



Εθνικό και
Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας



Διπλωματική Εργασία

Μοριακή ανάλυση του γονιδιακού τύπου AT4G08685 στο *Arabidopsis thaliana*

Κωνσταντίνα Μάλλιαρη

A.M.: 1810769

Τριμελής Επιτροπή: Ανδρέας Ρούσσης, Κοσμάς Χαραλαμπίδης, Καλλιόπη
Παπαδοπούλου



National and
Kapodistrian
University of
Athens

University of
Thessaly



Bachelor's Thesis

Molecular analysis of the gene locus *AT4G08685* in *Arabidopsis thaliana*

Konstantina Malliari

R.N.: 1810769

Three-member commission: Andreas Roussis, Kosmas Charalampidis,
Kalliopi Papadopoulou

Περιεχόμενα

Περίληψη

Abstract

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Η πρωτεΐνη Selenium Binding Protein (SBP)

1.1.1 Το σελήνιο στους οργανισμούς

1.1.2 Πρωτεΐνη SBP

1.1.3 Ρόλος της SBP πρωτεΐνης στους ζωικούς οργανισμούς

1.1.4 Ρόλος της SBP πρωτεΐνης στους φυτικούς οργανισμούς

1.2 Το αλλεργιογόνο γύρης της ελιάς Ole e 1

1.2.1 Αλλεργιογόνα γύρης

1.2.2 Αλλεργιογόνα της τάξης των Λαμιωδών

1.2.3 Ole e 1: το κύριο συστατικό δέσμευσης IgE της γύρης της ελιάς

1.2.4 Δομή του αλλεργιογόνου Ole e 1

1.2.5 Αλλεργιογόνα της οικογένειας Oleaceae

1.2.6 Λειτουργία του αλλεργιογόνου Ole e 1

1.2.7 Νέες πιθανές θεραπείες έναντι αλλεργιογόνων

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων

2.1.1 Καλλιέργεια κυττάρων *Escherichia coli* (*E. coli*)

2.1.2 Αποθήκευση βακτηριακών στελεχών

2.2 Απομόνωση και καθαρισμός DNA

2.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

2.2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

2.2.4 Αλκαλική λύση πλασμιδιακού DNA, Miniprep

2.2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα *E. coli* με ΚΙΤ της εταιρίας Macherey Nagel (high-copy)

2.2.6 Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

2.2.7 Απομόνωση DNA από ζώνη πηκτής αγαρόζης (Gel Extraction) βάσει του πρωτοκόλλου NucleoSpinR Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel (2012)

2.2.8 Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA μετά από πέψεις βάσει του πρωτόκολλου NucleoSpinR Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel (2012)

2.3 Μετασχηματισμός χημειοδεκτικών κυττάρων *E. coli*

2.3.1 Κλωνοποίηση γονιδίων σε πλασμιδιακό φορέα με την Αντίδραση Λιγάσης

2.3.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. Coli*

2.3.3 Έλεγχος επιτυχίας μετασχηματισμού μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης Colony PCR

2.4 Σταθερός μετασχηματισμός φυτών

2.4.1 Πρότυποι οργανισμοί

2.4.2 *Arabidopsis thaliana*

2.4.3 Καλλιέργεια φυτών *Arabidopsis thaliana* οικότυπου Columbia (Col-0)

2.4.4 Χρήση του συστήματος του *Agrobacterium tumefaciens*

- i. Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών *Agrobacterium tumefaciens*
- ii. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *Agrobacterium tumefaciens*, Miniprep
- iii. Σταθερός μετασχηματισμός φυτών

2.5 Απομόνωση RNA από φυτικούς ιστούς

2.5.1 Απομόνωση RNA

2.5.2 Θεραπεία με Dnase (Biolabs)

2.5.3 RT- PCR (Reverse transcript)

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

3.1 Απομόνωση ενθεμάτων

3.2 Κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pJET1.2 και απομόνωση πλασμιδίων

3.3 Καθαρισμός ενθεμάτων

3.4 Καθαρισμός φορέων έκφρασης pCambia1301 και pGBKT7

3.5 Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με ανασυνδυασμένα πλασμίδια

3.6 Μετασχηματισμός Αγροβακτηρίων (*Agrobacterium tumefaciens*) και Σταθερός Μετασχηματισμός φυτών (*Arabidopsis thaliana*)

3.7 Αποτελέσματα πρωτοκόλλου χρώσης GUS

3.8 Αναπτυξιακό προφίλ γονιδίου SAH7

3.9 Αποτελέσματα αναζητήσεων σε βάσεις δεδομένων

3.10 Συμπεράσματα – Συζήτηση

3.11 Μελλοντικοί στόχοι

Κεφάλαιο 4: Λίστα βιβλιογραφικών αναφορών

4.1 Άρθρα σε επιστημονικά περιοδικά

4.2 Βιβλία

Κεφάλαιο 5: Παράρτημα

5.1 Θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας βακτηρίων και φυτών

5.1.1 Υγρό θρεπτικό διάλυμα LB (Lysogeny Broth, Bertani, 1951)

5.1.2 Υγρό θρεπτικό διάλυμα ½ MS

5.2 Διαλύματα και Αντιδραστήρια

5.2.1 Διάλυμα παρείσφρησης για τον σταθερό μετασχηματισμό φυτών IM (1000ml)

5.2.2 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης και χρώσης πηκτώματος

5.2.3 Υλικά απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με K17 της εταιρείας Macherey Nagel (high-copy)

5.2.4 Υλικά αλκαλικής λύσης πλασμιδιακού DNA, Miniprep

5.2.5 Αντιδραστήρια PCR

5.2.6 Διαλύματα αντίδρασης λιγάσης

5.2.7 Αντιδραστήρια πέψων περιοριστικών ενδονουκλεασών

5.2.8 Αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου GUS staining

5.2.9 Διαλύματα πρωτοκόλλου απομόνωσης RNA από φυτικούς ιστούς

5.3 Αντιβιοτικά

5.4 Χάρτες πλασμιδιακών φορέων

5.4.1 Πλασμιδιακός φορέας pJET1.2/blunt (Thermo scientific)

5.4.2 Πλασμιδιακός φορέας pGBKT7

5.4.3 Πλασμιδιακός φορέας pCambia1301

Περίληψη

Η πρωτεΐνη SBP (Selenium Binding Protein) απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 1989 λόγω της ικανότητάς της να δεσμεύει το ραδιενεργό σεληνίου σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ήπαρ ποντικού. Ο μηχανισμός πρόσδεσης του σεληνίου, αν και παραμένει άγνωστος, διαφέρει από εκείνο των σεληνοπρωτεϊνών και θεωρείται πως η δέσμευση του στοιχείου αυτού επιτυγχάνεται μέσω της σύζευξής του με παράγωγα της γλουταθειόνης. Μέχρι σήμερα, ομόλογες πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί σε μικροοργανισμούς, ζώα και ανώτερα φυτά, ενώ συγκριτικές αναλύσεις αποκαλύπτουν αρκετά μεγάλο ποσοστό συντήρησης των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών ακολουθιών τους ανάμεσα στα είδη. Στους φυτικούς οργανισμούς συσχετίζονται κυρίως με την απόκριση σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, ενώ στους ζωικούς μελετάται έντονα ο ρόλος τους σε περιπτώσεις καρκίνου. Ο ρόλος τους όμως στα φυτά δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί με ακρίβεια και τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες είχαν ως στόχο τη διερεύνηση του ρόλου αυτού κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες (Agalou *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2010). Έρευνες έδειξαν την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών SBP με το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδιακού τόπου AT4G08685 (Agalou *et al.*, 2006), ή αλλιώς SAH7, που πρόκειται για μια πρωτεΐνη που σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες εκφράζεται στα φύλλα. Επίσης, αναζητήσεις σε βάσεις δεδομένων δείχνουν 100% ομοιότητα με μια νουκλεοτιδική περιοχή (135-614bp) του κυριότερου αλλεργιογόνου γύρης της ελιάς, Ole e 1.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδιακού τόπου και να προταθεί κάποιος πιθανός ρόλος ή λειτουργίες στις οποίες φαίνεται να συμμετέχει, καθώς και η εξέταση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του υποκινητή του που είναι υπεύθυνες για την έκφρασή του. Για τον λόγο αυτό ο συγκεκριμένος υποκινητής χωρίστηκε σε τρία μικρότερα, άνισα και αλληλοεπικαλυπτόμενα τμήματα, και μελετήθηκε η έκφρασή του υπό την επίδραση καθενός από αυτά. Ταυτόχρονα μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου SAH7 υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, ενώ αναζητήσεις σε βάσεις δεδομένων (PlantCare) υπέδειξαν πληθώρα cis-ενεργών στοιχείων στον υποκινητή του (pSAH7).

Τα αποτελέσματα μέσω χρώσης με το σύστημα GUS έδειξαν την έκφραση του γονιδίου στον αγωγό ιστό των κοτυληδόνων και των νεαρών φύλλων, και στο μεγαλύτερο μέρος του αγωγού ιστού της ρίζας. Στα συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια και στους συγκεκριμένους ιστούς, το πρότυπο έκφρασης δεν επηρεάστηκε, ακόμα και όταν βρισκόταν υπό τον έλεγχο του μικρότερου κομματιού στο οποίο χωρίστηκε ο υποκινητής του γονιδίου. Επίσης τα αποτελέσματα από τις αναζητήσεις των cis-ενεργών του στοιχείων υποδεικνύουν την πιθανή αλληλεπίδραση του με τις πρωτεΐνες SBP στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην απόκριση στο φως.

Ωστόσο κρίνεται απαραίτητη η μετέπειτα μελέτη του προτύπου έκφρασής του σε ιστούς και αναπτυξιακά στάδια όπου συμβαίνει η ανάπτυξη της γύρης και η ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πρωτεϊνικού προϊόντος του τόπου αυτού με τις πρωτεΐνες SBP μέσω του συστήματος δύο υβριδίων στις ζύμες.

Abstract

One of the proteins that is likely to be involved in selenium metabolism is the selenium-binding protein (SBP) which was originally identified by labeling experiments in mouse liver as one of the main cytosolic proteins able to bind radioactive selenium by an as yet unidentified mechanism. Homologues of SBP exist in many eukaryotic and prokaryotic organisms, sharing a significantly conserved amino acid sequence. Although the physiological function of SBP remains unknown, studies based primarily on animal systems associate SBP with the inhibition of cell proliferation and anti-carcinogenic growth regulation. Analyses in various plant species have shown that SBP is transcriptionally regulated during biotic and / or abiotic stress. To study the function of SBP in plants we used the yeast two hybrid system to screen an *A. thaliana* cDNA library for proteins potentially interacting with SBP, such as the protein product of the gene locus AT4G08685, also named as SAH7. Locus SAH7 encodes a protein, expressed in leaves, with similarity to pollen allergens. Furthermore, research in databases showed 100% homology with a nucleotide region (135-614bp) of the major olive pollen allergen, Ole e 1.

The purpose of this research is to study the expression pattern and the possible functions of the protein product encoded by SAH7, alongside with the deletion analysis of its promoter, pSAH7. At the same time, the expression levels of SAH7 under normal growth conditions were studied, while PlantCare searches denote rich cis-active elements in its promoter.

The results by staining with the GUS staining system showed the expression of the gene in the duct tissue of the cotyledons and the young leaves, and most of the root tissue conduit. In these developmental stages and specific tissues, the pattern of expression was unaffected, even when under the control of the smallest fragment in which the gene's promoter was split. Also the results from searches of its cis-active elements indicate its possible interaction with the SBP proteins in the mechanisms involved in the response to light.

However, it is necessary to further study its pattern of expression in tissues and developmental stages where pollen development occurs and to analyze the interaction of the protein product of this gene locus with the SBP proteins via the two hybrids system in yeasts.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Η πρωτεΐνη Selenium Binding Protein (SBP)

1.1.1 Το σελήνιο στους οργανισμούς

Το σελήνιο (*selenium*) είναι ένα χημικό στοιχείο, η ονομασία του οποίου προέρχεται από την ελληνική λέξη *Σελήνη*. Ανήκει στην 4^η περίοδο και 16^η ομάδα του περιοδικού πίνακα, στη κατηγορία των αμετάλλων, με ατομικό αριθμό 34 και συμβολίζεται ως Se. Στην φύση βρίσκεται σπάνια ως ελεύθερο στοιχείο, ενώ πιο συχνά το συναντά κανείς ως πρόσμειξη σε ορυκτά θειούχων μετάλλων, στα οποία μερικώς αντικαθιστά το θείο. Αποτελεί βασικό ιχνοστοιχείο για τα ζώα και τους μικροοργανισμούς (Combs and Combs 1984, Mayland 1994) και ενώ δεν έχει αποσαφηνιστεί η αναγκαιότητά της ύπαρξης του στα ανώτερα φυτά (Shrift 1969, Lauchli 1993, Terry *et al.*, 2000), ή ο ρόλος του στον μεταβολισμό, μελέτες υποδεικνύουν πως είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των φυκών (Price *et al.*, 1987, Fu *et al.*, 2002, Novoselov *et al.*, 2002). Στα θηλαστικά, το σελήνιο είναι ένα αναπόσπαστο θρεπτικό συστατικό που ενσωματώνεται στο αμινοξύ κυστεΐνη, προς σχηματισμό σεληνοκυστεΐνης (SelenoCysteine, Se-Cys), και που απαιτείται για τη μετάφραση πολλών πρωτεϊνών που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην κυτταρική άμυνα και τη ρύθμιση των ορμονών (Behne & Kyriakopoulos, 2001, Papp *et al.*, 2007). Πολλές αναφορές, όσον αφορά τους ζωικούς οργανισμούς, περιγράφουν μια σχέση ανάμεσα στην ανεπαρκή πρόσληψη σεληνίου και στον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου (Behne & Kyriakopoulos, 2001, Tapiero *et al.*, 2003, Papp *et al.*, 2007). Μάλιστα, έχει δειχθεί πως το συγκεκριμένο στοιχείο πιθανά σχετίζεται με μείωση της τάξης του 39-52% του ποσοστού εμφάνισης και θνησιμότητας σε διάφορες περιπτώσεις καρκίνου, όπως στον καρκίνο του προστάτη, των πνευμόνων, του παγκρέατος και του παχέος εντέρου (Clark *et al.*, 1996, Yang & Sytkowski, 1998). Πιο συγκεκριμένα, πιθανολογείται πως η συμμετοχή του σε διαδικασίες όπως η ρύθμιση της απόπτωσης, η επαγωγή της διακοπής του κυτταρικού κύκλου, η αναστολή της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων και η επίδρασή του στην έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων και ανδρογόνων (Lee *et al.*, 2005, Surai, 2006, Zeng & Combs, 2008), ενισχύουν την άποψη πως το σελήνιο συμβάλλει στην πρόληψη του καρκίνου. Η έλλειψη σεληνίου, έχει επίσης συσχετισθεί με την εμφάνιση νευρολογικών ασθενειών (Emard *et al.*, 1995), όπως η σχιζοφρένεια (Berry, 1994), ενώ αρκετές μελέτες υποστηρίζουν πως η μειωμένη πρόσληψη σεληνίου μπορεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη υποθυρεοειδισμού και της νόσου του Crohn, με καρδιαγγειακές παθήσεις και με την εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος (Zimmerman & Kohrle, 2002). Υπάρχουν ακόμη, ενδείξεις ότι παίζει ρόλο στον περιορισμό της ιικής έκφρασης (Beck, 2001), ότι βοηθά στη πρόληψη καρδιακών νόσων και άλλων μυϊκών και καρδιαγγειακών διαταραχών (Corringier *et al.*, 2001), αλλά και στην επιβράδυνση της προόδου του AIDS σε ανθρώπινες ανοσοεπάρκειες (Baum *et al.*, 2001). Το σελήνιο έχει επίσης μελετηθεί σαν παράγοντας

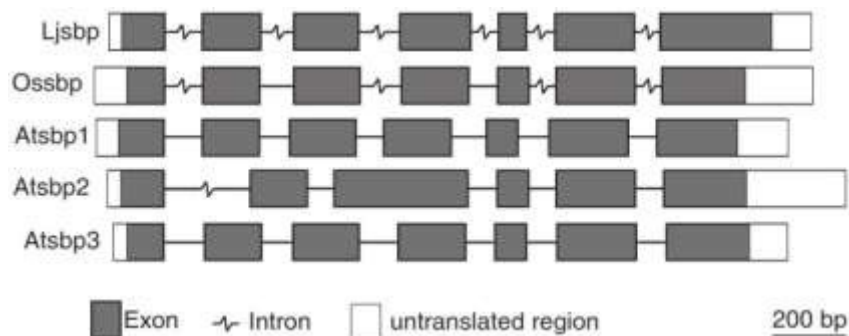
για τη θεραπεία δεκάδων ασθενειών (από άσθμα μέχρι αρθρίτιδα και στειρότητα) με ασαφή ωστόσο αποτελέσματα, ενώ φαίνεται να παίζει ρόλο και στην επιβράδυνση της διαδικασίας της γήρανσης (McKenzie *et al.*, 2001). Η ημερήσια απαιτούμενη ποσότητα σεληνίου για την διατροφή ενός ενήλικα υπολογίζεται στα 60-70 μg και η κύρια πηγή πρόσληψής του είναι τα φυτά. Παρόλα αυτά, σε υψηλές συγκεντρώσεις το σελήνιο στα κύτταρα είναι τοξικό για όλους τους οργανισμούς (Wilber, 1980) και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες, ακόμα και να θέσει σε κίνδυνο τη βιωσιμότητα των οργανισμών (Goldhaber, 2003).

