

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΑΝΑΦΟΡΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

**«Σίγηση γονιδίου συνθάσης της β-αμυρίνης στις ρίζες
του ψυχανθούς *Lotus japonicus*»**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ:
ΓΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:
ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:
ΔΕΛΗΣ Κ., ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ Κ., ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ Κ.**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Η μεγάλη οικονομική και φαρμακολογική σημασία των τριτερπενίων, καθώς και η σημαντική θέση που κατέχει η βιοσύνθεσή τους στο μεταβολικό δίκτυο των φυτών έχουν περιγραφεί σε αρκετά ερευνητικά έργα. Ως εκ τούτου έχουν γίνει πολλές μελέτες που επιχειρούν να διευκρινίσουν αυτές τις μεταβολικές οδούς και τα γονίδια που εμπλέκονται σ' αυτές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα γονίδια των OSCs που κωδικοποιούν συνθάσες τριτερπενίων. Μεταξύ αυτών το προϊόν του AMY2 (GenBank accession number: AF478455.1) έχει προτεινόμενη λειτουργία συνθάσης τριτερπενοειδών μικτής δράσης (συνθάση β-αμυρίνης και λουπεόλης) στο μοντέλο ψυχανθές *Lotus japonicus*. Αποβλέποντας στη διευκρίνιση του ρόλου του AMY2, κάναμε στοχευμένη σίγηση του γονιδίου αυτού μέσω μηχανισμού(ών) RNAi. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν τέσσερις κατασκευές RNA-φουρκέτας σε πλασμιαδικούς φορείς, χρησιμοποιώντας τμήματα του ORF του AMY2. Οι κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν για μόλυνση φυτών *Lotus japonicus* με τη μέθοδο Hairy Root, ώστε να προκύψουν «σύνθετα φυτά» των οποίων οι ρίζες ήταν μετασχηματισμένες με κάποια από τις κατασκευές. Μολυσμένα φυτά ελέγχθηκαν για την παρουσία της κατασκευής και για τα επίπεδα έκφρασης του AMY2 στο ριζικό σύστημα. Ακολουθώντας αυτή τη διαδικασία ανιχνεύθηκαν φυτά με μειωμένη έκφραση του γονιδίου τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για ανάλυση των περιεχόμενων μεταβολιτών, καθώς και για έλεγχο της έκφρασης γονιδίων που δρουν στο ίδιο μεταβολικό μονοπάτι με το AMY2.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

«Σίγηση γονιδίου συνθάσης της β-αμυρίνης στις ρίζες του ψυχανθούς <i>Lotus japonicus</i> »	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ:	2
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ:	5
ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ, β-ΑΜΥΡΙΝΗ και AMY2	5
ΤΟ ΨΥΧΑΝΘΕΣ <i>Lotus japonicus</i>	9
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ GATEWAY	10
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ HAIRY ROOT.....	12
ΕΚΜΕΤΑΛΛΕΥΣΗ ΤΟΥ RNAi ΣΕ ΦΥΤΑ.....	14
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:	16
Επιλογή των εκκινητών PCR, Real Time PCR	16
PCR για ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου AMY2:.....	16
Κλωνοποίηση των γονιδιακών τμημάτων για δημιουργία κατασκευών RNA φουρκέτας σε πλασμιδιακούς φορείς:.....	17
Μετασχηματισμός <i>Agrobacterium rhizogenes</i> και επιλογή επιθυμητά μετασχηματισμένων κλώνων:	18
Μετασχηματισμός-Hairy Root σε αρτίβλαστα <i>Lotus japonicus</i> μέσω του <i>A. rhizogenes</i> :	19
Ανάπτυξη φυτών μετά την αναγέννηση του ριζικού συστήματος και δειγματοληψία:	20
Έλεγχος φθορισμού GFP σε δείγματα ριζών <i>L. japonicus</i> :.....	20
PCR για ανίχνευση μετασχηματισμένων ριζών.....	20
Απομόνωση και καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων από δείγματα ριζικού ιστού: ..	21
Σύνθεση cDNA και Real Time PCR:	21
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:	23
Κατασκευές σίγησης στους πλασμιδιακούς φορείς:.....	23
Έλεγχος μετασχηματισμού σε μολυσμένα φυτά:	24
Έλεγχος μετασχηματισμού με PCR:.....	26
Έλεγχος έκφρασης του AMY2 σε μετασχηματισμένες ρίζες:.....	28
Επίδραση της σίγησης του AMY2 στο σχηματισμό φυματίων:	31
ΣΥΖΗΤΗΣΗ:	32
Συμπεράσματα:	32
Μελλοντικά πειράματα:	33
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:	34
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	36
ΠΑΡΑΤΗΜΑ1: ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ.....	36
I) Ενίσχυση Ακολουθιών mRNA με τη χρήση της τεχνικής PCR πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR).....	36
II) Παρασκευή δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> ικανών για μετασχηματισμό με πλασμιδιακό DNA (competent cells).....	37
III) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> για εισαγωγή πλασμιδιακού DNA (Heat shock method)	38
IV) Απομόνωση πλασμιδίου από υγρή καλλιέργεια <i>E.coli</i> με την μέθοδο του βρασμού (Boiling prep)	39
V) Παρασκευή δεκτικών κυττάρων <i>A.rhizogenes</i> ικανών για μετασχηματισμό με πλασμιδιακό DNA (competent cells).....	40

VI) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>A. rhizogenes</i> για εισαγωγή πλασμιδιακού DNA (Freeze-Thaw method).....	41
VII) Διατήρηση βακτηριακών κλώνων που φέρουν τα επιθυμητά πλασμίδια	41
VIII) Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με το πρωτόκολλο της φαινόλης-χλωροφορμίου.....	44
IX) Πέψη τμημάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	45
X) Ανάλυση τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	46
XI) Επανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	47
XII) Ενίσχυση ακολουθιών DNA με την χρήση της PCR.....	47
XIII) Αντίδραση σύνδεσης DNA- Ligation.....	48
XIV) Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικά κύτταρα (CTAB method).....	49
XV) Θρεπτικά μέσα για ανάπτυξη φυτών	50
XVI) Επαγωγή φυματίων σε ρίζες <i>Lotus japonicus</i>	51
XVII) Αντίδραση ανασυνδυασμού LR Clonase	52
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2: ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ.....	53
pBluescript SK+:.....	53
pGemT-easy™:.....	53
pHannibal:.....	54
pCambia 1300:.....	54
pENTR4™:.....	55
pUBI-GWS-GFP:.....	55
Ανασυνδυασμένοι φορείς pCAMBIA-AMY2.3 και pUBI-AMY2.3	56
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3: ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ-ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:	60

ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ, β -ΑΜΥΡΙΝΗ και AMY2

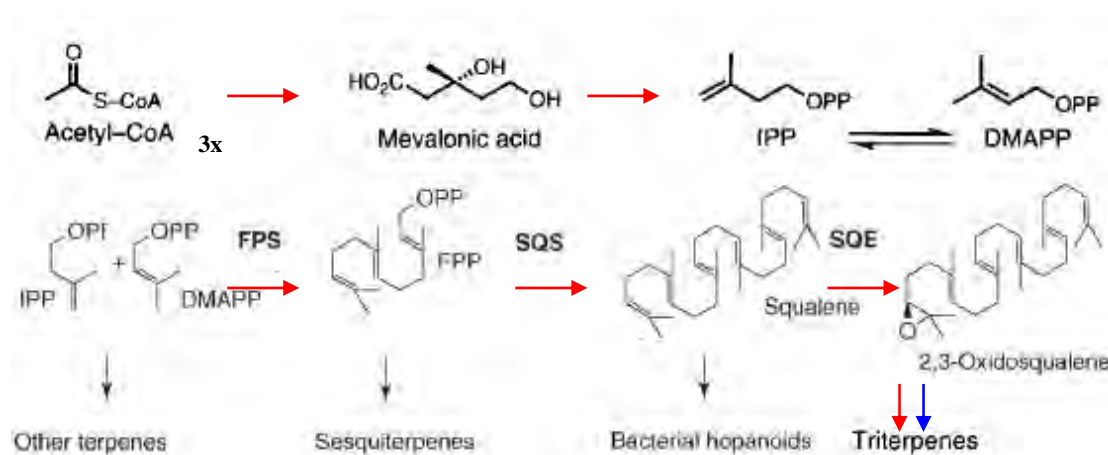
Τα τερπενοειδή αποτελούν ίσως τη μεγαλύτερη κατηγορία μεταβολιτών στους φυτικούς οργανισμούς και την μεγαλύτερη οικογένεια φυσικών προϊόντων από την οποία έχουν ήδη περιγραφεί περισσότερες από 22,000 δομές [1]. Κάποια από αυτά θεωρούνται προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού όπως οι στερόλες, οι φυτοορμόνες: γιβεριλλίνες και ABA, καθώς και οι πλευρικές αλυσίδες των κυτοκινών και της χλωροφύλλης. Άλλα τερπενοειδή θεωρείται ότι ανήκουν στον δευτερογενή μεταβολισμό, είτε διότι δεν συμμετέχουν στις διαδικασίες αύξησης, ανάπτυξης ή παραγωγής ενέργειας, είτε διότι ο ρόλος τους δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Σ' αυτή την κατηγορία ανήκει η πληθώρα των φυτικών ελαίων που προσδίδουν στα φυτά τις χαρακτηριστικές οσμές και γεύσεις, καθώς και οι σαπωνίνες. Οι λειτουργίες της δεύτερης κατηγορίας τερπενοειδών είναι ποικίλες και διαφέρουν ανάμεσα στα φυτικά είδη αλλά και στον τύπο του τερπενοειδούς. Μερικές από αυτές είναι η σηματοδότηση για προσέλκυση επικονιαστών ή για διασκόρπιση σπερμάτων αλλά κυρίως η φυτό-προστατευτική τους δράση ως φυσικά εντομοκτόνα, μικροβιοκτόνα ή ακόμα ως τοξίνες και απωθητικές ενώσεις έναντι φυτοφάγων ζώων [2,3].

Όλα τα τερπενοειδή προκύπτουν ως πολυμερή του ισοπρενίου (2-μέθυλο-1,3-βουταδιένιο), ενώ στον τελικό ανθρακικό σκελετό τους μπορεί να προστεθούν διάφορες λειτουργικές ομάδες ή σάκχαρα [2]. Μια υποκατηγορία των τερπενίων, τα τριτερπένια, (ο σκελετός τους αποτελείται από 30 άτομα C) προκύπτει από τη βιοσυνθετική οδό του μεβαλονικού οξέως με συμπύκνωση δυο μορίων FPP σε σκουαλένιο, το οποίο με δράση εποξειδάσης μετατρέπεται σε 2,3-οξειδοσκουαλένιο (2,3-oxidosqualene, εικόνα 1). Αυτό το μόριο αποτελεί σημείο διακλάδωσης του πρωτογενούς και του δευτερογενούς μεταβολισμού, καθώς μπορεί να κυκλοποιηθεί προς ενώσεις με στερολικό σκελετό ή σε τριτερπένια με τη δράση ενζύμων της οικογένειας OSC [4]. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου σταθεροποιώντας ενδιάμεσες δομές καρβοκατιόντων για να σχηματισθεί μέχρι και εξακυκλικός ανθρακικός σκελετός [5].

Ο ρόλος των τριτερπενίων φαίνεται να είναι κυρίως η φυτοπροστασία, αφού εκδηλώνουν ισχυρές αντιμικροβιακές ιδιότητες [6,7]. Η δράση τους αυτή εκδηλώνεται κυρίως από τις γλυκοζυλιωμένες τους μορφές, τις σαπωνίνες που

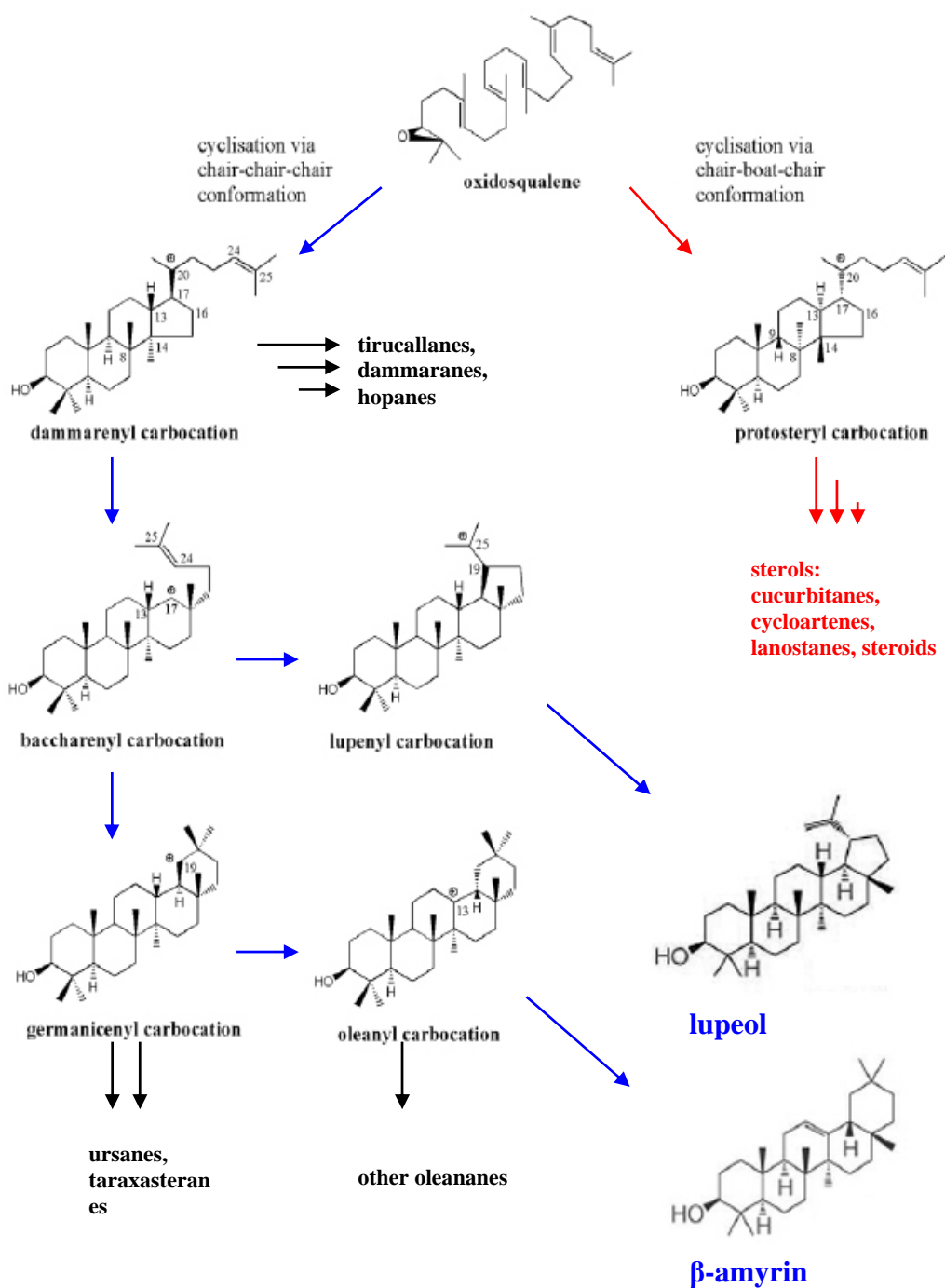
αποκαλούνται έτσι λόγω τις ιδιότητας απορρυπαντικού που αποκτούν με αυτή την τροποποίηση [8,9]. Ωστόσο έχειδειχθεί ότι μερικά τριτερπένια μπορεί να συμμετέχουν σε διαδικασίες της ανάπτυξης και αύξησης ακόμη και στη μη-γλυκοζυλιωμένη μορφή τους (στην οποία καλούνται αγλυκόνες) [10]. Επίσης, υπάρχουν πειραματικά ευρήματα που υποδηλώνουν συμμετοχή των αγλυκόνων αυτών στη μεμβρανική λειτουργία και στο σχηματισμό ριζοβιακών-μυκκοριζικών συμβιώσεων[11,12].

Προσφάτως, οι σαπωνίνες κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με τον ανθρακικό τους σκελετό, όπως αυτός προκύπτει από τα μονοπάτια βιοσύνθεσης τους. Με βάση αυτή την κατηγοριοποίηση υπάρχουν 11 βασικές κατηγορίες σαπωνίνων διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο χωρίς να περιορίζονται σε ορισμένες κλάσεις ή τάξεις φυτών. Ο πιο διαδεδομένος τύπος σκελετού στις περισσότερες τάξεις φυτών φαίνεται πως είναι ο τύπος των ολεανινών (oleanane) (εικόνα 2). Ο σκελετός αυτός μπορεί να δεχθεί διάφορους υποκαταστάτες όπως υδροξυλομάδες (-OH), καρβονυλομάδες (=O) αλλά και αλυσίδες σακχάρων από 1-8 κατάλοιπα [13].



Εικόνα 1: Βιοσύνθεση των τερπενοειδών από ακέτυλο-CoA μέσω του μεβαλονικού οξέως. Αποτελεί μονοπάτι του πρωτογενούς μεταβολισμού μέχρι το σημείο διακλάδωσης, το 2,3-οξειδοσκουαλένιο. CoA: Coenzyme A, IPP: Isoprene diphosphate, DMAPP: dimethylallyl diphosphate, FPP: farnesyl diphosphate, FPS: farnesyl diphosphate synthase, SQS: squalene synthase, SQE: squalene epoxidase.

Για τον σχηματισμό του βασικού σκελετού των ολεανινών απαιτούνται τουλάχιστον τέσσερις διακριτές αλλαγές στο μόριο του 2,3-οξειδοσκουαλενίου (εικόνα 2) ενώ από το μόριο του ολεανικού καρβοκατιόντος μπορεί να προκύψει πληθώρα μορίων με διαφορές στους τύπους υποκαταστατών ή τη θέση τους στον ανθρακικό σκελετό ανάλογα με το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση κυκλοποίησης και τα ένζυμα που δρουν καθοδικά του. Ένα συχνά απαντώμενο παράγωγο του ολεανικού καρβοκατιόντος είναι η β-αμυρίνη (beta-amyrin, βλέπε εικόνα 2) [14]. Η



Εικόνα 2: Απλοποιημένο διάγραμμα της κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου με τη δράση των OSCs και οι κατηγορίες των παραγόμενων τριτερπενίων-σαπωνίνων κατά τους Vincken *et al* 2007. Με κόκκινα βέλη φαίνονται οι αντιδράσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού. Με μαύρο και μπλε απεικονίζονται οι αντιδράσεις του δευτερογενούς μεταβολισμού. Τα μπλε βέλη δείχνουν τις αντιδράσεις που πιθανόν καταλύει το προϊόν του *LjAMY2* παράγοντας μίγμα λουπεόλης και β-αμυρίνης.

ίδια ένωση, καθώς και σαπωνίνες που προκύπτουν καθοδικά της φαίνεται ότι έχουν ποικίλες λειτουργίες σε διαφορετικά φυτικά είδη, όπως η αντιμικροβιακή δράση στις ρίζες της βρώμης [8] ή ως συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών στο μπιζέλι με

πιθανό ρόλο στη διαδικασία εκβλάστησης των σπερμάτων του [10]. Ακόμη, έχουν προταθεί και φαρμακολογικές χρήσεις β-αμυρίνης απομονωμένης από διάφορα φυτικά είδη, ως αναλγητικό [15], ως αντί-βακτηριακή ουσία ευρείας δράσης [16] και πιθανών ως αντικαρκινική ουσία [54].

Η παραγωγή της β-αμυρίνης καταλύεται από ένζυμα: συνθάσες της β-αμυρίνης τα οποία ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των OSCs (EC 5.4.99). Εξ' αιτίας των βιοχημικά πολύπλοκων αντιδράσεων που καταλύουν αυτά τα ένζυμα, της σημασίας που έχουν στο μεταβολικό δίκτυο των φυτών ενδεχομένως δρώντας ρυθμιστικά σε μια διακλάδωση μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού (εικόνα 2) αλλά και λόγω του γενικότερου ενδιαφέροντος για το μεταβολισμό των τριτερπενίων, έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες κλωνοποίησης και χαρακτηρισμού των γονιδίων που τα κωδικοποιούν σε αρκετά φυτικά είδη [5,7,14,17, 18,19].

Η πλήρης κατανόηση αυτών των μεταβολικών οδών, εκτός από το άμεσο επιστημονικό ενδιαφέρον, μπορεί να επιτρέψει την τροποποίηση και ρύθμιση της περιεκτικότητας φυτικών οργανισμών σε μεταβολίτες της κατηγορίας των τριτερπενίων. Έτσι μπορεί να επηρεαστεί η συσσώρευση επιθυμητών ουσιών σε ορισμένα φυτά και να βελτιωθούν οι φαρμακευτικές και κοσμητικές τους χρήσεις. Εναλλακτικά μπορεί η επίδραση στον μεταβολισμό να τροποποιήσει τα αγρονομικά χαρακτηριστικά παραγωγικών φυτών ενισχύοντας την ανθεκτικότητα σε προσβολή από παθογόνους μικροοργανισμούς ή την αζωτοδεύσμευση ενεργοποιώντας το σχηματισμό ριζοβιακών σχέσεων που συμβάλουν σ' αυτήν [12].

Εδώ περιγράφεται η σίγηση του γονιδίου AMY2 (GenBank accession number: AF478455.1) στις ρίζες του μοντέλου ψυχανθούς *Lotus japonicus*. Το mRNA του γονιδίου αυτού έχει είδη κλωνοποιηθεί [19] και με βάση την αλληλουχία του αλλά και από πειράματα υπερέκφρασης σε ζύμη, φαίνεται ότι έχει μικτή δράση συνθάσης τριτερπενίων, καταλύοντας την παραγωγή τόσο β-αμυρίνης όσο και λουπεόλης (ένα άλλο τριτερπενοειδές που έχει όμοια δομή με τη β-αμυρίνη). Η έκφραση του γονιδίου φαίνεται να γίνεται επιλεκτικά στις ρίζες του *L.japonicus* [19,20], ωστόσο δεν έχουν γίνει ακόμα πειράματα που να διευκρινίζουν το ρόλο του στην ανάπτυξη και λειτουργία της σ' αυτό το φυτό. Αποβλέποντας στη διευκρίνιση του ρόλου της συνθάσης β-αμυρίνης μικτής δράσης, AMY2 στην ανάπτυξη και λειτουργία της ρίζας του ψυχανθούς μοντέλου *L. japonicus*, δημιουργήθηκαν τέσσερις κατασκευές RNA-φουρκέτας οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό φυτών *L. japonicus* με

τη μέθοδο Hairy Root. Με την προσέγγιση αυτή προέκυψαν «σύνθετα φυτά» στα οποία ανιχνεύθηκε μερική σίγηση του γονιδίου στόχου. Δεδομένου ότι η β-αμυρίνη ως τριτερπενοειδές μπορεί να επηρεάζει τη δημιουργία ριζοβιακών συμβιώσεων ελέγχθηκε ο σχηματισμός φυματίων σε φυτά με μετασχηματισμένες ρίζες. Ενώ δεν προέκυψε κάποια οπτική φαινοτυπική διαφορά μεταξύ μετασχηματισμένων φυτών και φυτών-μαρτύρων, οι ιστοί τους θα χρησιμοποιηθούν για ανάλυση έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της β-αμυρίνης και καθοδικών μεταβολιτών της, αλλά και για ανάλυση περιεκτικότητας σε μεταβολίτες της κατηγορίας των τριτερπενίων ώστε να σχηματιστεί κάποιο συμπέρασμα για το ρόλο του AMY2. Παράλληλα έγινε σύγκριση της αποτελεσματικότητας κάθε κατασκευής ώστε να χρησιμοποιηθεί η πιο λειτουργική σε περαιτέρω πειραματικούς χειρισμούς.

