην αρχή της αλληλουχίας του gRNA. Η αλληλουχίες που στοχεύουν τα gRNAs απεικονίζονται παραπάνω (Εικόνα 10).

4.2.β Κατασκευή των κασέτων έκφρασης μέσω Golden Gate

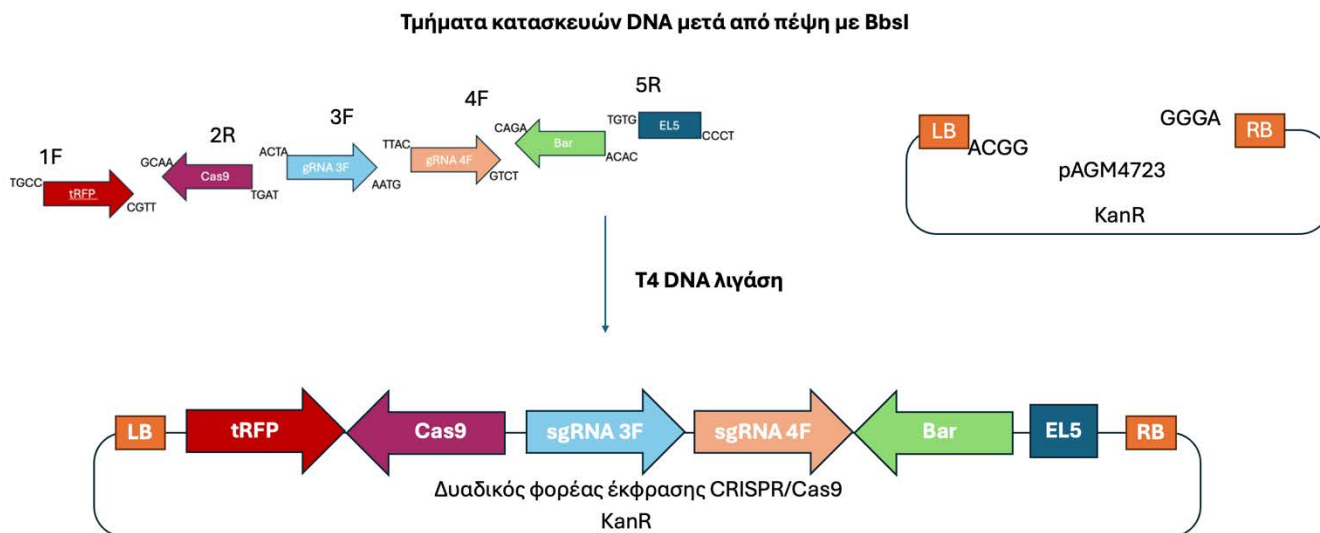
Επίπεδο 1 - Level 1: Στο εργαστήριο υπήρχαν διαθέσιμοι οι φορείς L1 που περιέχουν τον υποκινητή U6 και το gRNA scaffold, επομένως για την κασέτα των sgRNAs το μόνο που έλειπε ήταν να εισαχθεί η αλληλουχία αναγνώρισης (gRNA). Αυτό έγινε μέσω του ενζύμου Sapl και των άκρων του φορέα που είχαν σχεδιαστεί να είναι συμπληρωματικά με τα προεξέχοντα άκρα των gRNA (Εικόνα 11). Τα μετασχηματισμένα κύτταρα DH5a στρώθηκαν σε τρυβλίο με το αντιβιοτικό Carb 100 µg/ml, αφού ο φορέας φέρει γονίδιο - ανθεκτικότητας σε αυτό το αντιβιοτικό. Η αντίδραση κλωνοποίησης είναι πολύ αποτελεσματική και για αυτό δεν ήταν απαραίτητη περαιτέρω επιλογή. Τέλος, έγιναν υγρές καλλιέργειες και απομόνωση πλάσμιδιου.



Εικόνα 11: Συναρμολόγηση της κασέτας έκφρασης του LjSK6_gRNA1 σε φορέα 3F.

Παρουσιάζεται η υβριδοποίηση των εκκινητών των gRNA και η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο τύπου II Sapl, που πέπτει εκτός της αλληλουχίας που αναγνωρίζει. Οι θέσεις αναγνώρισης μετά την πέψη απομακρύνονται από το πλάσμιδιο και προσαρτάται η αλληλουχία του gRNA. Παρόμοια γίνεται και για τα υπόλοιπα gRNAs στον 3F ή 4F αντίστοιχα.

Επίπεδο 2 - Level 2: Μετά την κατασκευή των L1 φορέων έπρεπε να γίνει η ένωση των κασετών sgRNA με των κασετών των υπόλοιπων γονιδίων, οι οποίες ήταν διαθέσιμες στο εργαστήριο. Στον πίνακα 18, παρουσιάζονται οι κασέτες και τα επιμέρους χαρακτηριστικά τους και στην εικόνα 10 φαίνονται τα άκρα και η σειρά των γονιδιακών κατασκευών στον pAGM4723 φορέα. Οι κατασκευές κλωνοποιήθηκαν με τη βοήθεια του περιοριστικού ενζύμου τύπου II BbsI και ενώθηκαν με την T4 DNA λιγάση, βάση συμπληρωματικότητας των άκρων τους (Εικόνα 12). Τα μετασχηματισμένα DH5a κύτταρα, στρώθηκαν σε τρυβλία LB με Kan 50 µg/ml, που χρησιμοποιούνταν σαν δείκτης επιλογής των κυττάρων που πήραν πλασμίδιο. Επιπλέον, για να γίνει η επιλογή των αποικιών που έχουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *CRed*, ένα τεχνητό βακτηριακό οπερόνιο υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση της κανθαξανθίνης, προσδίδοντας κόκκινο χρώμα στις αποικίες. Στον φορέα pAGM4723 το *CRed* είναι τοποθετημένο μέσα στην αλληλουχία που χάνεται από τον φορέα μετά την πέψη του με το περιοριστικό ένζυμο. Επομένως, τα μετασχηματισμένα βακτήρια θα έχουν άσπρο χρώμα αποικιών, γιατί θα έχουν χάσει το γονίδιο *CRed*.



Εικόνα 12: Σύνθεση φορέα L2.

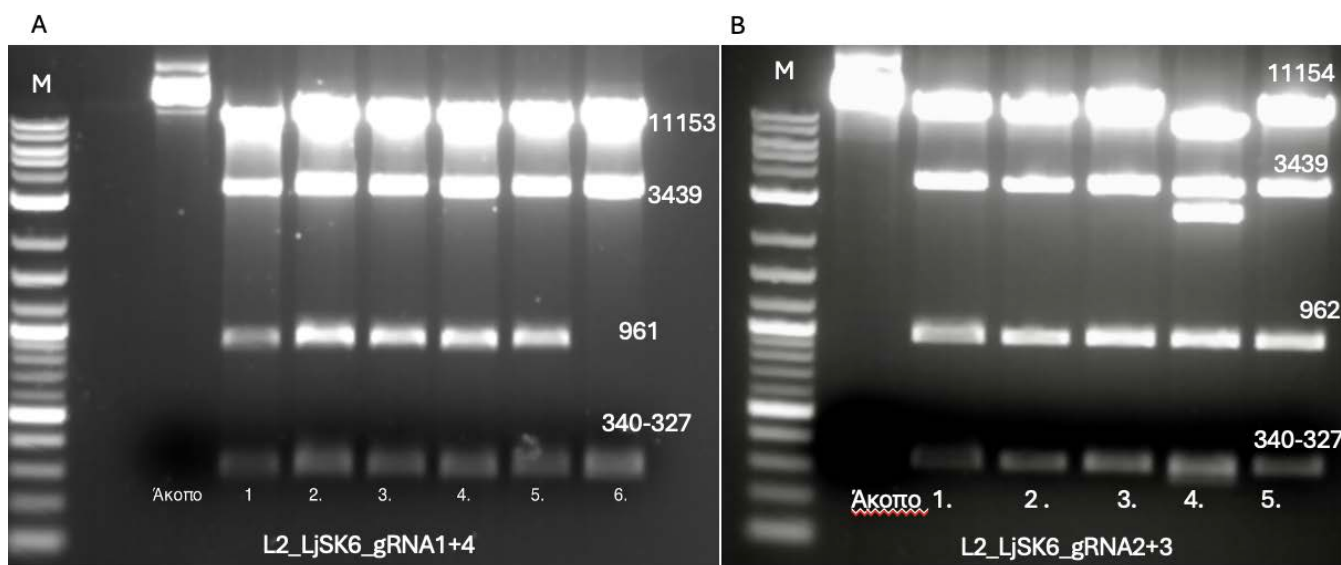
Παρουσιάζεται η διαδικασία σύνθεσης του φορέα L2 από μικρότερες γονιδιακές κατασκευές (1F-2R-3F-4F-5R) και τον τελικό προσδέτη EL5. Οι κατασκευές συνδυάζονται με τη σωστή σειρά, μέσω των κολλωδών συμπληρωματικών άκρων τους, και με τον ίδιο τρόπο συνδέονται και με τον φορέα κλωνοποίησης pAGM4723, που έχει ανθεκτικότητα στη Kan.