Αν και δεν έχει ακόμη αποδειχτεί η αναγκαιότητα του σεληνίου στους ανώτερους φυτικούς οργανισμούς φαίνεται πως σε μικρές συγκεντρώσεις παίζει θετικό ρόλο στην ανάπτυξη τους. Η είσοδος του στο φυτικό σώμα γίνεται μέσω των ριζών, κυρίως ως ανόργανη ένωση εξασθενούς {selenate [Se(VI)]} ή τετρασθενούς σεληνίου {selenite [Se(IV)]} για να μετατραπεί στη συνέχεια σε οργανικό σελήνιο, το οποίο μπορεί είτε να συσσωρευτεί στους φυτικούς ιστούς είτε να απελευθερωθεί στην ατμόσφαιρα (Lauchli, 1993, Terry *et al.*, 2000, Ellis & Salt, 2003). Έκθεση των φυτικών οργανισμών σε υψηλές συγκεντρώσεις σεληνίου, είτε εξαιτίας πυριγενών και ιζηματογενών πετρωμάτων είτε εξαιτίας της μόλυνσης του εδάφους από ανθρώπινη δραστηριότητα, οδηγεί σε μια μεγάλη γκάμα συμπτωμάτων όπως αναστολή της φυσιολογικής ανάπτυξης του φυτού, χλώρωση, ξήρανση και μαρασμός των φύλλων, ελαττωμένη σύνθεση πρωτεϊνών και τελικά νέκρωση του φυτού (Terry *et al.*, 2000)

1.1.2 Η πρωτεΐνη Selenium Binding Protein

Πέραν από την ενσωμάτωσή του σε σεληνοπρωτεΐνες, το Se μπορεί να δεσμευθεί και από άλλες πρωτεΐνες. Η Selenium Binding Protein1 (SBP1) των θηλαστικών, αρχικά χαρακτηρίστηκε σε ήπαρ ποντικού σε πειράματα που αποσκοπούσαν στον εντοπισμό σεληνοπρωτεϊνών (Bansal *et al.*, 1990). Σήμερα, ομόλογα των SBP έχουν βρεθεί σε πολλούς οργανισμούς, όπως νηματώδη, βακτηρίδια, χτένια (Song *et al.*, 2006), και σε ποικίλα είδη φυτών (Flemetakis *et al.*, 2002, Sawada *et al.*, 2004, Agalou *et al.*, 2005). Προς το παρόν δεν έχουν βρεθεί ομόλογα των πρωτεϊνών αυτών σε ζύμες (*Saccharomyces cerevisiae*). Η SBP1 είναι μια πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο SELENBP1. Ο αριθμός των *sbp* γονιδίων όμως φαίνεται να διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα είδη. Στον άνθρωπο όπως προαναφέρθηκε ταυτοποιήθηκε μόνο ένα γονίδιο *sbp* (Chang *et al.*, 1997), όπως και στο φυτό *Lotus japonicus* (Flemetakis *et al.*, 2002), ενώ στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχουν βρεθεί τρία ομόλογα γονίδια (*AtSBP1*, *AtSBP2*, *AtSBP3*) (Flemetakis *et al.*, 2002, Agalou *et al.*, 2005). Τα γονίδια του *Arabidopsis thaliana*, *AtSBP1* και *AtSBP2* εδράζονται στο 4ο χρωμόσωμα, ενώ το *AtSBP3* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3 (Agalou *et al.*, 2005). Πέραν από τον διαφορετικό αριθμό των SBP γονιδίων ανάμεσα στα διάφορα είδη, διαφορές εντοπίζονται επίσης στον τρόπο οργάνωσης, στον αριθμό και στο μέγεθος των εσώνων και των εξώνων. Η σύγκριση

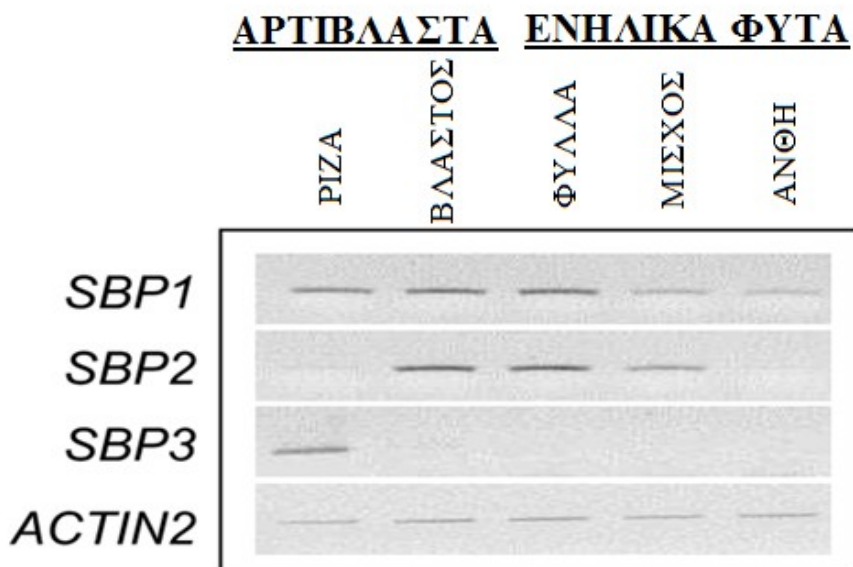
των γονιδίων *sbp* στους φυτικούς οργανισμούς *Lotus japonicus*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* έδειξε πως όλα τα γονίδια *sbp* περιέχουν επτά εξόνια με την εξαίρεση του γονιδίου *AtSBP2* που αποτελείται από έξι. Το μέγεθος των εξονίων και των εσώνιων μεταξύ των γονιδίων *AtSBP1* και *AtSBP3* είναι συγκρίσιμο. Στο γονίδιο *AtSBP2*, το πρώτο εσόνιο και το τρίτο εξόνιο είναι μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα των άλλων γονιδίων (Agalou *et al.*, 2005).



Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση των *sbp* γονιδίων των οργανισμών *Lotus japonicus* (*Ljsbp*), *Oryza sativa* (*Ossbp*) και *Arabidopsis thaliana* (*AtSBP1*, *AtSBP2*, *AtSBP3*). Οι μαύρες εγκιβωτισμένες περιοχές αντιπροσωπεύουν εξόνια (exons) και οι λευκές αντιπροσωπεύουν μη μεταφραζόμενες περιοχές (untranslated regions). Οι ευθείες γραμμές υποδηλώνουν ανάλογο μήκος εσονίων (introns), ενώ οι διαταραγμένες υποδηλώνουν μήκος άνω των 200 ζευγών βάσεων (bp) (Agalou *et al.*, 2005).

Σύγκριση των κωδικών περιοχών των γονιδίων *AtSBP1*, *AtSBP2* έδειξαν ταυτοποίηση κατά 85% μεταξύ τους και 69% με τις αντίστοιχες περιοχές του γονιδίου *AtSBP3*. Μάλιστα, η ταυτότητα των γονιδίων *AtSBP1* και *AtSBP2* στο 3' άκρο τους είναι πολύ υψηλή, ενώ υπάρχουν ακόμα και περιοχές μεγαλύτερες των 21 νουκλεοτιδίων που είναι όμοιες. Φυλογενετικές αναλύσεις έχουν δείξει πως τα γονίδια *AtSBP* προέκυψαν από γεγονότα διπλασιασμού μετά την απόκλιση των φυτών από τα υπόλοιπα βασίλεια (Agalou *et al.*, 2006).

Όσον αφορά την έκφρασή τους, τα γονίδια SBP των φυτών εκφράζονται σταθερά σε διάφορους ιστούς, με τα *AtSBP1* και *AtSBP2* να παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης. Με την έκφραση να παρατηρείται πιο υψηλή σε νεαρούς αυξανόμενους ιστούς και στα φύλλα των ώριμων φυτών, πειράματα ημιποσοτικής αντίστροφης μεταγραφής (RT)-PCR (Dutilleul *et al.*, 2008), έδειξαν ότι το γονίδιο *ATtsbp1* εκφράζεται στα φύλλα, τους βλαστούς, τα άνθη, τους μίσχους και τα σπέρματα ενώ το πρότυπο του γονιδίου *ATtsbp2*, αν και παρόμοιο έδειξε ιδιαίτερα μειωμένη έκφραση στις ρίζες και τα άνθη. Σε αντίθεση με τα γονίδια *ATtsbp1* και *ATtsbp2*, το γονίδιο *ATtsbp3* εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα μόνο στις ρίζες νεαρών αρτιβλάστων.



Εικόνα 1.2: Η έκφραση των πρωτεϊνών *SBP1*, *SBP2*, *SBP3* και *ACTIN2* (θετικός μάρτυρας) σε ιστούς αρτίβλαστων (ρίζα, βλαστός) και ενήλικών φυτών (φύλλα, μίσχος, άνθη) *Arabidopsis thaliana* (Dutilleul *et al.*, 2008).

1.1.3 Δομή της πρωτεΐνης SBP

Ομόλογες πρωτεΐνες SBP έχουν βρεθεί τόσο σε ευκαρυωτικούς όσο και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. Αλληλούχιση των αμινοξικών αλληλουχιών της πρωτεΐνης SBP σε διάφορα φυτά (*Lotus japonicas*, *Medicago sativa*, *Arabidopsis thaliana*) και θηλαστικά (*Mus musculus*, *Homo sapiens*) παρουσίασε ένα ποσοστό 77-88% ταυτότητας στην αμινοξική αλληλουχία μεταξύ των φυτών και 86% μεταξύ των θηλαστικών, ενώ ανάμεσα στα φυτά και τα θηλαστικά το ποσοστό της ταυτόσημης αμινοξικής αλληλουχίας ήταν 68,5-70,2% (Agalou *et al.*, 2005). Ταυτότητα 37% βρέθηκε επίσης μεταξύ των αμινοξικών ακολουθιών των SBP πρωτεϊνών του ανθρώπου και των αρχαίων, ενώ παρατηρήθηκε και ταυτότητα 59% μεταξύ του ανθρώπου και διαφόρων φυτικών ειδών (Agalou *et al.*, 2006). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μόνο λίγες οικογένειες πρωτεϊνών όπως αυτές των ιστονών, της ακτίνης, της ουβικουιτίνης, της γ-τουμπουλίνης, των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins), των 14-3-3 πρωτεϊνών (Doolittle, 1992, Radice *et al.*, 1995), της πρωτεΐνης άμυνας ενάντια στην απόπτωση 1 (48%) (Gallois *et al.*, 1997) και της eIF4E (52%) (Rodriguez *et al.*, 1998) εμφανίζουν τόσο μεγάλη ταυτότητα αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ φυτικών και ζωικών οργανισμών.

Υψηλό βαθμό συντήρησης εμφάνισαν και ορισμένα μοτίβα που απαντώνται στην αμινοξική αλληλουχία των συγκεκριμένων πρωτεϊνών, τόσο στους φυτικούς όσο και στους ζωικούς οργανισμούς. Ένα από τα εν λόγω μοτίβα είναι το μοτίβο CSSC, με δύο παρακαείμενες κυστεΐνες (cysteine, C) να διαχωρίζονται από δύο άλλα αμινοξικά κατάλοιπα (S) (Flemetakis *et al.*, 2002, Lu

et al., 2013), μοτίβο χαρακτηριστικό αρκετών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη ρύθμιση της κατάστασης οξειδωσης/αναγωγής των πρωτεϊνών στόχων τους *in vivo* (Meyer *et al.*, 1999). Η οξειδοαναγωγική κατάσταση των SBP πρωτεϊνών είναι πιθανό να επηρεάζει τη διαμόρφωσή τους και κατ' επέκταση την ικανότητα δέσμευσης στοιχείων, όπως το σελήνιο και το κάδμιο, εκθέτοντας περισσότερες θέσεις πρόσδεσης με αυτά. Έχει βρεθεί πως πρωτεΐνες που περιέχουν το μοτίβο CSSC εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια με το σελήνιο (Jamba *et al.*, 1997, Liu & Stadtman, 1997), ενώ έχουν χαρακτηριστεί και πολλοί μοριακοί συνοδοί που έχουν την ικανότητα να προσδέουν μέταλλα και διαθέτουν το συγκεκριμένο μοτίβο (DiDonato *et al.*, 2000, Wernimont *et al.*, 2000, Urvoas *et al.*, 2003).

Πιθανές θέσεις δέσμευσης μετάλλων αποτελούν οι επικράτειες HxxH (H151, H154) και HxD (H343) που μαζί με τρία κατάλοιπα ιστιδίνης (H75, H87, H88) συναντώνται κοντά στο μοτίβο CSSC, και πιθανολογείται ότι θα μπορούσαν να παίζουν ρόλο στην δέσμευση του σεληνίου (Flemetakis *et al.*, 2002, Agalou *et al.*, 2006).

Τέλος, έχουν αναγνωρισθεί δύο πιθανά μοτίβα δέσμευσης κλαθρίνης (Lafer, 2002, Agalou *et al.*, 2006), μιας πρωτεΐνης με βασικό ρόλο στις διαδικασίες ενδοκύτωσης και μεταφοράς κυστιδίων στο σύστημα Golgi (ter Haar *et al.*, 1998, Marsh & McMahon, 1999), αλλά και πιθανά σήματα παραμονής σε αυτό καθώς και για το ενδοπλασματικό δίκτυο (KDEL) (Agalou *et al.*, 2006).

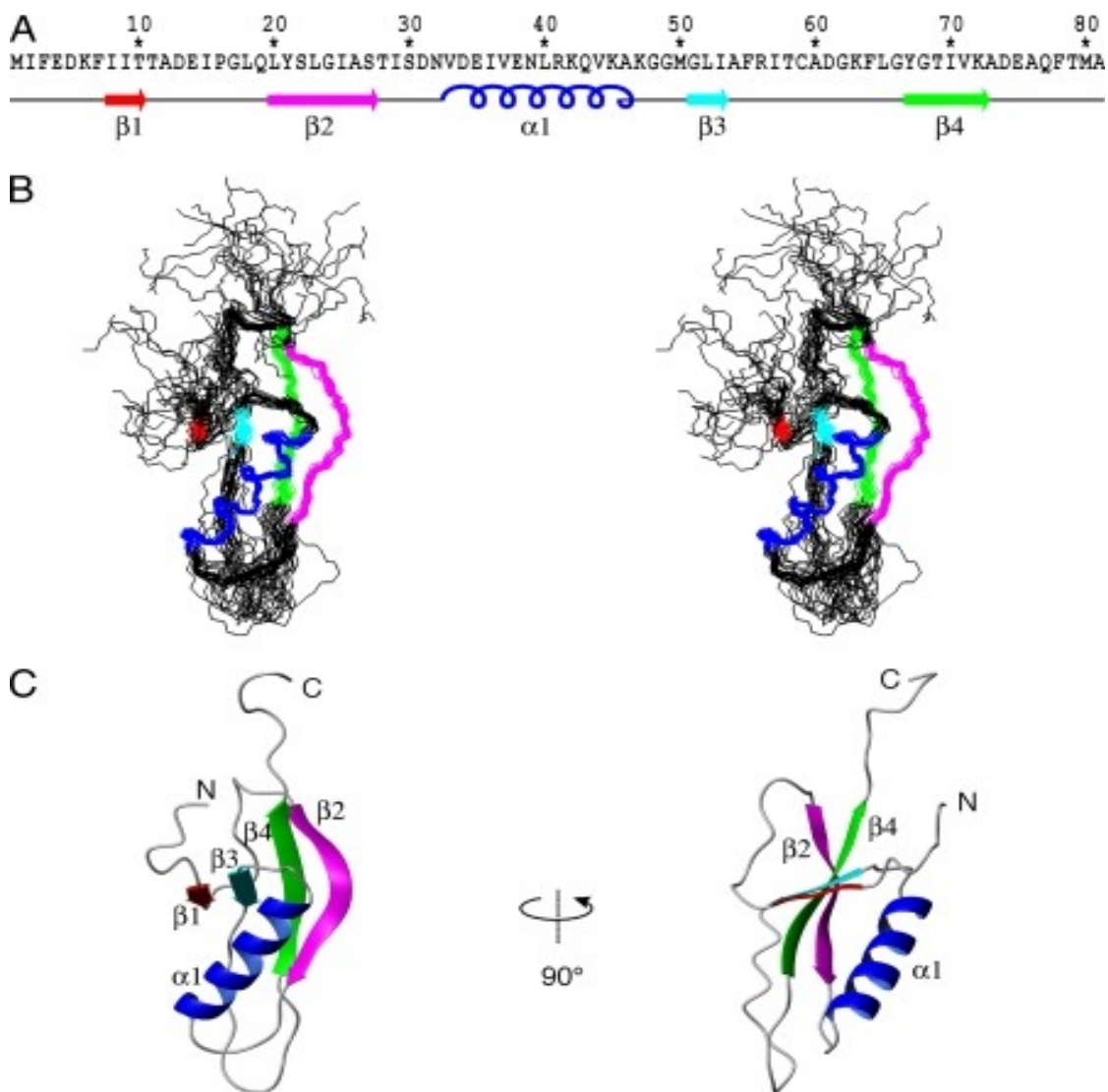
Η παρουσία του μοτίβου KDEL καθώς και αυτή του μοτίβου δέσμευσης κλαθρίνης συμφωνεί με τις υποθέσεις περί συμμετοχής των πρωτεϊνών SBP στις διαδικασίες μεταφοράς κυστιδίων (Porat *et al.*, 2000). Αξίζει να αναφερθεί πως έχουν χαρακτηριστεί επιπλέον μοτίβα που συσχετίζουν τις πρωτεΐνες SBP με το ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συσκευή Golgi (Agalou *et al.*, 2006), ενώ η δευτεροταγής δομή τόσο των ζωικών όσο και των φυτικών πρωτεϊνών SBP φανερώνει πως δεν πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Flemetakis *et al.*, 2002).