ΤΟ ΨΥΧΑΝΘΕΣ *Lotus japonicus*

Τα ψυχανθή (Fabales ή Leguminosae) είναι η δεύτερη σε σημασία κατηγορία φυτών μετά τα σιτηρά, καθώς αποτελούν πηγή τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα και παρέχουν πρώτες ύλες για τη βιομηχανία [21]. Τα περισσότερα ψυχανθή διαθέτουν ισχυρό ριζικό σύστημα, στο οποίο παρατηρούνται χαρακτηριστικές δομές, οι οποίες καλούνται φυμάτια. Τα φυμάτια προκύπτουν από τη συμβίωση διαφόρων ειδών βακτηρίων της οικογένειας Rhizobiaceae με το ριζικό σύστημα του ψυχανθούς. Αποτελούνται κυρίως από μάζα φυτικών κυττάρων που εποικίζονται στο εσωτερικό από βακτηριακά κύτταρα. Οι δομές αυτές έχουν την ικανότητα δέσμευσης και ενσωμάτωσης του ατμοσφαιρικού αζώτου σε οργανικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα φυτά [22]. Ο σχηματισμός των φυματίων στις ρίζες και η ικανότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου από τα ψυχανθή είναι ίσως το βασικό χαρακτηριστικό τους. Υπολογίζεται ότι περίπου 40-60 εκατομμύρια τόνοι αζώτου δεσμεύονται ετησίως από καλλιεργούμενα ψυχανθή [23]. Αντιπροσωπευτικά είδη καλλιεργούμενων ψυχανθών είναι, το μπιζέλι (*Pisum sativum*), η φακή (*Lens culinaris*), η μηδική (*Medicago sativa*) και η σόγια (*Glycine max*). Ωστόσο, τα είδη αυτά δεν έχουν χαρακτηριστικά που να επιτρέπουν την εύκολη μελέτη της βιολογίας τους.

Το *Lotus japonicus*, [Kingdom: Plantae, Division: Magnoliophyta, Order: Fabales (Leguminosae), Family: Fabaceae (Papilionaceae), Subfamily: Faboideae, Tribe: Loteae, Genus: *Lotus*] χρησιμοποιείται λόγω των αγρονομικών του χαρακτηριστικών και του μικρού, διπλοειδούς, γονιδιώματος ως φυτό-μοντέλο για τα ψυχανθή [24].

Ενώ το ίδιο είναι οικονομικά ασήμαντο και παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πολύ περισσότερα ερευνητικά εργαλεία και πειραματικά δεδομένα για το πρώτο φυτό-μοντέλο *Arabidopsis thaliana* το *L.japonicus* είναι ιδανικό για τη μελέτη και διευκρίνιση της βιολογίας των ψυχανθών με μεγάλο ενδιαφέρον να εστιάζεται στις διαδικασίες της φυματιογένεσης και της αζωτοδεύσμησης [25].

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ GATEWAY

Η τεχνολογία Gateway (Invitrogen) βασίζεται στην ικανότητα του βακτηριοφάγου-λ να ενσωματώνεται και ν' αποκόπτεται από το βακτηριακό γένωμα. Ο ανασυνδυασμός αυτός γίνεται μεταξύ ειδικών αλληλουχιών του βακτηριακού DNA, τις θέσεις attB και του φάγου, τη θέση attP. Οι αλληλουχίες αυτές αποτελούνται από μια κοινή πυρηνική αλληλουχία 7 bp και δύο πλευρικές αλληλουχίες-βραχίονες (B, B' και P, P'), οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους. Ο ανασυνδυασμός επιτυγχάνεται παρουσία πρωτεϊνών του φάγου και του βακτηρίου τις Integrase (Int) και Integration Host Factor (IHF) αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες επιτρέπουν την ενσωμάτωση του φάγου φέρνοντας κοντά τις θέσεις αναγνώρισης και δημιουργώντας μονόκλιωνα ρήγματα στα δύο μόρια DNA. Ακολουθεί ανταλλαγή κλώνων και σχηματισμός ετεροδιμερούς αλυσίδας λόγω της συμπληρωματικής πυρηνικής αλληλουχίας. Με την επίλυση της δομής Holiday που προκύπτει ολοκληρώνεται η ενσωμάτωση του φάγου στη θέση B μόνο που εκατέρωθεν του φάγου προκύπτουν δυο υβριδικές θέσεις ανασυνδυασμού που αποτελούνται: από έναν βραχίονα της θέσης B, την πυρηνική αλληλουχία και βραχίονα P' (θέση attL, από το left), ενώ η θέση attR (από το right) αποτελείται από τον άλλο βραχίονα B', την πυρηνική αλληλουχία και το βραχίονα P'. Η αντίστροφη αντίδραση καταλύεται πάλι από τις Int και IHF παρουσία της πρωτεΐνης Xis (κωδικοποιείται από το DNA του φάγου) η οποία εμποδίζει τον ανασυνδυασμό σε θέσεις attP, ενώ επιτρέπει την αντίδραση LR οδηγώντας σε αποκοπή του φάγου από το βακτηριακό χρωμόσωμα και την αναγέννηση των θέσεων attB και attP.

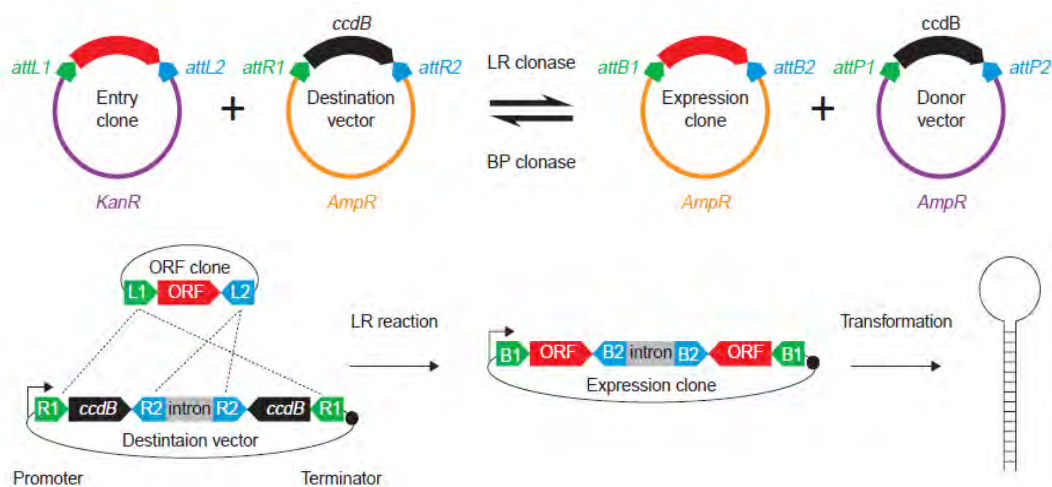
Η τεχνολογία Gateway και οι συνώνυμες άλλων εταιριών εκμεταλλεύονται την ιδιότητα αυτού του ειδικού ανασυνδυασμού. Δημιουργώντας σημειακές μεταλλάξεις στην πυρηνική αλληλουχία προκύπτουν ειδικές θέσεις B-P και L-R που ανασυνδυάζονται μόνο με την αντίστοιχα τροποποιημένη θέση. Ενσωματώνοντας το επιθυμητό τμήμα DNA ανάμεσα σε δύο διαφορετικές θέσεις attL ενός πλασμιδίου προκύπτει ο κλώνος Entry. Ο φορέας προορισμού (Destination vector) περιέχει το

γονίδιο επιλογής *ccdB* (προκαλεί κυτταρικό θάνατο δημιουργώντας δίκλινα ρήγματα στο DNA μέσω της γυράσης σε στελέχη *E.coli* που δεν φέρουν το γονίδιο *ccdA*, όπως το DH5α) ανάμεσα σε δύο διαφορετικές θέσεις *attR* που να αντιδρούν με τις *attL* του φορέα Entry. Ιδανικά τα δύο αυτά πλασμίδια φέρουν διαφορετικά γονίδια βακτηριακής επιλογής στον κορμό τους (χωρίς αυτό ν' αποτελεί περιορισμό). Προσθέτοντας μίγμα LR Clonase (περιέχει τις *Int*, *IHF* και *Xis* σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης) καταλύεται ο ανασυνδυασμός LR μεταξύ των πλασμιδίων οδηγώντας στη δημιουργία δυο νέων κλώνων. Έναν φορέα έκφρασης (Expression vector) που φέρει το επιθυμητό DNA ανάμεσα σε δύο θέσεις *attB* στον κορμό του Destination vector και έναν φορέα δότη (Donor vector) με το *ccdB* ανάμεσα σε θέσεις *attP* στον κορμό του Entry vector. Το μίγμα μετασχηματίζεται σε δεκτικά βακτήρια, στελέχους ευαίσθητου στο *ccdB* τα οποία αναπτύσσονται σε θρεπτικό με αντιβιοτικό στο οποίο έχει ανθεκτικότητα ο Expression vector. Βακτήρια που φέρουν κάποιον από τους άλλους τρεις φορείς δεν αναπτύσσονται, αφού οι φορείς Donor και Destination φέρουν το *ccdB* ενώ ο Entry ιδανικά δεν έχει ανοχή στο χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό (σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιείται σε γραμμική μορφή ώστε να μην μετασχηματίζεται εύκολα σε βακτήρια). Η αντίστροφη αντίδραση είναι δυνατή με μίγμα BP Clonase (δεν περιέχει *Xis*) και χρησιμοποιείται για δημιουργία φορέων Entry ανασυνδυάζοντας τμήμα DNA με άκρα *attB* σε φορέα Donor (εικόνα 3 επάνω).

Θετικά της μεθόδου είναι η ταχεία κλωνοποίηση και εύκολη επιλογή επιθυμητών κλώνων. Επίσης δεν αλλοιώνεται η κλωνοποιούμενη αλληλουχία αφού δεν μεσολαβεί στάδιο αντιγραφής DNA και δεν υπάρχει συνολική απώλεια DNA. Υπάρχουν αρκετές καθοδικές εφαρμογές, μεταξύ των οποίων η ταυτόχρονη κλωνοποίηση πολλών τμημάτων DNA σ' έναν φορέα με μία αντίδραση [26].

Στο παρόν πείραμα έγινε χρήση αυτής της μεθόδου για κατασκευή φορέων έκφρασης RNA φουρκέτας. Τμήματα του γονιδίου στόχου κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pEntr4 (Παράρτημα II) ανάμεσα στις θέσεις *attL1/2*. Έγινε αντίδραση LR με τον φορέα Destination, pUBI-GWS-GFP (Παράρτημα II) ο οποίος φέρει σε ανάστροφη επανάληψη, εκατέρωθεν ιντρονίου τα γονίδια *ChlR* (Chloramphenicol resistance) και *ccdB* ανάμεσα στις θέσεις *attR1/2*. Ακολουθώντας την διαδικασία της προηγούμενης παραγράφου προέκυψαν τελικοί φορείς έκφρασης RNA φουρκέτας με τα τμήματα του γονιδίου ν' αντικαθιστούν τα *ChlR* και *ccdB* ανάμεσα σε θέσεις *attB1/2*. Ο αντιπαράλληλος προσανατολισμός των γονιδιακών τμημάτων επιτρέπει τη

δημιουργία του στελέχους της φουρκέτας στο προκύπτον μεταγράφημα, ενώ το ιντρόνιο αποτελεί το βρόχο της κατασκευής (εικόνα 3 κάτω).



Εικόνα 3: Επάνω: στρατηγική της τεχνολογίας Gateway, με κόκκινο το επιθυμητό τμήμα DNA. Κάτω: Δημιουργία φορέα έκφρασης RNA φουρκέτας σε ένα βήμα με την τεχνολογία Gateway. Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των φορέων pUBI-AMY2.2/3 στο παρόν πείραμα[26].

Agrobacterium rhizogenes ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ HAIRY ROOT

Το *Agrobacterium rhizogenes* είναι Gram αρνητικό βακτήριο που μαζί με το συγγενικό του είδος *A. tumefaciens* ευθύνονται για τις νεοπλαστικές ασθένειες *hairy root* και *crown gall* αντίστοιχα σε ανώτερα φυτά. Η παθογένειά τους οφείλεται σε παράγοντες που κωδικοποιούνται από δύο μεγάλα πλασμίδια, το Ti για το *A. tumefaciens* και το Ri στο *A. rhizogenes*. Και τα δύο πλασμίδια φέρουν περιοχές T-DNA που μεταφέρονται και ενσωματώνονται στο φυτικό γένομα, όπου εκφράζονται τα περιεχόμενα σ' αυτά γονίδια και εκδηλώνεται η παθογένεια των βακτηρίων [27,28]. Στο T-DNA υπάρχουν γονίδια βιοσύνθεσης φυτοορμονών της κατηγορίας των αυξινών και των κυτοκινών. Έκφραση αυτών των γονιδίων στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα οδηγεί σε εκτοπική σύνθεση ορμονών που προκαλούν αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κατά συνέπεια την εμφάνιση νεοπλαστικών δομών [29]. Επίσης μεταφέρονται γονίδια σύνθεσης οπινών που αποτελούν πηγή άνθρακα, αζώτου και ενέργειας για τα βακτήρια. Η ενσωμάτωση του T-DNA στο φυτό οδηγεί σε αυξημένο αριθμό κυττάρων τα οποία παράγουν θρεπτικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά από τα βακτήρια αυτά [27]. Ο φαινότυπος Hairy Root προκαλείται από τα γονίδια *rolA*, B, C, D (συμμετέχουν στη σύνθεση/μεταβολισμό κυτοκινών) που κωδικοποιούνται σε T-DNA περιοχή του Ri πλασμιδίου. Γενικά χαρακτηρίζεται από αυξημένη ανάπτυξη του ριζικού ιστού με

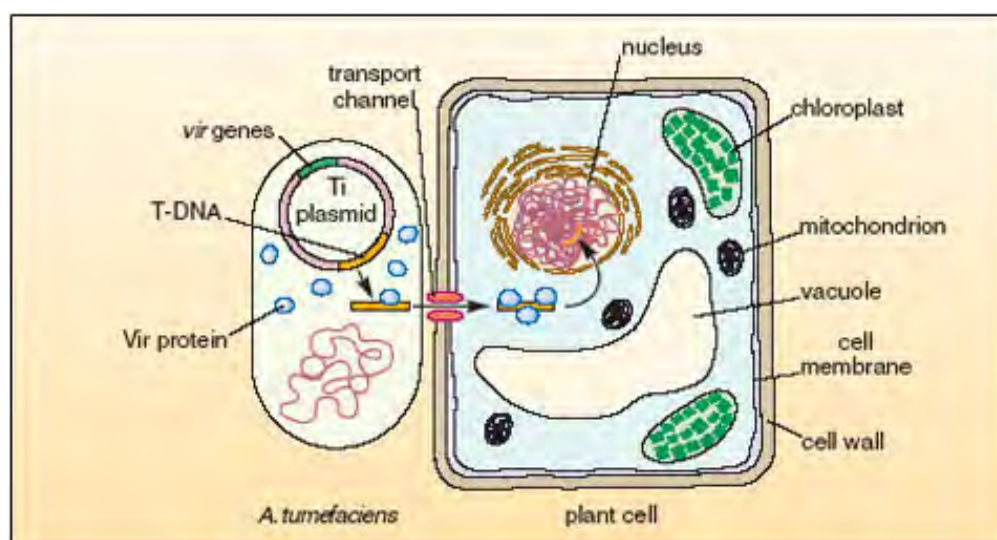
πολλές διακλαδιζόμενες, σγουρές ρίζες μικρότερου μήκους από το φυσιολογικό [29,30].

Η ενσωμάτωση του T-DNA μεσολαβεί από δύο συνοριακές αλληλουχίες 25bp (βρίσκονται μία σε κάθε άκρο του T-DNA) [31], η συχνότητα μετασχηματισμού αυξάνεται παρουσία συγκεκριμένων γειτονικών αλληλουχιών, χωρίς αυτές να είναι απαραίτητες για τη μεταφορά και ενσωμάτωση [32]. Για την μεταφορά του T-DNA απαιτείται η δράση των *vir* γονιδίων που κωδικοποιούνται από περιοχή του Ri πλασμιδίου εκτός του T-DNA. Προϊόντα αυτών των γονιδίων συμμετέχουν στην αποκοπή του T-DNA από το πλασμίδιο, την μεταφορά και ενσωμάτωσή του στο φυτικό γένωμα [33]. Στην εικόνα 4 φαίνεται απλοποιημένη η μεταφορά και ενσωμάτωση του T-DNA σε φυτικό κύτταρο.

Εκμεταλλεζόμενοι την ικανότητα μεταφοράς του T-DNA έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι μετασχηματισμού πολλών φυτικών οργανισμών μέσω του *A. rhizogenes* [30,34,35], μάλιστα μετασχηματισμένες ρίζες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αναγέννηση πλήρως μετασχηματισμένων, διαγονιδιακών φυτών [36,37]. Τοποθετώντας οποιαδήποτε επιθυμητή αλληλουχία ανάμεσα σε δυο συνοριακά 25bp έχουν μεταφερθεί έως και 15kb DNA μ' αυτό το μηχανισμό [38]. Για ευκολότερο χειρισμό των πλασμιδίων (τα φυσιολογικά πλασμίδια Ti, Ri είναι μέγα-πλασμίδια >200kb) χρησιμοποιείται δυαδικό σύστημα φορέων κατά το οποίο η κατασκευή T-DNA κλωνοποιείται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και εισάγεται σε βακτηριακό κλώνο που περιέχει δεύτερο πλασμίδιο με τα *vir* γονίδια για τη μεταφορά του T-DNA [33].

Η μέθοδος μετασχηματισμού μέσω του *A. tumefaciens* χρησιμοποιείται πιο συχνά για δημιουργία διαγονιδιακών φυτών, ωστόσο είναι αρκετά χρονοβόρα (περίπου 6 μήνες για μόλυνση φυτικού ιστού και αναγέννηση διαγονιδιακών φυτών). Αντίθετα, η μέθοδος Hairy root επιτρέπει τη δημιουργία σύνθετων φυτών με μετασχηματισμένες ρίζες σε 1 μήνα, μέσω του *A. rhizogenes*. Τονίζεται ότι φυτά που προκύπτουν μ' αυτή τη μέθοδο δεν είναι διαγονιδιακά, αλλά αποτελούνται από υπέργειες δομές αγρίου τύπου και μετασχηματισμένες ρίζες [39,40]. Εάν απαιτούνται πλήρως μετασχηματισμένα-διαγονιδιακά φυτά, μετασχηματισμένες ρίζες μπορούν να επιλεγθούν και να χρησιμοποιηθούν για αναγέννηση φυτών χωρίς δεύτερη μόλυνση με την επιθυμητή κατασκευή [36,37,41]. Οπότε, η δεύτερη μέθοδος προτιμάται όταν γίνονται μελέτες σε γονίδια που εκφράζονται μόνο στο ριζικό σύστημα ή όταν

εξετάζεται η επίδρασή γονιδίων και άλλων αλληλουχιών DNA επιλεκτικά σ' αυτό [39,42,43,44].



Εικόνα 4: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταφοράς του T-DNA από πλασμίδιο βακτηρίου του γένους *Agrobacterium* και ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα φυτικού κυττάρου.

ΕΚΜΕΤΑΛΛΕΥΣΗ ΤΟΥ RNAi ΣΕ ΦΥΤΑ

Έχει δειχθεί ότι το δίκλωνο RNA μπορεί να οδηγήσει μεταξύ άλλων και σε μετά μεταφραστική σίγηση της γονιδιακής έκφρασης στα φυτά και σε άλλους οργανισμούς [45,46]. Μια πολύ επιτυχημένη μέθοδος γονιδιακής σίγησης σε φυτικούς οργανισμούς είναι η εισαγωγή δίκλωνου RNA «φουρκέτας» στη οποία το στέλεχος αποτελείται από τμήμα του ORF γονιδίου στόχου σε ανάστροφη επανάληψη [47,48]. Μάλιστα όταν στη φουρκέτα προστίθεται βρόχος ανάμεσα στην ανάστροφη επανάληψη σχηματιζόμενος από κάποιο ιντρόνιο, η σίγηση επιτυγχάνεται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό [47]. Ιδανικά η κατασκευή εκφράζεται υπο την καθοδήγηση κάποιου ιδιοσυστατικού υποκινητή που να διατηρεί την έκφραση της κατασκευής σ' όλους ή τους περισσότερους ιστούς σε αρκετά υψηλά επίπεδα ώστε να επιτυγχάνεται κατά το δυνατό ισχυρότερη έκφραση της κατασκευής και άρα σίγηση του γονιδίου στόχου σε μεγαλύτερο βαθμό. Έχουν σχεδιαστεί αρκετοί πλασμιδιακοί φορείς για δημιουργία κατασκευών έκφρασης δίκλωνου RNA σε φυτικούς ιστούς. Στους φορείς αυτούς συνήθως προϋπάρχει ένας υποκινητής (για έκφραση σε φυτικά κύτταρα), ένα ιντρόνιο για σχηματισμό βρόχου στη φουρκέτα RNA και αλληλουχία τερματισμού έκφρασης [43,48,49].