Ωστόσο, επειδή ο μετασχηματισμός των DH5a με L2 είναι μία πιο δύσκολη αντίδραση, λόγω του μεγέθους των πλασμιδίων (~16.220 bp) και των πολλών τμημάτων που έπρεπε να συνδυαστούν, γίνεται και έλεγχος με τη χρήση πέσεων με το ένζυμο περιορισμού τύπου III, XhoI. Μετά την δημιουργία υγρών καλλιέργειών από άσπρες αποικίες των τρυβλίων και την απομόνωση του πλασμιδίου, ακολούθησε η πέψη. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της πέψης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Οι αναμενόμενες μπάντες που θα προκύπτανε από την πέψη είχαν τα εξής μεγέθη: 11153bp, 3439 bp, 961bp και 340 bp, 327bp οι δύο τελευταίες θα φαίνονται μαζί καθώς η διαφορά τους

είναι πολύ μικρή. Άρα αναμένονταν 4 ζώνες, για να θεωρηθεί ότι το πλασμίδιο έχει τη σωστή δομή. Τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων παρουσιάζονται στην εικόνα 13 Α το L2_LjSK6_gRNA1+4 και στην εικόνα 13Β το L2_LjSK6_gRNA2+3. Οι αναλυτικοί χάρτες των πλασμιδίων L2 είναι στο παράρτημα.

Πίνακας 17: Δομή γονιδιακών κατασκευών

Ονομασία	Υποκινητής	Γονίδιο	Τερματική αλληλουχία
1F	LjUb	tRFP	Act2t
2R	2x35S	SV40-NLS_Cas9_SV40-NLS	tNOS
3F	LjU6	sgRNA	TTTTTTT
4F	LjU6	sgRNA	TTTTTTT
5R	LjUb	Bar	35S ter
EL5	Είναι η αλληλουχία που ενώνει το 5R με τον φορέα pAGM4723		



Εικόνα 13: Διαγνωστική πέψη L2 φορέων.

M: μάρτυρας μεγέθους (Ladder) 1 kb Plus DNA. Μετά τον μάρτυρα έχουμε ένα πλασμίδιο που δεν έχει γίνει πέψη. Οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν με το ένζυμο XmnI. Α) L2_LjSK6_gRNA1+4: όλα τα πλασμίδια είχαν το αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης εκτός από το 6. Β) L2_LjSK6_gRNA2+3: όλα τα πλασμίδια είχαν το αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης εκτός από το 4.

Για περαιτέρω επιβεβαίωση για την ορθότητα των κατασκευών των φορέων L2, ένα πλασμίδιο από κάθε κατασκευή στάλθηκε για αλληλούχηση, και για τις δύο κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια από την αντίστοιχη καλλιέργεια 1. Η αλληλούχηση έγινε με δύο εκκινητές: τον P1-P7R και τον LjU63F. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αλληλουχίες ήταν με τον σωστό προσανατολισμό και τη σωστή σειρά. Επίσης, ελέγχθηκε και το χρωματογράφημα, για την επιβεβαίωση της ποιότητας της αλληλούχησης. Μάλιστα, επειδή το LjU63F πιάνει δύο φορές στον φορέα καθώς είναι συμπληρωματικός ως προς τις κασέτες sgRNAs, στα σημεία που ήταν οι διαφορετικές αλληλουχίες αναγνώρισης το χρωματογράφημα εμφανίζονταν σαν ετεροζυγωτία (δύο διαφορετικά ζεύγη βάσεων στα δύο αλληλόμορφα ταυτόχρονα) και η ανάγνωσή του έγινε βάση προς βάση σε σύγκριση με την αναμενόμενη νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Έτσι, επιβεβαιώθηκε ότι τα πλασμίδια είχαν την επιθυμητή νουκλεοτιδική αλληλουχία και τα πειράματα συνεχίστηκαν με τα ελεγμένα πλασμίδια.

4.2.γ Μεταφορά του L2 πλασμιδίου στο *R. rhizogenes*

Μετά την απομόνωση των πλασμιδίων L2 από τα *E. coli*, μεταφέρθηκαν σε βακτήρια *R. rhizogenes* LBA9402 μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Στη συνέχεια, έγινε επιλογή των βακτηρίων που είχαν λάβει το πλασμίδιο με δύο αντιβιοτικά, Kan και Rif, καθώς το πλασμίδιο έχει γονίδιο - ανθεκτικότητας προς το πρώτο και το στέλεχος LBA9402 προς το δεύτερο. Με την ίδια λογική όπως και στα DH5a, πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες σε θρεπτικό YMB. Ωστόσο, στο σημείο αυτό δημιουργήθηκαν πολλά ζητήματα καθώς τα βακτήρια δεν αναπτύσσονταν με τη σωστή μορφολογία και στον αναμενόμενο χρόνο. Μετά από επαναλήψεις της διαδικασίας και αλλαγές συνθηκών, διαπιστώθηκε ότι με την αλλαγή του θρεπτικού μέσου από YMB σε LB, τα βακτήρια LBA9402 αναπτύσσονταν με τους αναμενόμενους ρυθμούς. Επομένως, η διαδικασία επαναλήφθηκε σε τρυβλία και υγρές καλλιέργειες με LB και τα κατάλληλα αντιβιοτικά και το πείραμα συνεχίστηκε.

4.2.δ Μεταφορά του T-DNA στο *L. japonicus*

Για το σκοπό του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν περίπου 350 σπόροι του φυτού *L. japonicus* του οικότυπου MG-20. Από τους οποίους κατάφεραν να εκβλαστήσουν 100 φυτάρια. 7 ημέρες μετά τη διαδικασία αυτή τα φυτά που είχαν την επιθυμητή μορφολογία (δύο υγιείς κοτυληδόνες και ανεπτυγμένη ρίζα) επιλέχθηκαν για μετασχηματισμό. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 90 φυτά για τον μετασχηματισμό: 30 φυτά με την κατασκευή το L2_LjSK6_gRNA1+4, 30 φυτά με την το L2_LjSK6_gRNA2+3 και 30 φυτά με την κατασκευή Control (περιέχει όλες τις κασέτες εκτός από εκείνες των gRNAs). Μετά την παραμονή των φυτών για δύο μέρες στο σκοτάδι (22 °C) και τρεις μέρες σε φωτοπερίοδο 16/8h στους 22 °C, μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό ½MS με το αντιβιοτικό Ceft. Στο στάδιο της μεταφοράς των φυτών, παρατηρήθηκε επιμόλυνση των φυτών με την κατασκευή L2_LjSK6_gRNA2+3 και έτσι ο αριθμός τους ανέρχεται στα 20 φυτά και όχι 30. Τα φυτά συνεχίζουν να αναπτύσσονται παρουσία του αντιβιοτικού αλλά όχι τα βακτήρια. Οι πέντε ημέρες επώασης των φυτών με τα μετασχηματισμένα βακτήρια είναι αρκετές για να δημιουργηθεί η ένθεση του T-DNA στα φυτικά κύτταρα και δεν διατρέχει κίνδυνο η βιωσιμότητα των φυτών.