Με την βοήθεια της φασματοσκοπίας NMR (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy) βρέθηκε πως η δομή της πρωτεΐνης SBP, όπως καθορίστηκε στον οργανισμό *Methanobacterium vannielii* (Suzuki *et al.*, 2008), είναι αυτή ενός συμμετρικού πενταμερούς, μοριακού βάρους 42kDa (Self *et al.*, 2004, Patteson *et al.*, 2005). Κάθε υπομονάδα αλληλεπιδρά με τις υπόλοιπες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου, ενώ βασικό ρόλο για τη δέσμευση του σεληνίου φαίνεται να έχει το αμινοξύ κυστεΐνη που βρίσκεται στη θέση 59 της κάθε υπομονάδας (Cys59). Η κάθε υπομονάδα αποτελείται από μια α -έλικα και από τέσσερις β -αλυσίδες. Η Cys59 που φαίνεται να εμπλέκεται στην δέσμευση του σεληνίου (Patteson *et al.*, 2005), εδράζεται στο βρόγχο που σχηματίζεται μεταξύ των αλυσίδων β 3- β 4 και η αλκυλίωση της ενδέχεται να αποδεσμεύει το σελήνιο.

Alias	Accession #	Organism	I				II	III		IV		
			KDELH	W	CSSC	HxD	HxxH	pLφpφ	W HxD	pLφpφ		
			**	*					*			
1	BAC53217	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	[65]	GDELFHHFGWNA	CSSALS	-PLAGH	[135]	RPHTTHCG	[326]	DIDLSDORFLYVSCWSTGEMRQ	[434]	KDVFVSEFD--
2	BAB65016	<i>Sulfobobus tokodaii</i>	[70]	NDELHHPGWNAC	SSAL	--CPWKG	[139]	RLFTVRCG	[325]	DIDLSDORFLYLSLACIGEVKQ	[433]	KKFFVDFGE--
3	NP_650256	<i>Drosophila melanogaster</i>	[70]	GDELHHSQWNA	CSSQ	YVDESSK	[140]	APHTTACL	[321]	DILISLDRFLYVNCWREGGVIRQ	[450]	EDFLVDFANEP
4	AAM19706	<i>Theilingiella halophila</i>	[19]	GDELHHSQWNA	CSSC	----HGD	[71]	YPHTAHCL	[249]	DFLISLDRFLYFVNWLEGGDIRQ	[377]	ENFFVDFGQEP
5	NP_193139	<i>Arabidopsis thaliana</i>	[86]	GDELHHSQWNA	CSSC	----HGD	[152]	FPHTAHCL	[330]	DFLISLDRFLYFVNWLEGGDIRQ	[458]	PDFFVDFGQEP
6	NP_193140	<i>Arabidopsis thaliana</i>	[83]	GDELHHTGWNAC	SSC	----HGD	[149]	FPHTSHCL	[327]	DFLISLDRFLYFVNWLEGGDIRQ	[455]	PDFFVDFGQEP
7	NP_189022	<i>Arabidopsis thaliana</i>	[76]	EDELHHSQWNA	CSSC	----HDK	[142]	YPHTQHCL	[320]	DFLISLDRFLYFVNWLEGGDIRQ	[448]	ENFFVDFGTPEP
8	CAC67492	<i>Lotus japonicus</i>	[83]	GDELHHTGWNAC	SSC	----HGD	[149]	YPHTSHCL	[327]	DFLISLDRFLYFVNWLEGGDIRQ	[455]	ENFFVDFGQEP
9	CAC67501	<i>Medicago sativa</i>	[84]	GDELHHTGWNAC	SSC	----HGD	[150]	YPHTSHCL	[328]	DFLISLDRFLYFVNWLEGGDIRQ	[456]	ENFFVDFGQEP
10	AY104661	<i>Zea mays</i>	[92]	GDELHHSQWNA	CSSC	----HGD	[158]	FPHTSHCL	[336]	DFVTSLDRFLYFVNWLEGGDIRQ	[465]	ENFFVDFGTPEP
11	NP_914832	<i>Oryza sativa</i>	[77]	GDELHHSQWNA	CSSC	----HGD	[143]	FPHTSHCL	[321]	DFVTSLDRFLYFVNWLEGGDIRQ	[450]	ENFFVDFGQEP
12	NP_502691	<i>Caenorhabditis elegans</i>	[69]	GDEVHHTGWNAC	SSC	----HDK	[133]	FPHTSHCL	[314]	DILTSMDORFLYVSCWLEGGDIRQ	[439]	RDFLDFGKIE
13	XP_707846	<i>Danio rerio</i>	[69]	KDELHHSQWNA	CSSC	----FGD	[135]	NPHTSHCL	[313]	DILISLDRFLYFVNWLEGGDIRQ	[441]	ENFLVDFGQEP
14	XP_423397	<i>Gallus gallus</i>	[105]	KDELHHSQWNA	CSSC	----FGD	[171]	NPHTSHCL	[348]	DILISLDRFLYFVNWLEGGDIRQ	[476]	TNFLVDFGKEP
15	AAH94129	<i>Xenopus laevis</i>	[68]	NDELHHSQWNA	CSSC	----YGD	[134]	NPHTSHCL	[312]	DILISLDRFLYFVNWLEGGDIRQ	[440]	ENFLVDFGKEP
16	NP_033176	<i>Mus musculus</i>	[69]	KDELHHSQWNA	CSSC	----FGD	[135]	SLHTSHCL	[312]	DILISLDRFLYFVNWLEGGDIRQ	[440]	ENFLVDFGKEP
17	XP_533056	<i>Canis familiaris</i>	[206]	RDELHHSQWNA	CSSC	----FGD	[272]	YVHTSHCL	[449]	DILISLDRFLYFVNWLEGGDLRQ	[577]	ENFLVDFGKEP
18	NP_003935	<i>Homo sapiens</i>	[69]	KDELHHSQWNA	CSSC	----FGD	[135]	FLHTSHCL	[312]	DILISLDRFLYFVNWLEGGDLRQ	[440]	ENFLVDFGKEP

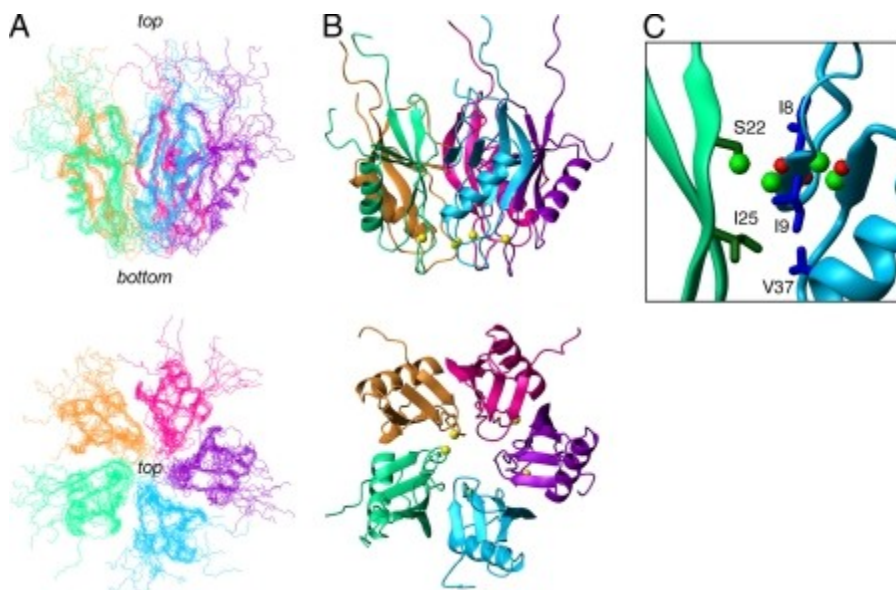
Εικόνα 1.3: Στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των συντηρημένων περιοχών SBP πρωτεϊνών διαφόρων οργανισμών που περιλαμβάνουν πιθανά δομικά μοτίβα. Τα συντηρημένα μοτίβα που φαίνονται είναι τα: KDEL (περιοχή I), CSSC (περιοχή I), HxD (περιοχές I και III), HxxH (περιοχή II) και pLφpφ (περιοχές III και IV). Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν πολύ συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης ή τρυπτοφάνης. Οι κάθετες γραμμές υποδηλώνουν τα βασικά μοτίβα (Agalou *et al.*, 2006).

Το κατάλοιπο Cys59 στην τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης δεν είναι εύκολα προσβάσιμο (Patteson *et al.*, 2005), με τα περιβάλλοντα φορτισμένα (Asp31, Asp61, Lys63) και υδρόφοβα (Thr58, Ala60, Phe64, Leu65) αμινοξικά κατάλοιπα να αυξάνουν την εξειδίκευση του υποστρώματος. Είναι πιθανό πως πρέπει να συμβούν ορισμένες αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση του μορίου, έτσι ώστε να αποκαλυφθεί η συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης.



Εικόνα 1.4: Η δομή μιας υπομονάδας της SeBP. (A) Η δευτεροταγής δομή της SeBP. Η πρωτεΐνη αποτελείται από μια α-έλικα (μπλε χρώμα) και τέσσερις β-αλυσίδες (κόκκινο, ροζ, γαλάζιο, πράσινο χρώμα αντίστοιχα). (B) Απεικόνιση του πρωτεϊνικού σκελετού. (Γ) Αναπαράσταση πρωτεϊνικού μορίου σε δύο κάθετα μεταξύ τους επίπεδα (Suzuki *et al.*, 2008).

Παρόλα αυτά, η Cys59 δεν είναι συντηρημένη ανάμεσα στις ομόλογες SBP πρωτεΐνες. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν την περιοχή πρόσδεσης του σεληνίου στη πρωτεΐνη SBP1 του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Schild *et al.*, 2014) που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα κυστεΐνης Cys²¹ και Cys²². Η *AtSBP1* έχει την ικανότητα να μετατρέπει το τετρασθενές σελήνιο σε δισθενές με τα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης Cys²¹ και Cys²² να σχηματίζουν μια R-S-Se(II)-S-R-τύπου περιοχή δέσμευσης του σεληνίου, ενώ η πρόσδεση θεωρείται ότι συμβαίνει μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού. Στην ίδια μελέτη προτάθηκε επιπλέον πως στα θηλαστικά τα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης στο Cys⁵-X₂-Cys⁸ μοτίβο είναι πιθανότερο να παίζουν κάποιο ρόλο στην δέσμευση του σεληνίου παρά το Cys⁵⁹ μόνο του. (Schild *et al.*, 2014).



Εικόνα 1.5: Η δομή της SeBP, όπως προκύπτει από φασματομετρία NMR. (Α) Αναπαράσταση τριτοταγούς δομής σε δύο επίπεδα κάθετα μεταξύ τους. (Β) Ομοίως με Α. (Γ) Κοντινή άποψη του συνδέσμου μεταξύ δύο υπομονάδων. Οι κόκκινες σφαίρες αποτελούν άτομα H^N του σκελετού ενώ οι πράσινες τα άτομα O (Suzuki *et al.*, 2008)

1.1.4 Ο ρόλος των SBP πρωτεϊνών στους ζωικούς οργανισμούς

Αν και ο φυσιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης δεν έχει εξακριβωθεί, έχει παρατηρηθεί πως η hSBP1 συμμετέχει στην μεταφορά πρωτεϊνών στο σύστημα Golgi (Porat *et al.*, 2000), ενώ πολλές μελέτες βιολογικών λειτουργιών στα ζώα δείχνουν πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Πειράματα *in vitro* έδειξαν πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη φαίνεται να συμμετέχει στα τελικά στάδια μεταφοράς πρωτεϊνών στο σύστημα Golgi που αφορούν την προσάραξη και την σύντηξη κυστιδίων.

Ιδιαίτερης σημασίας είναι οι μελέτες που εμφανίζουν την SBP ανάμεσα στα προϊόντα εκείνα που παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης. Η έκφραση της έχει αποδειχθεί πως μειώνεται σε διάφορους τύπους επιθηλιακών καρκίνων όπως ο καρκίνος του προστάτη (Yang *et al.*, 1998), του στομάχου (He *et al.*, 2004), των ωθηκών (Huang *et al.*, 2006), των πνευμόνων (Chen *et al.*, 2004), του παχέος εντέρου (Kim *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008), του μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα (Pass *et al.*, 2004) ενώ τα μειωμένα αυτά επίπεδα έκφρασης της SBP σε διάφορους καρκίνους έχουν σχετιστεί με κακή πρόγνωση επιβίωσης (Chen *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2008, Pass *et al.*, 2004). Τα επίπεδα της μειώνονται καθώς εξελίσσεται η νόσος, ενώ η αντικαρκινική δράση της SBP φαίνεται να έχει σχέση με την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Chen *et al.*, 2004, Pohl *et al.*, 2009, Huang *et al.*, 2012). Αξίζει να σημειωθεί πως έχει προταθεί η χρήση της SELENBP1 ως βιοδείκτη για την πρόβλεψη εμφάνισης

διαφόρων τύπων καρκίνου (Yang & Diamond, 2013), ενώ τα επίπεδά της μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες και για άλλες ασθένειες, όπως για παράδειγμα σε περιστατικά σχιζοφρένειας, όπου η έκφρασή της παρουσιάζει αλλαγές (Glatt *et al.*, 2005). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες SBP μπορούν επίσης να προστατέψουν το κύτταρο συμμετέχοντας σε μηχανισμούς αποτοξίνωσης (Ishii *et al.*, 1996a, Ishii *et al.*, 1996b, Ishida *et al.*, 1998, Ishida *et al.*, 1999) και έχει επισημανθεί η συμμετοχή τους σε αποκρίσεις οξειδωτικής καταπόνησης (Yang *et al.*, 1998, Gracey *et al.*, 2001, Casey *et al.*, 2002, Fajardo *et al.*, 2004, Song *et al.*, 2006, Lu *et al.*, 2013)

1.1.5 Ο ρόλος των SBP πρωτεϊνών στους φυτικούς οργανισμούς

Στο γονιδίωμα του πρότυπου οργανισμού *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν τρία υψηλά συντηρημένα ομόλογα της πρωτεΐνης SBP των θηλαστικών (SBP1–SBP3). Η κωδική αλληλουχία της SBP1 παρουσιάζει 85% και 69% ταυτότητα με την SBP2 και την SBP3, αντίστοιχα. Ενώ η έκφραση της SBP1 είναι καθολική, η SBP2 εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα σε άνθη και ρίζες, και η SBP3 μόνο σε νεαρά αρτίβλαστα. Σύμφωνα με μελέτη, φυτά στα οποία είχε επιτευχθεί είτε σίγηση είτε υπερέκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης παρουσίασαν φυσιολογικό φαινότυπο, υπό κανονικές συνθήκες ανάπτυξης, σε σύγκριση με τα φυτά του αγρίου τύπου. Τα διαγονιδιακά αυτά φυτά παρουσίασαν όμως διαφορετικά αναπτυξιακά πρότυπα όταν εκτέθηκαν σε ποσότητες σεληνίτη, τα οποία σχετίστηκαν με τα επίπεδα έκφρασης της *AtSBP1*. Τα φυτά εκείνα που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη έδειξαν αυξημένη αντοχή στις ποσότητες σεληνίτη, ενώ εκείνα στα οποία τα επίπεδα της ήταν μειωμένα ήταν πιο ευαίσθητα. Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος έδειξαν ότι αν και η *AtSBP1* δεν φαίνεται να παίζει ανιχνεύσιμο ρόλο στις αναπτυξιακές διαδικασίες υπό φυσιολογικές συνθήκες, εντούτοις φαίνεται να εμπλέκεται στις διαδικασίες που ελέγχουν την τοξικότητα στο *Arabidopsis* από σελήνιο (Agalou *et al.*, 2005). Ο μηχανισμός που μπορεί να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα απέναντι στο σελήνιο δεν είναι ακόμη γνωστός. Αν και η φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης SBP στα φυτά δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί, η φυτική *AtSBP* συσσωρεύεται σε απόκριση στο κάδμιο (Cd) και ενδέχεται να αποτελεί έναν νέο παράγοντα στους μηχανισμούς αποτοξίνωσης μετάλλων (Sarry *et al.*, 2006; Dutilleul *et al.*, 2008). Η έκφραση της φυτικής πρωτεΐνης SBP σε σπορόφυτα *Arabidopsis* μελετήθηκε κάτω από συνθήκες στρες (επίδραση με κάδμιο (Cd), σελήνιο {σεληνικό [Se (VI)] και σεληνικό [Se (IV)]}, χαλκός (Cu), ψευδάργυρος (Zn), και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Πολλές καταπονήσεις, αν και όχι όλες, ήταν επαγωγείς της έκφρασης της SBP1 και είχαν σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση της. Το Cd και το Se, όταν παρέχεται ως Se (VI), ο Cu, και το H₂O₂ ενεργοποίησαν την έκφραση της SBP1, ενώ το Se (IV) ή ο Zn δεν είχαν καμία επίδραση (Hugounioux *et al.*, 2009). Το συγκεκριμένο μοτίβο επαγωγής της έκφρασης της πρωτεΐνης που είναι παρόμοιο με του γονιδίου PRH43, γονίδιο που κωδικοποιεί ένα ένζυμο που εμπλέκεται στο μονοπάτι αφομοίωσης του θείου (S) οδήγησε στην

υπόθεση ότι οι στρεσογόνοι παράγοντες που οδηγούν στην αύξηση της απαίτησης σε θείο είναι επαγωγείς της SBP1. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι η έκφραση της SBP1 ήταν ιδιαίτερα αυξημένη ως απόκριση σε θεραπεία με θείο, ενώ εντοπίστηκε και η παρουσία πολλών αντιγράφων του μοτίβου GAGAC (στοιχείο της απόκρισης σε θείο) (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2005) στον υποκινητή της SBP1.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά την επεξεργασία των φυτών με κάδμιο, τα επίπεδα έκφρασης της SBP1 αυξήθηκαν αρκετά γρήγορα στις ρίζες. Στους βλαστούς, τα μετάγραφα της πρωτεΐνης συσσωρεύθηκαν σε μετέπειτα χρόνο και υψηλότερες δόσεις Cd. Η απόκριση των SBP2 και SBP3 ήταν καθυστερημένη ή τελείως απύσχα (Dutilleul *et al.*, 2008). In vitro πειράματα έδειξαν ότι η SBP1 έχει την ικανότητα να δεσμεύει Cd. Κατά την καταπόνηση παρατηρήθηκε αύξηση των μεταγράφων του γονιδίου *AtSBP1* στις ρίζες και στο βλαστό, και των γονιδίων *AtSBP2* και *AtSBP3* στις ρίζες. Τα στοιχεία αυτά υπογραμμίζουν τη σημασία της διατήρησης των κατάλληλων επιπέδων της πρωτεΐνης, τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε καταπόνηση, και υποδεικνύουν ότι κατά την επεξεργασία με Cd, η συσσώρευση της βοηθά αποτελεσματικά στην αποτοξίνωση του Cd, πιθανότατα μέσω άμεσης σύνδεσης. Το γεγονός ότι η SBP1, υπερεκφράζεται με αποτέλεσμα την αντοχή απέναντι στην καταπόνηση με κάδμιο, αποκαλύπτει τον ουσιαστικό της ρόλο στους μηχανισμούς αποτοξίνωσης των φυτών που καταπονούνται με βαρέα μέταλλα (Dutilleul *et al.*, 2008). Το κάδμιο που ανήκει σε αυτά, έχει χαρακτηριστεί ως καρκινογόνο για τον άνθρωπο, και η συσσώρευσή του στα φυτά αποτελεί τον κύριο τρόπο εισόδου του στην τροφική αλυσίδα.