Το πόσο επιτυχής θα είναι η σίγηση, εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, όπως τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στόχου και της κατασκευής, ή ο ρυθμός ανακύκλωσης του mRNA στόχου [42,49]. Σημαντική επίδραση στο βαθμό σίγησης έχει το τμήμα ORF του γονιδίου στόχου που χρησιμοποιείται στη δημιουργία της κατασκευής δίκλωνου RNA. Ιδανικά το τμήμα του ORF είναι μεταξύ 300-600bp, είτε στο 5' είτε στο 3' UTR του mRNA στόχου. Η επιλεκτικότητα της σίγησης εξαρτάται από την αλληλουχία του τμήματος ORF. Εάν η αλληλουχία του είναι συντηρημένη μπορεί να επιτευχθεί σίγηση ολόκληρης γονιδιακής οικογένειας. Χρησιμοποιώντας περιοχή του ORF με χαμηλή ομοιότητα αλληλουχίας σε σχέση με άλλα γονίδια μπορεί να επιτευχθεί ειδική σίγηση του γονιδίου από το οποίο προέρχεται το ORF. Με αυτή τη μέθοδο συχνά επιτυγχάνεται σίγηση σε βαθμό κοντά στο 100%, ισοδύναμη με παντελή απουσία του γονιδίου στόχου [48]. Επίσης έχουν αναφερθεί περιπτώσεις στις οποίες η σίγηση γονιδίου που προκαλείται από την έκφραση RNA φουρκέτας εξαπλώνεται και σε ιστούς που δεν έχουν μετασχηματιστεί με την κατασκευή [43,50].

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:

Επιλογή των εκκινητών PCR, Real Time PCR

Οι εκκινητές επιλέχθηκαν σε μη συντηρημένες περιοχές των γονιδίων (όπως προέκυψε με ομοπαράθεση βασισμένη στον αλγόριθμο ClustalW), ώστε να αποφευχθεί ο υβριδισμός των εκκινητών με μη-επιθυμητές αλληλουχίες. Μη-επικαλυπτόμενες αλληλουχίες των γονιδίων ελέγχθηκαν και με BLAST σε όλες τις γονιδιακές βάσεις δεδομένων ώστε να αποφευχθεί η ενίσχυση μη επιθυμητών γονιδίων κατά την PCR. Η επιλογή των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση προγράμματος επιλογής εκκινητών “Beacon designer v7.0.” Για την Real time PCR το μέγεθος των ενισχυόμενων τμημάτων ήταν περίπου 100 ζεύγη βάσεων. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός ομοδιμερών ή ετεροδιμερών.

PCR για ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου AMY2:

Χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών που έφεραν θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού στο 5' άκρο (πίνακας 1) με σκοπό την ενίσχυση τμημάτων του cDNA του γονιδίου AMY2. Το πρώτο ζεύγος εκκινητών ενισχύει τμήμα του cDNA μήκους 194bp μεταξύ των θέσεων 2172-2365bp (AMY2.2), ενώ το δεύτερο ενισχύει τμήμα 217bp μεταξύ των θέσεων 2225-2441bp του cDNA (AMY2.3). Σε κάθε περίπτωση ο Forward εκκινητής (υβριδίζεται στο 5' άκρο του cDNA) φέρει τις θέσεις αναγνώρισης για τα περιοριστικά ένζυμα XhoI, XbaI ενώ ο Reverse εκκινητής (υβριδίζεται στο 3' άκρο του cDNA) τις θέσεις KpnI, HindIII. PCR έγινε με kit και το αντίστοιχο πρωτόκολλο της Kappa Taq Polymerase σε όγκο 50μl με Tm=55°C και 54°C για τα ζεύγη AMY2.2 και AMY2.3 αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκε το εξής θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 95°C για 2' στη συνέχεια, 95°C για 30'', 54°C για 30'', 72°C για 40'', για 35 κύκλους και τέλος 72°C για 10'. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1.5% για ανίχνευση των προϊόντων αναμενόμενου μήκους. Ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός τους με “QIAquick Gel extraction kit” (QIAGEN) σύμφωνα με τις αντίστοιχες οδηγίες.

Σύμβολο εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
AMY2.2 Forward	5'-GGA CTC GAG TCT AGA CAA CAG GAT ATT ACT GGA GTA TAC G-3'
AMY2.2 Reverse	5'-ΓΤΑ GGT ACC AAG CTT GAA CTT GTT TGA TTA TTT TAT TTG CAT G-3'
AMY2.3 Forward	5'GCA CTC GAG TCT AGA GTA CAG AAA TAA TTT TAC AAC GAT GG-3'
AMY2.3 Reverse	5'-AAG GTA CCA AGC TTG CAA CAA ACC GAC ACT AAA TAC-3'

Πίνακας 1: Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιηθήκαν για ενίσχυση των τμημάτων cDNA AMY2.2/3. Με χρώματα φαίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων. Πράσινο: XhoI, Καφέ: XbaI, Κόκκινο: KpnI, Μπλε: HindIII

Κλωνοποίηση των γονιδιακών τμημάτων για δημιουργία κατασκευών RNA φουρκέτας σε πλασμιδιακούς φορείς:

Τα γονιδιακά τμήματα που λήφθηκαν με την προηγούμενη μέθοδο κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEMT-easy (Promega) με το ομώνυμο ligation kit και τις οδηγίες του προμηθευτή. Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων E.coli, στέλεχος DH5α με τη μέθοδο θερμικού σοκ (Heat Shock). Μετασχηματισμένα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε τρυβλία LB-Amp από τα οποία επιλέχθηκαν ορισμένες αποικίες και αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες LB-Amp. Από αυτές έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο βρασμού (Boiling prep) και έλεγχος επιτυχούς ανασυνδιασμού με χρήση περιοριστικών ενζύμων. Καλλιέργειες που έφεραν επιθυμητά πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για εκ' νέου απομόνωση πλασμιδίου με kit "Nucleospin, plasmid" (Macherey-Nagel) όπως περιγράφει το αντίστοιχο πρωτόκολλο.

Τα καθαρισμένα πλασμίδια υποβλήθηκαν σε πέψεις με περιοριστικά ένζυμα για απομόνωση των γονιδιακών τμημάτων AMY2.2 και AMY2.3. Έγιναν διπλές πέψεις με τα ένζυμα XbaI-HindIII (NEB) και XhoI-KpnI (Takara Bio Inc.) σύμφωνα με τις προτεινόμενες συνθήκες των προμηθευτών. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% και απομονώθηκαν ζώνες DNA που βρισκόταν κοντά στο επιθυμητό μέγεθος (100-300bp) σύμφωνα με το μάρτυρα μοριακού βάρους, χρησιμοποιώντας "QIAquick Gel extraction kit" (QIAGEN) και τις αντίστοιχες οδηγίες.

Ακολούθησε κλωνοποίηση των τμημάτων αυτών στις αντίστοιχες θέσεις XbaI-HindIII και XhoI-KpnI του πλασμιδιακού φορέα pHannibal (Παράρτημα II) ώστε να επιτευχθεί ενσωμάτωσή τους με αντιπαράλληλη φορά, εκατέρωθεν του

προϋπάρχοντος ιντρονίου του φορέα και ανάμεσα στον προαγωγέα CaMV35S (υποκινητής ικής προέλευση που εκφράζεται στους περισσότερους φυτικούς ιστούς) και την αλληλουχία τερματισμού OCS. Ομοίως τα τμήματα XhoI-KpnI ενσωματώθηκαν και στον φορέα pENTR4 (Invitrogen) στις αντίστοιχες θέσεις, αντικαθιστώντας το θνησιγόνο γονίδιο ccdB του φορέα.. Ligations έγιναν με kit της “Promega”, όπως προηγουμένως χρησιμοποιώντας τους φορείς pHannibal και pENTR4, κομμένους με τα κατάλληλα ένζυμα και καθαρισμένους με “QIAquick Gel extraction kit”.

Στη συνέχεια απομονώθηκαν από τον ανασυνδιασμένο pHannibal ολόκληρες οι κασέτες έκφρασης με χρήση των περιοριστικών ενζύμων SacI-SpeI και κλωνοποιήθηκαν στις αντίστοιχες θέσεις του pBluescript SK+ (Το βήμα αυτό ήταν αναγκαίο διότι ο pHannibal δεν φέρει κατάλληλες θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων που να υπάρχουν στο MCS του τελικού φορέα έκφρασης pCambia 1300). Από τον pBsk + έγινε απομόνωση των κατασκευών με τα ένζυμα BamHI-SacI και κλωνοποίησή τους στις αντίστοιχες θέσεις του pCambia 1300 (Παράρτημα II).

Οι δύο ανασυνδιασμένοι φορείς pENTR4 (pENTR4-AMY2.2/2.3) χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις πλασμιδιακού ανασυνδιασμού με τον φορέα έκφρασης pUBI-GWS-GFP με χρήση της τεχνολογίας Gateway (Invitrogen). Χρησιμοποιήθηκαν 150-200 ng υπερελικωμένου πλασμιδίου (από κάθε πλασμίδιο) σε αντιδράσεις “LR-Clonase” σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή. (Χάρτες για τους τελικούς φορείς σίγησης που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στο παράρτημα II)

Επιλογή και πολλαπλασιασμός των επιθυμητά ανασυνδιασμένων πλασμιδίων γινόταν κάθε φορά όπως περιγράφηκε προηγουμένως (απομόνωση πλασμιδίου από καλλιέργειες βακτηρίων χρησιμοποιώντας διαφορετικά αντιβιοτικά ανάλογα με κάθε φορέα και πέψεις με περιοριστικά ένζυμα). Σε όσους φορείς ήταν εφικτό γινόταν χρήση blue/white screening για διευκόλυνση της επιλογής ανασυνδιασμένων πλασμιδίων. Επίσης στα τελικά πλασμίδια (pCambia-AMY2.2/3, pUBI-AMY2.2/3) έγινε και αλληλούχιση για επιπλέον επιβεβαίωση της ορθής κατασκευής των φορέων σίγησης.

Μετασχηματισμός *Agrobacterium rhizogenes* και επιλογή επιθυμητά μετασχηματισμένων κλώνων:

Οι τέσσερις κατασκευές σίγησης (pCambia-AMY2.2/2.3, pUBI-AMY2.2/2.3) μετασχηματίστηκαν σε βακτήρια *Agrobacterium rhizogenes* στέλεχος LBA1334 με

τη μέθοδο freeze/thaw. Μετασχηματισμένα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε τρυβλία LB-Rif, Spec, Kan. Απ' αυτά, μεμονωμένες αποικίες αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες LB με τα ίδια αντιβιοτικά. Στη συνέχεια μικρή ποσότητα από κάθε υγρή καλλιέργεια επιστρώθηκε πάλι σε τρυβλίο LB-Rif, Spec, Kan για δεύτερο γύρο επιλογής. Επειδή τα πλασμίδια αυτά βρίσκονται σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων στο *Agrobacterium rhizogenes*, απαιτούνται μεγάλες ποσότητες καλλιέργειας για απομόνωση πλασμιδίου. Ανίχνευση των επιθυμητών πλασμιδίων θα μπορούσε να γίνει επίσης με colony PCR, αλλά η επιλογή με αντιβιοτικά κρίθηκε επαρκής για ανίχνευση των επιθυμητών βακτηρίων. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν τελικά διατηρήθηκαν σε τρυβλία LB με τα αντίστοιχα αντιβιοτικά και σε glycerol stocks.

Μετασχηματισμός-Hairy Root σε αρτίβλαστα *Lotus japonicus* μέσω του *A. rhizogenes*:

Εκβλάστηση σπερμάτων *Lotus japonicus* σειράς MG20 έγινε τραυματίζοντας ελαφρά το εξωτερικό περίβλημα με γυαλόχαρτο και αποστειρώνοντας τους σπόρους σε διάλυμα αποστείρωσης (2% v/v NaOCl, 0.02% Tween 20 σε dH₂O). Μετά από αρκετές πλύσεις με αποστειρωμένο dH₂O τα σπέρματα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri πάνω σε βρεγμένο διηθητικό χαρτί και αφέθηκαν να βλαστήσουν στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ημέρες. Έπειτα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (φως/σκοτάδι 16/8 h, 23°C) για 2 ακόμη μέρες.

Παράλληλα αναπτύχθηκαν σε τρυβλία LB-Rif, Spec, Kan τα επιθυμητά στελέχη *A. rhizogenes* (pCambia-AMY2.2/2.3, pUBI-AMY2.2/2.3 καθώς και στελέχη με τους μη ανασυνδυσμένους φορείς pCambia 1300 και pUBI-GWS-GFP ως μάρτυρες).

Τα αναπτυγμένα βακτήρια διαλύθηκαν σε 2-5ml απιονισμένου, dH₂O. Αρτίβλαστα μεγέθους 1-2cm τοποθετούνταν μέσα στο αιώρημα βακτηρίων και κοβόταν στο ύψος του υποκοτυλίου, έπειτα από 5-10' μεταφέρονταν σε τρυβλία με θρεπτικό B5, 0.8% άγαρ και τοποθετούνταν σε θάλαμο ανάπτυξης. Μετά από μία εβδομάδα συγκαλλιέργειας φυτών/βακτηρίων τα φυτά ξεπλένονταν σε διάλυμα Cefotaxime 300μg/ml για απομάκρυνση του *A. rhizogenes* και μεταφέρονταν σε νέο θρεπτικό B5, 0.8% άγαρ με 300μg/ml Cef για άλλη μια εβδομάδα. Ακολούθως τοποθετούνταν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο Jensen για τρίτη εβδομάδα ώστε ν' αναγεννηθούν πλήρως οι ρίζες.

Ανάπτυξη φυτών μετά την αναγέννηση του ριζικού συστήματος και δειγματοληψία:

Φυτά με αναγεννημένες ρίζες τοποθετούνταν σε υπόστρωμα βερμικουλίτη/περλίτη (1:1) μέσα σε θάλαμο ανάπτυξης με σταθερή φωτοπερίοδο 16h-φως/8h-σκοτάδι στα 300 μmol φωτονίων $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ στους 23°C. Το πότισμα των φυτών ξεκινούσε με θρεπτικό διάλυμα Hoagland 0.25x. Η συγκέντρωση του θρεπτικού αυξανόταν προοδευτικά μέχρι συγκέντρωσης Hoagland 1x. Τα φυτά ποτίζονταν εναλλάξ με θρεπτικό διάλυμα και νερό. Η ανάπτυξη των φυτών γινόταν σε σταθερές συνθήκες μέχρι την ολοκλήρωση των πειραμάτων. Κατά τη φύτευση τα φυτά μολύνονταν με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*, στέλεχος R7A, για επαγωγή φυματίων στο ριζικό σύστημα.

Δείγματα ριζικού ιστού λήφθηκαν στις 20 και τις 60 ημέρες μετά την τοποθέτηση των φυτών στο τελευταίο υπόστρωμα. Αφού απομακρυνόταν η μεγαλύτερη ποσότητα υποστρώματος, επαρκές τμήμα του ριζικού συστήματος κοβόταν σε δοχεία erppendorf των 1.5ml και τοποθετούνταν σε υγρό N_2 για μεταφορά στους -80°C, όπου αποθηκευόταν μέχρι τους μετέπειτα χειρισμούς.

Έλεγχος φθορισμού GFP σε δείγματα ριζών *L. japonicus*:

Δείγματα ριζικού ιστού από φυτά μολυσμένα με τους φορείς pUBI τοποθετήθηκαν σε erppendorf 1.5ml με 500 μl αποστειρωμένου dH_2O μέχρι τον έλεγχο στο μικροσκόπιο. Για τον έλεγχο τμήμα της ρίζας τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα με ελάχιστο νερό και σκεπαζόταν με αντίστοιχη καλυπτρίδα. Παρατήρηση φθορισμού GFP έγινε σε μικροσκόπιο Leica DM2000, σε μεγέθυνση 10x με διεγείρουσα ακτινοβολία UV. Φωτογραφίες λήφθηκαν με φωτογραφική συσκευή Leica DFC 490 συνδεδεμένη στο μικροσκόπιο και H/Y με το αντίστοιχο λογισμικό της Leica Microsystems.

PCR για ανίχνευση μετασχηματισμένων ριζών

Για την ανίχνευση μετασχηματισμένων ριζών διεξήχθη PCR με KapaTaq polymerase. Χρησιμοποιήθηκε αρχικά ο Forward εκκινητής για τις κατασκευές pCambia και ο Reverse για τις κατασκευές pUBI (πίνακας 1) μαζί με Reverse εκκινητή σχεδιασμένο μέσα στο ιντρόνιο κάθε φορέα. Για τον pHannibal η αλληλουχία είναι 5'-TTAGTCGAACATGAATAACAAGG-3', ενώ για το ιντρόνιο του pUBI η αλληλουχία είναι 5'-CCAATTAGTGATGATAATCTGTGTTTGATG-

3'. Σε όσες αντιδράσεις προέκυψε επιθυμητό προϊόν με αυτή την PCR έγινε και δεύτερη, χρησιμοποιώντας πάλι τον ίδιο εκκινητή κάθε κατασκευής μαζί με έναν Forward σχεδιασμένο μέσα στο ιντρόνιο κάθε φορέα. Οι αλληλουχίες αυτών των εκκινητών είναι, pHannibal Forward: 5'-TCAAACCAG CTAGAATTACTATTATG-3' και για τον pUBI forward: 5'-GAAGTCAG AACCTGCAAAACAATCC-3'. Το που χρησιμοποιήθηκε για τα ζεύγη AMY2.3 Forward,-pHannibal Reverse/Forward ήταν 55°C και για τα AMY2.2/3 Reverse-pUBIForward/Reverse ήταν 57°C.

Απομόνωση και καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων από δείγματα ριζικού ιστού:

Τα δείγματα λειοτριβούνταν σε υγρό άζωτο με χρήση αποστειρωμένων εμβόλων. Απομόνωση και καθαρισμός DNA έγινε με βάση το πρωτόκολλο CTAB. Απομόνωση ολικού RNA έγινε με RNA extraction kit (QIAGEN) και τις αντίστοιχες οδηγίες για φυτά μετασχηματισμένα με τους φορείς pCambia. Για φυτά μετασχηματισμένα με τους φορείς pUBI χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο απομόνωσης με LiCl κατά τους Brusslan and Tobin [53].

Σύνθεση cDNA και Real Time PCR:

Από φυτά με μετασχηματισμένες ρίζες έγινε απομόνωση ολικού RNA όπως περιγράφηκε στην αντίστοιχη παράγραφο. Τα δείγματα RNA υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με DNaseI (Takara Bio Inc) σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή για εξάλειψη υπολειμματικού DNA. Στη συνέχεια τα δείγματα καθαρίζονταν με την εφαρμογή της τεχνικής φαινόλη/χλωροφόρμιο. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η απουσία DNA, όλα τα υπό μελέτη δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο της Ubiquitine του *L. japonicus*.

Σύνθεση πρώτης αλυσίδας cDNA έγινε με “cDNA synthesis kit, Superscript II” (Invitrogen) χρησιμοποιώντας 1 μg ολικού RNA καθαρισμένο με την προηγούμενη μέθοδο και 500ng εκκινητή oligodT_{12-18mer} σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή. Ενίσχυση του cDNA για παρακολούθηση των επιπέδων έκφρασης του AMY2 έγινε με ημιποσοτική Real Time PCR χρησιμοποιώντας το “KAPA SYBER FAST Universal qPCR” kit της Kapa Biosystems με χρωστική αναφοράς ROX Low σύμφωνα με τις προτεινόμενες συνθήκες αντίδρασης σε συσκευή Mx3005P (ABI) της Stratagene. Έγινε κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA με βάση την έκφραση του γονιδίου *L. japonicus* Ubiquitin. Έπειτα κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε σε τρεις

ξεχωριστές αντιδράσεις με εκκινητές για το AMY2 και για το *L. japonicus* Ubiquitin (πίνακας 2) με το παρακάτω θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 95°C για 10', έπειτα 95°C 30'', 1' στους 58°C, 15'' στους 72°C για 45 κύκλους και τέλος 95°C για 1', 55°C για 30'' και 95°C για 30'', 3' στους 25°C. Τα δεδομένα φθορισμού που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων επεξεργάστηκαν με το λογισμικό LinRegPCR προκειμένου να προσδιοριστούν η απόδοση (efficiency) κάθε αντίδρασης και ο αριθμός των κύκλων ορίου (Ct), ο οποίος αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης πάνω από τους οποίους είναι δυνατή η ανίχνευση φθορισμού. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων κατά τους Livak και Schmittgen [51] για εύρεση της σχετικής έκφρασης του AMY2.

Σύμβολο εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
AMY2 Forward	5'-GCAGTTTAACTTGTAAGATAGC-3'
AMY2 Reverse	5'-GGCAACAAACCGACACTAAATAC-3'
LjUBI Forward	5'-TTAGTCGAACATGAATAAACAAGG-3'
LjUBI Reverse	5'-TCAAACCAGCTAGAATTACTATTATG-3'

Πίνακας 2: Εκκινητές για την αντίδραση της qReal-time-PCR.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

Κατασκευές σίγησης στους πλασμιδιακούς φορείς:

Χρησιμοποιώντας την τεχνική PCR και κατάλληλα σχεδιασμένους εκκινητές, ενισχύθηκαν οι επιθυμητές περιοχές του cDNA του γονιδίου AMY2. Τα τμήματα φαίνονται στην εικόνα 5. Ο λόγος που επιλέχθηκαν δύο επικαλυπτόμενα τμήματα είναι ότι το γονίδιο στόχος παρουσιάζει μεγάλη ομολογία στις υπόλοιπες περιοχές του με άλλα γονίδια OSCs του *L. japonicus* [19,20] και όπως προκύπτει από BLAST της αλληλουχίας AMY2 στη βάση δεδομένων του NCBI (δεν φαίνονται τ' αποτελέσματα), οπότε οι κατασκευές σίγησης θα προκαλούσαν σίγηση περισσότερων γονιδίων από το AMY2 [48].