21 ημέρες μετά την διαμόλυνση των φυτών με τα LBA9402 με τα πλασμίδια, τα φυτά αξιολογήθηκαν φαινοτυπικά ως προς την ανάπτυξη hairy roots αλλά και κάτω από το στερεοσκόπιο για την ύπαρξη της κόκκινης φθορίζουσας tRFP. Η ικανότητα παραγωγής της tRFP από τα φυτά σημαίνει ότι το T-DNA έχει περάσει στο γονιδίωμα του φυτού και μπορεί να εκφράζει το γονίδιο tRFP και πολύ πιθανόν και τα γονίδια του συστήματος CRISPR/Cas9. Το ποσοστό επιτυχίας του μετασχηματισμού ήταν μικρότερο από το αναμενόμενο, ενώ πολλά φυτά που δεν φθόριζαν είχαν τον φαινότυπο hairy root.

Από τα φυτά που φθόριζαν, αφαιρέθηκαν οι μη μετασχηματισμένες ρίζες και οι μετασχηματισμένες ρίζες χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή DNA (Εικόνα 14). Για να μεγαλώσουν οι ρίζες και να υπάρχει αρκετός ιστός για την απομόνωση του DNA, τα φθορίζοντα *L. japonicus* φυτεύτηκαν σε αποστειρωμένη άμμο με βερμικουλίτη σε αναλογία 3:1 και ποτίστηκαν με αποστειρωμένο θρεπτικό Hoagland. Μετά από 4 ημέρες έγινε η δειγματοληψία. Στα φυτά που είχε γίνει μετασχηματισμός θα ακολουθούσε και φαινοτυπική

ανάλυση παρουσία του MAFF303099. Ωστόσο, λόγω χρονικών πιέσεων, η ανάλυση αυτή θα γίνει σε μεταγενέστερο χρόνο.

Για την αξιολόγηση της δράσης των sgRNAs απομονώθηκε DNA από κάθε φθορίζουσα ρίζα. Όσες ρίζες είχαν αρκετό ιστό απομονώθηκαν χωριστά. Διαφορετικά από τις ρίζες που ήταν πολύ μικρές το DNA απομονώθηκε από πολλές ρίζες μαζί. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και ρίζες που δεν είχαν πολύ έντονο φθορισμό. Για την ανάλυση, ως ξεχωριστή ρίζα θεωρείται η κάθε ρίζα που ξεκινάει από τον κάλο, που έχουν δημιουργήσει τα LBA9402. Έτσι, δημιουργήθηκαν δείγματα DNA από φυτά που έχουν διαμολυνθεί με το Control ή με το L2_LjSK6_gRNA1+4 ή με το L2_LjSK6_gRNA2+3 (Πίνακας 19). Μετά την απομόνωση του DNA των δειγμάτων ελέγχθηκε και η καθαρότητά τους και η ποσότητα του DNA τους.



Εικόνα 14: Ρίζες μετασχηματισμένου φυτού.

Αριστερά φαίνονται οι ρίζες κάτω από το στερεοσκόπιο με τη χρήση της του laser DsRed fluorescence filter από το Leica StereomicroscopeMZ 10 F. Δεξιά φαίνεται η ρίζα του ίδιου φυτού, ελάχιστα διαφορετικά τοποθετημένου.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA και χαρακτηριστικά των δειγμάτων.

Όνομα δείγματος	Αριθμός ριζών ανά δείγμα	Έντονος φθορισμός	Καθαρότητα A260/A280*	Ποσότητα DNA (ng/μl) *
Control	1	Ναι	1,97	243,8
L2_LjSK6_gRNA1+4 (1)	>1	Ναι	1,96	818,8
L2_LjSK6_gRNA1+4 (2)	>1	Όχι	1,87	64,8
L2_LjSK6_gRNA1+4 (3)	1	Όχι	1,71	116,0
L2_LjSK6_gRNA2+3 (1)	1	Ναι	1,93	726,3
L2_LjSK6_gRNA1+4 (2)	1	Ναι	1,95	1184,3

* προσδιορίστηκαν με το Q3000 UV spectrophotometer (Quawell)

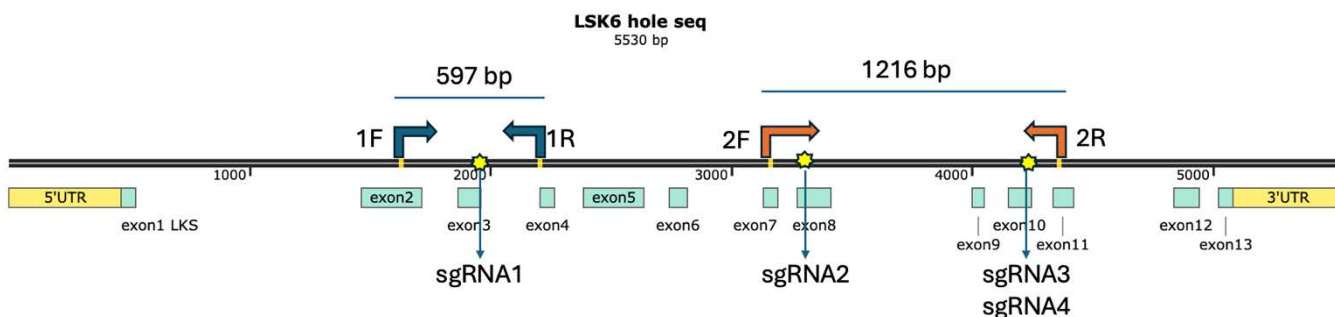
4.2.ε Αποτελέσματα Q5 PCR για το γονίδιο της LjSK6

Μετά την απομόνωση του DNA από τα μετασχηματισμένα φυτά, ακολούθησε PCR για να μπορέσουμε αργότερα να αξιολογήσουμε την δημιουργία μεταλλάξεων από το σύστημα CRISPR/Cas9.

Τα δείγματα DNA που έχουν προέλθει από φυτό που έλαβε το πλασμίδιο L2_LjSK6_gRNA1+4 αλλά και τα δείγματα που έλαβαν το πλασμίδιο Control, ενισχύθηκαν και με τα δύο ζεύγη εκκινητών. Έτσι για το L2_LjSK6_gRNA1+4 θα προσδιοριστεί η ικανότητα δημιουργίας μεταλλάξεων και από το sgRNA 1 (εξόνιο 3) και από το sgRNA4 (εξόνιο 10), ενώ το Control θα χρησιμοποιηθεί ως μέτρο σύγκρισης. Αντίθετα, τα

δείγματα DNA που προήλθαν από φυτά *L. japonicus* που είχαν το L2_LjSK6_gRNA2+3, ενισχύθηκαν μόνο με το ζεύγος εκκινητών 2 καθώς τα sgRNA2 (εξόνιο 8) και sgRNA3 (εξόνιο 10) στοχεύουν σε κοντινές περιοχές (Εικόνα 15).

Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Q5, ένα ένζυμο υψηλής πιστότητας. Αυτό μας διασφαλίζει ότι αν ανιχνευθούν μεταλλάξεις, αυτές θα οφείλονται στη δράση των sgRNAs και όχι σε τυχόν λάθη της πολυμεράσης. Τα αποτελέσματα της ενίσχυσης αξιολογήθηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (Εικόνα 16). Για την PCR με το ζεύγος εκκινητών Q5_LjSK6_1F/R παρατηρήθηκε η αναμενόμενη ζώνη στα 597 bp και μία πολύ αχνή ζώνη από διμερή εκκινητών. Για την PCR με το ζεύγος εκκινητών Q5_LjSK6_2F/R διαπιστώθηκε επιτυχής ενίσχυση, καθώς υπάρχει η ζώνη των 1216 bp και μία ζώνη με διμερή εκκινητών επίσης φαίνονται και κάποιες αχνές ζώνες στα 300 bp, που μπορεί να οφείλονται σε παραπροϊόν. Η αντιδράσεις θεωρούνται επιτυχημένες. Στο δείγμα 2 (1), εμφανίζεται και μία δεύτερη ζώνη περίπου στα 1.000 bp. Η ζώνη αυτή δεν υπάρχει στο 2 (2) και επομένως είναι δύσκολο να οφείλεται σε παραπροϊόν της αντίδρασης. Είναι πιθανό, να έχει γίνει διπλή ρήξη και κατά την επιδιόρθωση του γενετικού υλικού, να έχουν χαθεί ορισμένες νουκλεοτιδικές βάσεις και για αυτό το λόγο το τμήμα που ενισχύεται να είναι μικρότερο.

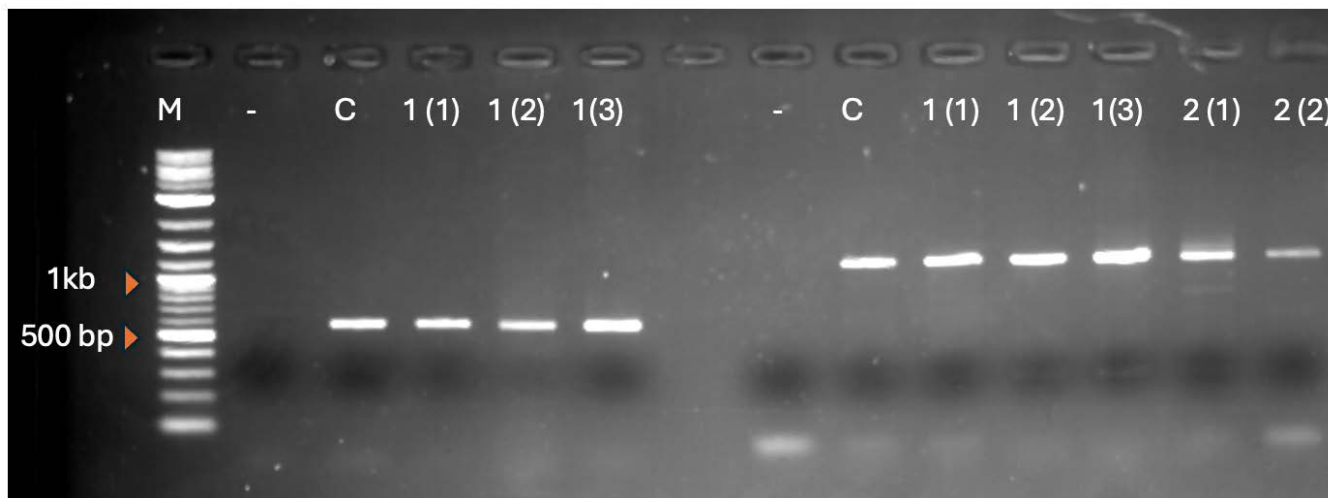


Εικόνα 15: Θέσεις ενίσχυσης PCR, εντός του γονιδίου LjSK6.

Στην εικόνα παρουσιάζονται με αστερίσκο τα σημεία στόχευσης της LjSK6 μέσω του CRISPR/Cas9. Επιπλέον, προσδιορίζονται και τα τμήματα του γονιδίου που θα ενισχυθούν από τους αντίστοιχους εκκινητές. Με κίτρινο χρώμα φαίνονται οι αμετάφραστες περιοχές και με πράσινο τα εξόνια.

4.2.ζ Αποτελέσματα δοκιμασίας T7 ενδονουκλεάσης I

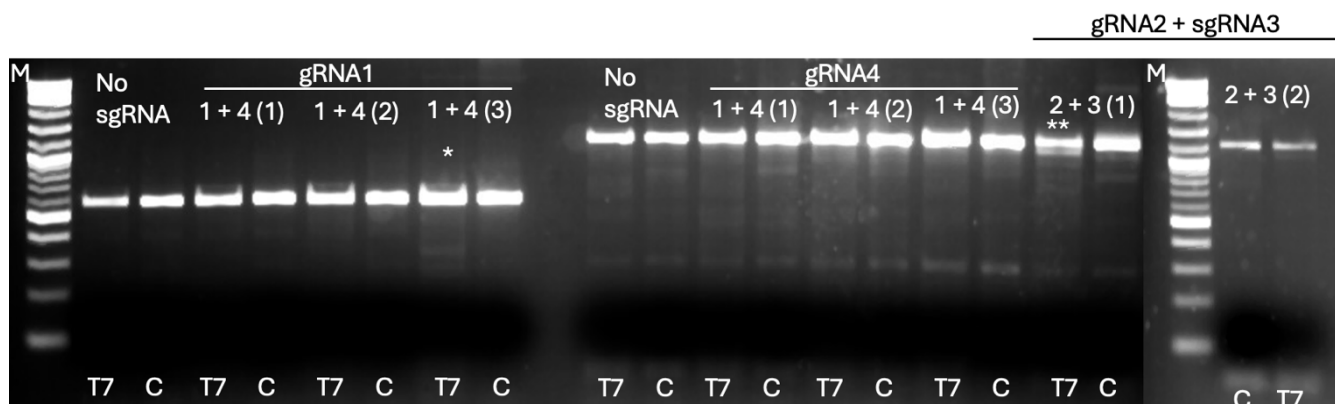
Μετά την επιτυχή ενίσχυση και την παραγωγή προϊόντων PCR ακολούθησε αποδιάταξη των κλώνων και ο υβριδισμός. Η σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας οδηγεί στον υβριδισμό κλώνων που δεν είναι πλήρως συμπληρωματικοί καθώς υπάρχει ένα μείγμα κλώνων με διαφορετικές μεταλλάξεις. Με το πέρας της διαδικασίας αυτής, δημιουργούνται δίκλινα τμήματα DNA με κάποια ζεύγη βάσεων να μην είναι συμπληρωματικά. Αυτά αναγνωρίζονται από την T7EI και κόβονται στο σημείο της μετάλλαξης. Μετά από μία ώρα απενεργοποιήθηκε το ένζυμο για να μην συνεχίζει να πέττει το DNA και για να αξιολογηθεί το αποτέλεσμα της πέψης, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 2%.



Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση τμημάτων της LjSK6 μετά την ενίσχυσή τους με PCR.

M: μάρτυρας μεγέθους (Ladder) 1 kb Plus DNA. – είναι τα αρνητικά δείγματα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR, C. είναι το δείγμα Control, με το 1 συμβολίζονται τα δείγματα που έχει εισαχθεί το πλασμίδιο με τα sgRNA 1 +4 και με 2 τα δείγματα που έχει εισαχθεί το πλασμίδιο με τα sgRNA 2 +3. Δεν υπάρχει επιμόλυνση και όλα τα δείγματα έχουν ενισχυθεί επιτυχώς. Αριστερά είναι η αντίδραση PCR από το ζεύγος εκκινητών Q5_LjSK6_1F/R και δεξιά από το Q5_LjSK6_2F/R.