Επιπλέον, μελέτες έχουν αποδείξει την αλληλεπίδραση της hSBP και με άλλες πρωτεΐνες. Ένα παράδειγμα τέτοιας πρωτεΐνης αποτελεί η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 1 (GPX1), μια σεληνοπρωτεΐνη που ανάγει το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) σε νερό (H₂O) και έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση καρκίνου (Fang *et al.*, 2010). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες συσχετίζονται αντίστροφα, με την αύξηση της συγκέντρωσης του σεληνίου να οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της GPX1 και σε αντίστοιχη μείωση της hSBP. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν τον πιθανό ρόλο και των δύο πρωτεϊνών στην εμφάνιση καρκίνου. Αλληλεπίδραση της hSBP έχει περιγραφεί επίσης, με την πρωτεΐνη από-ουβικουϊτίνωσης 1 von Hippel-Lindau (pVHL) (VDU1) σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη (Jeong *et al.*, 2009). Συγκεκριμένα, η hSBP αλληλεπιδρά με την VDU1 όταν δεσμεύει σελήνιο, κάτι που υποδεικνύει πως η ανθρώπινη SBP είναι πιθανό να συμμετέχει στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών μέσω ουβικουϊτίνωσης. Πρόσφατα μάλιστα περιγράφηκε η λειτουργία της hSBP1 ως στόχου του επαγόμενου από υποξία παράγοντα 1α (hypoxia-inducible factor-1 alpha, HIF-1α) (Scortegagna *et al.*, 2009), ενώ φάνηκε πως η μείωση της έκφρασης της SBP μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένα επίπεδα του HIF-1α και στην προώθηση της μετάστασης του καρκίνου του ήπατος (Huang *et al.*, 2012). Η πρωτεΐνη HIF-1α αποτελεί παράγοντα εξέλιξης του καρκίνου, προωθώντας την ανάπτυξη, την εξάπλωση και τη μετάσταση.

Ωστόσο, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, ο HIF-1α λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας, συντονίζοντας την καταστολή του κυτταρικού κύκλου υπό συνθήκες υποξίας και την απόπτωση. Με πειράματα συστήματος δύο υβριδίων στη ζύμη, αποδείχθηκε ότι οι πρωτεΐνες αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) και αλδολάση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης (Fructose-bisphosphate aldolase, FBA) αλληλεπιδρούν με την *AtSBP1* (Agalou *et al.*, 2006). Επίσης, έχει αποδειχθεί *in vitro* αλληλεπίδραση μεταξύ μιας NADPH-εξαρτημένης GAPDH πρωτεΐνης και μιας FBA σε μελέτες δέσμευσης και κινητικής πρωτεϊνών σε μύες κουνελιού, και ότι η αλληλεπίδραση αυτή επηρεάζει την ενεργότητά τους (Neuzil *et al.*, 1990) καθώς και ότι τόσο η GAPDH, όσο και μια προκαρυωτική αλδολάση (DPA) έχουν βρεθεί ως πιθανές πρωτεΐνες δέσμευσης σεληνίου (Lacourciere *et al.* 2002). Από τα παραπάνω φαίνεται πιθανή η ύπαρξη ενός δικτύου πρωτεϊνών για τη ρύθμιση του μεταβολισμού του σεληνίου στα φυτικά κύτταρα, που θα περιλαμβάνει πολυλειτουργικές πρωτεΐνες, όπως οι SBP, GAPDH και FBA, οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για την τέλεση ενός ή περισσότερων φυσιολογικών ρόλων.

1.2 Το αλλεργιογόνο Ole e 1

1.2.1 Αλλεργιογόνα γύρης

Σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου SAH7 με την μέθοδο BLAST, έδειξε 100% ομολογία με μια νουκλεοτιδική περιοχή (135-614bp) του κύριου αλλεργιογόνου της γύρης της ελιάς, Ole e 1.

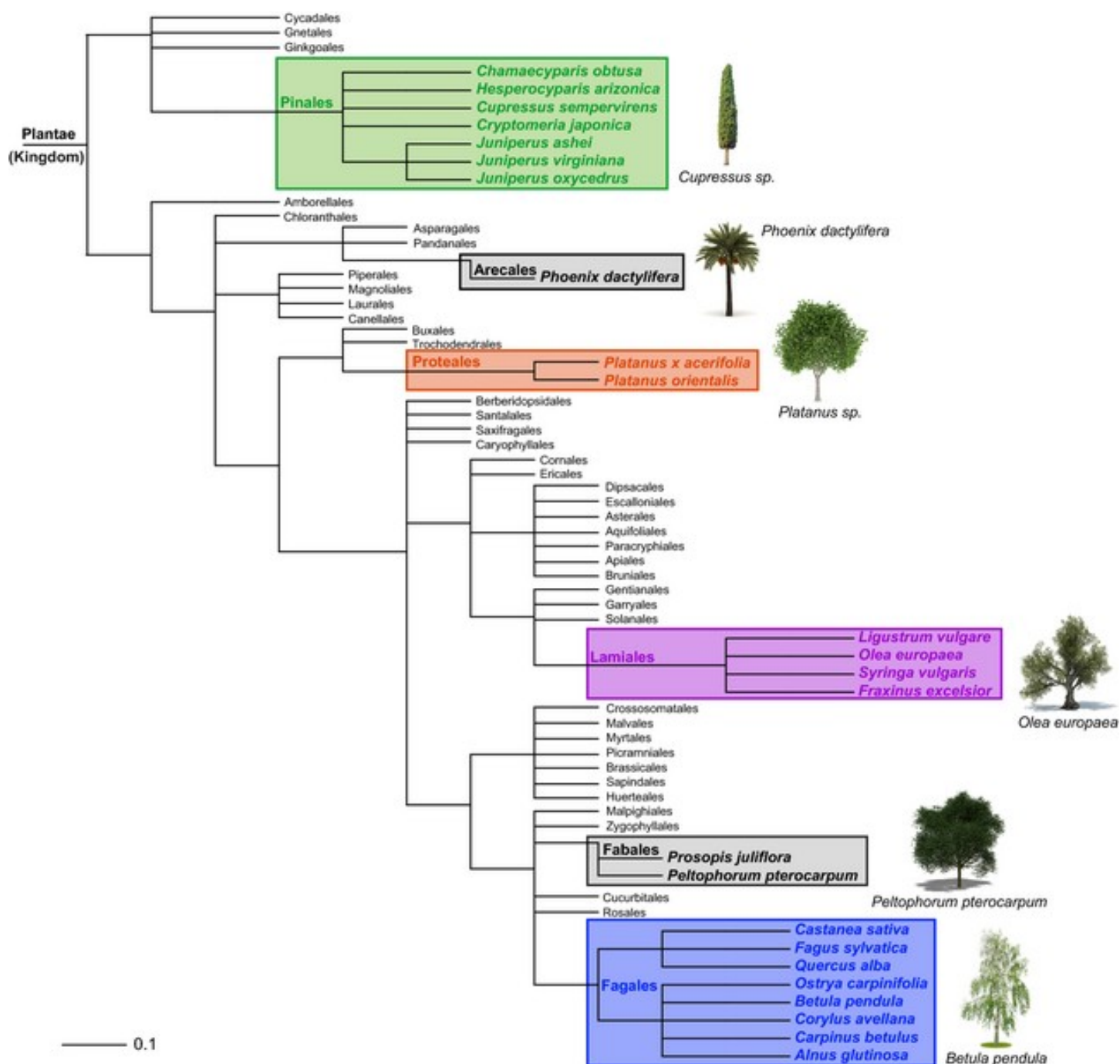
Οι αλλεργίες είναι αντιδράσεις υπερευαισθησίας του ανοσοποιητικού συστήματος σε συγκεκριμένες ουσίες που ονομάζονται αλλεργιογόνα (όπως γύρη, φάρμακα, ή τρόφιμα) που, στους περισσότερους ανθρώπους, δεν επιφέρουν συμπτώματα. Εντός του περασμένου αιώνα, οι αλλεργικές παθήσεις εξελίχθηκαν από το να είναι σχεδόν σπάνιες, σε πανδημικό πρόβλημα υγείας, ενώ κάποιες συντηρητικές εκτιμήσεις δείχνουν ότι περίπου μισό δισεκατομμύριο άνθρωποι πάσχουν παγκοσμίως από αλλεργική ρινίτιδα (Bousquet *et al.*, 2008).

Τα αλλεργιογόνα γύρης θεωρούνται σημαντικός παράγοντας κινδύνου τόσο για την εποχιακή αλλεργική ρινίτιδα όσο και για το άσθμα, ενώ τα αλλεργιογόνα εσωτερικού χώρου ενδέχεται να είναι σημαντικός παράγοντας για την χρόνια ρινίτιδα. Ακόμη, μερικές μελέτες έδειξαν ότι το περισσότερο από το 50% των ασθενών με χρόνια αλλεργική ρινίτιδα είναι ευαισθητοποιημένο σε αλλεργιογόνα γύρης (Bousquet *et al.*, 2008), παρόλο που τα προφίλ ευαισθητοποίησης ποικίλλουν σημαντικά ανάλογα με τη γεωγραφική θέση του πληθυσμού της μελέτης.

Αλλεργιογόνα δέντρα μπορούν να βρεθούν σχεδόν σε όλο τον κόσμο, φθάνοντας από τις εύκρατες κλιματικές ζώνες της Ευρώπης, της Βόρειας Αμερικής και της Ασίας, έως την περιοχή της

Μεσογείου, της Βόρειας Αφρικής, τμήματα της Νότιας Αμερικής και Αφρικής, καθώς και τμήματα της Αυστραλίας, ενώ στις περιοχές τροπικού κλίματος οι αλλεργίες σε γύρη δέντρων είναι σχεδόν ανύπαρκτες (www.eol.org).

Τα δέντρα που ανήκουν στις τάξεις Fagales, Lamiales (Λαμιώδη), Proteales και Πευκώδη (www.allergen.org) (Εικ. 1.6) αναγνωρίζονται ως οι πιο ισχυρές πηγές αλλεργιογόνων, ενώ σε υποτροπικά κλίματα τα δέντρα Fabales Mesquite (*Prosopis juliflora*) και Gulmohar (*Peltophorum pterocarpum*) έχουν αναγνωριστεί ως κλινικά σημαντικές πηγές αλλεργιογόνων (Dhyani *et al.*, 2006, Mandal *et al.*, 2011).



Εικόνα 1.6: Φυλογενετικό δέντρο των τάξεων των φυτών που δημιουργήθηκε με την χρήση phyloT λογισμικού που παράγει φυλογενετικά δέντρα, με βάση την NCBI ταξινόμηση (<http://phyloT.biobyte.de/>). Οι ταξινομικές σειρές που περιέχουν είδη τα οποία έχουν αναγνωρισθεί από τη βάση δεδομένων ονοματολογίας αλλεργιογόνων WHO/IUIS (www.allergen.org) επισημαίνονται με χρώμα (Πευκώδη με πράσινο, Proteales σε κόκκινο, Λαμιώδη σε μωβ, Fagales σε μπλε, και άλλα με κίτρινο χρώμα). Οι φωτογραφίες ελήφθησαν από Fotolia.

1.2.2 Αλλεργιογόνα της τάξης των Λαμιωδών

Τα είδη των αλλεργιογόνων λαμιωδών είναι ενδημικά σε τεράστια μέρη της Ευρώπης αλλά είναι επίσης διάσπαρτα σε όλη την Βόρεια Αμερική, την Αφρική, την Ασία και την Αυστραλία (Εικ. 1.7). Από την τάξη των δέντρων Lamiales, μόνο η οικογένεια Oleaceae έχει βρεθεί να περιέχει αλλεργιογόνα είδη που γονιμοποιούνται μέσω του αέρα. Μέσα σε αυτήν την οικογένεια, έχει αναγνωρισθεί από την επιτροπή WHO/IUIS η γύρη τεσσάρων ειδών δέντρων ως περιέχουσα αλλεργιογόνων πρωτεϊνών: η γύρη του Ευρωπαϊκού φράξου (*Fraxinus excelsior*), του κοινού λιγούστρου (*Ligustrum vulgare*), της ελιάς (*Olea europaea*) και της πασχαλιάς (*Syringa vulgaris*). Τα αλλεργιογόνα αυτά παρουσιάζουν υψηλή ταυτότητα ακολουθιών (πάνω από 80%) αλλά εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα γλυκοζυλίωσης (Batanero *et al.* 1996, Barderas *et al.* 2005, Gonzalez *et al.* 2001).



Εικόνα 1.7: Γεωγραφική κατανομή των αλλεργιογόνων δέντρων της τάξης των Λαμιωδών. Τα δεδομένα κατανομής αποσπάστηκαν από τους χάρτες που παρέχονται στο www.eol.org. Οι φωτογραφίες των άνθων των μελών των Λαμιωδών (λίλα *Syringa vulgaris* και ευρωπαϊκής ελιάς) ελήφθησαν από Fotolia.

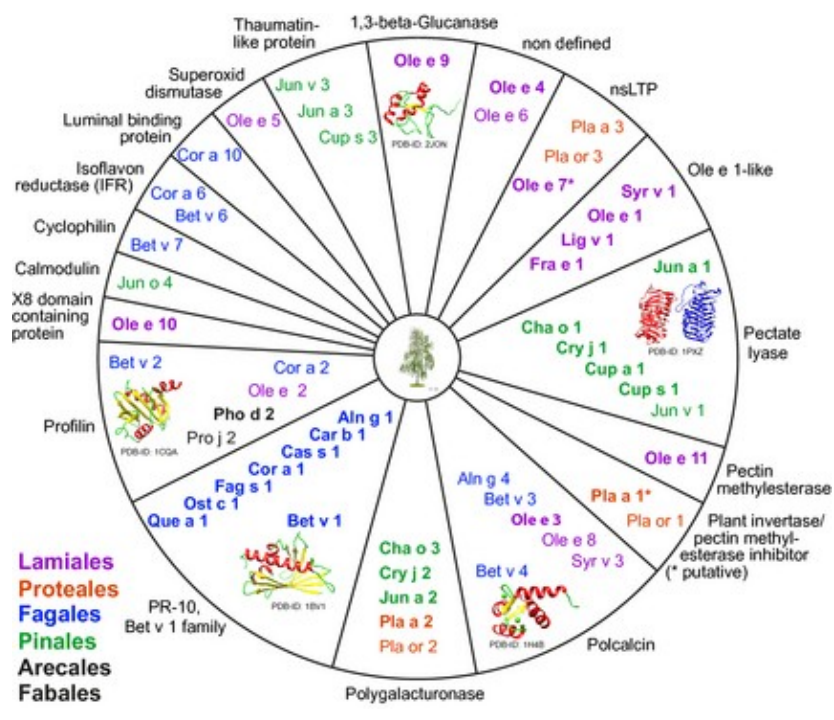
1.2.3 Ole e 1—το κύριο συστατικό δέσμευσης IgE της γύρης της ελιάς

Η αλλεργία στην γύρη της ελιάς είναι μία από τις πιο σημαντικές αιτίες της εποχιακής αναπνευστικής αλλεργίας στις μεσογειακές χώρες, όπου αυτό το δέντρο καλλιεργείται ευρύτατα. Η ελιά (*Olea europaea* L.) είναι ένα αιωνόβιο δέντρο από το οποίο οι άνθρωποι προμηθεύονται λάδι, καρπούς και ξύλο για πάνω από 5.000 χρόνια. Καλλιεργείται ευρέως στις χώρες της Μεσογείου αλλά και σε άλλες όπως η Αμερική, η Αυστραλία, η Ιαπωνία και η Νότια Αφρική. Το δέντρο της ελιάς παρουσιάζει έναν αρκετά μεγάλο βαθμό βοτανικής ποικιλίας δεδομένου ότι μόνο στην Ισπανία έχουν βρεθεί έως και 165 είδη, με πάνω από 1.500 διαφορετικές ποικιλίες σε όλο τον κόσμο (Bartolini *et al.* 1998). Αυτές οι ποικιλίες διαφέρουν τόσο στην ποιότητα των φρούτων τους όσο και στα χαρακτηριστικά της γύρης τους (Alche *et al.*, 2007, Geller-Bernstein *et al.*, 1996, Rodriguez *et al.*, 2002). Το δέντρο της ελιάς παράγει μικρά κίτρινα ή άσπρα άνθη με τέσσερα πέταλα τα οποία εμφανίζονται από τέλη Ιανουαρίου μέχρι τις αρχές του Ιουνίου, περίοδος που εξαρτάται από το γεωγραφικό τοπίο και το κλίμα (Wheeler *et al.* 1992). Η αλλεργία στην ελιά είναι αποτέλεσμα κυρίως της γύρης που παράγουν αυτά τα άνθη, και όχι τόσο των καρπών του δέντρου ή του λαδιού που παράγεται.