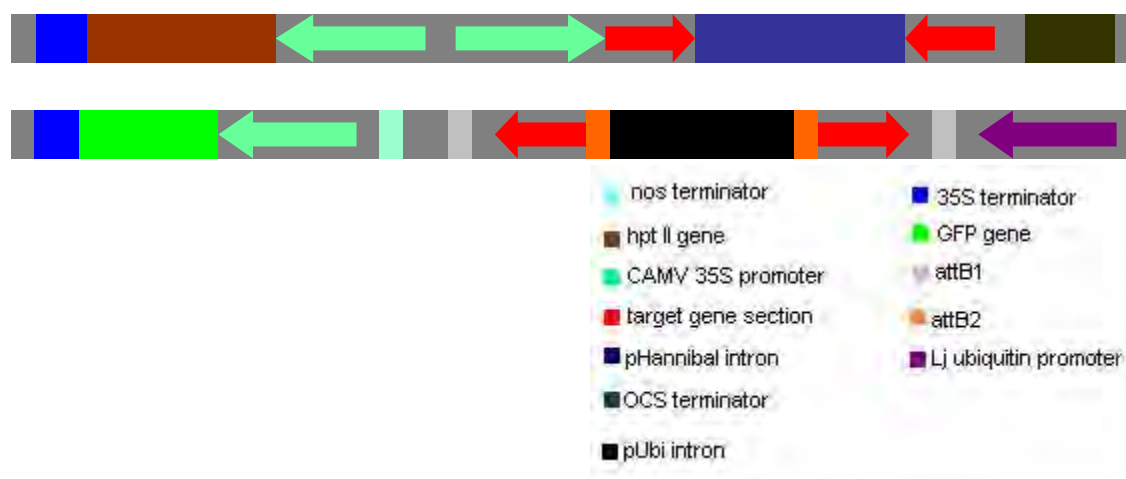


Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση του mRNA του AMY2, με τις περιοχές που επιλέχθηκαν για δημιουργία των κατασκευών σίγησης. Ροζ: AMY2.2, Πορτοκαλί: AMY2.3

Ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται στην αντίστοιχη παράγραφο των Μεθόδων προέκυψαν τέσσερις δυαδικοί φορείς για έκφραση RNA-φουρκέτας σε φυτικούς ιστούς. Οι δύο αποτελούνται από τη δομή έκφρασης φουρκέτας του pHannibal με τα τμήματα AMY2.2/3 ενσωματωμένα εκατέρωθεν του ιντρονίου με προσανατολισμό 5'-3' (σημαίνουσα φορά), ιντρόνιο, 3'-5' (αντί-σημαίνουσα φορά) (εικόνα 6, επάνω). Άλλες δύο κατασκευές δημιουργήθηκαν με χρήση της τεχνολογίας Gateway στον φορέα pUBI-GWS-GFP με τα τμήματα AMY2.2/3 ενσωματωμένα με προσανατολισμό 3'-5'(αντί-σημαίνουσα φορά), ιντρόνιο,5'-3' (σημαίνουσα φορά) (εικόνα 6, κάτω).

Εκτός από τις κατασκευές αυτές, στο T-DNA υπάρχουν γονίδια επιλογής ή γονίδια μάρτυρες για διευκόλυνση επιλογής των μετασχηματισμένων φυτικών κυττάρων. Το τρέχων μοντέλο για την μεταφορά του T-DNA προβλέπει ότι αυτό ενσωματώνεται πάντα πρώτα με το δεξί συνοριακό και έπειτα με το αριστερό, οπότε για να επιβεβαιωθεί η ενσωμάτωση ολόκληρου του T-DNA, τα γονίδια μάρτυρες/επιλογής τοποθετούνται δίπλα στο αριστερό συνοριακό και ακολουθεί η κατασκευή πιο κοντά στο δεξί συνοριακό.

Οι pCambia-AMY2.2 και pCambia-AMY2.3 που περιέχουν τα αντίστοιχα τμήματα του γονιδίου AMY2 στην κατασκευή RNA φουρκέτας φέρουν στο T-DNA, από το αριστερό προς το δεξί συνοριακό: Αριστερό συνοριακό, αλληλουχία τερματισμού CaMV35S, γονίδιο hptII (ανθεκτικότητα στην υδρομυκίνη), υποκινητής CaMV 35S. Με αντίθετη φορά πάλι τον υποκινητή CaMV 35S, AMY2.2/3 ενσωματωμένο με σημαίνουσα φορά, ιντρόνιο του pHannibal, AMY2.2/3 ενσωματωμένο με αντί-σημαίνουσα φορά, αλληλουχία τερματισμού OCS και το δεξί συνοριακό. Το T-DNA των pUBI-AMY2.2/3 περιέχει: Αριστερό συνοριακό, CaMV35S αλληλουχία τερματισμού, γονίδιο GFP, υποκινητής CaMV35S, αλληλουχία τερματισμού nos, attB1, AMY2.2/3 σημαίνουσα φορά, attB2, ιντρόνιο AtWRKY33, attB2, AMY2.2/3 αντί-σημαίνουσα φορά, attB1, υποκινητής LjUbiquitin μαζί με το πρώτο εξόνιο και ιντρόνιο του ίδιου γονιδίου, τέλος το δεξί συνοριακό. Στην εικόνα 6 φαίνονται διαγραμματικά τα τμήματα T-DNA των φορέων αυτών.



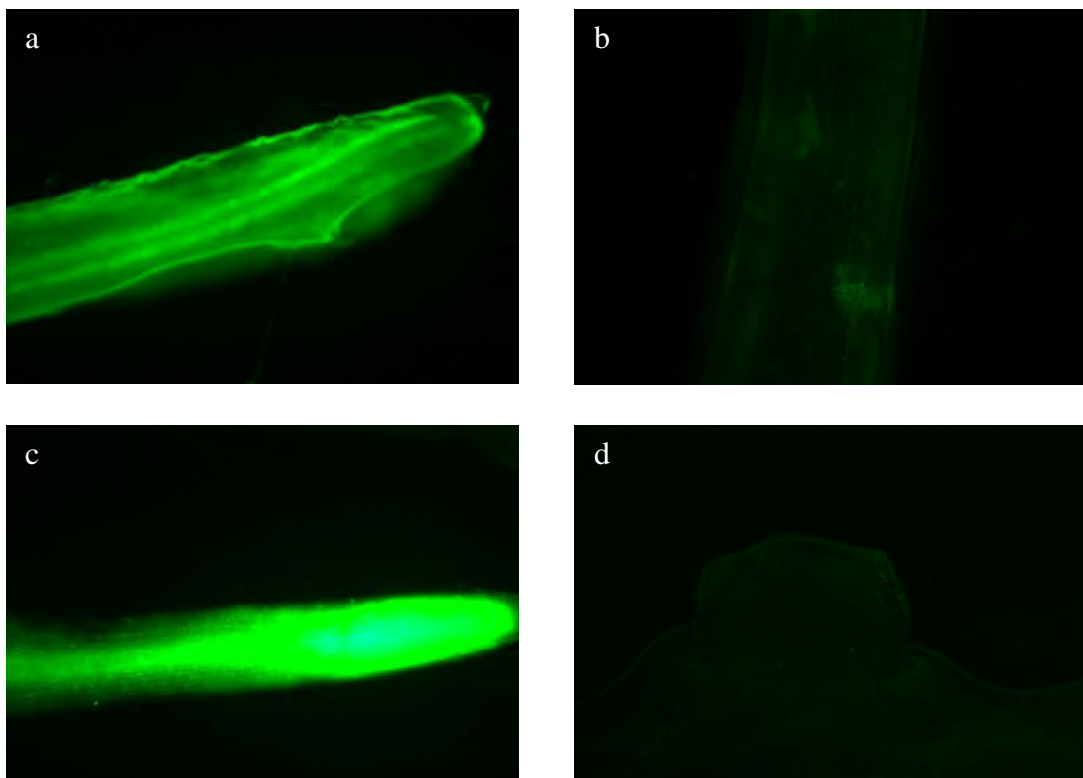
Εικόνα 6: Διαγραμματική απεικόνιση του T-DNA των φορέων pCambia (πάνω) και pUBI (κάτω) που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό Hairy Root. Απεικόνιση από το αριστερό προς το δεξί συνοριακό. Τα βέλη δείχνουν την φορά 5'...3' του mRNA που θα εκφραστεί, τα κόκκινα βέλη αντιπροσωπεύουν τα τμήματα του AMY2 με τη φορά 5'...3' του γονιδίου αυτού.

Έλεγχος μετασχηματισμού σε μολυσμένα φυτά:

Οι ρίζες φυτών που μετασχηματίστηκαν από το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes* παρουσίασαν τον φαινότυπο Hairy Root (εικόνα 7) λόγω των φυτο-ορμονών που συντίθενται από γονίδια του βακτηρίου. Ο φαινότυπος αυτός χαρακτηρίζεται από πολύ θυσανωτές, σγουρές και κοντότερες ρίζες σε σχέση με μη-μολυσμένα φυτά (βλέπε αντίστοιχο κεφάλαιο εισαγωγής).



Εικόνα 7: Ρίζα με φαινότυπο Hairy Root μετασχηματισμένη με *A. rhizogenes* (αριστερά) και μη μετασχηματισμένη ρίζα (δεξιά), σε φυτά *Lotus japonicus* 60 ημερών.



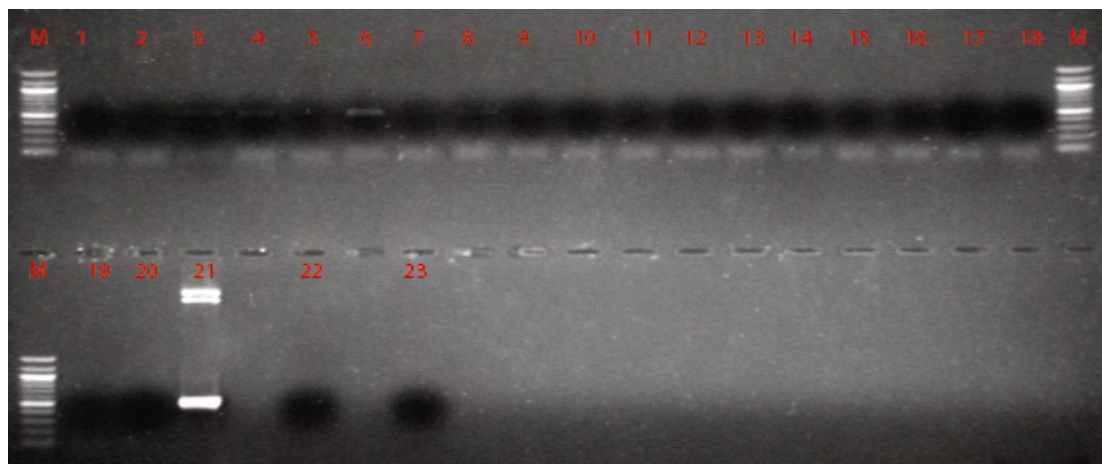
Εικόνα 8: Έλεγχος για φθορισμό GFP σε ρίζες φυτών μολυσμένων με *A. rhizogenes* που έφεραν τις κατασκευές pUBI. Ενδεικτικές φωτογραφίες: **a** και **c** θετικά μετασχηματισμένων ριζών, **b** και **d** μη μετασχηματισμένες. Διακρίνεται η έντονη διαφορά μεταξύ φθορισμού GFP και υποβάθρου.

Μετά τη δειγματοληψία του ριζικού ιστού, τα δείγματα φυτών που μολύνθηκαν με τις κατασκευές pUBI παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο για ανίχνευση φθορισμού GFP ώστε να επιλεγθούν θετικά μετασχηματισμένα φυτά. Ρίζες που έδειχναν φθορισμό πιο έντονο από μη μετασχηματισμένες ρίζες-μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση DNA και PCR για ανίχνευση των κατασκευών σίγησης. Στην εικόνα 8 φαίνονται δυο δείγματα φυτών που θεωρήθηκαν θετικά μετασχηματισμένα με βάση το φθορισμό GFP και δύο μη μετασχηματισμένα. Ακόμη και οι μη μετασχηματισμένες ρίζες παρουσιάζουν φθορισμό σε μικρό βαθμό, λόγω της παρουσίας φθοριζουσών ενώσεων στα κυτταρικά τοιχώματα (κυρίως φαινολικές ενώσεις της λιγνίνης). Ωστόσο ο φθορισμός GFP είναι πολύ πιο έντονος από το υπόβαθρο αυτό. Σε κάποιες ρίζες παρατηρήθηκε ενδιάμεσος φθορισμός, που μπορεί να οφείλεται, είτε στη θέση ενσωμάτωσης του T-DNA στο φυτικό γονιδίωμα πράγμα που επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων, είτε στο γεγονός ότι οι ρίζες αυτές ήταν χιμαιρικά μετασχηματισμένες με τις κατασκευές και δεν εκφράζανε όλα τα κύτταρα φθορισμό GFP [49]. Ωστόσο όλες οι ρίζες που εμφάνισαν φθορισμό πάνω από το υπόβαθρο των μη-μετασχηματισμένων φυτών θεωρήθηκαν θετικά μετασχηματισμένες και χρησιμοποιήθηκαν σε παρακάτω χειρισμούς.

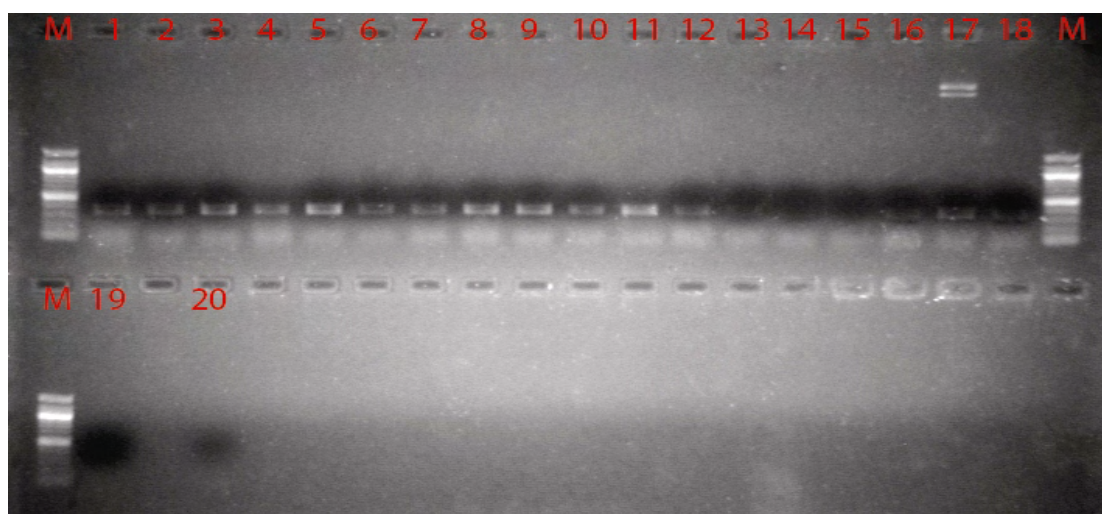
Έλεγχος μετασχηματισμού με PCR:

Δείγματα DNA από φυτά μολυσμένα με τις κατασκευές pCambia-AMY2.2/3 καθώς και από κάποια φυτά μολυσμένα με τις pUBI-AMY2.2/3, που έδειξαν φθορισμό GFP στον προηγούμενο έλεγχο, υποβλήθηκαν σε PCR για ανίχνευση των κατασκευών σίγησης (βλέπε αντίστοιχη παράγραφο μεθόδων). Στις εικόνες 9-10 φαίνονται κάποια αποτελέσματα των PCR σε δείγματα φυτών. Όσα φυτά έδωσαν το επιθυμητό προϊόν με αυτή τη μέθοδο θεωρήθηκαν θετικά μετασχηματισμένα με τις κατασκευές σίγησης. Συνολικά ελέγχθηκαν 60 φυτά μολυσμένα με την κατασκευή pCambia-AMY2.3 χρησιμοποιώντας τους εκκινητές AMY2.3 Forward και pHannibal Reverse (εικόνα 9), το αναμενόμενο προϊόν είναι περίπου 500bp. Όσα δείγματα ήταν θετικά μ' αυτή την PCR υποβλήθηκαν σε δεύτερη PCR με τους εκκινητές AMY2.3 Forward και pHannibal Forward με αναμενόμενο προϊόν περίπου 350bp (εικόνα 10). Εκτελώντας και τις δύο PCR ενισχύθηκαν σχεδόν ολόκληρες οι περιοχές που σχηματίζουν τη δομή φουρκέτας στο εκφραζόμενο μόριο RNA, επιβεβαιώνοντας την παρουσία της κατασκευής στο γενωμικό DNA των μετασχηματισμένων φυτών. Έτσι

για την κατασκευή pCambia-AMY2.3 προέκυψαν 15 φυτά θετικά και για τις δύο PCR (25% από συνολικά μολυσμένα φυτά).



Εικόνα 9: PCR σε δείγματα DNA από φυτά 20 ημερών μολυσμένα με την κατασκευή pCambia-AMY2.3 με τους εκκινητές AMY2.3 Forward και pHannibal Reverse σε πηκτή αгарόζης 1%. M: μάρτυρας μοριακού βάρους, 1-20 δείγματα, 21 θετικός μάρτυρας, 22, και 23 αρνητικοί μάρτυρες, διακρίνονται οι αναμενόμενες ζώνες 500bp στα δείγματα 3,4,6 και 8. Οι δύο ζώνες ψηλά στο 21 είναι το πλασμίδιο-μάρτυρας (pCambia-AMY2.3).



Εικόνα10: PCR σε δείγματα DNA από φυτά 20 ημερών μολυσμένα με την κατασκευή pCambia-AMY2.3 με τους εκκινητές AMY2.3 Forward και pHannibal Forward Σε πηκτή αгарόζης 1%. M: μάρτυρας μοριακού βάρους, 1-16,18 δείγματα, 17 θετικός μάρτυρας, 19,20 αρνητικοί μάρτυρες. Μόνο στα 14 και 15 δεν διακρίνεται προϊόν μεταξύ 300-400 bp.

Με την ίδια μέθοδο, χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών AMY2.2/3 Reverse-pUBII Reverse και AMY2.2/3 Reverse-pUBII Forward (δεν παρατίθενται τ' αποτελέσματα), προέκυψαν 24 φυτά θετικά για το pUBI-AMY2.3 από σύνολο 100 μολυσμένων φυτών και 19 φυτά θετικά για το pUBI-AMY2.2 από σύνολο 127 μολυσμένων φυτών. Σημειώνεται ότι τα φυτά μολυσμένα με τις κατασκευές pUBI που ελέγχθηκαν με PCR ήταν θετικά και για φθορισμό GFP. Ενδέχεται κάποια φυτά που δεν έδειχναν φθορισμό να ήταν μετασηματισμένα με τις κατασκευές [49],

ωστόσο κρίθηκε ότι δεν ήταν απαραίτητος ο εντοπισμός τους για τις ανάγκες του πειράματος. Επίσης έγινε έλεγχος μετασχηματισμού σε 31 φυτά-μάρτυρες που μολύνθηκαν με μη ανασυνδυασμένο φορέα pUBI-GWS-GFP. Όμως, επειδή με έλεγχο GFP και PCR ανιχνεύθηκαν μόνο 2 θετικά μετασχηματισμένα φυτά, στους παρακάτω χειρισμούς χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και φυτά αγρίου τύπου (δηλαδή φυτά που είχαν μολυνθεί με κάποιο στέλεχος *A. rhizogenes* αλλά έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα στην PCR και δεν έδειχναν φθορισμό GFP). Για φυτά μετασχηματισμένα με του φορείς pCambia1300 και pCambia-AMY2.2 δεν προσδιορίστηκε ο αριθμός θετικών μετασχηματισμών λόγω προβλημάτων κατά την διαδικασία ανίχνευσης.

Το ποσοστό μετασχηματισμού που παρατηρήθηκε για όλες τις κατασκευές (βλέπε πίνακα 3) ήταν αρκετά χαμηλότερο από αυτό που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (~50%) για την ίδια μέθοδο [49].

Κατασκευή	Αριθμός Φυτών μετασχηματισμένα/μολυσμένα	Ποσοστό % μετασχηματισμένων φυτών
pCambia1300	n/a	n/a
pCambia-AMY2.2	n/a	n/a
pCambia-AMY2.3	15/60	25.0
pUBI-GWS-GFP	2/31	06.7
pUBI-AMY2.2	19/127	15.0
pUBI-AMY2.3	24/100	24.0

Πίνακας 3: Ποσοστό θετικών μετασχηματισμών για κάθε κατασκευή με βάση το συνολικό αριθμό φυτών που μολύνθηκαν με *A. rhizogenes*. n/a: not available (δεν συλλέχθηκαν στοιχεία).

Έλεγχος έκφρασης του AMY2 σε μετασχηματισμένες ρίζες:

Ριζικός ιστός από θετικά μετασχηματισμένα φυτά και φυτά μάρτυρες ηλικίας 20 και 60 ημερών χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση ολικού RNA. Από αυτό έγινε σύνθεση cDNA το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε ημιποσοτική Real Time PCR για παρατήρηση των επιπέδων έκφρασης του AMY2 σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς LjUbiquitin [52]. Με βάση τη Real Time PCR προέκυψαν θετικά μετασχηματισμένα φυτά με έκφραση του γονιδίου AMY2 πολύ χαμηλότερη από φυτά μάρτυρες (εικόνα 11). Τα δείγματα 166 και 199 έχουν σχετική έκφραση κάτω από 0.005, ενώ το 150 έχει σχετική έκφραση 0.018, λίγο μικρότερη από τα φυτά μάρτυρες C131, C138 (μετασχηματισμένα με pUBI-GWS-GFP). Ομοίως ανιχνεύθηκαν δύο φυτά μετασχηματισμένα με την κατασκευή pUBI-AMY2.3 τα οποία εμφάνισαν πλήρη σίγηση του AMY2 (εικόνα 12, δείγματα 54 και 112). Η

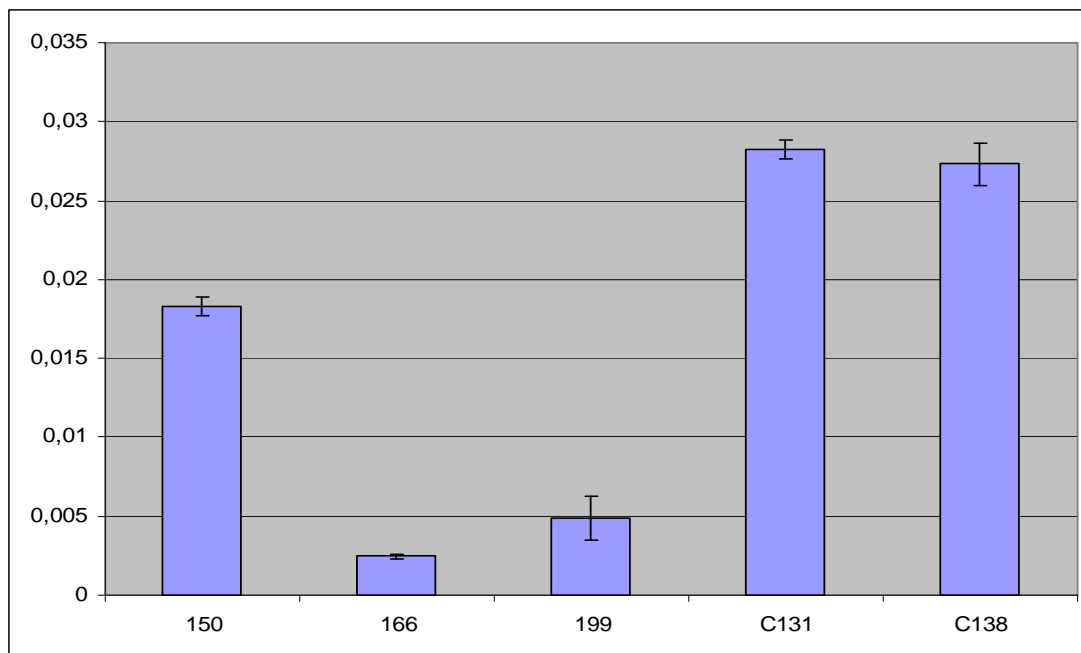
διαφορά έκφρασης του γονιδίου μεταξύ μετασχηματισμένων φυτών και φυτών μαρτύρων αποδόθηκε στη δράση της ενσωματωμένης κασέτας έκφρασης RNA φουρκέτας. Μερική σίγηση του γονιδίου AMY2 καθώς και φθορισμός GFP ήταν ανιχνεύσιμα ακόμη και στις 60 ημέρες μετά την πλήρη αναγέννηση των μετασχηματισμένων ριζών (δεν φαίνονται τ' αποτελέσματα).