Τα αποτελέσματα θα αξιολογηθούν με βάση της αναμενόμενες θέσεις μεταλλαξιγένεσης που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε πέψη από την T7EI. Για τα φυτά με το πλασμίδιο χωρίς τα sgRNAs αναμένεται ότι δεν θα δούμε καμία διαφορετική ζώνη μεταξύ των δειγμάτων με και χωρίς την T7EI και στις δύο PCR. Για τα δείγματα με τα sgRNA1 και sgRNA4, στην πρώτη PCR που ελέγχεται το σημείο δράσης του sgRNA1. Αν το sgRNA1 είναι λειτουργικό, αναμένεται να δημιουργηθούν 2 ζώνες μία στα 250 bp και μία στα 340 bp. Το μέγεθος των ζωνών ενδέχεται να διαφέρει καθώς μπορεί να έχει γίνει και αφαίρεση ή προσθήκη βάσεων. Επιπλέον, αν δούλεψαν και τα δύο sgRNAs, θα μπορούσε να έχει χαθεί το ενδιαμέσο τμήμα DNA. Ωστόσο αυτό θα είχε γίνει αντιληπτό από την ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης PCR. Στη δεύτερη αντίδραση PCR, αναμένεται να ανιχνευτούν μεταλλάξεις που οφείλονται σε τρία sgRNAs. Για το sgRNA4 αν έχει δράσει περιμένουμε ζώνες μεγέθους 140 bp και 1070 bp. Για το sgRNA2 οι αναμενόμενες ζώνες είναι 160 bp και 1060 bp και για το sgRNA3 οι αναμενόμενες ζώνες είναι 130 bp και 1080bp περίπου. Αν είχαν δράσει και τα δύο sgRNAs και είχε γίνει η αφαίρεση του τμήματος DNA μεταξύ τους, τότε θα βλέπαμε προϊόν στην ηλεκτροφόρηση της PCR, πριν την T7 (Εικόνα 16) στα 270 bp μόνο στα δείγματα 2(1) και 2(2).



*M: μάρτυρας μεγέθους (Ladder) 1 kb Plus DNA. Με το 1 +4 συμβολίζονται τα δείγματα που έχει εισαχθεί το πλασμίδιο με τα sgRNA 1 και sgRNA 4 και με 2 +3 τα δείγματα που έχει εισαχθεί το πλασμίδιο με τα sgRNA 2 + sgRNA 3. Για κάθε δείγμα πρώτα φαίνεται αυτό με την T7EI και μετά το άκοπο (C), εκτός από το δείγμα 2+3 (2). Με * επισημαίνεται το δείγμα που έχει ζώνες από την δράση της T7EI για την πρώτη αντίδραση PCR και με ** σημειώνεται το δείγμα που έχει ζώνες από την δράση της T7EI για την δεύτερη αντίδραση PCR. Πάνω από τα δείγματα αναφέρεται ποιο gRNA μελετάται από κάθε αντίδραση.*

Η μέθοδος της T7EI είναι μία πρώτη ένδειξη για την επιτυχία της μεταλλαξιγένεσης μέσω CRISPR/Cas9 και έδωσε την επιβεβαίωση ότι όντως το σύστημα που σχεδιάστηκε λειτουργεί. Ωστόσο, για να διαπιστώσουμε με ακρίβεια ποια sgRNA είναι τα λειτουργικά και τί ποσοστό σίγασης δημιουργούν στο γονίδιο, πρέπει να γίνει αλληλούχηση κατά Sanger. Τα δείγματα έχουν προετοιμαστεί και σταλεί για αλληλούχηση και τα αποτελέσματά της αναμένονται.

5. Συμπεράσματα – Μελλοντικές ενέργειες

Το άζωτο αποτελεί βασικό στοιχείο για την ανάπτυξη των ζωντανών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ψυχανθών φυτών, όπως το *L. japonicus*. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το άζωτο στο έδαφος (όπως τα νιτρικά ή η αμμωνία) μπορεί να είναι ανεπαρκές ή να βρίσκεται σε μορφή που δεν απορροφάται από το φυτό. Για τον λόγο αυτό, το φυτό αναπτύσσει διάφορους μηχανισμούς ώστε να το αφομοιώσει σε μεγαλύτερες ποσότητες. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την παρουσία ενζύμων, όπως μεμβρανικές πρωτεΐνες (κανάλια και διάυλοι), σηματοδοτικές πρωτεΐνες και τη συνεργασία με ριζόβια. Τα ψυχανθή έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ειδικές δομές στο ριζικό τους σύστημα απαραίτητες για τη καθήλωση του αζώτου, τα φυμάτια. Μέσω των φυματίων, επιτρέπεται η συμβίωση με τα αζωτοδεσμευτικά ριζόβια κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες. Τα ριζόβια αυτά, δεσμεύουν το άζωτο από την ατμόσφαιρα και το μετατρέπουν σε μορφές που το φυτό μπορεί να χρησιμοποιήσει, με αντάλλαγμα να λαμβάνουν υδατάνθρακες από το ψυχανθή, τους οποίους αξιοποιούν ως πηγή ενέργειας. Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει πραγματοποιηθεί στο πλαίσιο της μελέτης της φυματογένεσης και εξετάζει τη συμμετοχή της κινάσης LjSK6 στη διαδικασία αυτή.

Κατά τα στάδια της φυματογένεσης, η έκφραση της *LjSK6* εμφανίζει μία τάση να είναι αυξημένη στα φυτά που έχουν μεγαλώσει παρουσία του *M. japonicum* MAFF303099, σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία του MAFF303099. Ωστόσο, δεν βρέθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στην έκφραση της *LjSK6* στα δείγματα που είχαν αναπτυχθεί χωρίς ριζόβιο αλλά προέρχονται από διαφορετικές ημέρες δειγματοληψίας (dpi). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στα φυτά Control ότι η έκφραση της *LjSK6* την 3 dpi συγκριτικά με τις 14 dpi και 21 dpi, διαφέρουν με στάθμη σημαντικότητας ($p < 0,001$). Η ίδια μελέτη έγινε και για τα φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία MAFF303099 και βρέθηκαν τα παρακάτω. Η έκφραση της *LjSK6* την 1 dpi συγκριτικά με τις 14 dpi και 21 dpi διαφέρουν με στάθμη στατιστικής σημαντικότητας ($p < 0,05$). Ωστόσο, και η έκφραση της *LjSK6* από την 3 dpi συγκριτικά με τις 14 dpi και 21 dpi διαφέρουν με στάθμη στατιστικής σημαντικότητας ($p < 0,05$). Γενικότερα, παρατηρείται ότι τόσο στα φυτά *L. japonicus* απουσία όσο και παρουσία του ριζοβίου, ότι η έκφραση της *LjSK6* σε νεαρότερα φυτά είναι υψηλότερη σε σχέση με την έκφρασή της σε γηραιότερα φυτά. Η μείωση της έκφρασης της *LjSK6* όσο μεγαλώνει το φυτό, ενδέχεται να σχετίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό με τα αναπτυξιακά στάδια της ρίζας.