Οι σπόροι της γύρης της είναι μικροί (με μέση διάμετρο 17-21μm) με ελαφρώς ελλειπτικό σχήμα και η εξάπλωσή τους γίνεται κατ' εξοχήν μέσω εντόμων αλλά και μέσω του αέρα όταν βρίσκονται σε αφθονία. Η περίοδος γονιμοποίησης των συγκεκριμένων δέντρων ξεκινά περίπου στα μέσα του Απρίλη και τελειώνει στα τέλη του Ιουνίου. Τα κρούσματα αυτής της αλλεργίας είναι αυξημένα κατά την περίοδο παραγωγής της γύρης του δέντρου (από τον Μάιο μέχρι και τον Ιούνιο), αν και περιστατικά αλλεργίας έχουν καταγραφεί, αν και πολύ πιο σπάνια, καθ' όλη την διάρκεια του χρόνου (Kirmaz *et al.* 2005). Αυτά τα περιστατικά αλλεργίας παρουσιάζονται συχνότερα στους ενήλικες, αν και ευαισθησία στην ελιά έχει παρατηρηθεί και μεταξύ των παιδιών (Liccardi *et al.* 1996). Επιπλέον, η επικράτηση της αλλεργίας στην ελιά εξαρτάται από την συγκέντρωση της γύρης και από την περίοδο έκθεσης σε αυτήν (Rodríguez *et al.* 1998, Tejera *et al.* 1999, Baldo *et al.* 1991). Στα εκχυλίσματα της γύρης της ελιάς έχει ανιχνευθεί ένας αρκετά μεγάλος αριθμός αλλεργιογόνων πρωτεϊνών, πάνω από είκοσι πρωτεΐνες, που παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία και πολυπλοκότητα στις αντιδράσεις που προκαλούν στους ασθενείς με αλλεργία στην γύρη (Rodríguez *et al.* 2001). Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα, μόνο δώδεκα από αυτά τα αλλεργιογόνα (Ole e 1 – Ole e 12) έχουν αναγνωρισθεί.

Έχουν επίσης παρατηρηθεί περιπτώσεις όπου ασθενείς μετά από ανοσολογική απόκριση σε αλλεργία στη γύρη της ελιάς, παρουσίασαν αλλεργικές αντιδράσεις στους καρπούς της (Ünsel *et al.* 2009, Wüthrich *et al.*, 2010, Feo Brito *et al.*, 2011). Το γεγονός ότι μέχρι και το 70% των ασθενών με αλλεργία στην γύρη παρουσίασε αλλεργία και σε λαχανικά (Pastorello *et al.*, 1997) υποδεικνύει ότι πιθανότατα υπάρχει μια αλλεργική δομή που είναι κοινή τόσο στην γύρη όσο και στους

καρπούς της ελιάς, κάνοντας έτσι λόγω για μια περίπτωση διασταυρωτής αντίδρασης (cross-reactivity) μεταξύ φυτικών τροφίμων και της γύρης των συγκεκριμένων φυτών. Διασταυρωτή αντίδραση μεταξύ αλλεργιογόνων συμβαίνει όταν ένα IgE αντίσωμα που παράχθηκε εναντίον ενός συγκεκριμένου αντιγόνου (αλλεργιογόνου) δεσμεύει ή αναγνωρίζει μια άλλη πρωτεΐνη διαφορετικής βιολογικής προέλευσης. Παρόλο που εξελικτικά μη συσχετιζόμενες πρωτεΐνες μπορεί να περιέχουν ομόλογες συντηρημένες αλληλουχίες, το φαινόμενο αυτό είναι πολύ πιο έντονο όταν υπάρχουν στενές φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των βιολογικών πηγών των πρωτεϊνών. Εκτός από την οικογένεια δέντρων Oleaceae, και άλλες οικογένειες, όπως οι Gramineae και Betulaceae, έχουν βρεθεί να περιέχουν αλλεργιογόνα γύρης δομικά ή ανοσολογικά συσχετιζόμενα με αυτά των δέντρων της ελιάς, γεγονός που μας επιτρέπει να συμπεράνουμε την ύπαρξη έντονης αντιγονικής διασταυρωτής αντίδρασης μεταξύ των συγκεκριμένων αντιγόνων, αντίδραση που παρατηρείται συνήθως μεταξύ πολυσακχαριτικών αντιγόνων που περιέχουν παρόμοια ολιγοσακχαρικά κατάλοιπα (Rodriguez *et al.*, 2001).



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση των αλλεργιογόνων γύρης ομαδοποιημένα σύμφωνα με τις πρωτεϊνικές λειτουργίες τους. Τα σημαντικά αλλεργιογόνα απεικονίζονται με έντονη γραμματοσειρά, ενώ τα δευτερεύοντα με κανονική γραμματοσειρά. Τα αλλεργιογόνα της τάξης των Λαμιωδών απεικονίζονται με μωβ χρώμα, της τάξης Proteales με κόκκινο, Fagales με μπλε, Pinales

με πράσινο, και τα υπόλοιπα με μαύρο. Οι δομές των αλλεργιογόνων αποκτήθηκαν από την πρωτεϊνική βάση δεδομένων RCSB PDB (<http://www.rcsb.org>) και οι φωτογραφίες από Fotolia, όπως και οι διαφορές μεταξύ σημαντικών και δευτερευόντων αλλεργιογόνων.

Το αλλεργιογόνο Ole e 1 (σύμφωνα με την ονοματολογία IUIS) είναι το πρώτο που χαρακτηρίστηκε (Blanca *et al.*, 1983), παρόλο που η ονομασία του δεν του είχε δοθεί πριν από το 1988 (Lauzurica *et al.*, 1988). Αποτελεί το πιο διαδεδομένο αλλεργιογόνο, αφού έχει βρεθεί πως επηρεάζει το περισσότερο από το 70% των ασθενών με υπερευαισθησία στη γύρη (Rodríguez *et al.*, 2002) (Lauzurica *et al.*, 1988, Wheeler *et al.*, 1992). Αυτό μπορεί να συμβαίνει εξαιτίας της υψηλής αφθονίας του, μιας και αντιπροσωπεύει περίπου το 20% της συνολικής πρωτεΐνης των εκχυλισμάτων γύρης (Esteve *et al.*, 2012, Boluda *et al.*, 1999). Πράγματι, η αφαίρεσή του από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μειώνει σχεδόν εντελώς την αλλεργιογόνο τους δράση (Lombardero *et al.*, 1992).

1.2.4 Δομή του αλλεργιογόνου Ole e 1

Το αλλεργιογόνο Ole e 1 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που παρουσιάζει ένα πρότυπο ηλεκτροφόρησης που αποτελείται από δύο μπάντες, με την μία να αντιστοιχεί στην γλυκοζυλιωμένη (20 kDa) και την άλλη στη μη-γλυκοζυλιωμένη (18,5 kDa) μορφή του (Εικ. 1.9α) (De Cesare *et al.*, 1993, Lombardero *et al.*, 1992, Villalba *et al.*, 1990, Cardaba *et al.*, 2007). MALDI-TOF ανάλυση του αλλεργιογόνου υπέδειξε πως η πιο άφθονη μορφή του είναι η γλυκοζυλιωμένη (Εικ. 1.9β). Μια ακόμα 22-kDa υπεργλυκοζυλιωμένη παραλλαγή, όπως επίσης και μια 40-kDa παραλλαγή που συντίθεται από διμερή των γλυκοζυλιωμένων μορφών, είναι επίσης παρούσες σε πρωτεϊνικά παρασκευάσματα (Villalba *et al.*, 1993, Villalba *et al.*, 1994). Τόσο το cDNA (Lombardero *et al.*, 1994) του αλλεργιογόνου όσο και η αμινοξική του αλυσίδα έχουν αλληλουχιθεί πλήρως (Vela *et al.*, 1982, Wheeler *et al.*, 1992, Cardaba *et al.*, 2007), παρουσιάζοντας εκτεταμένη μικροετερογένεια, με επίκεντρο κυρίως το πρώτο 33% του μορίου (Villalba *et al.*, 1993). Η αλληλουχία των αμινοξέων καθορίστηκε με αυτοματοποιημένη αποικοδόμηση κατά Edman του μειωμένου και αλκυλιωμένου μορίου, καθώς και επιλεγμένων θραυσμάτων που λαμβάνονται με πρωτεολυτικές πέψεις. Το Ole e I περιέχει μια μόνο πολυπεπτιδική αλυσίδα από 145 κατάλοιπα αμινοξέων με υπολογισμένο μοριακό βάρος 16,331 Da. Δεν έχουν ανιχνευθεί ελεύθερες σουλφυδρυλικές ομάδες στη φυσική πρωτεΐνη. Επιπλέον, η αλληλούχιση έδειξε μια πιθανή θέση N-γλυκοσυλίωσης στο σημείο 111-113 (Lombardero *et al.*, 1994, Pajaron *et al.*, 1997) και την παρουσία έξι κυστεϊνικών καταλοίπων, συνδεδεμένα με δισουλφιδικούς δεσμούς (Villalba *et al.*, 1993, Alché *et al.*, 2004). Σύμφωνα με αναλύσεις κυκλικού διχρωισμού το Ole e I αποτελείται κατά 22% από α-έλικες, 38% β-δομές, και 40% από στροφές ή τυχαίες διαμορφώσεις, και τόσο η

γλυκοζυλίωση όσο και μια ανέπαφη δομή φαίνονται κρίσιμες για την αναγνώριση του αντισώματος. Ο πολυμορφισμός είναι ένα γενικό συστατικό των αλλεργιογόνων γύρης. Έχει αποδειχθεί ότι οι διαφορές στην σύνθεση των αλλεργιογόνων μεταξύ των καλλιεργειών ελιάς είναι υπεύθυνες για τις σημαντικότερες διαφορές στην αλλεργιογόνο ικανότητα των εκχυλισμάτων αυτών. Μελέτες που επικεντρώθηκαν στην ανάλυση της γύρης που συλλέχθηκε από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ισπανίας και κατά την διάρκεια διαφορετικών εποχών έδειξαν σημαντική μεταβλητότητα τόσο στις βιοχημικές όσο και στις ανοσοχημικές ιδιότητες (Barber *et al.*, 2008, Barber *et al.*, 1990). Επιπλέον, άλλες εργασίες πάνω στην ανάλυση πρωτεϊνών (Castro *et al.*, 2003, Fernández-Caldas *et al.*, 2007) αλλά και RNA (Hamman-Khalifa *et al.*, 2008) από διαφορετικές ποικιλίες γύρης της ελιάς, έδειξαν επίσης μεγάλες διαφορές στην αλλεργιογόνο τους ικανότητα και στην συγκέντρωση του Ole e 1 (Napoli *et al.*, 2006, Waisel *et al.*, 1999, Castro *et al.*, 2003, Fernández-Caldas *et al.*, 2007). Αυτές οι διαφορές στην αλλεργιογόνο δράση παρατηρήθηκαν για πέντε διαδοχικά έτη, αποδεικνύοντας ότι οφείλονται κυρίως σε γενετικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών ελιάς (Fernández-Caldas *et al.*, 2007). Παρ'όλα αυτά, η κλιματική επίδραση έχει επίσης αποδειχθεί πως επηρεάζει το περιεχόμενο της γύρης σε Ole e 1, υποδεικνύοντας μια θετική συσχέτιση μεταξύ των βροχοπτώσεων κατά τους χειμερινούς μήνες και της συνολικής ποσότητας αλλεργιογόνου γύρης (Quiralte *et al.*, 2000).

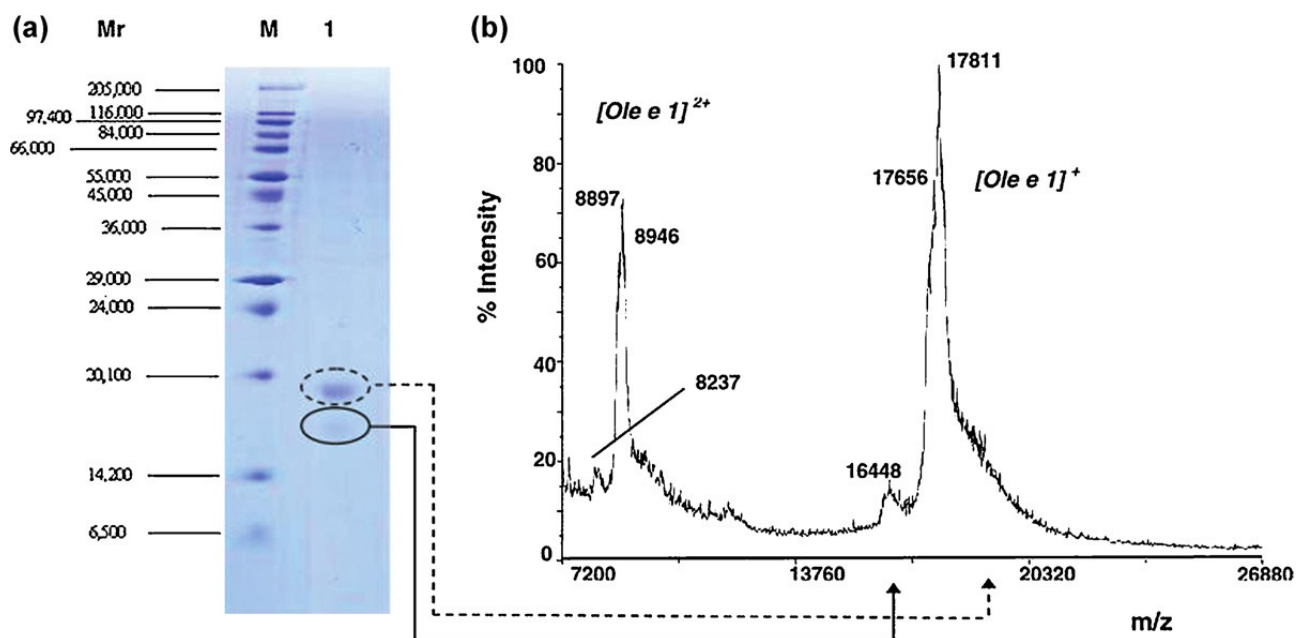
1.2.5 Αλλεργιογόνα της οικογένειας Oleaceae

Άλλα αλλεργιογόνα, όπως τα Ole e 2, Ole e 8, και Ole e 9, έχουν αποδειχθεί εξίσου σημαντικά, ενώ τα αλλεργιογόνα Ole e 6 και Ole e 7 παρουσιάζουν και αυτά αρκετά υψηλές τιμές κλινικής συχνότητας. Σε αυτά τα πλαίσια, γίνεται κατανοητό ότι η επικράτηση πολλών αλλεργιογόνων της ελιάς εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την γεωγραφική περιοχή στην οποία ζουν οι ασθενείς οι οποίοι εμφανίζουν την ευαισθησία.

Κάποια από αυτά τα αλλεργιογόνα έγιναν γνωστά ως μέλη γνωστών οικογενειών πρωτεϊνών όπως αυτή της προφιλίνης (Ole e 2), των πρωτεϊνών που δεσμεύουν Ca^{2+} (Ole e 3 και Ole e 8), της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Ole e 5) και πρωτεϊνών που μεταφέρουν λιπίδια (Ole e 7). Δεν έχει βρεθεί ακόμα η βιολογική λειτουργία του αλλεργιογόνου Ole e 1, ενώ τα Ole e 4 και Ole e 6 είναι καινούργιες πρωτεΐνες με καμιά μέχρι στιγμής ομολογία με γνωστές αλληλουχίες από βάσεις δεδομένων.

Άλλες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στον χαρακτηρισμό της διασταυρωτής αντιδραστικότητας του Ole e 1 και των υπολοίπων αλλεργιογόνων, που είτε ανήκουν είτε όχι στην οικογένεια Oleaceae. Η διασταυρωτή αντίδραση του Ole e 1 και του Ole e 4 (Boluda *et al.*, 1998) έχει καθοριστεί με διάφορες ανοσολογικές μεθόδους, ενώ έχει εκτιμηθεί και η διασταυρωτή αντίδραση μεταξύ του Ole e 1 και άλλων ειδών που ανήκουν στην οικογένεια Oleaceae όπως ash (*Fraxinus excelsior*) (Obispo

et al., 1993, Palomares *et al.*, 2006, Martin-Orozco *et al.*, 1994), privet (*Ligustrum vulgare*) (Baldo *et al.*, 1991, Obispo *et al.*, 1993, 2006, Martin-Orozco *et al.*, 1994), lilac (*Syringa vulgaris*) (Obispo *et al.*, 1993, Martin-Orozco *et al.*, 1994), και forsythia (*Forsythia suspensa*). Τα ομόλογα του Ole e 1 της συγκεκριμένης οικογένειας παρουσιάζουν εξαιρετικά όμοια αμινοξική αλληλουχία και τόσο η *in vivo* όσο και η *in vitro* δραστηριότητά τους υποδεικνύουν έναν ρόλο σχετικό με την διασταυρωτή αντιδραστικότητα (Obispo *et al.*, 1993, Martin-Orozco *et al.*, 1994). Πέραν από την οικογένεια της ελιάς, διασταυρωτή αντιδραστικότητα έχει παρατηρηθεί και με άλλα αλλεργιογόνα από φυλογενετικά μη συσχετιζόμενα είδη. Μελέτες έδειξαν ότι δ.α. συμβαίνει ανάμεσα στο Ole e 1 και στη γύρη της αίρας (*Bermuda*) (Baldo *et al.*, 1991), και και του *Plantago lanceolata* (*Plantago lanceolata* L.) (Castro *et al.*, 2003). Ο ρόλος της N-συνδεδεμένης γλυκάνης στην διασταυρωτή αντιδραστικότητα έχει επίσης προσδιοριστεί (Batanero *et al.*, 1996).