Η κατασκευή pCambia-AMY2.3 δεν φαίνεται να προκάλεσε σίγηση του AMY2 παρά το γεγονός ότι ανιχνεύθηκε η ενσωματωμένη κασέτα σίγησης σε ρίζες φυτών 20 ημερών (δεδομένα που δεν παρατίθενται). Ο λόγος για τον οποίο δεν ανιχνεύθηκε σίγηση στην προκειμένη περίπτωση δεν εξακριβώθηκε, ωστόσο μπορεί να οφείλεται σε τεχνικό σφάλμα κατά την επεξεργασία των δειγμάτων, στο μικρό αριθμό μετασχηματισμένων φυτών που ελέγχθηκαν ή σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης της κατασκευής στους φυτικούς ιστούς.

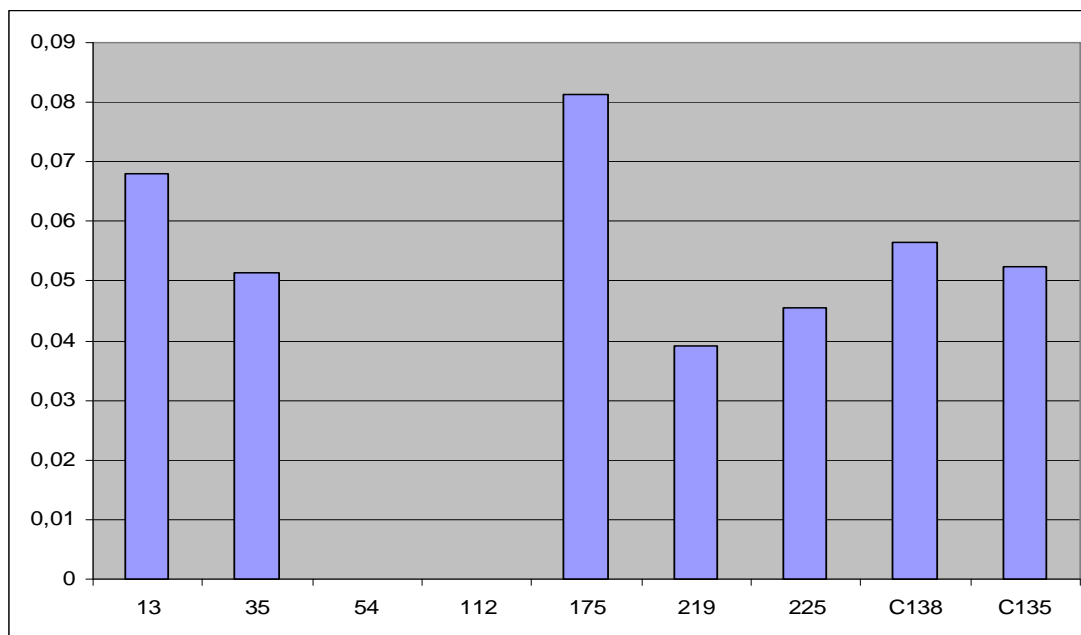
Η συχνότητα σίγησης σε φυτά μετασχηματισμένα με τις κατασκευές pUBI-AMY2.2/3 φαίνεται παρακάτω (πίνακας 4). Το μεγαλύτερο ποσοστό σίγησης φαίνεται να προκάλεσε η κατασκευή pUBI-AMY2. Όμως και στα τέσσερα αυτά φυτά προέκυψε μερική σίγηση, σε αντίθεση με την κατασκευή pUBI-AMY2.3 η οποία προκάλεσε πλήρη σίγηση σε δύο φυτά ενώ δεν ανιχνεύθηκαν φυτά μετασχηματισμένα μ' αυτή την κατασκευή που να εμφάνισαν μερική σίγηση. Κάποια δείγματα θετικά μετασχηματισμένων φυτών ήταν πολύ αραιά για να χρησιμοποιηθούν σε Real Time PCR για προσδιορισμό της έκφρασης του AMY2. Οι συχνότητες στον παρακάτω πίνακα είναι με βάση τον συνολικό αριθμό φυτών που ελέγχθηκαν και όχι με το σύνολο των μετασχηματισμένων φυτών.

Κατασκευή σίγησης	Φυτά με σίγηση/ μετασχηματισμένα % (πραγματικές τιμές)	Φυτά με σίγηση/μολυσμένα % (πραγματικές τιμές)
pUBI-AMY2.2	30.7(4/13)	3.14 (4/127)
pUBI-AMY2.3	14.3(2/14)	2.00 (2/100)

Πίνακας 4: Συχνότητα σίγησης με βάση τον αριθμό φυτών που μετασχηματίστηκαν/μολύνθηκαν με κάθε κατασκευή pUBI

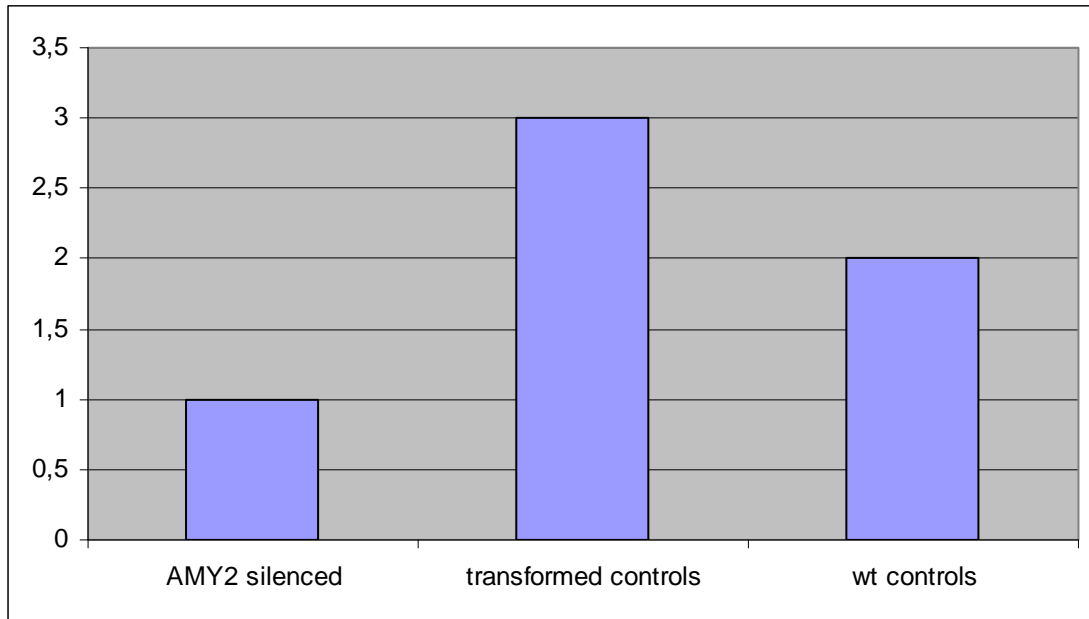


Εικόνα 11: Σχετική έκφραση του γονιδίου AMY2 σε ρίζες 20 ημερών: μετασχηματισμένες με την κατασκευή pUBI-AMY2.2 (150, 166, 199) και μετασχηματισμένες με τον μη-ανασυνδασμένο pUBI-GWS-GFP (C131, C138) όπως προκύπτει από Real Time PCR χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς την LjUbiquitin.



Εικόνα 12: Σχετική έκφραση του γονιδίου AMY2 σε ρίζες 20 ημερών: μετασχηματισμένες με την κατασκευή pUBI-AMY2.3 (13, 35, 54, 112), pUBI-AMY2.2 (175, 219, 225), τον μη ανασυνδασμένο pUBI-GWS-GFP (C138) και το αγρίον τύπου (C135), όπως προκύπτει από Real Time PCR χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς την LjUbiquitin.. Είναι φανερή η απουσία έκφρασης στα φυτά 54 και 112.

Επίδραση της σίγησης του AMY2 στο σχηματισμό φυματίων:



Εικόνα 13: Μέσος αριθμός φυματίων σε φυτά με σίγηση του γονιδίου AMY2 σε σχέση με φυτά-μάρτυρες μετασχηματισμένα με τον pUBI-GWS-GFP (transformed controls) και φυτά αγρίου τύπου (wt controls). Χρησιμοποιείται ο μέσος αριθμός φυματίων στρογγυλοποιημένος προς τον κοντινότερο ακέραιο.

Σε φυτά με σίγηση του AMY2 δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές φαινοτυπικές διαφορές (οπτικά τουλάχιστον) σε σχέση με μετασχηματισμένα φυτά μάρτυρες.

Ωστόσο, έγινε καταμέτρηση του αριθμού φυματίων σε φυτά μολυσμένα με όλες τις κατασκευές και συγκρίθηκε με τον αριθμό φυματίων σε φυτά μάρτυρες. Από τη σύγκριση αυτή προκύπτει ότι φυτά με σίγηση (πλήρη ή μερική) του AMY2 έχουν μικρότερο μέσο αριθμό φυματίων απ' ότι φυτά μάρτυρες-μετασχηματισμένα με τον pUBI-GWS-GFP ή από φυτά αγρίου τύπου. Στην εικόνα 13 φαίνεται ο μέσος όρος του αριθμού φυματίων σε κάθε κατηγορία φυτών, με σίγηση (πλήρη ή μερική του AMY2), φυτά μάρτυρες μετασχηματισμένα με pUBI-GWS-GFP και φυτά αγρίου τύπου. Όμως, τα δεδομένα αυτά δεν είναι επαρκή για τη διεξαγωγή απόλυτου συμπεράσματος, διότι η τυπική απόκλιση του αριθμού φυματίων είναι ιδιαίτερα μεγάλη και για τις τρεις κατηγορίες φυτών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ:

Συμπεράσματα:

Χρησιμοποιώντας κλασικές τεχνικές κλωνοποίησης και την τεχνολογία Gateway κατασκευάστηκαν τέσσερις φορείς έκφρασης RNA φουρκέτας σε φυτικούς ιστούς που στοχεύουν το γονίδιο AMY2 οι οποίες εισήχθηκαν σε ρίζες φυτών *Lotus japonicus*. Σε όλες τις περιπτώσεις οι κατασκευές ανιχνεύθηκαν στο γενωμικό DNA των φυτών σε αρκετά καλή συχνότητα (αν και όχι όσο υψηλή αναφέρεται βιβλιογραφικά), εξαιρουμένου του pUBI-GWS-GFP το οποίο έδωσε συχνότητα μετασχηματισμού 6.0%. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι μολύνθηκαν πολύ λιγότερα φυτά απ' ό,τι με τις υπόλοιπες κατασκευές, αλλά και στο ότι κάποιες αναγεννημένες ρίζες από μετασχηματισμένα φυτά είναι αγρίου τύπου, οπότε δεν ανιχνεύθηκαν υπάρχοντες μετασχηματισμοί κατά τον έλεγχο, αφού δεν έγινε απομόνωση ολόκληρου του ριζικού συστήματος

Από τις τέσσερις κατασκευές Για την κατασκευή pUBI-AMY2.3 προέκυψαν μόνο δύο φυτά με πλήρη σίγηση. Σχεδόν πλήρης σίγηση ανιχνεύθηκε σε τουλάχιστον τρία φυτά μετασχηματισμένα με την κατασκευή pUBI-AMY2.2, ενώ άλλο ένα εμφάνιζε μερική σίγηση του AMY2 σε σχέση με φυτά μάρτυρες. Υπάρχουν δυο προφανείς λόγοι για τους οποίους δεν εμφάνισε και αυτό σίγηση στον ίδιο βαθμό. Η μία περίπτωση είναι ότι η κατασκευή δεν εκφράζεται σε αρκετά υψηλό βαθμό ώστε να προκαλέσει σίγηση, λόγω της θέσης στην οποία ενσωματώθηκε στο γενωμικό DNA. Εναλλακτικά ενδέχεται η ρίζα του συγκεκριμένου φυτού να είναι χιμαιρική, οπότε απαρτίζεται από κύτταρα στα οποία έχει ενσωματωθεί η κασέτα και από κύτταρα αγρίου τύπου, έτσι το mRNA του AMY2 ανιχνεύεται διότι αυτό εκφράζεται στα κύτταρα αγρίου τύπου αλλά όχι στα επίπεδα των φυτών μαρτύρων. Η επίδραση της ενσωματωμένης κατασκευής pUBI-AMY2.2 καθώς και ο φθορισμός GFP ανιχνεύονται ακόμα και στις 60 ημέρες υποδηλώνοντας σταθερή έκφραση της κασέτας στα φυτικά κύτταρα.

Επιπλέον πολύ λίγα μετασχηματισμένα φυτά παρουσίασαν μείωση των επιπέδων του AMY2. Η συχνότητα της σίγησης για τις κατασκευές ήταν 30,7 και 14,3% για φυτά μετασχηματισμένα με τους φορείς pUBI-AMY2.2 και 2.3 αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές είναι αρκετά χαμηλότερες από αυτές που αναφέρονται βιβλιογραφικά [43, 49]. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον μικρό αριθμό μετασχηματισμένων φυτών που ελέγχθηκαν, αλλά και σε χαμηλή λειτουργικότητα των κατασκευών. Γενικά

προτείνεται το στέλεχος της δομή φουρκέτας ν' αποτελείται από τμήμα του ORF στόχου μεγαλύτερο των 300bp [48]. Εδώ χρησιμοποιήθηκαν δύο πολύ μικρότερα τμήματα, 194 και 217bp για τα AMY2.2/3 αντίστοιχα. Πρακτικά δεν μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες περιοχές του AMY2 λόγω υψηλής ομοιότητας με άλλα γονίδια του *L. japonicus*. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα είναι δύσκολο να ειπωθεί πια κατασκευή λειτουργεί καλύτερα. Δεδομένου ότι η κατασκευή pUBI-AMY2.2 έδωσε φυτά με μερική σίγηση σε μεγαλύτερη συχνότητα από την pUBI-AMY2.3. Όμως η τελευταία έδωσε φυτά με πλήρη σίγηση.

Ακόμη, σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται ότι η σίγηση του AMY2 επιδρά στο σχηματισμό φυματίων, καθώς θετικά μετασχηματισμένα φυτά είχαν λιγότερα φυμάτια από τα υπόλοιπα στις 20 ημέρες. Όμως, επειδή ο αριθμός των θετικά μετασχηματισμένων φυτών δεν ήταν αρκετά μεγάλος, αλλά και λόγω του τρόπου με τον οποίο διεξήχθησαν οι πειραματικοί χειρισμοί δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα. Κρίνεται απαραίτητη η δημιουργία περισσότερων φυτών με σίγηση του AMY2 στα οποία θα παρακολουθείται ο αριθμός φυματίων και η μορφολογία τους καθ' όλη τη διάρκεια βιογένεσής τους ώστε να προκύψουν ολοκληρωμένα συμπεράσματα για τη συμμετοχή του AMY2 σ' αυτές τις διαδικασίες.

Παρά το χαμηλό αριθμό μετασχηματισμένων φυτών με επιτυχή σίγηση του AMY2, τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν ότι τουλάχιστον δύο από τις κατασκευές σίγησης δουλεύουν επιτυχώς και μπορεί να χρησιμοποιηθούν σ' επόμενα πειράματα για το χαρακτηρισμό του γονιδίου αυτού στο *Lotus japonicus*. Επίσης λήφθηκαν ορισμένα προκαταρκτικά αποτελέσματα τα οποία μπορεί χρησιμοποιηθούν για βελτίωση του σχεδιασμού περαιτέρω πειραμάτων που θα διευκρινίσουν το ρόλο του γονιδίου αυτού στην ανάπτυξη και λειτουργία της ρίζας.

Μελλοντικά πειράματα:

Η κατασκευή pCambia AMY2.3 είδη χρησιμοποιείται για τη δημιουργία σταθερών διαγονιδιακών σειρών *L. japonicus* με σίγηση του AMY2, που θα χρησιμοποιηθούν σε πειράματα ανάλυσης περιεχόμενων μεταβολιτών και αλληλεπίδρασης φυτών με ριζοβιακούς ή παθογόνους μικροοργανισμούς.

Ο καλύτερος από τους δυο φορείς (pUBI-AMY2.3) θα χρησιμοποιηθεί για επανάληψη του πειράματος, στη διάρκεια του οποίου θα παρακολουθηθεί ο αριθμός και η λειτουργικότητα των φυματίων καθ' όλη τη διάρκεια βιογένεσής τους.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Χωρίς τη βοήθεια και τη στήριξη πολλών ανθρώπων γύρω μου, η εργασία αυτή θα ήταν αδύνατη για μένα. Ως εκ τούτου θεωρώ πρόπον, ως ελάχιστη αναγνώριση χρέους, να τους ευχαριστήσω εδώ για ό,τι έκαναν, ο καθένας με τον τρόπο του.

Ξεκινώντας από τους συνεργάτες και εκπαιδευτές μου: Ευχαριστώ την Αφροδίτη για την πολύτιμη βοήθειά της, ιδίως τον πρώτο καιρό όταν πραγματικά έκανε babysitting. Το ίδιο ισχύει και για τον Κώστα, για την βοήθειά του με τις Real Time PCR, την ανάλυση των αποτελεσμάτων, αλλά και για το ότι ήταν πάντα πρόθυμος ν' απαντήσει τις ενδεχομένως ενοχλητικές και πολύ συχνές απορίες μου. Ήταν καλύτερος από οποιοδήποτε εργαστηριακό οδηγό και έδωσε πολλές λύσεις σε σημεία που ένιωθα ότι είχα κολλήσει. Εάν δούλευα μόνος μου δεν θα είχα τελειώσει ούτε τα μισά πειράματα. Ευχαριστώ ξανά και τους δύο για όλα. Ελπίζω να μην σας έκανα τη ζωή πολύ δύσκολη.

Πολλές ευχαριστίες επίσης χρωστάω σ' όλους τους διδάσκοντες του τμήματος την περίοδο των σπουδών μου, διότι, αφ' ενός, μου δώσανε τις γνώσεις ώστε να μπορέσω να παρακολουθήσω και να εκτελέσω αυτή την εργασία και, αφ' ετέρου, μου προκάλεσαν το ενδιαφέρον και την επιθυμία να μάθω περισσότερα.

Πρέπει να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Ιωάννα για αρκετές συμβουλές και μαζί με την Chiara για το πλούσιο humor που διαθέτουν. Έκαναν πολλές ώρες στο εργαστήριο να περάσουν ευχάριστα και με στήριζαν ψυχολογικά όταν κατάφερα να θαλασσώσω τα πειράματά μου ή όταν απλά ένιωθα καταπτοημένος από τις αποτυχίες. Αξίζουν ένα επιπλέον ευχαριστώ για τα συχνά coffee breaks/trips, ιδίως εκ' μέρους της τσέπης μου που ελάφρυνε κατά πολύ εξαιτίας τους. Τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τη Δήμητρα, τη Δάφνη, τον Παναγιώτη, την Κωνσταντίνα ευχαριστώ για τη βοήθειά που μου δώσανε κυρίως με τεχνικά και πρακτικά θέματα.

Όλους τους παραπάνω, καθώς και τα μέλη των υπολοίπων εργαστηρίων με τα οποία συστεγαζόμασταν τον τελευταίο ενάμιση χρόνο, τους ευχαριστώ εκ βαθέων γιατί μέχρι τότε είχα μόνο ακούσει για το Vietnam. Συνεισέφεραν κατά πολύ στο ν' αναπτύξω βασικές τεχνικές επιβίωσης σε μία εμπόλεμη ζώνη και στο ν' αποκτήσω διπλωματικές δεξιότητες. Αυτό δεν είναι απλώς ένα Ακαδημαϊκό όφελος, αλλά κέρδος ζωής.

Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στην οικογένειά μου. Στους γονείς και τα' αδέρφια μου για την ψυχολογική υποστήριξη και την υπομονή που έδειχναν με το ν' ακούν τα

προβλήματά μου παρά το ότι συνήθως δεν τα καταλάβαιναν. Καθώς επίσης και στη γραφική γιαγιά μου Χαρίκλεια η οποία επιμένει ότι πάω χαμένος με το ν' ασχολούμαι με «άχρηστα βότανα» αντί να «βρω κάνα φάρμακο» ή να « γένω γιατρός».

Τελευταία και πάνω απ' όλους, κατά το ρητό, «τό ζῆν ὀφείλω εἰς τόν πατέρα μου, τό εὔ ζῆν εἰς τόν διδάσκαλόν μου», θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου. Κυρία Πόπη, ευχαριστώ για όλα: τις εργασίες στα μαθήματα της φυσιολογίας και βιοτεχνολογίας φυτών οι οποίες καλλιέργησαν το ενδιαφέρον μου για τις επιστήμες φυτών, την ευκαιρία να ξεκινήσω την πτυχιακή μου εργασία και την εργαστηριακή μου εκπαίδευση ένα χρόνο πριν από τους συναδέλφους μου, τον χρόνο τον οποίο αφιερώσατε για ν' ακούσετε τους προβληματισμούς μου, την φροντίδα με την οποία με συμβουλευάτε κάθε φορά που το χρειαζόμουν. Ευχαριστώ για την υπομονή που δείξατε με τα λάθη και τις απροσεξίες μου, αλλά και για την ευκαιρία που μου δώσατε να τα κάνω. Μπορεί να μην κατάφερα κάτι θεαματικό ή ουσιαστικό, αλλά απόκτησα αρχικές εμπειρίες που θα με βοηθήσουν σε μια, ευελπιστώ μακρά, σταδιοδρομία στον τομέα της βιολογίας φυτών, αλλά και στη ζωή μου γενικά. Ελπίζω να κρατήσατε κάποιες αντοχές γιατί... I still need a mentor, if you can put up with me any more.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΤΗΜΑ 1: ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

1) Ενίσχυση Ακολουθιών mRNA με τη χρήση της τεχνικής PCR πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR)

Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι μία εναλλακτική μέθοδος λογαριθμικής ενίσχυσης και ημι-ποσοτικού προσδιορισμού αλληλουχιών DNA/cDNA. Σε αντίθεση με την κλασική μέθοδο PCR, δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθ' όλη τη διάρκεια που λαμβάνει χώρα, σε πραγματικό χρόνο. Παρουσία της φθορίζουσας χρωστική Syber Green (Stratagene), η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεσή της στα δίκλινα μόρια του DNA ελέγχονται τα επίπεδα του φθορισμού (άρα και ο αριθμός των μορίων DNA) στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης PCR. Τα δεδομένα φθορισμού που συλλέγονται μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της απόδοσης της PCR και για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης γονιδίων.