Σε μία προηγούμενη δημοσίευση, οι ερευνητές είχαν παρατηρήσει στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση της *LjSK6*, μία ώρα μετά τον εμβολιασμό των φυτών με το ριζόβιο *M. loti* R7A σε σχέση με τα φυτά χωρίς το ριζόβιο (Garagounis et al., 2019). Οι ερευνητές είχαν υποθέσει ότι η *LjSK6* ενδέχεται να έχει ρόλο στα πολύ αρχικά στάδια της φυματογένεσης. Εμείς ξεκινήσαμε τη διερεύνηση από την 1 dpi. Ίσως, οι 23 ώρες διαφοράς μεταξύ των δειγματοληψιών των δύο ερευνών, να ήταν επαρκής χρόνος για να επανέλθει η έκφραση της *LjSK6*. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί και ότι τα βακτήρια που χρησιμοποίησαν οι ερευνητές (Garagounis et al., 2019) είναι διαφορετικά από το *M. japonicum* MAFF303099 που χρησιμοποίησαμε. Το ριζόβιο MAFF303099 με το R7A, εμφανίζουν διαφορές ως προς την ικανότητα σύναψης συμβιωτικών σχέσεων με το *L. japonicus*. Το MAFF303099 δημιουργεί περισσότερα φυμάτια στις ρίζες του φυτού, σε σύγκριση με το R7A που δημιουργεί λιγότερα φυμάτια. Ο

παράγοντας αυτός θα μπορούσε ενδεχομένως να δημιουργήσει διαφορά στη βιολογική απόκριση του φυτού, αν και τα δύο βακτηριακά στελέχη είναι πολύ συγγενικά.

Για να μπορέσουμε όμως να εξάγουμε ένα ασφαλές συμπέρασμα για την έκφραση της *LjSK6* στη φυματογένεση, πρέπει να εξετάσουμε και τα δείγματα των φυματίων, καθώς η έκφραση της *LjSK6* μπορεί να αλλάζει μέσα στο φυμάτιο και όχι σε όλο το ριζικό σύστημα του φυτού. Επιπλέον, αναμένεται και η επανάληψη της qPCR, για την έκφραση της *LjSK6* την 7^η dpi όπου τα αποτελέσματα δεν μπορούσαν να αναλυθούν. Για να ολοκληρωθεί η μελέτη της έκφρασης της *LjSK6*, πρέπει να μελετηθεί και το υπέργειο τμήμα του φυτού. Μετά από όλα αυτά, θα έχουμε μία πιο πλήρη εικόνα της δράσης της *LjSK6* στα στάδια της φυματογένεσης χωροχρονικά. Ενδιαφέρον θα είχε, να ελέγξουμε και την έκφραση της *LjSK6* πριν τον εμβολιασμό, για να έχουμε ένα μέτρο σύγκρισης για τη φυσιολογική ανάπτυξη της ρίζας απουσία οποιαδήποτε παρέμβασης.

Για τον χαρακτηρισμό του ρόλου ενός γονιδίου, δεν αρκεί η ανάλυση της έκφρασής του. Μπορεί η πληροφορία αυτή να αποτελεί μία συσχέτιση αλλά δεν είναι απόδειξη της συμμετοχής του. Για το σκοπό αυτό απαραίτητη είναι η σίγαση του γονιδίου και η πραγματοποίηση φαινοτυπικής ανάλυσης τόσο στο φυτό όσο και μοριακά. Προκειμένου να γίνει η σίγαση, πρέπει να επιλεγεί ο μηχανισμός γενετικής τροποποίησης. Έτσι, προχωρήσαμε στην παραγωγή μεταλλαγμάτων μέσω παροδικού μετασχηματισμού και της τεχνολογίας CRISPR/Cas9. Η αξιοποίηση του συστήματος αυτού, προσφέρει έναν γρήγορο και στοχευμένο τρόπο μεταλλαξιγένεσης.

Το πρώτο βήμα ήταν να κατασκευαστούν τα πλασμίδια μέσω των οποίων θα μεταφερθεί ο μηχανισμός του CRISPR στο φυτό. Έτσι σχεδιάστηκαν 4 sgRNAs σε περιοχές εξόνων, που πληρούσαν τις προδιαγραφές μοναδικότητας, έφεραν την PAM αλληλουχία και λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς για τον σχεδιασμό των sgRNAs (μήκος, GC%, κλπ.). Στη συνέχεια, έπρεπε να αξιολογηθεί η δράση των sgRNAs που σχεδιάσαμε και η αποτελεσματικότητά τους στη γενετική τροποποίηση. Για να γίνει αυτό πρέπει το πλασμίδιο επιπέδου 2 που σχεδιάσαμε (φέρει πολλές γονιδιακές κατασκευές) να μεταφερθεί από τα *E. coli* στο *R. rhizogenes* 9402 και μετά να γίνει διαμόλυνση των *L. japonicus* με τα μετασχηματισμένα αγροβακτήρια.

Μετά από 21 ημέρες από την διαμόλυνση των φυτών με το βακτήριο παρατηρήθηκε ο αναμενόμενος φαινότυπος από τον μετασχηματισμό με *R. rhizogenes* 9402, δηλαδή η παρουσία πολλών ριζών από τον αρχικό καλό που δημιούργησαν στην αρχή της ρίζας τα βακτήρια (hairy roots). Ωστόσο τα φυτά που έλαβαν και εκφράζουν τα γονίδια του T-DNA είναι λιγότερα από τα φυτά με τον φαινότυπο hairy roots. Η μειωμένη ικανότητα στη μεταφορά του T-DNA μπορεί να σχετίζεται με το stress φαίνεται να έχουν δεχθεί τα *R. rhizogenes* 9402 κατά την ανάπτυξή τους μετά την ηλεκτροδιάτρηση. Οι συνθήκες ανάπτυξης επηρεάζουν συχνά την αποτελεσματικότητα. Καθώς τα βακτήρια είχαν υποστεί stress, ενδεχομένως να χρειάζονταν μεγαλύτερη χρονικά έκθεση των φυτών στα μετασχηματισμένα βακτήρια, για να μπορέσει να μεταφερθεί το T-DNA στο φυτικό γονιδίωμα.

Στα μετασχηματισμένα *L. japonicus*, διερευνήθηκε η επιτυχία της στόχευσης της *LjSK6* μέσω της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 και προκύψαν οι παρακάτω παρατηρήσεις. Από τα 4 sgRNAs που σχεδιάσαμε, επιβεβαιώθηκε η ικανότητα δημιουργίας μεταλλάξεων για το sgRNA1 και για το συνδυασμό sgRNA2 με sgRNA3, χωρίς να γνωρίζουμε αν ένα από τα δύο ή αν και τα δύο είναι λειτουργικά. Για το

sgRNA4 δεν μπορεί μέχρι στιγμής να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα. Η διερεύνηση της ικανότητας γενετικής τροποποίησης, έγινε με την δοκιμασία της T7EI. Το ένζυμο αυτό, μπορεί να αναγνωρίζει μεταλλάξεις και να δημιουργεί ρήξεις στο DNA. Τελικά, οι ρήξεις αυτές αξιολογούνται από το μοτίβο ζώνωσης σε πηκτή αгарόζης. Ωστόσο, η δοκιμασία αυτή συνήθως υποεκτιμά την ύπαρξη μεταλλάξεων και ιδιαίτερα των σημειακών μεταλλάξεων (Sentmanat et al., 2018b). Επομένως, για να είμαστε βέβαιοι για την δράση των sgRNAs που σχεδιάσαμε πρέπει τα δείγματα να αλληλουχηθούν κατά Sanger και να επαναξιολογηθούν. Επιπλέον, το ότι δεν είδαμε την αναμενόμενη λειτουργία των sgRNAs σε όλα τα δείγματα των μετασχηματισμένων ριζών, μπορεί να οφείλεται στην ημέρα της δειγματοληψίας. Η διαμόλυνση των φυτών με τα βακτήρια *R. rhizogenes* για τη δημιουργία παροδικού μετασχηματισμού στα φυτά, είχε γίνει μόνο 25 ημέρες πριν την απομόνωση του γενετικού υλικού. Ενδεχομένως, αν η δειγματοληψία είχε γίνει πιο μετά, τυχόν μεταλλάξεις που είχαν γίνει αλλά ήταν σε λίγα αντίγραφα του γονιδιώματος να μπορούσαν να ανιχνευθούν. Αυτό θα ήταν πιθανό, γιατί αυξάνοντας τον αριθμό των κυττάρων της ρίζας θα μπορούσε να πολλαπλασιαστούν και τα κύτταρα που έχουν μεταλλάξεις. Προς το παρόν, τα sgRNA φαίνεται να μπορεί να δημιουργεί μετάλλαξη στην αλληλουχία της *LjSK6* στο εξόνιο 3 από το sgRNA1 και στο εξόνιο 8 ή στο εξόνιο 10 από το sgRNA2 ή το sgRNA3 αντίστοιχα.