Εικόνα 1.9 (A) SDS-PAGE (lane M, marker, lane 1, Ole e 1 pure fraction) (B) γραμμική MALDI χημικού κλάσματος ορού Ole e 1 (Esteve *et al.* 2012)

Σύγκριση της αλληλουχίας του Ole e 1 με βάσεις δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλουχιών δεν έδειξε ομοιότητα με άλλα γνωστά αλλεργιογόνα. Η αμινοξική αλληλουχία του εμφανίζει μια σχετική ομοιότητα (24–34%) με πρωτεΐνες γύρης από αραβόσιτο, ντομάτα, ήρα, σημύδα, ρύζι αλλά και του *Arabidopsis*. Η ομοιότητα φτάνει τιμές πάνω από 80% όταν η αλληλουχία συγκρίνεται με αυτήν άλλων πρωτεϊνών όμοιων με την ole e-1 της οικογένειας Oleaceae (πασχαλιά, privet, ash, forsythia) (Obispo *et al.*, 1993, Martín-Orozco *et al.*, 1994, Batanero *et al.*, 1994a, Batanero *et al.*, 1996). Το ίδιο το Ole e 1 παρουσιάζει ένα ποσοστό μικροετερογένειας σε διάφορες θέσεις της αμινοξικής αλληλουχίας του (Villalba *et al.*, 1993, Villalba *et al.*, 1994, Lombardero *et al.*, 1994). Ένα 36% και

38% ποσοστό ταυτόσημης αλληλουχίας συναντάται με τις δομές πολυπεπτιδίων, που προκύπτουν, αντίστοιχα, από νουκλεοτιδικές αλληλουχίες γονιδίων που έχουν απομονωθεί από ανθήρες ντομάτας και γύρη αραβοσίτου, οι οποίες έχει προταθεί ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη του σωλήνα της γύρης. Ως εκ τούτου, το συγκεκριμένο αλλεργιογόνο της ελιάς μπορεί να είναι μία συστατική πρωτεΐνη της γύρης που εμπλέκεται σε αναπαραγωγικές λειτουργίες (Alché *et al.*, 2004). Εκτός από το Ole e 1, άλλα 10 αλλεργιογόνα γύρη της ελιάς έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων IUIS (www.allergen.org). Η προφιλίνη Ole e 2 (15 kDa) και το polcalcin Ole e 3 (9 kDa) ανήκουν στα παναλλεργιογόνα. Λίγα είναι γνωστά για το Ole e 4 (32 kDa), αν και το συγκεκριμένο αλλεργιογόνο παρουσιάζει ομοιότητες με το N-τερματικό άκρο του Ole e 9, γεγονός που υποδηλώνει ότι το Ole e 4 μπορεί να είναι προϊόν αποδόμησης αυτού του αλλεργιογόνου (Villalba M *et al.* 2014). Το αλλεργιογόνο Ole e 5, μια πρωτεΐνη 16-kDa, ανήκει στην οικογένεια των υπεροξειδικών δισμουτασών Cu / Zn (SODs) και παρουσιάζει ομολογία με άλλες ειδικές για τα φυτά SODs. Η ενζυμική δραστηριότητα του Ole e 5 έχει επιβεβαιωθεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αλλεργιογόνο δεν εκφράζεται αποκλειστικά στη γύρη, αλλά επίσης και σε άλλους φυτικούς ιστούς. Με μόλις 50 αμινοξέα στην αλληλουχία του, το Ole e 6 (10 kDa) είναι ένα μάλλον μικρό αλλεργιογόνο, εμπλουτισμένο με κυστεΐνη, παρόλα αυτά, έως και το 50% των ασθενών που παρουσιάζουν αλλεργία στην γύρη της ελιάς, ευαισθητοποιούνται με την συγκεκριμένη πρωτεΐνη (Esteve *et al.* 2012). Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το ότι η έκφραση των Ole e 6, 7, 9, 10, και 11 στη γύρη φαίνεται να είναι εξαιρετικά μεταβλητή και να εξαρτάται από την γεωγραφική θέση των φυτών (Villalba M *et al.* 2014).

1.2.6 Λειτουργία του αλλεργιογόνου Ole e 1

Αν και η βιολογική λειτουργία του Ole e 1 δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, μελέτες που διεξάγονται υποδεικνύουν πως το συγκεκριμένο αλλεργιογόνο εμπλέκεται στην ενυδάτωση της γύρης καθώς και στις διεργασίες της βλάστησης (Rodriguez *et al.* 2001). Η κατανομή της πρωτεΐνης και των μεταγράφων της, έχει μελετηθεί σε ιστούς ανθήρα σε όλη την διάρκεια της ανάπτυξής τους (Alché *et al.* 1999). Αυτές οι έρευνες δείχνουν ότι τόσο η σύνθεση όσο και η αποθήκευση πραγματοποιούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κόκκων γύρης, πως το αλλεργιογόνο βρίσκεται επίσης στο εξωτερικό περιβάλλον της γύρης και ότι το σποράγγιο εμπλέκεται στην σύνθεσή του. Βάσει κάποιων πρόσφατων ευρημάτων ενδέχεται η πρωτεΐνη Ole e 1 να συμμετέχει σε ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος στην ελιά, όμοιο με αυτό της ομόλογής της στην τομάτα πρωτεΐνης LAT52, όπου ελέγχει την δημιουργία του σωλήνα της γύρης (Alché *et al.*, 2004). Ενδείξεις για την λειτουργία του αλλεργιογόνου μπορούν να αναδυθούν και από μελέτες σχετικά με την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης LAT52 και του εξωκυτταρικού τμήματος της κινάσης υποδοχέα γύρης LePRK2 (Tang *et al.* 2002). Πρόσφατες ανακαλύψεις (Tang *et al.* 2002, Wengier *et al.* 2003)

δείχνουν ότι η εξωκυττάρια LAT52 αλληλεπιδρά με δύο κινάσες υποδοχέα της γύρης της ντομάτας (LePRK1 και κυρίως LePRK2). Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να είναι ένα αυτοκρινές σύστημα σηματοδότησης που ρυθμίζει την έναρξη, την συντήρηση αλλά και την καθοδήγηση της ανάπτυξης του σωλήνα γύρης, επιτρέποντας έτσι την επιτυχή γονιμοποίηση. Το μοντέλο που προτείνεται από τους συγγραφείς αυτούς περιλαμβάνει την ένωση των LAT52 πρωτεϊνών στις κινάσες υποδοχέα, πριν από την διαδικασία της βλάστησης. Κατά τη βλάστηση στο στίγμα, οι συνδεδεμένες LAT52 θα εκτοπιστούν και η επαγωγή της αποφωσφορυλίωσης της LePRK2 θα πυροδοτήσει έναν καταρράκτη μεταγωγής σήματος στον σωλήνα γύρης.

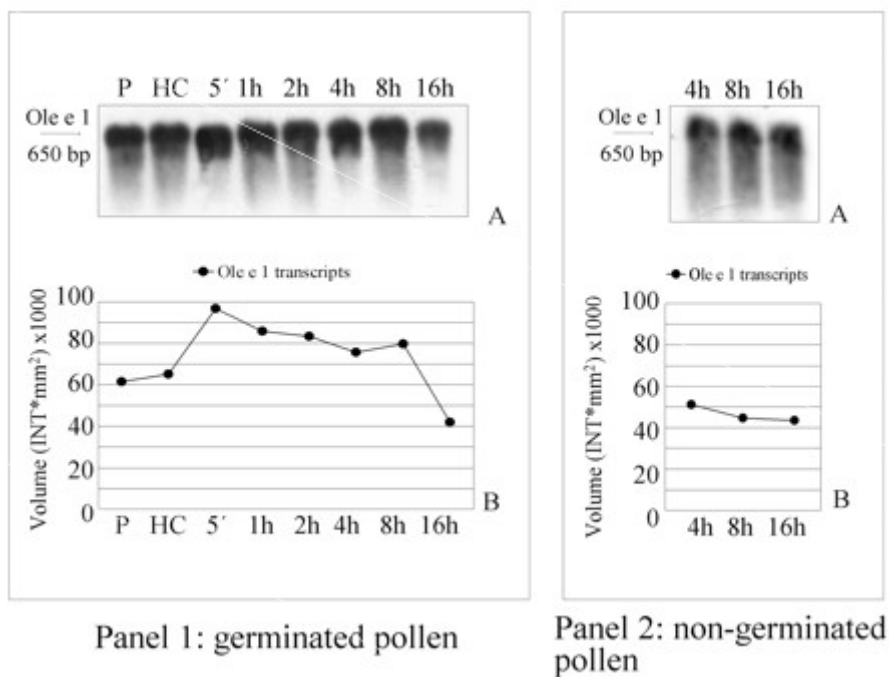
Η πρωτεΐνη LAT52 μοιράζεται πολλά κοινά χαρακτηριστικά με το Ole e 1, συμπεριλαμβανομένου του πλούσιου σε κυστεΐνη και γλυκοζυλιωμένου χαρακτήρα τους, την σχετικά υψηλή ομολογία των αλληλουχιών τους, όπως επίσης και της εκκριτικής φύσης τους. Αμφότερες πρωτεΐνες είναι εξίσου σταθερές έναντι της θερμότητας, εμφανίζουν παρόμοια μοριακή μάζα μετά SDS-PAGE, και τα εκφράζονται μαζί στην ώριμη γύρη. Το μοντέλο σηματοδότησης LAT52 / LePRK1-LePRK2 μπορεί κάλλιστα να ισχύει για την Ole e 1 και πολλές άλλες ομόλογες πρωτεΐνες που έχουν χαρακτηριστεί στη γύρη των διαφόρων ειδών φυτών. Ωστόσο τα ομόλογα στην γύρη της ελιάς των κινασών υποδοχέων, LePRK1 και LePRK2, έχουν ακόμη χαρακτηριστεί (Alché *et al*, 2004).

Μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία μιας σημαντικής αύξησης του ποσοστού της πρωτεΐνης Ole e 1, αλλά και των μεταγράφων του Ole e 1, κατά την διάρκεια της βλάστησης, σε σύγκριση με γύρη που δεν βρίσκεται κατά την διαδικασία αυτή, στην οποία τα επίπεδα της Ole e 1 παρέμειναν σταθερά (Alché *et al*, 2004) (Εικ. 1.10). Οι παρατηρήσεις αυτές ενδέχεται να μοιάζουν με εκείνες που αφορούν την ομόλογή της πρωτεΐνη LAT52 των Muschiatti *et al*. (1994), όπου μετά από αποσιώπηση του συγκεκριμένου γονιδίου της πρωτεΐνης παρουσιάστηκαν δυσκολίες στην ενυδάτωση της γύρης και στην βλάστηση στην τομάτα.

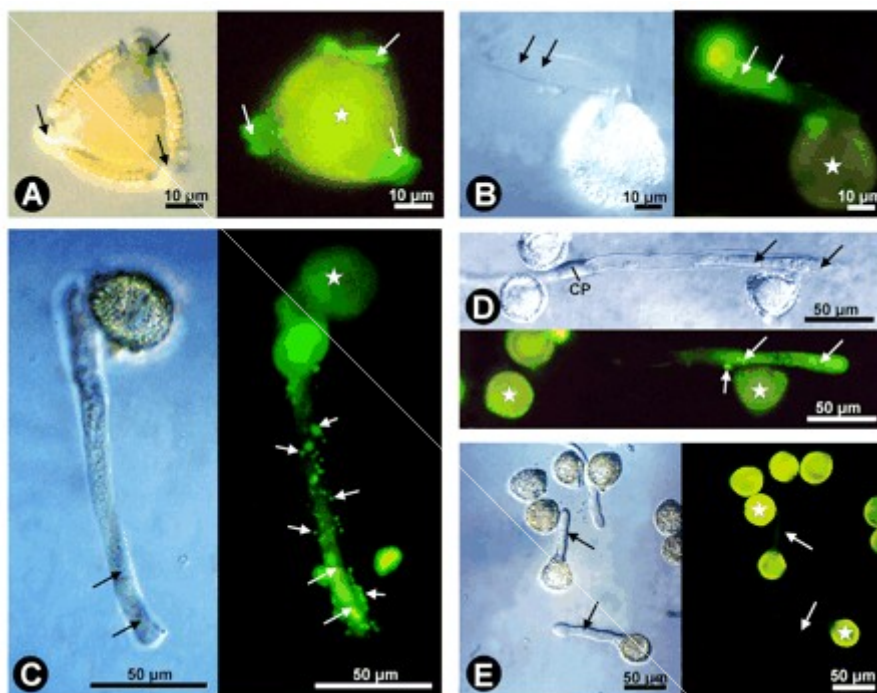
Το αλλεργιογόνο Ole e 1 βρέθηκε και με τις τρεις του παραλλαγές (μη-γλυκοζυλιωμένη, μονο και διγλυκοσυλιωμένη), όπως έχει περιγραφεί εκτενώς για την γύρη ώριμης ελιάς (Lauzurica *et al*. 1988a, Lauzurica *et al*. 1988b, Villalba *et al*. 1990, Batanero *et al*. 1994b) και κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της ανάπτυξης της γύρης της (Alché *et al*. 1999). Ο υψηλός βαθμός πολυμορφισμού που ανιχνεύθηκε για αυτή την πρωτεΐνη είναι επίσης ένα χαρακτηριστικό για πολλά άλλα αλλεργιογόνα γύρης (Johnson and Marsh 1965, Bond *et al*. 1991, Griffith *et al*. 1991, Swoboda *et al*. 1995a). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στη σχετική αναλογία αυτών των τριών παραλλαγών. Η μονογλυκοζυλιωμένη παραλλαγή ήταν η πιο άφθονη, και ως εκ τούτου η μόνη που ανιχνεύθηκε σε εκείνα τα δείγματα όπου το Ole e 1 ήταν λιγιστό (π.χ., στο μέσο καλλιέργειας). Η εμφάνιση των νεοσυντιθέμενων γλυκοσυλιωμένων μορφών του Ole e 1 μεταξύ 4 και 8 ωρών της καλλιέργειας, παράλληλα με την αύξηση των επιπέδων της μη γλυκοζυλιωμένης

παραλλαγής, δείχνουν ότι οι μηχανισμοί γλυκοζυλίωσης είναι πιθανώς παρόντες και ενεργοί στο κυτταρόπλασμα του σωλήνα της γύρης (Alché *et al.* 2004).

Στα περισσότερα είδη φυτών, τόσο η καθυστερημένη ανάπτυξη του σωλήνα της γύρης όσο και η διαίρεση του κυττάρου εξαρτάται από μια νέα σύνθεση των μεταγραφών μέσα στον σωλήνα γύρης, που συμβαίνει μόνο αφού η βλάστηση έχει ήδη ξεκινήσει (Mascarenhas *et al.* 1975). Η αύξηση των επιπέδων μεταγραφής του Ole e 1 που ανιχνεύθηκε 2 ώρες μετά την έναρξη της βλαστήσεως υποστηρίζει αυτά τα δεδομένα. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ επιβεβαιώνουν ότι τα μετάγραφα του Ole e 1 που βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα εξετάστηκαν και ότι η νέα σύνθεση συμβαίνει μόνο εφόσον η βλάστηση έχει προχωρήσει περαιτέρω. Όπως έχει αποδειχθεί και στο παρελθόν σε όλη την ανάπτυξη της γύρης ελιάς (Rodríguez-García *et al.* 1995, Alché *et al.* 1999), το ενδοπλασματικό δίκτυο cisternae έχουν επίσης αναγνωριστεί ως ο τόπος στον οποίο συμβαίνει η σύνθεση και αποθήκευση του Ole e 1, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του σωλήνα γύρης.



Εικόνα 1.10: Έκφραση του Ole e 1 σε γύρη της ελιάς κατά τη διάρκεια in vitro βλάστησης II. (Πίνακας 1) δείγματα γύρης που έχουν βλαστήσει (Πίνακας 2) δείγματα γύρης που δεν έχουν βλαστήσει. Από πάνω προς τα κάτω: (A) ανάλυση Northern blot των μεταγράφων του Ole e 1. Ανιχνευτής DNA για το Ole e 1 υβριδοποιημένος σε άφθονη μοναδική ζώνη των περίπου 650 bp σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν. Φόρτωση: 5 μg του συνολικού RNA ανά λωρίδα επί 2% αποδιατακτικά πηκτώματα αγαρόζης. (B) Ανάλυση πυκνομετρίας των λωρίδων υβριδισμού. P, ώριμη γύρη, HC, γύρη μετά την επεξεργασία προ-ενυδάτωση.



Εικόνα 1.11: Εντοπισμός Ole e 1 σε κόκκο γύρης που βλασταίνει, με ανοσοφθορισμό. Οι εικόνες περιλαμβάνουν μία εικόνα αναφοράς και την αντίστοιχη εικόνα που λαμβάνεται με επιφθορισμό. (A) Πρασινωπός φθορισμός δείχνει την παρουσία του αλλεργιογόνου στις τρεις περιοχές οπών (βέλη) μετά από 2 ώρες *in vitro* καλλιέργειας. (B-D) Σήμα φθορισμού (βέλη) ανιχνεύθηκε στις υποκορυφαίες και κορυφαίες περιοχές του σωλήνα γύρης που αναδύθηκε μετά από 4, 8 και 16 ώρες επώασης, αντίστοιχα. Τα κοιτάσματα φθορισμού στοιβάζονται στο εξωτερικό του σωλήνα της γύρης (μικρά βέλη). (E) Αρνητικός μάρτυρας παρασκευάστηκε παραλείποντας το πρωτεΐον αντίσωμα από τη διαδικασία ανοσοανίχνευσης.