Η δημιουργία της πρώτης αλυσίδας cDNA πραγματοποιήθηκε με τη μεταγραφή 1 μg ολικού RNA ακολουθώντας τη διαδικασία:

1. Αποδιάταξη του RNA στους 65°C για 5 ' και άμεση μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο.
2. Προσθήκη 12 μl μίγματος αντίδρασης, το οποίο περιέχει 500 ng oligo(dT)_{12-18mer} και 1 μl of 10 mM dNTPs.
3. Προσθήκη 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης (5x First-strand buffer).
4. Προσθήκη 1 μl (5 units) αναστολέα RNAσών.
5. Προσθήκη 2 μl DTT 0.1 M.
6. Προθέρμανση των δειγμάτων στους 42°C για 2 '.
7. Προσθήκη 1 μl (200 U) της αντίστροφης μεταγραφάσης (SuperScript II, Invitrogen).
8. Επώαση των δειγμάτων στους 42°C για 50 '.
9. Απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 70° C για 15 '.

Η ενίσχυση των cDNA πραγματοποιήθηκε με qRT-PCR kit (Kapa Biosystems) χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές, όπως περιγράφηκε

προηγουμένως στην αντίστοιχη παράγραφο των μεθόδων. Δεδομένα φθορισμού εισήχθησαν στο πρόγραμμα LineReg PCR, υπολογίστηκε η απόδοση (E) από την κλίση της εφαπτομένης της καμπύλης φθορισμού κάθε αντίδρασης. Για κάθε δείγμα η αντίδραση έγινε εις τριπλούν, για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος σχετικής έκφρασης των τριών επαναλήψεων. Ο προσδιορισμός της σχετικής έκφρασης έγινε κατά τους Livak και Schmittgen [51].

II) Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *E.coli* ικανών για μετασχηματισμό με πλασμιδιακό DNA (competent cells)

Αρχή της μεθόδου:

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να εισαχθούν σε εργαστηριακά στελέχη βακτηρίων επιθυμητά πλασμίδια, έτσι ώστε πολλαπλασιαζόμενα τα βακτηριακά κύτταρα να παράγουν σε μεγάλη ποσότητα το πλασμίδιο. Στηρίζεται στην φυσική διεργασία του βακτηριακού μετασχηματισμού κατά την οποία ελεύθερα μόρια DNA μπορούν να εισαχθούν στο βακτηριακό κύτταρο. Μόνο συγκεκριμένα γένη βακτηρίων (όπως τα *Streptococcus* και *Haemophilus*) τα οποία εκφράζουν γονίδια ετοιμότητας είναι σε θέση να προσλάβουν εξωγενές, «γυμνό» DNA και να το εκφράζουν στην συνέχεια. Άλλα βακτήρια μπορούν να επαχθούν τεχνητά σε κατάσταση ετοιμότητας με την έκθεση τους σε υψηλές συγκεντρώσεις δισθενών κατιόντων.

Πρωτόκολλο:

- 1) Ενοφθάμιση σε 200 ml LB 2 ml καλλιέργειας βακτηρίων *E.coli DH5a*
- 2) Ανάπτυξη της καλλιέργειας στους 37⁰C μέχρι OD₆₀₀=0,2-0,3
- 3) Τοποθέτηση σε πάγο και φυγοκέντρηση στους 6.000 rpm για 10 '(4⁰C) (Όλοι οι επόμενοι χειρισμοί γίνονται σε πάγο)
- 4) Επαναδιάλυση του ιζήματος με 10 ml CaCl₂ 25mM
- 5) Φυγοκέντρηση για 10 ' στους 6.000 rpm(+4⁰C)
- 6) Επαναδιάλυση σε 5 ml CaCl₂ 75mM
- 7) Τοποθέτηση στον πάγο για 20 '
- 8) Φυγοκέντρηση για 10 ' στους 6.000 rpm(+4⁰C)
- 9) Επαναδιάλυση με 9,6 ml CaCl₂ 0,1M ,ανάδευση και μετά προσθήκη 2,4 ml γλυκερόλης

Τα δεκτικά κύτταρα διατηρούνται για μελλοντική χρήση στους -80⁰C

III) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* για εισαγωγή πλασμιδιακού DNA (Heat shock method)

Αρχή της μεθόδου:

Τα δεκτικά κύτταρα που βρίσκονται σε υποτονικό διάλυμα CaCl_2 , είναι σε μορφή σφαιροπλαστών, καθώς νερό διέρχεται από τον εξωκυττάριο χώρο προς αυτά. Με την προσθήκη DNA, σχηματίζεται ένα σύμπλοκο φωσφορικού υδροξυλίου του ασβεστίου που είναι ανθεκτικό στην δράση DNAσών. Το σύμπλοκο αυτό προσκολλάται στην επιφάνεια των σφαιροπλαστών. Με σύντομη έκθεση των κυττάρων στους 42°C , τα βακτηριακά τοιχώματα γίνονται παροδικά διαπερατά και προσλαμβάνουν το σύμπλοκο. Μετά από επώαση των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα επανακάμπτουν και αναπτύσσουν την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό που τους προσδίδει το νεοεισαχθέν πλασμίδιο.

Υλικά:

Διάλυμα 100 mM IPTG: 0,238g IPTG(isopropyl β -D-thiogalactopyranoside) διαλύονται σε 10 ml H_2O . Το διάλυμα αποστειρώθηκε με φιλτράρισμα(0,22 μm , Whatman) και φυλάσσεται στους $+4^\circ\text{C}$

Διάλυμα 2% X-Gal: 0,02g X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase) προστέθηκαν σε 1 ml διμεθυλ-φορμαμίδιου. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C

Πρωτόκολλο:

- 1) Ξεπάγωμα δεκτικών κυττάρων στον πάγο
- 2) Προσθήκη σε 60 μl δεκτικών κυττάρων 2 μl πλασμιδίου. Τοποθέτηση στον πάγο για 30 ‘
- 3) Θέρμανση στους 42°C για 50’ . Τοποθέτηση στον πάγο για 2 ‘.
- 4) Προσθήκη 200 μl LB.
- 5) Επώαση στους 37°C για 1 h.
- 6) Στρώσιμο 50 μl X-Gal, 10 μl IPTG σε τρυβλίο LB με ανάλογο αντιβιοτικό (Το βήμα αυτό εφαρμόζεται μόνο για φορείς που περιέχουν το MCS εντός lacZ γονιδίου).
- 7) Επίστρωση των κυττάρων στο τρυβλίο
- 8) Ανάπτυξη των βακτηρίων στους 37°C overnight (12-16 h).

IV) Απομόνωση πλασμιδίου από υγρή καλλιέργεια *E.coli* με την μέθοδο του βρασμού (Boiling prep)

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιούνται κατά κόρον από τους ερευνητές πριν την αυτοματοποιημένη απομόνωση πλασμιδίου από βακτήρια με kit. Οδηγεί στην απομόνωση του πλασμιδίου που όμως περιέχει και ποσότητα RNA, καθώς διέρχεται και αυτό από τους πόρους που δημιουργεί η λυσοζύμη στο βακτηριακό τοίχωμα. Για τον λόγο αυτό απαιτείται η κατεργασία του απομονωμένου πλασμιδίου με RNase. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση πλασμιδίων από μεγάλο αριθμών διαφορετικών κλώνων μετά από μετασχηματισμό, για ανίχνευση επιθυμητών κλώνων. Στηρίζεται στην ικανότητα της λυσοζύμης να διασπά τον β-1,4 γλυκοσιδικό δεσμό της πεπτιδογλυκάνης του βακτηριακού τοιχώματος και να δημιουργεί μικρούς πόρους από τους οποίους διέρχεται το πλασμίδιο όχι όμως το χρωμοσωμικό DNA.

Υλικά:

STET Buffer (SUCROSE-TRITON-EDTA- TRIS) pH=8,0

8% sucrose

0,5% Triton X-100

50 mM EDTA

10 mM Tris

lysozyme 50 mg/ml

Χρήση βακτηριακής καλλιέργειας (η οποία έχει προκύψει από εμβολιασμό σε 5ml LB μίας μοναδικής αποικίας από τον μετασχηματισμό, προσθήκη ανάλογης ποσότητας κατάλληλου αντιβιοτικού και ανάπτυξη στους 37°C στις 210rpm, overnight)

Πρωτόκολλο:

- 1) Φυγοκέντρηση 2 ml της υγρής καλλιέργειας στα 6.000 rpm για 4 ‘
- 2) Απόρριψη υπερκειμένου
- 3) Προσθήκη 150 μl STET Buffer
- 4) Προσθήκη 1 μl λυσοζύμη
- 5) Βίαια ανάδευση
- 6) Τοποθέτηση των δειγμάτων για 1 ‘ σε νερό που βράζει (για αδρανοποίηση της λυσοζύμης, προκειμένου να μην δράσει περαιτέρω)

- 7) Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 20 ‘
- 8) Απομάκρυνση του ιζήματος με οδοντογλυφίδα
- 9) Προσθήκη 180 μl ισοπροπανόλης(καθιζάνει το πλασμίδιο, ως αδιάλυτο)
- 10) Ανακίνηση με αναποδογύρισμα των eppendorffs
- 11) Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 7 ‘
- 12) Απόρριψη υπερκειμένου
- 13) Προσθήκη 300 μl EtOH 70%
- 14) Ανακίνηση με σύρσιμο στο στατώ
- 15) Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 5 ‘
- 16) Απόρριψη υπερκειμένου
- 17) Τα epperdoffs αφήνονται ανοιχτά για 15 ‘ προκειμένου να εξατμιστούν τα τελευταία ίχνη αιθανόλης
- 18) Επαναδιάλυση σε 20 μl ddH₂O
- 19) Αποθήκευση του DNA στους -20⁰ C

V) Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *A.rhizogenes* ικανών για μετασηματισμό με πλασμιδιακό DNA (competent cells)

Αρχή της μεθόδου:

Τα βακτήρια του γένους *Agrobacterium* είναι και αυτά Gram(-) βακτήρια όπως τα *E.coli*. Συνεπώς η δημιουργία δεκτικών *Agrobacterium* διέπεται από τις ίδιες αρχές με αυτές του *E.coli*.

Πρωτόκολλο:

1. *Agrobacterium rhizogenes* στέλεχος LBA 1334 καλλιεργείται σε 5 ml YEB μέσο που περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά overnight στους 28⁰C με ανάδευση.
2. 2 ml της προηγούμενης καλλιέργειας προστίθενται σε 50 ml θρεπτικού YEB και αναπτύσσονται στους 28⁰C με ανάδευση μέχρι να φτάσουν οπτική πυκνότητα OD₆₀₀=0,5-1,0
3. Οι χειρισμοί από εδώ και πέρα γίνονται στον πάγο. Φυγοκέντρηση στα 3.000g για 5 ‘ στους 4⁰C.
4. Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση ου ιζήματος σε 1 ml CaCl₂ 20 mM. Το διάλυμα μοιράστηκε σε aliquots των 0,1 ml σε epperdoffs που είχαν προψυχθεί. Τα δεκτικά κύτταρα *A.rhizogenes* διατηρούνται στους -80⁰C για μελλοντική χρήση.

Σημείωση:

Σε περίπτωση που τα δεκτικά κύτταρα χρησιμοποιηθούν αμέσως, τότε γίνεται προσθήκη του πλασμιδίου και τα κύτταρα τοποθετούνται σε υγρό άζωτο, ακολουθώντας το επόμενο πρωτόκολλο.

VI) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *A. rhizogenes* για εισαγωγή πλασμιδιακού DNA (Freeze-Thaw method)

Πρωτόκολλο:

1. Προσθήκη στα δεκτικά κύτταρα *A.rhizogenes* ανάλογης ποσότητας πλασμιδίου έτσι ώστε να προστεθεί 1 μg (οι χειρισμοί γίνονται στον πάγο)
2. Ψύξη σε υγρό άζωτο (λίγα δευτερόλεπτα)
3. Επώαση στους 37⁰C για 5 ‘ (σε υδατόλουτρο)
4. Προσθήκη 1 ml YEB/LB σε κάθε erperdorff και ακολουθεί ανάπτυξη για 4h στους 28⁰ C με ήπια ανάδευση. Στο στάδιο αυτό τα βακτήρια εκφράζουν την αντίσταση στα αντιβιοτικά.
5. Φυγοκέντρηση των erperdorffs στους 13.000 rpm για 30 ‘. Απόρριψη του υπερκειμένου. Προσθήκη 100 μl YEB/LB μέσο.
6. Στρώσιμο των κυττάρων σε YEP/LB μέσο που περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά Επώαση στους 28⁰ C για 2-3 days

VII) Διατήρηση βακτηριακών κλώνων που φέρουν τα επιθυμητά πλασμίδια

Η διατήρηση πλασμιδιακών φορέων σε βακτήρια γίνεται με εφαρμογή επιλογής, προσθέτοντας αντιβιοτικά (στα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας των βακτηρίων) για τα οποία τα πλασμίδια φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας την οποία στερούνται από μόνα τους τα βακτήρια. Έτσι σε θρεπτικό με ένα αντιβιοτικό αναπτύσσονται μόνο οι βακτηριακοί κλώνοι που φέρουν πλασμίδιο με αντίστοιχη ανθεκτικότητα, ενώ άλλα στελέχη θανατώνονται από το αντιβιοτικό. Στελέχη που έχουν αναπτυχθεί σε τρυβλία με στερεό υπόστρωμα μπορεί ν’ αποθηκευτούν στους 4⁰C για περίπου ένα μήνα. Για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα χρησιμοποιούνται glycerol stocks προσθέτοντας πυκνή γλυκερόλη σε αναπτυγμένη υγρή καλλιέργεια βακτηρίων (20% γλυκερόλη στον τελικό όγκο) τα οποία διατηρούνται στους -80⁰C για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Στους επόμενους πίνακες φαίνονται τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για επιλογή, τα βακτηριακά στελέχη με συνοπτική περιγραφή καθώς και η σύσταση των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξή τους.

Αντιβιοτικό	Stock διαλύματα ***			Συγκέντρωση στο θρεπτικό υλικό**
	Συγκέντρωση*	διαλύτης	Θερμοκρασία φύλαξης	
Αμπικιλίνη(Amp)	100mg/ml	ddH ₂ O	-20 ⁰ C	100μg/ml
Καναμυκίνη(Kan)	50mg/ml	ddH ₂ O	-20 ⁰ C	50μg/ml
Ριφαμικίνη(Rif)	25mg/ml	μεθανόλη	-20 ⁰ C	50μg/ml
Σπεκτινομυκίνη(Spe)	50mg/ml	ddH ₂ O	-20 ⁰ C	250μg/ml
Σεφοταξάμη(Cef)	200mg/ml	ddH ₂ O	-20 ⁰ C	200μg/ml

Πίνακας 4 : Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για την επιλογή βακτηριακών κλώνων με επιθυμητά πλασμίδια.

* Εξαρτάται αφενός από τον βαθμό κορεσμού του κάθε διαλύματος και αφετέρου από την τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό υλικό

**Εξαρτάται πάντα από το βακτηριακό είδος και στέλεχος. Στο συγκεκριμένο πίνακα παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που απαιτούσαν για να αναπτυχθούν τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν

*** Τα διαλύματα των αντιβιοτικών αποστειρώνονται με φιλτράρισμα μέσω φίλτρου 0,22 μm (Whatman).

Βακτηριακά Στελέχη & Θρεπτικά Υλικά

Όνομασία στελέχους	Χαρακτηριστικά	Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης θερμοκρασία
<i>DH5a</i>	Στέλεχος <i>E.coli</i> που χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό με πλασμίδια κατά την διαδικασία κατασκευής τους. Έχει υποστεί ένα έλλειμμα στο οπερόνιο lac, οπότε είναι συμβατό με blue/white screening.	LB 37 ⁰ C
<i>LBA 1334</i>	Στέλεχος <i>A.rhizogenes</i> το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά και ενσωμάτωση της κατασκευής στο φυτικό γένωμα με συνέπεια την παραγωγή μετασχηματισμένων hairy roots. Έχει ενδογενή ανθεκτικότητα στην ριφαμικίνη (χρωμοσωμικός τύπος) και στην σπεκτινομυκίνη, εξαιτίας του Ri πλασμιδίου της αγροπίνης, το οποίο έχει διατηρημένα τα vir	YEB/YEP/LB 28 ⁰ C

	και τα <i>rol</i> γονίδια για τη μεταφορά T-DNA στο φυτικό γένωμα, αλλά απενεργοποιημένα τα γονίδια παραγωγής οπινών.	
R7A	Στέλεχος <i>Mesorhizobium loti</i> της οικογένειας <i>Rhizobiaceae</i> . Χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή φυματίων στις μετασχηματισμένες ρίζες του <i>Lotus japonicus</i>	YMB/TYR 30°C
DB3.1	Στέλεχος <i>E.coli</i> που χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό με πλασμίδια. Φέρει το γονίδιο <i>ccdA</i> οπότε παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο <i>ccdB</i> που προκαλεί διάσπαση δίκλωνου DNA μέσω της γυράσης. Ως εκ τούτου χρησιμοποιείται για διατήρηση πλασμιδίων που φέρουν αυτό το γονίδιο.	LB 37°C

Πίνακας 5: Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και περιγραφή των κυριότερων χαρακτηριστικών τους

Ονομασία θρεπτικού υλικού	Είδος βακτηρίου για το οποίο χρησιμοποιείται	Συστατικά
LB	<i>E.coli, A.rhizogenes</i>	1%(w/v) NaCl, 1%(w/v)καζεΐνη 0,5 %(w/v) yeast extract 1,5 %(w/v) (για τρυβλίο)
YEB/ YEP	<i>A.rhizogenes</i>	1%(w/v) peptone bacteriological 1%(w/v) yeast extract 0,5 %(w/v) NaCl 0,124 g MgSO ₄ *7H ₂ O 1,5 %(w/v) άγαρ(για τρυβλίο)
TYR	<i>Mesorhizobium loti</i>	0,3%(w/v) yeast extract 0,5%(w/v) tryptone 1,8 ml CaCl ₂ 0,5 M
YMB (Yeast Mannitol Broth)	<i>Mesorhizobium loti</i>	1%(w/v) μαννιτόλη 0,05%(w/v) K ₂ HPO ₄ 0,02%(w/v) MgSO ₄ 0,01%(w/v) NaCl 0,05%(w/v) yeast extract

Πίνακας 6: Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης και συντήρησης βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

VIII) Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με το πρωτόκολλο της φαινόλης-χλωροφορμίου

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή έχει ως στόχο να παραληφθούν καθαρά νουκλεϊκά οξέα από τα οποία θα έχουν απομακρυνθεί οι περισσότερες πρωτεΐνες. Στηρίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεϊκά οξέα λόγω της χημικής τους δομής (σακχαροφωσφορικός σκελετός) είναι διαλυτά στο νερό και αδιάλυτα σε οργανικούς διαλύτες. Συνεπώς, παρουσία φαινόλης, χλωροφορμίου, αιθανόλης οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται και μετά από φυγοκέντρηση, πραγματοποιείται διαχωρισμός των δύο φάσεων (υδατικής & οργανικής) και παραλαβή του DNA από την υδατική φάση (εκχύλιση DNA), ενώ οι περισσότερες πρωτεΐνες παραμένουν στην οργανική φάση. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό πλασμιδικών φορέων και ενθεμάτων μετά από πέψη, από τα περιοριστικά ένζυμα και τα ρυθμιστικά διαλύματα τους ή κατά τον καθαρισμό RNA μετά από χειρισμό με DNase I.

Πρωτόκολλο:

Στο DNA προς καθαρισμό προστίθεται τριπλάσια ποσότητα ddH₂O(υδατική φάση). Σε αυτό προστίθεται ποσότητα φαινόλης (PH=8,0) ίση με την υδατική φάση. Ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5 ' στους 13.000 rpm.

Από τις 2 φάσεις που προκύπτουν γίνεται μεταφορά της υδατικής φάσης (που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα) σε νέο epperdoff. Σε αυτό γίνεται προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης-χλωροφορμίου. Ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5' στους 13.000 rpm

Από τις 2 φάσεις που προκύπτουν γίνεται πάλι μεταφορά της υδατικής φάσης (που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα) σε νέο epperdoff. Σε αυτό γίνεται προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου. Ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5' στους 13.000 rpm

Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο epperdoff και ακολουθεί κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με προσθήκη αιθανόλης 100% και 1/20 όγκου οξικού νατρίου 3 M (PH=5,2). Μετά από ανάδευση των δειγμάτων ακολουθεί επώαση είτε στους -20⁰ C overnight είτε στους -80 για 45 '.

Φυγοκέντρηση στους 4⁰ C για 20 ' στα 13.000 rpm

Απομάκρυνση του υπερκείμενου προσεκτικά με πιπέτα ώστε να μείνει το ίζημα

Πλύση με 70% αιθανόλη. Ο χειρισμός αυτός γίνεται στον πάγο. Ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 20 ' στους 13.000 rpm στους 4⁰ C

Αφαίρεση υπερκειμένου πολύ προσεκτικά με πιπέτα. Γρήγορη φυγοκέντρηση για να απομακρυνθούν τα τελευταία ίχνη αιθανόλης

Τα epperdoff μένουν ανοιχτά για 5-10' σε θερμοκρασία δωματίου για να εξατμιστούν και τα τελευταία ίχνη αιθανόλης.

Επαναδιάλυση του ιζήματος σε ανάλογη ποσότητα ddH₂O ή TE.

IX) Πέψη τμημάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Στην παρούσα εργασία, οι πέψεις με ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιήθηκαν:

(α) Για την παραλαβή τμημάτων DNA από πλασμιαδικές κατασκευές και περαιτέρω κλωνοποίησή τους.

(β) Για διαγνωστικό σκοπό, προκειμένου να ανιχνευθούν επιθυμητοί κλώνοι.

(α) Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιούνται μεγάλη ποσότητα DNA(1-2 μg), σε μεγάλο τελικό όγκο αντίδρασης (50μl), 10u περιοριστικού ενζύμου και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για το κάθε ένζυμο.

Δείγμα DNA	~1μg
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 10X	5 μl
Περιοριστικό ένζυμο	10-20u
BSA	100μg/ml
ddH ₂ O	Μέχρι 50 μl

Πίνακας 7: Ενδεικτική αντίδραση πέψης με περιοριστικό ένζυμο

*Το BSA χρησιμοποιούνται όταν προτείνονται από την εταιρία προέλευσης των ενζύμων.

**Διπλές πέψεις πραγματοποιήθηκαν μόνο όταν τα δύο ένζυμα είχαν σε κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα ενζυμική δραστηριότητα πάνω από 75% της μέγιστης τους .