Για να μπορεί να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα για τη συμμετοχή της *LjSK6* στη φυματογένεση, θα πρέπει να ολοκληρωθεί και η φαινοτυπική ανάλυση του αριθμού και του μεγέθους των φυματίων. Επιπλέον, θα ήταν δόκιμο να μετρηθεί ο αριθμός των ώριμων και των ανώριμων φυματίων και να γίνει σύγκριση των φυτών που δεν εκφράζουν την *LjSK6* με τα φυτά που εκφράζουν την *LjSK6* αλλά φέρουν και όλο τον μηχανισμό του CRISPR/Cas9, εκτός από τα sgRNA γονίδια. Και οι δύο ομάδες θα εξεταστούν μετά τον εμβολιασμό τους με το ριζόβιο MAFF303099. Η ημέρα της δειγματοληψίας μετά τον εμβολιασμό θα διευκρινιστεί όταν ολοκληρωθεί και η διερεύνηση της έκφρασης της *LjSK6* ανά τα στάδια της φυματογένεσης. Αν η σίγαση του γονιδίου οδηγήσει στη δημιουργία μακροσκοπικού φαινοτύπου στη φυματογένεση, τότε αυτό θα είναι ικανό να συσχετίσει την *LjSK6* με τη φυματογένεση. Ωστόσο, απόδειξη θα μπορούσε να αποτελέσει και η απορρύθμιση κύριων γονιδίων – τελεστών της φυματογένεσης όπως *NIN*, *NSP1*, *NSP2*, *CLE-RS1*, *CLE-RS2* και άλλων. Δηλαδή να επηρεάζεται μοριακά ο φαινότυπος του φυτού.

Συμπερασματικά, έχει δημιουργηθεί νέα γνώση γύρω από το γονίδιο της *LjSK6*, την έκφρασή του ανά τα στάδια της φυματογένεσης. Παράλληλα, κατασκευάστηκαν και εργαλεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη παραγωγή μεταλλαγμάτων *LjSK6*, με στόχο την περαιτέρω διερεύνηση της λειτουργίας της *LjSK6*, που θα ολοκληρωθεί σε επόμενο στάδιο της μελέτης.

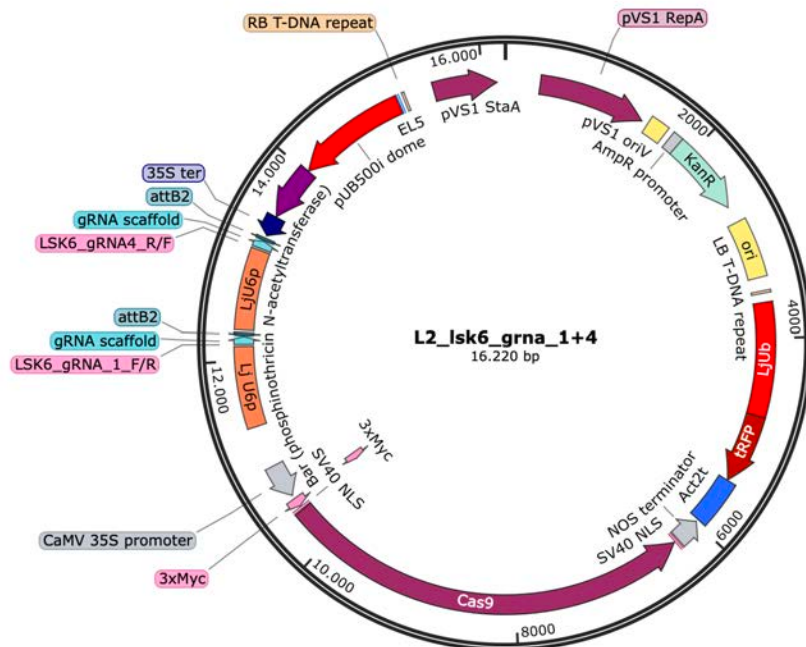
6. Βιβλιογραφία

- Babu, K., Kathiresan, V., Kumari, P., Newsom, S., Parameshwaran, H. P., Chen, X., Liu, J., Qin, P. Z., & Rajan, R. (2021). Coordinated Actions of Cas9 HNH and RuvC Nuclease Domains Are Regulated by the Bridge Helix and the Target DNA Sequence. *Biochemistry*, 60(49), 3783–3800. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00354>
- Bird, J. E., Marles-Wright, J., & Giachino, A. (2022). A User's Guide to Golden Gate Cloning Methods and Standards. *ACS Synthetic Biology*, 11(11), 3551–3563. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00355>
- Cherkasov, N., Ibhaddon, A. O., & Fitzpatrick, P. (2015). A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 90, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.02.004>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Garagounis, C., Tsikou, D., Plitsi, P. K., Psarrakou, I. S., Avramidou, M., Stedel, C., Anagnostou, M., Georgopoulou, M. E., & Papadopoulou, K. K. (2019). Lotus SHAGGY-like kinase 1 is required to suppress nodulation in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, 98(2), 228–242. <https://doi.org/10.1111/tpj.14207>
- Handberg, K., & Stougaard, J. (1992). *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2(4), 487–496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1992.00487.x>
- Hooykaas, M. J. G., & Hooykaas, P. J. J. (2021). The genome sequence of hairy root *Rhizobium rhizogenes* strain LBA9402: Bioinformatics analysis suggests the presence of a new opine system in the agropine Ri plasmid. *MicrobiologyOpen*, 10(2), e1180. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1180>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jansen, Ruud., Embden, Jan. D. A. V., Gastra, Wim., & Schouls, Leo. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Kameshita, I. (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/mvi007>
- Kelly, S., Mun, T., Stougaard, J., Ben, C., & Andersen, S. U. (2018). Distinct *Lotus japonicus* Transcriptomic Responses to a Spectrum of Bacteria Ranging From Symbiotic to Pathogenic. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1218. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01218>
- Khan, S. H. (2019). Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 16, 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.027>
- Kiryushkin, A. S., Ilina, E. L., Guseva, E. D., Pawlowski, K., & Demchenko, K. N. (2021). Hairy CRISPR: Genome Editing in Plants Using Hairy Root Transformation. *Plants*, 11(1), 51. <https://doi.org/10.3390/plants11010051>
- Li, Y., Pei, Y., Shen, Y., Zhang, R., Kang, M., Ma, Y., Li, D., & Chen, Y. (2022). Progress in the Self-Regulation System in Legume Nodule Development-AON (Autoregulation of Nodulation). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6676. <https://doi.org/10.3390/ijms23126676>