1.2.7 Νέες πιθανές θεραπείες έναντι αλλεργιών

Το Ole e 1, θεωρείται ότι είναι το κυριότερο αλλεργιογόνο καθώς προκαλεί ευαισθητοποίηση σε περισσότερο από το 70% των ασθενών. Έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών που αναζητούν παράγοντες κινδύνου και τρόπους προστασίας από την ευαισθητοποίηση (Esteve *et al.*, 2012). Δείκτες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας και άλλοι γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την αλλεργική απόκριση έχουν αναλυθεί χρησιμοποιώντας βάσεις πληθυσμών, που βασίζονται στην οικογένεια, και λειτουργικές προσεγγίσεις, οι οποίες έχουν αποκαλύψει την εμπλοκή γενετικών παραγόντων σε αυτόν τον τύπο αντίδρασης. Για τον λόγο αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία η αξιολόγηση των περιβαλλοντικών παραγόντων και η σχέση τους με τους γενετικούς παράγοντες για την κατανόηση της αντίδρασης του κάθε οργανισμού στα συγκεκριμένα αλλεργιογόνα. Η έκθεση σε υψηλές δόσεις της γύρης της ελιάς σε ένα συγκεκριμένο γενετικό πλαίσιο μπορεί να προκαλέσει μια ποικιλία αλλεργικών καταστάσεων όπως άσθμα, ή να μην προκαλέσει καμία απολύτως απόκριση.

Σημαντική θεωρείται η καλύτερη μελέτη των διάφορων ποικιλιών σχετικά με τις διαφορές που παρουσιάζει η καθεμιά από αυτές ως προς τις συγκεντρώσεις των σημαντικότερων αλλεργιογόνων. Οι διαφορές που συναντώνται στις συγκεντρώσεις των αλλεργιογόνων αυτών στις διάφορες παρτίδες της γύρης της ελιάς, θα πρέπει να αναλυθούν με περισσότερες λεπτομέρειες διότι η ύπαρξη ποικιλιών λιγότερο αλλεργιογόνων ή ακόμα και υποαλλεργικών θα μπορούσε να έχει μεγάλη εμπορική σημασία και να συμβάλλει στην πρόληψη των αλλεργιών, δεδομένου ότι πλέον δέντρα ελιάς φυτεύονται ευρέως ως καλλωπιστικά σε πολλές χώρες.

Στις εκβιομηχανοποιημένες χώρες έχει παρατηρηθεί μια γενικότερη γενίκευση και επικράτηση ασθενειών όπως το άσθμα, η αλλεργική ρινίτιδα και οι τροφικές αλλεργίες, τα τελευταία είκοσι χρόνια. Οι υπάρχουσες θεραπείες έναντι των αλλεργιών συμπεριλαμβάνουν την αποφυγή της έκθεσης σε αλλεργιογόνα, θεραπείες με φάρμακα, οι οποίες όμως ανακουφίζουν μόνο από τα συμπτώματα, και την συμβατική αλλεργιογόνο-ειδική ανοσοθεραπεία. Αν και η τελευταία έχει αποδειχτεί αρκετά αποτελεσματική σε πολλούς ασθενείς, έχει εμφανίσει σε ορισμένες περιπτώσεις αναφυλακτικές παρενέργειες. Έτσι η ανάπτυξη νέων θεραπειών έχει καταστεί ένας αρκετά επιθυμητός στόχος. Έχει δείχθει πως η γενετική μηχανική είναι ένα χρήσιμο εργαλείο με το οποίο πολλά σημαντικά αλλεργιογόνα μπορούν να μετατραπούν σε υποαλλεργικά παράγωγά τους, που έχουν την ικανότητα να αποτελέσουν ασφαλούς ανοσοθεραπευτικούς παράγοντες αφού παρουσιάζουν καθόλου ή ελάχιστη ικανότητα δέσμευσης IgE, περιέχουν επιτόπους των T κυττάρων και επάγουν την παραγωγή προστατευτικών αντισωμάτων (Marazuela *et al.*, 2007). Η C-τελική περιοχή του αλλεργιογόνου ole e 1, είναι κυρίαρχος τόπος της IgE αντίδρασης υπερευαισθησίας και αποτελεί στόχο για μεταλλάξεις προκειμένου να παραχθούν ποικιλίες με μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης του συμπλέγματος IgE (Marazuela *et al.*, 2007). Επομένως μεταλλάγματα με μειωμένη αλλεργιογόνο δραστηριότητα μπορούν να αποτελέσουν υποψήφια εμβόλια για επαρκή και αποτελεσματική αντιμετώπιση των αλλεργιών. Η απόκριση (proliferative response) των κυττάρων του αίματος ασθενών με αλλεργία επαγομένη από συνθετικά πεπτίδια του συγκεκριμένου αλλεργιογόνου επέτρεψε να καθοριστεί πως η IgE και η IgG απόκριση ουσιαστικά στρέφεται εναντίον των πεπτιδίων που βρίσκονται στο C-τερματικό ήμισυ της πρωτεΐνης (Cárdaba *et al.*, 1998, González *et al.*, 2006). Πέραν αυτού, εργαλεία που επιτρέπουν την πρόβλεψη αντιγονικών πεπτιδίων υπέδειξαν την ύπαρξη τεσσάρων περιοχών που μπορεί να συμβάλλουν ως επίτοποι των B-κυττάρων (Villalba *et al.*, 1993).

Το Ole e 1 ήταν επίσης το πρώτο αλλεργιογόνο της ελιάς που κλωνοποιήθηκε. Παρότι οι πρώτοι κλώνοι εισήχθηκαν σε *E. coli*, σήμερα το *P. Pastoris* (Huecas *et al.*, 1999) είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος ξενιστής, καθιστώντας δυσδιάκριτο το διαχωρισμό του φυσικού από το ανασυνδυασμένο αλλεργιογόνο που λαμβάνεται από αυτόν (Huecas *et al.*, 1999, Quiralte *et al.*, 2000).

Μελέτες πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να δειχθεί ο ρόλος του ημίσεος υδατάνθρακα του μορίου στην IgE αναγνώριση, όπου αναλύθηκε η αντιδραστικότητα των ορών που συλλέχθηκαν από αλλεργικούς ασθενείς (Batanero *et al.*, 1999). Μόνο τα μη γλυκοζυλιωμένα συνθετικά πεπτίδια έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα, υποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο του κλάσματος του υδατάνθρακα στην αναγνώριση αντιγόνου-αντισώματος.

Τέλος, πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για την ανάπτυξη νέων θεραπειών για τη καταπολέμηση των αλλεργιών στην γύρη της ελιάς. Το κύριο μέρος των εξελίξεων βασίζεται στη χρήση του αλλεργιογόνου Ole e 1, λόγω της υψηλής του παρουσίας στην γύρη της ελιάς και τον υψηλό του επιπολασμό στους ασθενείς. Ανασυνδυασμένα μεταλλάγματα του Ole e 1 με χαμηλότερη αλλεργιογόνο δράση έχουν πραγματοποιηθεί μέσω της γενετικής μηχανικής (Marazuela *et al.*, 2007). Τρία μεταλλάγματα του αλλεργιογόνου, που περιέχουν αλλαγές στο Ο-τερματικό άκρο του, παρήχθησαν και δοκιμάστηκαν ανοσολογικά τόσο με *in vitro*, όσο και με *in vivo* μεθοδολογίες. Μόνο ένα από αυτά θεωρήθηκε πως παρουσιάζει ενδιαφέρον ως ανοσοθεραπευτικός παράγοντα για την θεραπεία αλλεργικών ασθενών. Το Ole e 1 έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη ενδορινικών εμβολίων χρησιμοποιώντας βιοαποικοδομήσιμα πολυ (dl-λακτίδιο γλυκολίδιο) μικροσωματίδια ως όχημα (Marazuela *et al.*, 2008, Batanero *et al.*, 2002, Batanero *et al.*, 2003). Σε αυτές τις μελέτες, ολόκληρο το αλλεργιογόνο (Batanero *et al.*, 2002, Batanero *et al.*, 2003) ή το πεπτίδιο με τον μείζονα επίτοπο T κυττάρου (Marazuela *et al.*, 2008) ενθυλακώθηκαν στο βιοσυμβατό και βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές και αξιολογήθηκε η βιωσιμότητά τους να χρησιμεύσουν ως ένα όχημα για την χορήγηση του αλλεργιογόνου. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν την αποτελεσματικότητα αυτού του τύπου ανοσοποίησης για την πρόληψη της αλλεργικής ευαισθητοποίησης στο Ole e 1.

Η γύρη της ελιάς είναι μια σημαντική αιτία τόσο της ρινοεπιπεφυκίτιδας όσο και του άσθματος σε αυτές τις περιοχές, όπως εκείνη της Μεσογείου, όπου μεγάλα ποσά αερομεταφερόμενης γύρης ελιάς προκύπτουν από την εντατική της καλλιέργεια. Εκτός από την αλλεργία στην γύρη της ελιάς, τα τρόφιμα του συγκεκριμένου δέντρου έχουν επίσης αναφερθεί πως προκαλούν αλλεργία. Η αναζήτηση για θεραπείες για την καταπολέμηση αυτών των αλλεργιών απαιτεί καλύτερη κατανόηση της μοριακής φύσης του αλλεργιογόνου και των δομών που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των κυττάρων. Παρόλο που υπάρχει ένα σημαντικό ερευνητικό έργο για τον χαρακτηρισμό κάποιων αλλεργιογόνων της ελιάς, όπως του Ole e 1, στις περισσότερες περιπτώσεις, οι γνώσεις είναι ελλιπείς και τα αποτελέσματα αντιφατικά. Μια άλλη πτυχή που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όσον αφορά την γύρη της ελιάς και την αλλεργιογόνο ικανότητα των καρπών της, είναι η υψηλή διασταυρωτή αντίδραση που παρατηρήθηκε σε μερικά από αυτά. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να προκαλέσει έντονες αντιδράσεις υπερευαισθησίας και συνεργιστικά αποτελέσματα. Ένας άλλος περιορισμός είναι η χαμηλή παρουσία ορισμένων από αυτά τα

αλλεργιογόνα που καθιστά πιο δύσκολη την απομόνωση και την περαιτέρω μελέτη τους. Καινοτόμες μέθοδοι ανάλυσης και οι νέες εφαρμογές των διαθέσιμων τεχνικών απαιτούνται για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που οφείλονται στα αλλεργιογόνα της ελιάς με έναν πιο ολοκληρωμένο τρόπο (Esteve *et al.*).

Κεφάλαιο 2: Υλικά Μέθοδοι

2.1 Καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων

2.1.1 Καλλιέργειες *Escherichia coli* (*E. coli*)

Στην φύση οι μικροοργανισμοί υπάρχουν συνήθως ως μεικτοί πληθυσμοί που αποτελούνται από διαφορετικά είδη και στελέχη μικροβίων. Η μελέτη και εξέταση των χαρακτηριστικών και βιοχημικών ιδιοτήτων ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού θα πρέπει να γίνεται σε καθαρή καλλιέργεια, δηλαδή καλλιέργεια που περιέχει ένα μόνο στέλεχος μικροοργανισμού και κανένα άλλο. Για παράδειγμα, μια καθαρή καλλιέργεια *Escherichia coli* περιέχει μόνο *E. coli* κύτταρα ενός συγκεκριμένου στελέχους. Επειδή τα μικρόβια βρίσκονται παντού στο περιβάλλον, η δημιουργία και διατήρηση μιας καθαρής καλλιέργειας απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, την χρήση αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων, συσκευών και ασηπτικών μεθόδων.

Όπως κάθε άλλος ζωντανός οργανισμός, έτσι και οι μικροοργανισμοί απαιτούν θρεπτικά συστατικά και τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιασθούν. Τα μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα πρέπει να καλύπτουν τις ανάγκες των μικροοργανισμών και συνεπώς πρέπει να περιέχουν: νερό, πηγή άνθρακα και ενέργειας, πηγή αλάτων, αζώτου, καθώς και διάφορα ιχνοστοιχεία.

Ανάλογα με την φάση του θρεπτικού μέσου τα υποστρώματα χωρίζονται σε υγρά και στερεά. Τα υγρά θρεπτικά μέσα έναντι των στερεών, έχουν το πλεονέκτημα ότι επιτυγχάνουν τη μαζική παραγωγή του μικροοργανισμού που μας ενδιαφέρει. Τα στερεά από την άλλη, πλεονεκτούν στο ότι επιτρέπουν την ανάπτυξη μικροβιακών αποικιών με σαφή μορφολογικά χαρακτηριστικά (σημαντικό για την ταυτοποίηση τους), την ανάπτυξη διαφορετικών στελεχών ενός μικροοργανισμού στην ίδια καλλιέργεια, καθώς και την ευκολότερη απομόνωση της μικροβιακής μάζας. Αρχικά όλα τα θρεπτικά υποστρώματα είναι υγρά, ενώ η στερεοποίησή τους επιτυγχάνεται με την προσθήκη του πολυσακχαρίτη άγαρ (εκχύλισμα θαλάσσιων φυκών). Το άγαρ τήκεται στους 100°C και πήζει στους 40-43°C, ενώ έχει το πλεονέκτημα να είναι μεταβολικά αδρανές για τα βακτήρια.

Τα κύτταρα των στελεχών *E. Coli* και *Agrobacterium* που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας (στέλεχος Omnimax για *E. Coli* και GV1301 για *Agrobacterium*) καλλιεργήθηκαν τόσο σε υγρά όσο και σε στερεά θρεπτικά μέσα. Για την υγρή καλλιέργεια *E. coli*, τα κύτταρά εμβολιάστηκαν με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα σε 8ml αποστειρωμένου θρεπτικού LB, στα οποία είχε προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού (8μl αμικικλίνης 100mg/ml) και επώαστηκαν σε επωαστικό θάλαμο 37°C υπό ανάδευση για 16 ώρες. Αντίστοιχα για τα κύτταρα του *Agrobacterium*, αυτά εμβολιάστηκαν σε 8ml υγρού θρεπτικού μέσου YEB και επώαστηκαν σε 28°C για 36 ώρες υπό ανάδευση, στα οποία είχε προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού (καναμικίνη, γενταμυκίνη).

Όσον αφορά τις στερεές καλλιέργειες, κύτταρα *E. coli* επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB-άγαρ 1,4% με αντιβιοτικό επιλογής αμπικιλίνη με τη μέθοδο διασποράς και επώαστηκαν ανεστραμμένα σε κλίβανο, σε θερμοκρασία 37°C για 16 ώρες. Στην περίπτωση των κυττάρων του *Agrobacterium* χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά επιλογής ριφαμικίνη 50mg/ml, γενταμυκίνη 30mg/ml και καναμικίνη 50mg/ml, και ακολούθησε επώαση στους 28°C για δύο μέρες.

2.1.2 Αποθήκευση βακτηριακών στελεχών *E. coli*

Τα βακτηριακά κύτταρα των στελεχών που επρόκειτο να αποθηκευτούν εμβολιάστηκαν από μονή αποικία σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο LB όγκου 8ml σε γυάλινο φιαλίδιο (universal) παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού επιλογής αμπικιλίνη 100mg/ml και επώαστηκαν στους 37°C υπό ανάδευση για 16 ώρες. Από την καλλιέργεια αυτή, ποσότητα ίση με 900 μl μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο πλαστικό σωλήνα erpendorf χωρητικότητας 1,5ml στον οποίο προστέθηκαν επίσης 300μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 60% και ακολούθησε έντονη ανάδευση. Το erpendorf με την καλλιέργεια φυλάσσεται σε υπερκαταψύκτη -80°C.

2.2 Απομόνωση και καθαρισμός DNA

2.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

Με την PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, “in vitro”. Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του '60.

Το DNA στόχος επεκτείνεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές, σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων) που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Εν συνεχεία συνδέονται, “υβριδίζονται”, τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία καλούνται εκκινητές (primers) στις δύο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA (2ο στάδιο). Με

την δράση του ενζύμου DNA πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και η αλυσίδα επεκτείνεται (3ο στάδιο). Έτσι σχηματίζονται δύο καινούργιες αλυσίδες DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δύο κλώνων του πρότυπου DNA με αποτέλεσμα τον διαπλασιασμό του DNA στόχου. Η σειρά των τριών αυτών σταδίων αποτελούν 1 κύκλο της αντίδρασης PCR. Όλη η αντίδραση ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται:

- Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer
- Ελεύθερα 5' τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTP's)
- Εκκινητής Forward
- Εκκινητής Reverse
- DNA πολυμεράση (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase homemade)
- Αλληλουχία DNA που αποτελεί τη μήτρα
- ddH₂O

Συγκεκριμένα:

Συστατικά	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος (μl)
Phusion HF Buffer	5x	1x	10
dNTP's	10mM	200	1
Forward Primer	10μM	0,5	2,5
Reverse Primer	10μM	0,5	2,5
Phusion DNA Polymerase			0,8
Template DNA		1pg-10ng	2
ddH₂O			Μέχρι 50

Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα τρία στάδια, αποδιάταξης του DNA (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing) και επιμήκυνση των εκκινητών από μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση (extension). Η μετουσίωση του DNA επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία 94-95°C για 30sec περίπου, όπου το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται ενώ ο υβριδισμός που εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών πραγματοποιείται με ψύξη του δείγματος, κατά την οποία οι εκκινητές υβριδοποιούνται εκλεκτικά με τις συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA εκμαγείου. Τέλος η επέκταση των εκκινητών γίνεται στους 72-74°C ανάλογα με το μέγεθος του προϊόντος της PCR και της ποσότητας της πολυμεράσης η οποία επιμηκύνει τους εκκινητές, παρουσία ελεύθερων 5' τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTP's). Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος γίνεται στις μέρες μας αυτόματα από ειδικά μηχανήματα τους θερμικούς κυκλοποιητές (thermal cyclers). Τα στάδια επώασης στο θερμικό κυκλοποιητή:

Αρχική αποδιάταξη	98 ⁰ C	30sec
Αποδιάταξη	98 ⁰ C	10sec
Αναδιάταξη	Θ* ¹	30sec
Επέκταση	72 ⁰ C	T* ²
Τελική επέκταση	72 ⁰ C	10min

Θ*¹: Θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητών, εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών, από το μήκος τους, από τη περιεκτικότητά τους σε GC νουκλεοτιδικές βάσεις.