(β) Στην δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα DNA (~0.5μg) , σε μικρό τελικό όγκο αντίδρασης(30μl), 5-10u περιοριστικού ενζύμου και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για το αντίστοιχο ένζυμο. Μετά το πέρας των αντιδράσεων γινόταν προσθήκη 0,5 μl RNase για να διασπαστεί το υπάρχον RNA.

Μετά από πολύ καλή ανάδευση, οι πέψεις γίνονται στην προτεινόμενη θερμοκρασία για 2-3 ώρες.

Ένζυμο περιορισμού	Αλληλουχία αναγνώρισης
KpnI	GGTAC/C
HindIII	A/AGCTT
XhoI	C/TCGAG
XbaI	T/CTAGA
EcoRI	G/AATTC
BamHI	G/GATCC
SacI	GAGGCT/C
PstI	CTGCA/G
SpeI	A/CTAGT

Πίνακας 8: Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και αλληλουχίες που αναγνωρίζουν. Με τις καθέτους φαίνεται η θέση περιορισμού.

X) Ανάλυση τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης

Αρχή της μεθόδου:

Η ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης οδηγεί στο διαχωρισμό τους με βάση του μοριακό τους βάρος και την μορφή τους (γραμμικό/κυκλικό υπερελικομένο/χαλαρό). Μικρότερα σε μέγεθος τμήματα να κινούνται πιο γρήγορα μέσω της πηκτής. Στην περίπτωση που τα τμήματα είναι γραμμικά, η κινητικότητα τους είναι ευθέως ανάλογη του μεγέθους τους. Δεν ισχύει, όμως, το ίδιο για κυκλικά μόρια. Γενικότερα, όσο πιο μεγάλα τμήματα διαχωρίζονται τόσο πιο αραιή πρέπει να είναι η πηκτή και το αντίστροφο. Το DNA γίνεται ορατό με την βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και το σύμπλοκο που δημιουργείται φθορίζει όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία.

Υλικά:

- 50X TAE: 24,2%(w/v) Tris, 57,1 ml/lit οξικό οξύ, 100 ml/lit 0.5 M EDTA.
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου: Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH₂O και φυλάσσεται στους 4⁰ C

- Διάλυμα 10X Loading Buffer: 0,25% Μπλέ της βρωμοφαινόλης 0,25 % κυανό του ξυλενίου και 35% γλυκερόλη.

- 1) Κατάλληλη ποσότητα αгарόζης προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το σημείο βρασμού.
- 2) Στην συνέχεια στο τηγμένο διάλυμα αгарόζης προστίθεται 0,007% v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου.
- 3) Η πηκτή χύνεται σε κατάλληλο εκμαγείο συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στην πηκτή βυθίζεται ειδική «χτένα» που δημιουργεί υποδοχές των δειγμάτων.
- 4) Στα δείγματα DNA που πρόκειται να αναλυθούν, προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής 10X Loading Buffer
- 5) Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή, απομακρύνεται η «χτένα» και η πηκτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE.
- 6) Τα δείγματα διαχωρίζονται σε ηλεκτρικό πεδίο τάσεως μέχρι 100 V

XI) Επανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης

Αρχή της μεθόδου:

Πραγματοποιήθηκε σε ειδικές στήλες διαχωρισμού με βάση το πρωτόκολλο της QIAGEN (QIAquick Gel Extraction kit). Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR από εκκινητές, νουκλεοτίδια αλλά και το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε όταν ύστερα από πέψη προέκυπτε μίγμα πλασμιδιακών τμημάτων.

XII) Ενίσχυση ακολουθιών DNA με την χρήση της PCR

Αρχή της μεθόδου:

PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμημάτων DNA από cDNA ή πλασμίδια. Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιούνταν ως μήτρα για την αντίδραση εξαρτιόνταν από το είδος τού. Στην περίπτωση του cDNA, χρησιμοποιούνταν ποσότητα ίση με 20ng (1-2 μl), ενώ για πλασμιδιακό αρκούν 10-100ng (1 μl από 1/100 αραιώση πλασμιδίου καθαρισμένο με kit). Η θερμοκρασία υβριδισμού των

εκκινητών χρησιμοποιούνται η μέση την θερμοκρασία τήξεως τους, $T_m-5^{\circ}\text{C}$. Γενικότερα, όσο πιο υψηλή είναι η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών, τόσο πιο αυστηρές είναι οι συνθήκες της αντίδρασης, δηλαδή μειώνεται η παραγωγή μη-ειδικών προϊόντων.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Μήτρα DNA	1-2 μl
Primer F 10 μM	2,5 μl
Primer R 10 μM	2,5 μl
5X Ρυθμιστικό διάλυμα*	10 μl
Μίγμα dNTPs(10mM το καθένα)	1 μl
Taq DNA πολυμεράση(1U/ μl)	0,5-1 μl
ddH ₂ O	Μέχρι τα 50 μl
Τελικός όγκος	50 μl

Πίνακας 9: Τυπική αντίδραση PCR

* Εάν το ρυθμιστικό διάλυμα δεν περιέχει MgCl_2 , προστίθεται κατάλληλη ποσότητα, καθώς η DNA πολυμεράση απαιτεί την παρουσία δισθενών κατιόντων για να δράσει.

Διαδικασία	θερμοκρασία	χρόνος
Έναρξη αντίδρασης	95°C	3'
Αποδιάταξη dsDNA	95°C	30''-60''
Υβριδισμός εκκινητών	$T_m-5^{\circ}\text{C}$	30''
Επιμήκυνση	72°C	1'/kb
Τελική επιμήκυνση	72°C	10'

Επανάληψη για
25-35 κύκλους

Πίνακας 10: Τυπικές συνθήκες αντίδρασης PCR

XIII) Αντίδραση σύνδεσης DNA- Ligation

Αρχή της μεθόδου:

Στηρίζεται στην ικανότητα της λιγάσης να καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού, με κατανάλωση ενέργειας. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η T4-λιγάση από το "pGemT-easy ligation kit" της Promega. Η αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των κατασκευών μας στα

επιθυμητά πλασμίδια, μέσω της σύνδεσης πλασμιδίου και ενθέματος που είχαν συνεκτικά άκρα.

Πρωτόκολλο:

Ανάλογα με το μέγεθος ενθέματος και φορέα επιλέγεται επιθυμητή μοριακή αναλογία των δύο με τιμή από 1/3-3/1 ένθεμα/φορέα. Για υπολογισμό της ποσότητας ενθέματος που πρέπει να προστεθεί σε δεδομένη ποσότητα φορέα για την επίτευξη επιθυμητής μοριακής αναλογίας χρησιμοποιείται ο παρακάτω αλγόριθμος:

$$\text{ng of insert} = \frac{\text{ng vector} * \text{kb insert size}}{\text{kb vector size}} * \frac{\text{insert}}{\text{vector}}$$

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
2X Ligation Buffer	5 μl
T4-λιγάση	1 μl
Ένθεμα	*
Φορέας	Ιδανικά 50ng
ddH ₂ O	Μέχρι 10 μl

Πίνακας 11: Ενδεικτική αντίδραση ligation

* Προσδιορίζεται με βάση τον προηγούμενο αλγόριθμο και προστίθεται αντίστοιχος όγκος του δείγματος

XIV) Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικά κύτταρα (CTAB method)

Αρχή Μεθόδου

Η απομόνωση γενωμικού DNA με το πρωτόκολλο που παρατίθεται παρακάτω στηρίζεται στο σπάσιμο των συνδέσεων των ιστών και των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων με λειοτρίβηση ιστών, που βρίσκονται υπό μορφή κρυστάλλων. Η χρήση του διαλύματος CTAB και της μερκαπτοαιθανόλης βοηθούν στην περαιτέρω διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με συνέπεια την απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου. Στη συνέχεια ακολουθεί καθαρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες.

Σύσταση διαλύματος CTAB

50 mM EDTA (pH=8,0), 50 mM Tris (pH=6,0), 6,4 LiCl

1% CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide), 0,5% Tween 20, 1,1 M NaCl

Πρωτόκολλο

- 1) Τοποθέτηση των erpendorffs με τους ιστούς σε υγρό άζωτο. Ακολουθεί λειοτρίβηση του κάθε ιστού μέχρι ο ιστός να κονιορτοποιηθεί. Σημαντικό στοιχείο της διαδικασίας είναι οι ιστοί να μη ξεπαγώσουν έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η λειοτρίβηση τους.
- 2) Προσθήκη σε κάθε δείγμα 100 μl προθερμασμένου στους 65⁰ C CTAB στο οποίο γίνεται προσθήκη μερκαπτοαιθανόλης 1% v/v.
- 3) Τα δείγματα επωάζονται για 15 ‘ στους 65⁰ C.
- 4) Προσθήκη 150 μl χλωροφορμίου + 1/25 όγκου ισοαμυλική αλκοόλη . Ακολουθεί καλή ανάδευση.
- 5) Φυγοκέντρηση για 5 ‘ στα 13.000 rpm
- 6) Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο erpendorffs, προσθήκη 0,8 του όγκου ισοπροπανόλη και ανάδευση των δειγμάτων.
- 7) Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 ‘
- 8) Φυγοκέντρηση για 15 ‘ στα 13.000 rpm. Το ίζημα στο οποίο βρίσκεται το γενωμικό DNA είναι ορατό. Απόρριψη υπερκειμένου.
- 9) Προσθήκη 500μl παγωμένης 70% EtOH. Οι επόμενοι χειρισμοί γίνονται στον πάγκο προκειμένου να μην επαναδιαλύεται το ίζημα.
- 10) Φυγοκέντρηση για 5 ‘ στα 13.000 rpm. Απόρριψη υπερκειμένου.
- 11) Φυγοκέντρηση για άλλα 5 ‘ στα 13.000 rpm ώστε να απομακρυνθεί και η τελευταία ποσότητα αιθανόλης.
- 12) Αφού απομακρυνθούν με εξάτμιση και τα τελευταία ίχνη αιθανόλης, το DNA επαναδιαλύεται σε 20 μl ddH₂O.

XV) Θρεπτικά μέσα για ανάπτυξη φυτών

B5 (στερεό υπόστρωμα 0.8% άγαρ)

3,87g/L B5 basal salt mix

20g/L sucrose

8g/L άγαρ

Σε αποσταγμένο H₂O

Ρύθμιση pH στο 5.5 με προσθήκη NaOH 1N

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

Μετά την αποστείρωση προστίθεται διάλυμα B5 vita’ mix για τελική συγκέντρωση

1x και αν είναι επιθυμητό 10ml/L διάλυμα Cef 30mg/ml

Jensen Μέσο

Συστατικά	Stock διάλυμα	ml/l
CaHPO ₄	100g/l	1
K ₂ HPO ₄	20g/l	1
MgSO ₄ 7H ₂ O	20g/l	1
NaCl (20g/l)	20g/l	1
Fe citrate*	-	0,010 g
Na ₂ MoO ₄ 4H ₂ O	40g/l	2,5
Mixed stock*		2,5
H ₃ BO ₃	12,7 g/l	2,5

Πίνακας12:Σύσταση

Jensen

* Το Fe citrate ως φωτοευαίσθητο δεν παρασκευάζεται για αυτό μητρικό διάλυμα αλλά προστίθεται κατευθείαν στο τελικό διάλυμα.

Συστατικό	Ποσότητα(g/l)
CuSO ₄ *5H ₂ O	3,5
MnSO ₄ *4H ₂ O	61
ZnSO ₄ *7H ₂ O	9,7

Πίνακας 13: Σύσταση Mixed stock του Jensen

Στο παραπάνω μίγμα, προστέθηκε 1% (w/v) άγαρ για την παρασκευή των τρυβλίων Jensen Medium.

XVI) Επαγωγή φυματίων σε ρίζες *Lotus japonicus*

Υλικά:

1x PBS(Phosphate Buffer Saline)

1)4,3 mM Na₂HPO₄

2)137 mM NaCl

3)2,7 mM KCl

4)1,4 mM KH₂PO₄

Ρύθμιση του pH στο 7,4 με προσθήκη HCl

Mesorhizobium loti, στέλεχος R7A αναπτύχθηκε για 2 ημέρες στους 30⁰C με ανάδευση σε μέσο YMB. Ακολούθησε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στους 4⁰C στα 4500rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκε για κάθε 100 ml βακτηριακής καλλιέργειας 10 ml 1x PBS και το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναδιαλύθηκε. Με το εναιώρημα αυτό έγινε μόλυνση των μετασχηματισμένων ριζών. Συγκεκριμένα, κάθε ρίζα διαβρέχτηκε σε όλο της το μήκος με 500 ή με 750 μl

του εναιωρήματος του ριζοβίου. Η μόλυνση έγινε μόλις τα φυτά τοποθετήθηκαν στο μίγμα του περλίτη-βερμικουλίτη και αμέσως μετά φυτεύτηκαν. Ο σχηματισμός ώριμων φυματίων απαιτεί περίπου 3 εβδομάδες.

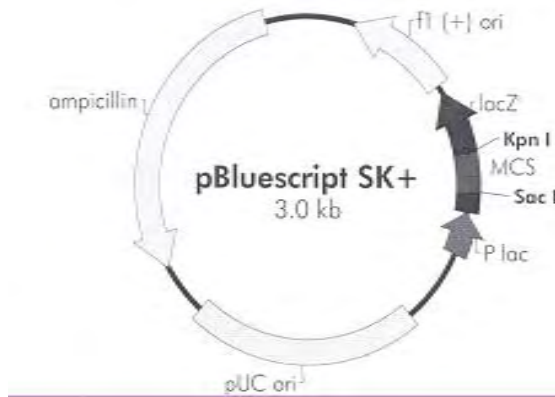
XVII) Αντίδραση ανασυνδυασμού LR Clonase

Ο τύπος αυτών των αντιδράσεων βασίζεται στην ικανότητα του φάγου λ ν' αποκόπτεται από το γονιδίωμα βακτηρίων-φορέων παρουσία των πρωτεϊνών Int, Xis και IHF. Το μίγμα LR Clonase mix II περιέχει αυτές τις πρωτεΐνες μαζί με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης, προσθήκη του σε μίγμα πλασμιδίων Entry (φέρει θέσεις attL γύρω από επιθυμητό τμήμα DNA) και Destination (φέρει θέσεις attR γύρω από κασέτα επιλογής) καταλύει τον ανασυνδυασμό των πλασμιδίων και τη μεταφορά του επιθυμητού DNA στο φορέα στόχο Destination vector (βλέπε αναλυτικά στο παράρτημα Gateway αντιδράσεις). Το πρωτόκολλο που ακολουθεί είναι της Invitrogen και μπορεί να διαφέρει από αυτό άλλων εταιριών ωστόσο η αρχή παραμένει ίδια.

Σε σωλήνες eppendorf του 1.5ml προστίθενται: 1-7μl Entry clone (50-150ng /αντίδραση), 1μl Destination clone (150ng/αντίδραση), TE buffer pH 8.0 μέχρι τα 8μl. Ξεπαγώνεται το μίγμα LR Clonase mix II και μετά από ανάδευση στο vortex για 2'' προστίθενται 2μl/αντίδραση, το μίγμα αντίδρασης αναδεύεται με πιπετάρισμα και επωάζεται στους 25°C για 1-18h (γενικά αρκεί 1 ώρα αλλά μεγαλύτερος χρόνος επώασης αυξάνει τον αριθμό ανασυνδυασμένων κλώνων και συνιστάται για μεγάλα πλασμίδια). Η αντίδραση σταματά με προσθήκη 1μl proteinase K/αντίδραση και επώαση στους 37°C για 10'. Μικρή ποσότητα του μίγματος αντίδρασης μετασχηματίζεται σε δεκτικά βακτήρια *E.coli* και ακολουθεί επιλογή των επιθυμητών κλώνων ανάλογα με τους φορείς που χρησιμοποιούνται.

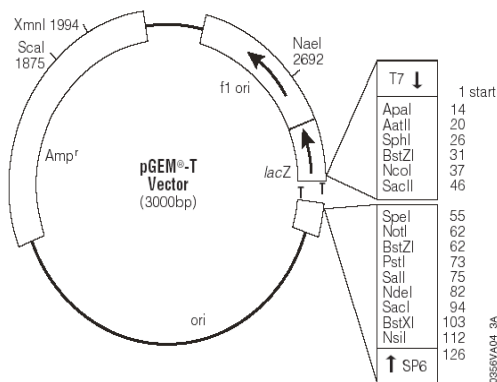
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2: ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται παρακάτω μαζί με συνοπτική περιγραφή.



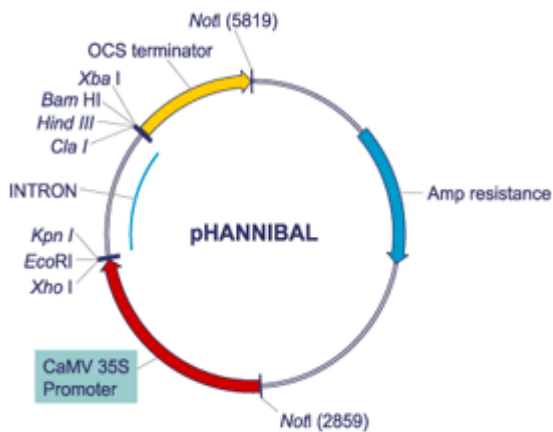
pBluescript SK+: Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA. Έχει μέγεθος 3,0kb και φέρει γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ampicillin. Δίνει την δυνατότητα κλωνοποίησης τμημάτων στο MCS(Multiple Cloning Site) που βρίσκεται εντός του τμήματος α του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης. Το

τελευταίο εκφράζεται κάτω από την επίδραση του προαγωγέα του, Plac, και μπορεί να επαναφέρει την λειτουργικότητα της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από το γένωμα ορισμένων στελεχών του *E.coli*. Εάν ενσωματωθεί αλληλουχία στο MCS, διακόπτεται το lacZ, με συνέπεια να μη μπορεί να μεταβολιστεί το χημικό ανάλογο της λακτόζης, X-Gal. Παρατηρούμε, έτσι, άσπρες αποικίες, σε αντίθεση με τις μπλε όπου το X-Gal μεταβολίζεται. Περιέχει, επιπλέον, αρχή έναρξης της αντιγραφής (pUC origin) για το *E.coli* για την διατήρηση του εντός των κυττάρων. Τέλος, διαθέτει εκατέρωθεν του MCS T3 & T7 εκκινήτες για την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης.



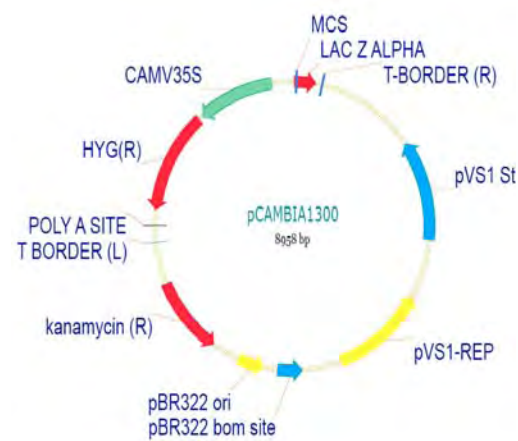
pGEMT-easy™: Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση τμημάτων. Προσδίδει ανθεκτικότητα στην ampicillin και έχει μέγεθος 3,0 kb Δίνει την δυνατότητα άμεσης κλωνοποίησης τμημάτων μέσω TA cloning, εντός lacZ γονιδίου. Περιέχει θέση έναρξης της αντιγραφής για το *E.coli*. διαθέτει εκατέρωθεν του MCS T7 & SP6 εκκινήτες για την πρόσδεση της

RNA πολυμεράσης.



φορές με αντίθετη φορά Προηγείται ο ισχυρός φυτικός προαγωγέας CaMV 35S (του ιού του μωσαϊκού του καπνού) και στο τέλος της δεύτερης θέσης κλωνοποίησης υπάρχει αλληλουχία για τον τερματισμό της μεταγραφής(OCS terminator). Επιπλέον, διαθέτει θέσεις περιορισμού δεξιά και αριστερά αυτής της κατασκευής, προκειμένου να μπορεί να αφαιρεθεί και να μπορεί να ενσωματωθεί σε τελικό φορέα. Προσδίδει ανθεκτικότητα στην ampicillin και έχει μέγεθος 5.824bp.

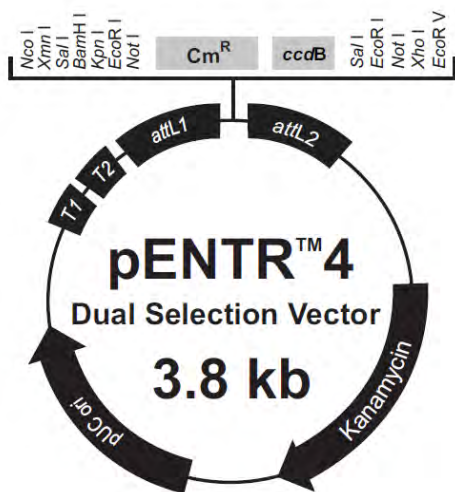
pHannibal: Αποτελεί έναν από τους κύριους φορείς που χρησιμοποιούνται για την γονιδιακή αποσιώπηση, καθώς δίνει την δυνατότητα δημιουργίας της φουρκέτας. Περιέχει ιντρόνιο από την κινάση της αποκαρβοξυλάσης του πυροσταφυλικού (Pdk), μεγέθους 880bp, εκατέρωθεν του οποίου υπάρχουν θέσεις περιορισμού που δίνουν την δυνατότητα ενσωμάτωσης της ίδιας αλληλουχίας δύο



αντιγραφή του πλασμιδίου και στις δύο οικογένειες βακτηρίων. Επιπλέον, έχει δεξί και αριστερό συντοριακό άκρο, προκειμένου να γίνει η τομή και η ενσωμάτωση του T-DNA από ένζυμα των βακτηρίων *Agrobacterium* στο φυτικό γένωμα. Στο T-DNA υπάρχει γονίδιο που κωδικοποιεί για ανθεκτικότητα στην υδρομυκίνη, προκειμένου να γίνεται η επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών. Το γονίδιο της hptII εκφράζεται υπό τον έλεγχο του CaMV35S, ενώ στο τέλος υπάρχει σήμα πολύ-αδενυλίωσης, προκειμένου να εκφραστεί η πρωτεΐνη στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το MCS για την

pCambia 1300: Αποτελεί δυαδικό φορέα για την μεταφορά και ενσωμάτωση τμημάτων DNA στο φυτικό γένωμα μέσω βακτηρίων του γένους *Agrobacterium*. Έχει μέγεθος 8.958 bp και προσδίδει ανθεκτικότητα στην Kanamycin για την επιλογή τόσο στα *E.coli*, όσο και στα *Agrobacterium*. Περιέχει αρχές έναρξης της αντιγραφής για την διατήρηση και

ένθεση της κατασκευής περιέχεται εντός της α- υπομονάδας του γονιδίου lacZ, η χρησιμότητα του οποίου περιγράφηκε προηγουμένως. Αποτελεί έναν βελτιωμένο δυαδικό φορέα, καθώς έχει το MCS κοντά στο 5' άκρο (δεξί συνοριακό) και το γονίδιο επιλογής στο 3' άκρο (αριστερό συνοριακό).