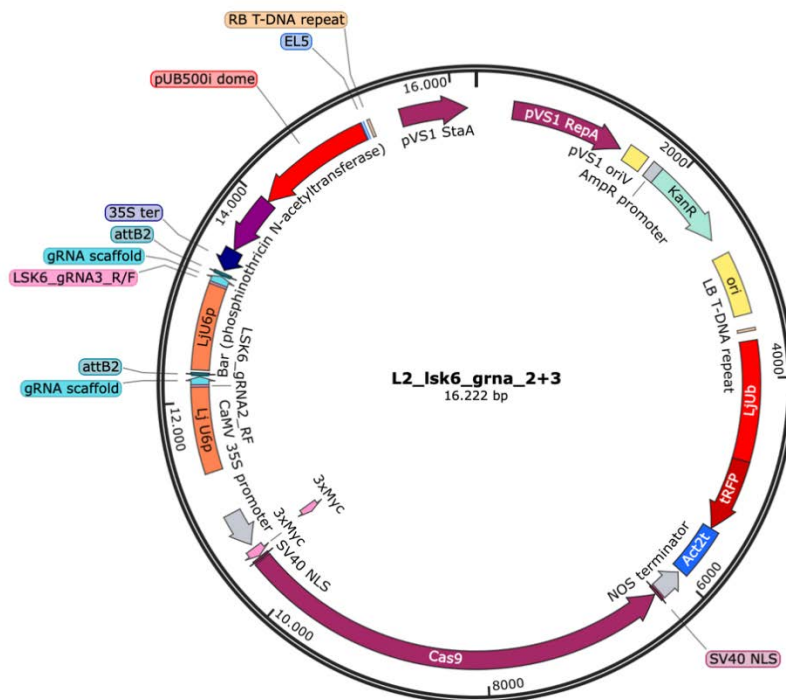
- Liang, G., Zhang, H., Lou, D., & Yu, D. (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Scientific Reports*, 6(1), 21451. <https://doi.org/10.1038/srep21451>
- Liu, H., Zhang, C., Yang, J., Yu, N., & Wang, E. (2018). Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(8), 632–648. <https://doi.org/10.1111/jipb.12653>
- Liu, Z., Dong, H., Cui, Y., Cong, L., & Zhang, D. (2020). Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 172. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01431-z>
- Malekshoar, M., Azimi, S. A., Kaki, A., Mousazadeh, L., Motaei, J., & Vatankhah, M. (2023). CRISPR-Cas9 Targeted Enrichment and Next-Generation Sequencing for Mutation Detection. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 25(5), 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2023.01.010>
- Marillonnet, S., & Grütznert, R. (2020). Synthetic DNA Assembly Using Golden Gate Cloning and the Hierarchical Modular Cloning Pipeline. *Current Protocols in Molecular Biology*, 130(1), e115. <https://doi.org/10.1002/cpmb.115>
- Martínez-Hidalgo, P., Ramírez-Bahena, M. H., Flores-Félix, J. D., Igual, J. M., Sanjuán, J., León-Barrios, M., Peix, A., & Velázquez, E. (2016). Reclassification of strains MAFF 303099T and R7A into *Mesorhizobium japonicum* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 4936–4941. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001448>
- Miyaoka, Y., Berman, J. R., Cooper, S. B., Mayerl, S. J., Chan, A. H., Zhang, B., Karlin-Neumann, G. A., & Conklin, B. R. (2016). Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing. *Scientific Reports*, 6(1), 23549. <https://doi.org/10.1038/srep23549>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 36(1), 244–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
- Mushtaq, S., Shafiq, M., Tariq, M. R., Sami, A., Nawaz-ul-Rehman, M. S., Bhatti, M. H. T., Haider, M. S., Sadiq, S., Abbas, M. T., Hussain, M., & Shahid, M. A. (2023). Interaction between bacterial endophytes and host plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1092105. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1092105>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e–445. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- Sentmanat, M. F., Peters, S. T., Florian, C. P., Connelly, J. P., & Pruett-Miller, S. M. (2018a). A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing. *Scientific Reports*, 8(1), 888. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19441-8>
- Sentmanat, M. F., Peters, S. T., Florian, C. P., Connelly, J. P., & Pruett-Miller, S. M. (2018b). A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing. *Scientific Reports*, 8(1), 888. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19441-8>
- Solovou, T. G. A., Garagounis, C., Kyriakis, E., Bobas, C., Papadopoulos, G. E., Skamnaki, V. T., Papadopoulou, K. K., & Leonidas, D. D. (2021). Mutagenesis of a *Lotus japonicus* GSK3 β /Shaggy-like kinase reveals functionally conserved regulatory residues. *Phytochemistry*, 186, 112707. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112707>

- Solovou, T. G. A., Stravodimos, G., Papadopoulos, G. E., Skamnaki, V. T., Papadopoulou, K., & Leonidas, D. D. (2024). Biochemical and Structural Studies of LjSK1, a *Lotus japonicus* GSK3 β /SHAGGY-like Kinase, Reveal Its Functional Role. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(7), 3763–3772. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c07101>
- Tabata, S., & Stougaard, J. (Eds.). (2014). *The Lotus japonicus Genome*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-44270-8>
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2018). *Plant physiology and development* ([International] 6th ed). Sinauer associates.
- Tsikou, D., Yan, Z., Holt, D. B., Abel, N. B., Reid, D. E., Madsen, L. H., Bhasin, H., Sexauer, M., Stougaard, J., & Markmann, K. (2018). Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science*, 362(6411), 233–236. <https://doi.org/10.1126/science.aat6907>
- Wang, L., Rubio, M. C., Xin, X., Zhang, B., Fan, Q., Wang, Q., Ning, G., Becana, M., & Duanmu, D. (2019). CRISPR/Cas9 knockout of leghemoglobin genes in *Lotus japonicus* uncovers their synergistic roles in symbiotic nitrogen fixation. *New Phytologist*, 224(2), 818–832. <https://doi.org/10.1111/nph.16077>
- Wang, L., Wang, L., Zhou, Y., & Duanmu, D. (2017a). Use of CRISPR/Cas9 for Symbiotic Nitrogen Fixation Research in Legumes. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 149, pp. 187–213). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.03.010>
- Wang, L., Wang, L., Zhou, Y., & Duanmu, D. (2017b). Use of CRISPR/Cas9 for Symbiotic Nitrogen Fixation Research in Legumes. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 149, pp. 187–213). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.03.010>
- Xu, Y., & Li, Z. (2020). CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 2401–2415. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.031>
- Yanni, A. E., Iakovidis, S., Vasilikopoulou, E., & Karathanos, V. T. (2023). Legumes: A Vehicle for Transition to Sustainability. *Nutrients*, 16(1), 98. <https://doi.org/10.3390/nu16010098>
- Zhang, D., Zhang, Z., Unver, T., & Zhang, B. (2021). CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement. *Journal of Advanced Research*, 29, 207–221. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.10.003>
- Zhang, X., Wu, J., & Kong, Z. (2024). Cellular basis of legume–rhizobium symbiosis. *Plant Communications*, 5(11), 101045. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2024.101045>
- Zhu, F., Deng, J., Chen, H., Liu, P., Zheng, L., Ye, Q., Li, R., Brault, M., Wen, J., Frugier, F., Dong, J., & Wang, T. (2020). A CEP Peptide Receptor-Like Kinase Regulates Auxin Biosynthesis and Ethylene Signaling to Coordinate Root Growth and Symbiotic Nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 32(9), 2855–2877. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00248>
- Zolkiewicz, K., & Gruszka, D. (2022). Glycogen synthase kinases in model and crop plants – From negative regulators of brassinosteroid signaling to multifaceted hubs of various signaling pathways and modulators of plant reproduction and yield. *Frontiers in Plant Science*, 13, 939487. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.939487>

7. Παράρτημα



Εικόνα Π. 1.: Πλασμίδιο επιπέδου 2 που φέρει όλες τις απαραίτητες κασέτες γονιδιακής έκφρασης και τα sgRNA 1 και sgRNA 4.



Εικόνα Π. 1.: Πλασμίδιο επιπέδου 2 που φέρει όλες τις απαραίτητες κασέτες γονιδιακής έκφρασης και τα sgRNA 2 και sgRNA3.