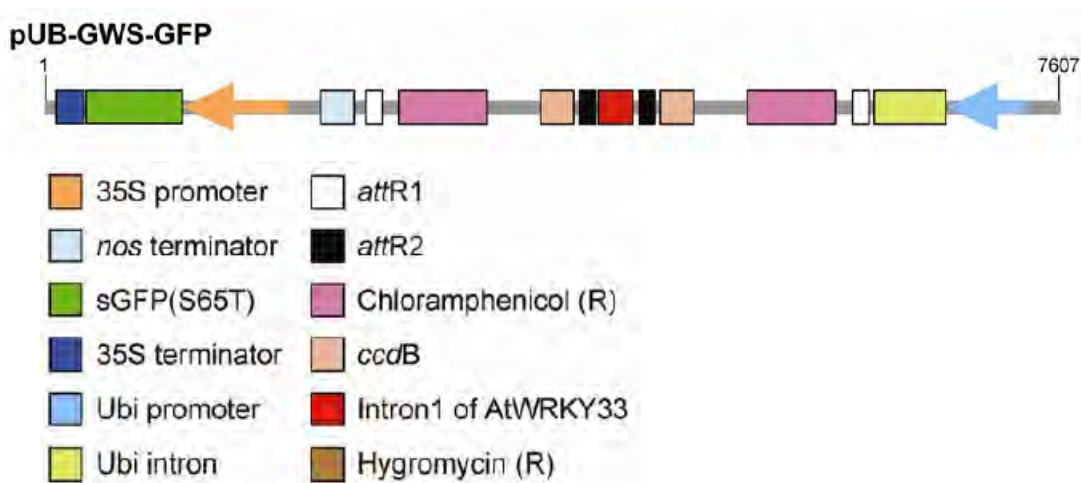
pENTR4™: Αποτελεί έναν από τους φορείς διπλής επιλογής (entry vector) για κλωνοποίηση τμημάτων DNA που θα χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις της τεχνολογίας Gateway (Invitrogen).

Περιέχει αλληλουχία τερματισμού rnhB για αναστολή έκφρασης του ενσωματωμένου DNA σε *E. coli*, θέσεις attL1 και attL2 για κατευθυνόμενο ανασυνδυασμό με φορέα προορισμού

(destination vector) χρησιμοποιώντας αντίδραση LR Clonase. Φέρει επίσης πλαίσιο Kozac για βελτιωμένη έκφραση του ενσωματωμένου DNA σε ευκαρυωτικά συστήματα, κασέτα διπλής επιλογής με γονίδιο ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη (CmR) και το θνησιγόνο γονίδιο ccdB (προκαλεί θάνατο σε συνηθισμένα στελέχη όπως DH5α και TOP10) ανάμεσα στις θέσεις attL, γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη για επιλογή σε *E. coli* και αλληλουχία αντιγραφής του pUC για διατήρηση σε *E. coli* (medium-low copy number). Λόγο του γονιδίου ccdB η διατήρηση του φορέα γίνεται σε βακτηριακά στελέχη με το γονίδιο ccdA που αναιρεί τη δράση του ccdB (τέτοια στελέχη είναι το TOP10F' και DB3.1). Η ενσωμάτωση του επιθυμητού τμήματος DNA γίνεται ώστε να αντικατασταθεί η κασέτα διπλής επιλογής, οπότε ο ανασυνδυασμένος φορέας μπορεί να μετασχηματιστεί σε συμβατικό στέλεχος *E. coli* το οποίο θα είναι ευαίσθητο στην Chloramphenicol αλλά ανθεκτικό σε Kanamycin.

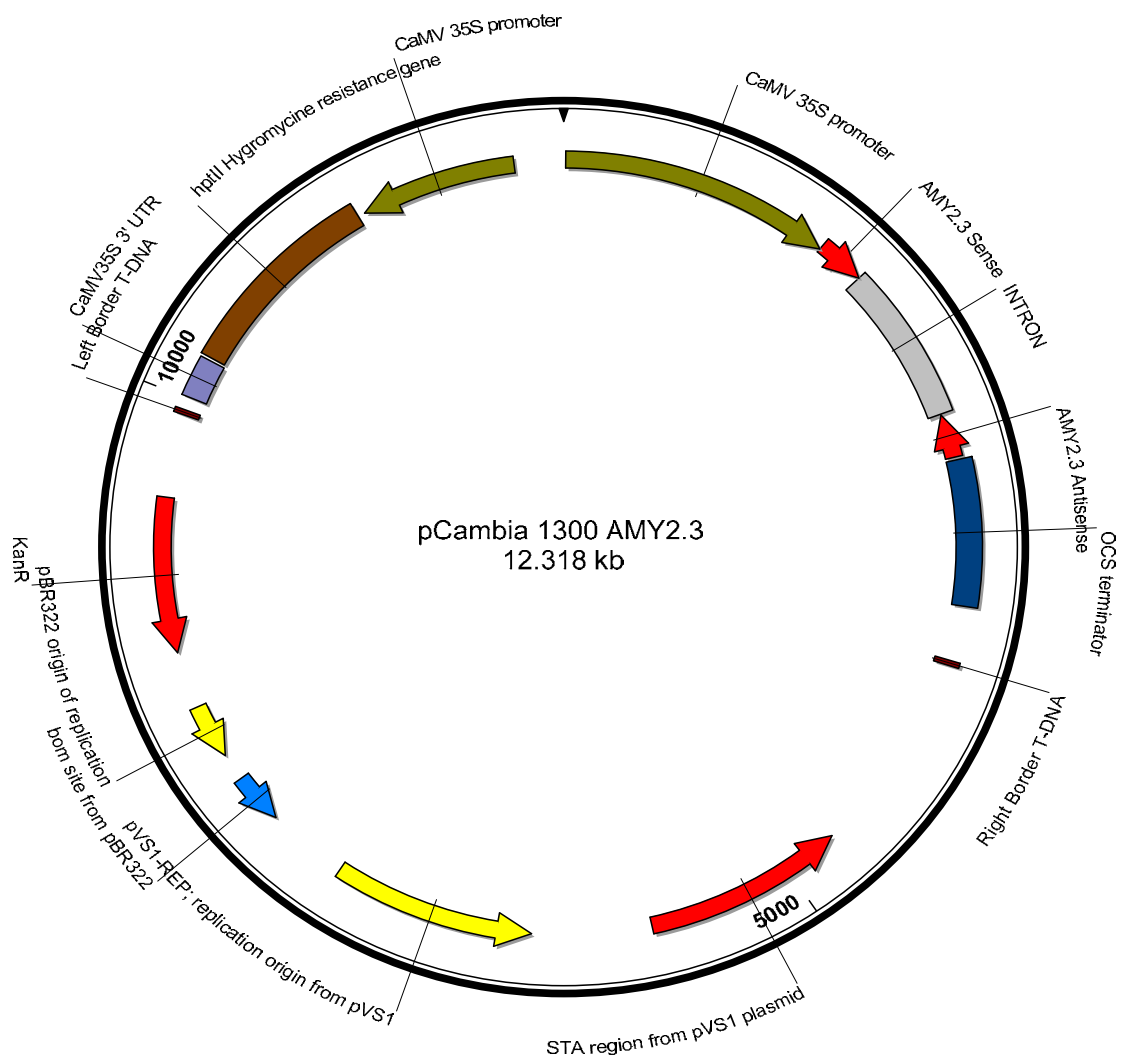
pUBI-GWS-GFP: Κατασκευάστηκε και περιγράφηκε αναλυτικά από τους Maekawa et al 2007. Είναι δυαδικός φορέας, βασίζεται στον κορμό του pCambia 1300 (περιγράφηκε προηγουμένως), μόνο που στην περιοχή T-DNA φέρει, αντί για γονίδιο ανθεκτικότητας σε Hygromycin, γονίδιο GFP για έκφραση σε φυτικά κύτταρα. Επίσης το MCS έχει αντικατασταθεί από κατασκευή για έκφραση RNA

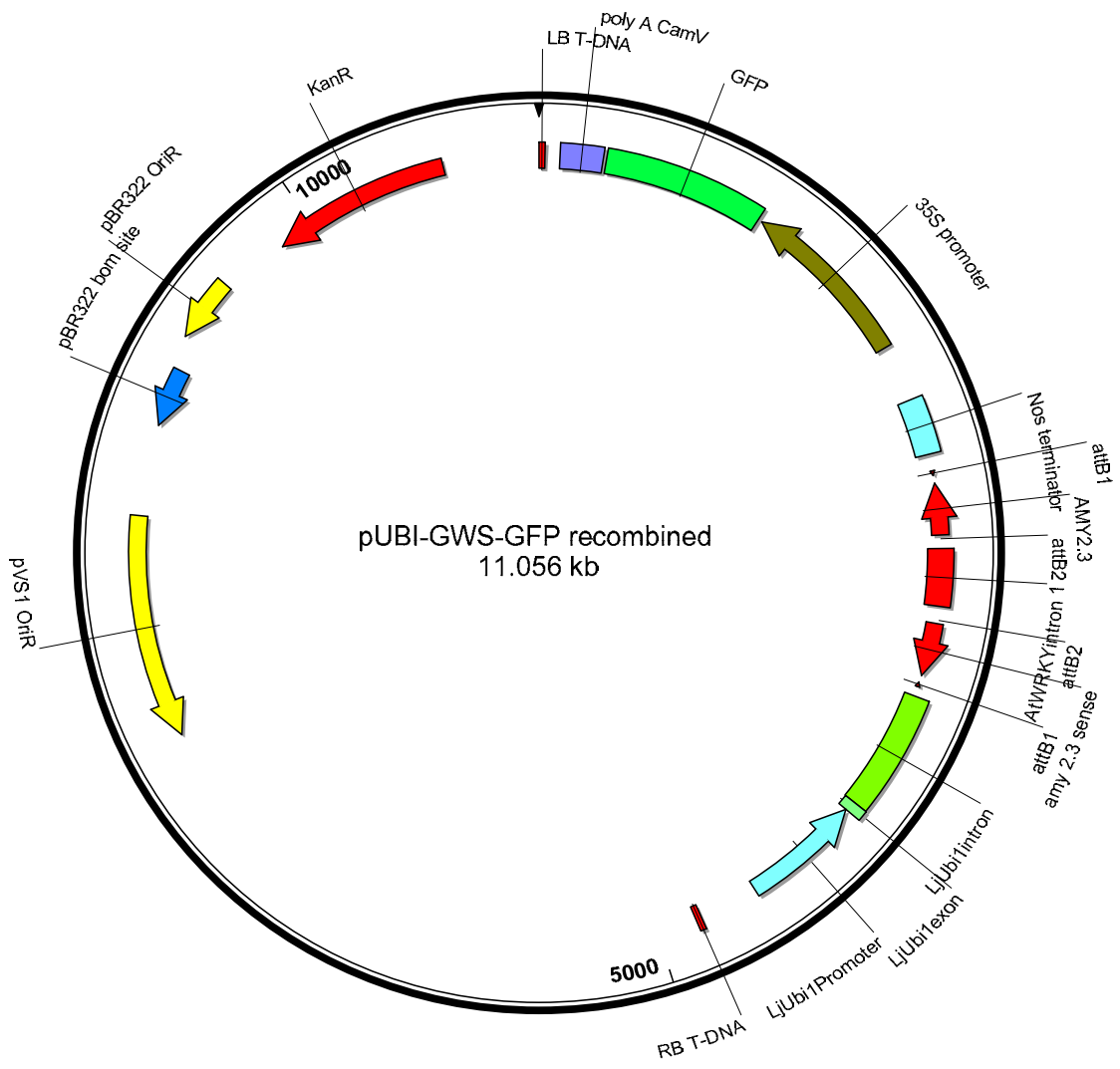
φουρκέτας. Η κατασκευή εκφράζεται υπο τον έλεγχο του υποκινητή LjUbiquitin1 μαζί με μικρό τμήμα του πρώτου ιντρονίου ενώ τερματίζεται από την αλληλουχία τερματισμού nos. Στο ενδιάμεσο υπάρχουν κασέτες διπλής επιλογής CmR και ccdB (βλέπε pENTR4™) ανάμεσα σε θέσεις ανασυνδυασμού attR1 και attR2 δύο φορές εκατέρωθεν του ιντρονίου AtWRKY για άμεση εισαγωγή του επιθυμητού τμήματος DNA και με τις δυο κατεύθυνσης από φορέα εισαγωγής (entry vector) χρησιμοποιώντας αντίδραση LR Clonase. Στο επόμενο σχήμα φαίνεται το T-DNA του φορέα ξεκινώντας από το αριστερό συνοριακό.



Ανασυνδυασμένοι φορείς pCAMBIA-AMY2.3 και pUBI-AMY2.3

Παρακάτω φαίνονται ολόκληροι οι χάρτες των ανασυνδυασμένων φορέων pCambia1300 και pUBI-GWS-GFP με τις κατασκευές σίγησης AMY2.3, οι χάρτες του AMY2.2 είναι οι ίδιοι με το αντίστοιχο τμήμα ORF.





ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3: ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ-ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ABA: ABscisic Acid
Amp: Ampicillin
At: *Arabidopsis thaliana*
bp: base pairs
C: Carbon
CaMV: Cauliflower Mosaic Virus
Cef: Cefotaxime
Chl: Chloramphenicol
ddH₂O: double distilled wa ter
dH₂O: de-ionized water (in this text)
DTT: DiThioThreitol
EDTA: EthyleneDiamineTetraAcetate
EtOH: Ethanol
FPP: Farnesyl PyrophosPhate
GFP: Green Fluorescent Protein
GWS: GateWay Silencing
Hyg: Hygromycin
Kan: Kanamycin
kb: kilobases
MCS: Multiple Cloning Site
nos: nopaline synthase
OCS: OCtopine Synthase
OD: Optical Density
ORF: Open Reading Frame
OSC(s): OxidoScualene Cyclase(s)
PCR: Polymerase Chain Reaction
Rif: Rifampicin
Spec: Spectinomycin
T-DNA: Transferred-DNA
TE: Tris-EDTA solution
Ubi/UBI: Ubiquitin
UTR: Un-Translated Region
' : minutes
'' : seconds

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Connolly, J.D. and Hill, R.A. 1991. Dictionary of Terpenoids. 1st Edn., Chapman and Hall, London, New York, ISBN: 041225770X, pp: 80-182
2. McGarvey D. J. and Croteau R. 1995. Terpenoid Metabolism. *The Plant Cell*, 7:1015-1026
3. Langenheim J. H. 1994. Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20: 1223-1280
4. Abe, I., Rohmer, M. and Prestwich, G.D. 1993. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chemical Review*. 93: 2189–2206
5. Phillips D. R., Rasbery J. M., Bartel B and Matsuda S.P.T. 2006. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology*. 9:305–314
6. Osbourn A. E. 1996. Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *The Plant Cell*. 8:1821-1831
7. Osbourn A. E. Qi X. Townsend B. and Qin B. 2003. Dissecting plant secondary metabolism– constitutive chemical defences in cereals. *New Phytologist* 159:101–108
8. Papadopoulou K. Melton R.E. Leggett M. Daniels M.J. and Osbourn, A.E. 1999. Compromised disease resistance in saponin deficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:12923–12928
9. Price K. R. Johnson I. T. Fenwick G. R. Malinow M. R. 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 26:27 - 135
10. Baisted D.J. 1971. Sterol and triterpene synthesis in the developing and germinating pea seed. *Biochemistry Journal* 124:375–383
11. Hernandez L.E. and Cooke D.T. 1996. Lipid composition of symbiosomes from pea root nodules. *Phytochemistry*. 42:341–346
12. Confalonieri M., Cammareri M., Biazzi E., Pecchia P., Pedro M., Fevereiro S., Balestrazzi A., Tava A. and Conicella C. 2009. Enhanced triterpene saponin biosynthesis and root nodulation in transgenic barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) expressing a novel β -amyrin synthase (*AsOXAI*) gene. *Plant Biotechnology Journal*. 7:172–182

13. Vincken JP, Heng L., de Groot A and Gruppen H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68:275–297
14. Kushiro T., Shibuya M. and Ebizuka Y. 1998a. Beta-amyrin synthase – Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *European Journal of Biochemistry* 256:238–244
15. Otuki M.F., Ferreira M, Lima F.V., Meyre-Silva C., Malheiros A, Muller L. A., Cani G.S., Santos A.R.S., Yunes R.A. and Calixto J.B. 2005. Antinociceptive Properties of Mixture of α -Amyrin and β -Amyrin Triterpenes: Evidence for Participation of Protein Kinase C and Protein Kinase A Pathways. *JPET* 313:310–318
16. Samy R.P. and Gopalakrishnakone P. 2008. Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. *eCAM Advance Access* 36:1-12
17. Kushiro, T., Shibuya, M. and Ebizuka, Y. 1998b. Molecular cloning of oxidosqualene cyclase cDNA from *Panax ginseng*. The isogene that encodes β -amyrin synthase. *Towards Natural Medicine Research in the 21st Century, Excerpta Medica International Congress Series* 1157:421–427
18. Morita, M., Shibuya, M., Kushiro, T., Masuda, K. and Ebizuka, Y. 2000. Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*) – New alpha-amyrin-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. *European Journal of Biochemistry* 267: 3453–3460.
19. Iturbe-Ormaetxe I., Haralampidis K., Papadopoulou K., Osbourn A.E. 2003. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology*. 51:731-743
20. Sawai S., Shindo T., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Ayabe S., Aoki T. 2006. Functional and structural analysis of genes encoding oxidosqualene cyclases of *Lotus japonicus*. *Plant Science* 170:247–257
21. Graham P.H. and Vance C.P. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131, 872–877
22. Long S.R. 1989. Rhizobium – legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56:203-14
23. Smil V. 1999 Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochemical Cycles* 13:647-662

24. Handberg K., Stougaard J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant Journal* 2:487-496
25. Udvardi M., Tabata S., Parniske M., Stougaard J. 2005. *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *TRENDS in Plant Science*. 10:222-228.
26. Katzen F. 2007. Gateway[®] recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion in Drug Discovery*. 2:571-589
27. Sinkar V.P., White F.F. and Gordon M. P.1987. Molecular biology of Ri-plasmid—A review. *Journal of Biosciences* 11:47–57
28. Zhu J., Oger P.M., Schrammeijer B., Hooyakas P.J.J., Farand S.K. and Winans S.C. 2000. The Bases of Crown Gall Tumorigenesis. *Journal of Bacteriology*. 182:3885–3895
29. White F.F., Taylor B.H., Huffman G.A., Gordon M.P. and Nester E.W. 1985. Molecular and Genetic Analysis of the Transferred DNA Regions of the Root-Inducing Plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology*. 164: 33-44
30. Chilton M.D., Tepfer D.A., Petit A., David C., Casse-Delbert F. and Tempe J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*. 295:432-434
31. Zambryski P., Joos H, Genetello C., Leemans J., Van Montagu and Schell J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of the normal regeneration capacity. *EMBO J* 2:2143-2150
32. Peralta E.G, Helmiss R. and Ream W. 1986. *Overdrive* a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumour inducing plasmid. *EMBO J* 5:1137-1142
33. Gustavo A., González-Cabrera J., Vázquez-Padrón R., Ayra-Pardo C. 1998. The *agrobacterium tumefaciens* gene transfer to plant cell. *Electronic Journal of Biotechnology*.
34. David C., Chilton M.D., Tempe J. 1984. Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. *Bio/Technology* 2:73-76
35. Diaz C.L., Melchers L.S. Hooyakas P.J.J., Lugtenverg B.J.J. and Kijne J. W. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature*. 338:579-581
36. Constantino P., Spano L., Pomponi M., Benvenuto E. and Ancora G. 1984. The T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* is transmitted through meiosis to

- the progeny of hairy root plantes. *Journal of Molecular Applied Genetics* 2:465-470
37. Tepfer D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium tumefaciens*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37:957-967
 38. Stougaard J., Abildsten D. and Marcker K.A. 1987. The *Agrobacterium rhizogenes* pRi TL-DNA segment as a gene vector system for transformation of plants. *Molecular General Genetics*. 207:251-255
 39. Limpens E, Ramos J, Franken C, Raz V, Compaan B, Franssen H, Bisseling T and Geurts R 2004 RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* 55:983–992
 40. Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Becard G, Rosenberg C, Barker D.G. 2001. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-Wxing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact*. 14:695–700
 41. Crane C., Wright E., Dixon R. A., Wang Z.Y. 2006. Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* 2006 223:1344–1354
 42. Martirani L, Stiller J, Mirabella R, Alfano F, Lamberti A, Radutoiu SE, Iaccarino M, Gresshoff PM, Chiurazzi M (1999) A fast and efficient experimental system for T-DNA tagging in the model legume *Lotus japonicus*. Trapping frequencies, expression patterns and potential for insertional mutagenesis. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 12:275–284
 43. Kumagai H. and Kouchi H. 2003. Gene silencing by expression of hairpin RNA in *Lotus japonicus* roots and root nodules. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 16:663-668
 44. Limpens E, Franken C, Smit P, Willemsse J, Bisseling T, Geurts R 2003. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302:630–633
 45. Herr A.J. and Baulcombe D.C. 2004. RNA Silencing Pathways in Plants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Volume LXIX

46. Sharp P.A. 2001. RNA interference—2001. *Genes and Development*. 15:485–490
47. Wesley S.V., Helliwell C.A., Smith N.A., Wang M.B., Rouse D.T., Liu Q., Gooding P.S., Singh S.P., Abbott D., Stoutjesdijk P.A., Robinson S.P., Gleave A.P. and Waterhouse P.M. 2001. *Plant Journal*. 27:581–590
48. Helliwell C. and Waterhouse P. 2003. Constructs and methods for high-throughput silencing in plants. *Methods* 30:289-295.
49. Maekawa T., Kusakabe M., Shimoda Y., Sato S., Tabata S., Murooka Y. and Hayashi M. 2007. Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 21:375-382
50. Palauqui, J. C., Elmayan, T., Pollien, J. M., and Vaucheret, H. 1997. Systemic acquired silencing: Transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to nonsilenced scions. *EMBO J*. 16:4738-4745
51. Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method, *Methods*, 25:402-408
52. Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M.K. and Scheible W-R. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 139:5-17
53. Brusslan, J.A. and Tobin, E.M. 1992. Light-independent developmental regulation of *cab* gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:7791-7795
54. Dixon R.A. and Sumner L.W. 2003. Legume Natural Products: Understanding and Manipulating Complex Pathways for Human and Animal Health. *Plant Physiology*. 131: 878–885