T*²: Χρόνος επέκτασης, εξαρτάται από μήκος αλληλουχίας βάσεων που οριοθετείται από την απόσταση των δύο αρχικών εκκινητών, με γενική αρχή 0,5-1Kb/1λεπτό.

Οι αλληλουχίες των primers-εκκινητών μορίων DNA που χρησιμοποιήθηκαν:

SAH7-F-RI: GAATTCATGTCTAAAGCAGTTCTATTGGTCGC

SAH7-R-BS: TACTAGTGGGGGGATCCCGTCCTCGGTTTCTTGGTATAGC

SAH7-F-NN: CGCGGCCGCCATATGTCTAAAGCAGTTCTATTGGTCGCTC

SAH7-R: CGTCCTCGGTTTCTTGGTATAG

pSAH7-F-AgeI: TACCGGTGTGTTTGGGCTATATTTAATTGGCTGCTTG

pSAH7-F2-BamHI: TGGATCCGGTAGCTAGGATTTTTGAAACAAATCGGAAG

pSAH7-F3-BamHI: AGGATCCGCACAATAAAAGGGAATTAGACTTTTTTC

pSAH7-F4-BamHI: AGGATCCGTTTAACCCATTTTTGATGTTTCATAGTGAGC

pSAH7-R2-NcoI: GACCATGGTGCAAAAGATTTTAACTGGAAAAG

Η συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε για να απομονωθεί το φυτικό γονίδιο SAH7, χρησιμοποιώντας ως DNA μήτρα cDNA του πρότυπου οργανισμού *Arabidopsis thaliana* (*At col*) με παράλληλη εξέταση του γονιδίου *AtCXIPI* ως μάρτυρα για την επαλήθευση της σωστής λειτουργίας της μεθόδου. Εν συνεχεία απομονώθηκε ο υποκινητής του γονιδίου, pSAH7 (pSAH7F AgeI-pSAH7R NcoI), χρησιμοποιώντας ως DNA μήτρα γονιδιωματικό αυτή την φορά DNA, εφόσον πρόκειται για υποκινητή γονιδίου. Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε για τα επιμέρους τμήματα στα οποία κόπηκε ο υποκινητής χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους κάθε φορά εκκινητές.

Ένθεμα	Μέγεθος τμήματος (bp)
SAH7	480
pSAH7	3435
Fragment 2	2477
Fragment 3	1420

Τα αποτελέσματα της μεθόδου οπτικοποιήθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης για την εξακρίβωση της επιτυχίας της έκβασης.

2.2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Τόσο οι πρωτεΐνες όσο και τα νουκλεϊκά οξέα είναι δυνατόν να αναλυθούν μέσω ηλεκτροφόρησης. Μόρια πρωτεϊνών ή/ και νουκλεϊκών οξέων τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό τους φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και έτσι είναι δυνατόν να διαχωριστούν υπό κατάλληλες συνθήκες, διατηρώντας μάλιστα τις βιολογικές τους ιδιότητες. Οι φωσφορικές ομάδες των δεοξυριβονουκλεοτιδίων προσδίδουν αρνητικό φορτίο στο DNA το οποίο παρουσία του διαλύματος ηλεκτροφόρησης θα “τρέξει” από τον αρνητικό στον θετικό πόλο. Το πήκτωμα της αγαρόζης λειτουργεί ως ηθμός με πόρους μέσω των οποίων τα διάφορα τμήματα DNA διαφορετικού μεγέθους και σχήματος ωθούνται να περάσουν λόγω της έκθεσης στο ηλεκτρικό πεδίο. Όσο πιο μεγάλο είναι το προϊόν τόσο πιο δύσκολα κινείται μέσα στο πήκτωμα της αγαρόζης. Επιπρόσθετα, οι διαμορφώσεις των πλασμιδιακών μορίων DNA παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα στο πήκτωμα αγαρόζης. Τα υπερελικομένα μόρια μετακινούνται ταχύτερα προς το θετικό πόλο σε σχέση με τα γραμμικά και κυκλικά. Η κινητικότητα των μορίων διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος (διάλυμα ηλεκτροφόρησης, συγκέντρωση αγαρόζης, τάση ηλεκτρικού πεδίου), έτσι, χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης επιτυγχάνουμε τον επιθυμητό διαχωρισμό ανάλογα με το εύρος των βάσεων που θέλουμε να ξεχωρίσουμε. Τα δείγματα που πρόκειται να υποβληθούν σε ηλεκτροφόρηση αναμειγνύονται με χρωστική που μας βοηθάει να παρακολουθούμε την εξέλιξη της ηλεκτροφόρησης. Προτού λοιπόν ηλεκτροφορηθούν τα δείγματα, αναμειγνύονται με ένα διάλυμα που ονομάζεται διάλυμα φόρτωσης και περιέχει μια ουσία υψηλής πυκνότητας (όπως γλυκερόλη) και 1 ή 2 χρωστικές που μετακινούνται με ταχύτητα περίπου ίδια με αυτήν του DNA. Ύστερα από την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα αγαρόζης υφίσταται εμβάπτιση σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο όταν παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (Lepcq & Paoletti, 1967), ή του RNA, μπορεί να φθορίζει στο υπεριώδες φως. Υπολογίζεται ότι ένα μόριο EtBr παρεμβάλλεται κάθε 2,5 νουκλεοτίδια και τοποθετώντας το πήκτωμα αγαρόζης σε συσκευή UV εντοπίζουμε τα δείγματα με την βοήθεια μαρτύρων μοριακού βάρους. Τέλος φωτογραφούμε το πήκτωμα ώστε να υπάρχει στο αρχείο μας. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, η ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε στις εξής περιπτώσεις:

- Για τον έλεγχο του αποτελέσματος μιας αντίδρασης PCR

- Για τον έλεγχο μιας πέψης περιοριστικών ενδονουκλεασών
- Για τον έλεγχο του αποτελέσματος μιας απομόνωσης πλασμιδιακών φορέων
- Κατά την απομόνωση τμήματος DNA που μπορεί να προέρχεται από μια αντίδραση PCR ή από μια πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Ιδιαίτερο ρόλο στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης διαδραματίζουν οι δείκτες μοριακών βαρών (ladders). Πρόκειται για ένα διάλυμα θραυσμάτων DNA, γνωστού μοριακού βάρους και διαφορετικής κινητικότητας. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα θραύσματα διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους, δημιουργώντας ζώνες. Βάσει του προτύπου που προκύπτει είναι δυνατός ο υπολογισμός του μεγέθους και της ποσότητας ενός άγνωστου δείγματος.

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε υγρό διάλυμα αγαρόζης 0,8% σε SB, το οποίο παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου πήξει. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και έγινε πλήρωση αυτής με ρυθμιστικό διάλυμα SB. Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστέθηκε ποσότητα χρωστικής 6x OrangeG, ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 1x. Η χρωστική προστίθεται με σκοπό να είναι εύκολη η τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα λόγω της γλυκερόλης που περιέχει και να είναι αυτά ορατά κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Σε όλα τα δείγματα προστέθηκε διπλά απεσταγμένο νερό (ddH₂O) ώστε να ηλεκτροφορείται η ίδια ποσότητα σε μl. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, πραγματοποιήθηκε οπτικοποίηση με EtBr και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία UV.

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA ακολουθείται η ίδια διαδικασία, όπως ακριβώς και για την ηλεκτροφόρηση του DNA, με την διαφορά ότι οι συνθήκες πρέπει να είναι αποστειρωμένες, τα διαλύματα καινούργια και να παραμείνουν τα δείγματα για λιγότερο χρόνο στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης SB και σε μεγαλύτερη τάση (120 volt).

2.2.4 Αλκαλική λύση πλασμιδιακού DNA, Miniprep

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου της απομόνωσης με αλκαλική λύση που περιγράφεται από τους Birnboim και Doly (1979). Η μέθοδος βασίζεται στην επιλεκτική αλκαλική αποδιάταξη του χρωμοσωμικού, υψηλού μοριακού βάρους DNA, τη στιγμή που το μικρό, κυκλικό πλασμιδιακό DNA παραμένει σχετικά ανέπαφο. Χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις ελέγχου των ορθών ανασυνδυασμένων πλασμιδίων ύστερα από την αντίδραση μετασχηματισμού. Τα επιθυμητά βακτηριακά στελέχη καλλιεργούνται στο κατάλληλο για την επιλογή τους θρεπτικό

μέσο. Μετά την καταβύθισή τους, η επαναιώρηση γίνεται σε διάλυμα που περιέχει EDTA και γλυκόζη. Το EDTA είναι απαραίτητο για την καταστολή της δράσης των ενδονουκλεασών και της DNAάσης, δεσμεύοντας ιόντα (π.χ. Mg^{2+}) που είναι συμπαράγοντες αυτών, ενώ η γλυκόζη διατηρεί την ωσμωτική ισορροπία ώστε τα κύτταρα να μη λυθούν. Η λύση τους επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ενός αλκαλικού ρυθμιστικού διαλύματος, που αποτελείται από το απορρυπαντικό δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (SDS) και την ισχυρή βάση υδροξειδίου του νατρίου. Το απορρυπαντικό δημιουργεί οπές στη μεμβράνη διαταράσσοντας με αυτό τον τρόπο τη δομή των φωσφολιπιδίων και των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Το υδροξείδιο του νατρίου συμβάλλει στη μετουσίωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα λειτουργεί και ως αποδιατακτικός παράγοντας για το δίκλωνο DNA καθώς η αύξηση του pH που προκαλεί, βοηθά στη διάσπαση των υδρογονοδεσμών που συνδέουν τα δίκλινα μόρια DNA. Η επαναδιάταξη του πλασμιδιακού DNA συμβαίνει με τη χρήση διαλύματος μειωμένου pH. Η μείωση του pH επιτρέπει την επανασύνδεση των βάσεων των μονόκλωνων αλυσίδων DNA μέσω υδρογονοδεσμών. Λόγω του μικρού του μεγέθους και της κυκλικής του μορφής, το πλασμιδιακό DNA είναι πιο εύκολο να επαναδιαταχθεί. Αντίθετα, το γενωμικό καθιζάνει λόγω της τυχαίας επανασύνδεσης των δύο κλώνων του.

- 1) Τα επιλεγμένα κύτταρα επώστηκαν σε 8 ml υγρού θρεπτικού LB εμβολιασμένο με αμικικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$. Η επώση έγινε στους 37 °C, υπό ανακίνηση στις 180-200 rpm, για 16 ώρες (hours, h) ώστε να φτάσουν, όπως και στο παραπάνω πρωτόκολλο, στη φάση στασιμότητας. Χρησιμοποιήθηκαν 3 ml της υγρής καλλιέργειας και φυγοκεντρήθηκαν για 30sec σε 11000 xg με συνακόλουθη αφαίρεση υπερκειμένου. Το βήμα αυτό χωρίστηκε σε δύο φάσεις, δηλαδή στο ίδιο δοχείο συλλογής, επαναλήφθηκε 2 φορές, με 1,5ml την κάθε φορά.
- 2) Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου, προστέθηκαν 150ml διαλύματος διαλυτοποίησης P1(περιέχει EDTA και γλυκόζη. Το EDTA καταστέλλει τη δράση ενδονουκλεασών και της DNAάσης δεσμεύοντας ιόντα (π.χ. Mg^{2+}) που είναι συμπαράγοντες αυτών, ενώ η γλυκόζη διατηρεί την ωσμωτική ισορροπία ώστε τα κύτταρα να μη λυθούν) και 2ml RNaseA 10mg/ml και πραγματοποιήθηκε επαναιώρηση του ιζήματος.
- 3) Ακολούθησε προσθήκη 200ml διαλύματος λύσης P2, με ήπια ανάδευση (6-8 φορές). Πρόκειται για αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα, που αποτελείται από το απορρυπαντικό δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (SDS) και την ισχυρή βάση υδροξειδίου του νατρίου. Το απορρυπαντικό δημιουργεί οπές στη μεμβράνη διαταράσσοντας τη δομή των φωσφολιπιδίων και των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Το υδροξείδιο του νατρίου συμβάλλει στη μετουσίωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα λειτουργεί και ως

αποδιατακτικός παράγοντας για το δίκλωνο DNA καθώς η αύξηση του pH που προκαλεί βοηθά στη διάσπαση των υδρογονοδεσμών που συνδέουν τα δίκλιωνα μόρια DNA.

- 4) Προστέθηκαν 350μl διαλύματος επαναδιάταξης P3, και έγινε πάλι ήπια ανάδευση. Το διάλυμα P3 αποτελεί διάλυμα μειωμένου pH. Η μείωση του pH επιτρέπει την επανασύνδεση των βάσεων των μονόκλωνων αλυσίδων DNA μέσω υδρογονοδεσμών. Λόγω του μικρού του μεγέθους και της κυκλικής του μορφής, το πλασμιδιακό DNA είναι πιο εύκολο να επαναδιαταχθεί. Αντίθετα, το γενωμικό καθιζάνει λόγω της τυχαίας επανασύνδεσης των δύο κλώνων του. Μετά από επώαση για 5 λεπτά σε πάγο, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 15min σε full speed σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C)
- 5) Το υπερκείμενο, στο οποίο υπάρχει το πλασμιδιακό DNA, μεταφέρθηκε σε νέο, αποστειρωμένο erpendorf και προστέθηκαν 700 μl ισοπροπανόλης για την κατακρήμνισή του. Ακολούθησε έντονη ανάδευση (4-5 φορές) και επώαση για 5 min σε συνθήκες δωματίου. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5min σε full speed και πλήρης αφαίρεση υπερκειμένου.
- 6) Ακολούθησε ξέπλυμα του ιζήματος με 350μl EtOH_{75%} (απομάκρυνση αλάτων και μορίων SDS), φυγοκέντρηση για 5 min σε full speed και πλήρης αφαίρεση υπερκειμένου.
- 7) Έπειτα έγινε πλήρης εξάτμιση της αιθανόλης με παραμονή του erpendorf στους 60 °C, για 2-3 min. Τέλος, έγινε επαναιώρηση του ιζήματος σε 25-50 μl ddH₂O (συνήθως 50 μl).

Η επιτυχία της διαδικασίας επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Με το πρωτόκολλο αυτό απομονώθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pJET1.2, pGBKT7 και pCambia1301 από βακτηριακά στελέχη *E. coli* Omnimax.

2.2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα *E. coli* βάσει του πρωτόκολλου NucleoSpinR Plasmid DNA Purification, Macherey-Nagel (2010)

Χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις απομόνωσης πλασμιδίων από επιλεγμένο κλώνο βακτηριακών κυττάρων για περαιτέρω χρήση του πλασμιδίου. Η συγκεκριμένη μέθοδος απομόνωσης βασίζεται στην αλκαλική αποδιάταξη του DNA και στην επιλεκτική πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA στην κολώνα NucleoSpinR Plasmid/Plasmid (NoLid). Η πρόσδεση επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλου διαλύματος εξουδετέρωσης που επιτρέπει την επαναδιάταξη του πλασμιδιακού DNA και τη δέσμευσή του στην κολώνα. Διάφορες πρωτεΐνες, γενωμικό DNA και θραύσματα των κυττάρων, ιζηματοποιούνται με φυγοκέντρηση. Προσμίξεις όπως άλατα, μεταβολίτες και διαλυτά μακρομοριακά κυτταρικά συστατικά απομακρύνονται μετά από έκλυση με διάλυμα που περιέχει

αιθανόλη. Το καθαρό πλασμιδιακό DNA εκλύεται κάτω από συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος με ένα ελαφρώς αλκαλικό διάλυμα. Το βασικό πρωτόκολλο NucleoSpin^R Plasmid DNA Purification (high copy protocol) που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

- 1) Τα επιλεγμένα κύτταρα επώστηκαν σε 8ml υγρού θρεπτικού LB εμβολιασμένο με αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Η επώση έγινε στους 37°C, υπό ανακίνηση στις 180-200rpm, για 16 ώρες ώστε να φτάσουν στη φάση στασιμότητας. Χρησιμοποιήθηκαν 3 ml της υγρής overnight καλλιέργειας θρεπτικού LB και φυγοκεντρήθηκαν για 30sec σε 11000xg με συνακόλουθη αφαίρεση υπερκειμένου. Το βήμα αυτό χωρίστηκε σε δύο φάσεις, δηλαδή στο ίδιο δοχείο συλλογής, επαναλήφθηκε 2 φορές, με 1,5ml την κάθε φορά.
- 2) Προσθήκη 250 μl διαλύματος επαναιώρησης A1 (Buffer A1), στο οποίο πριν τη χρήση έχει προστεθεί RNAase A, και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος. Έπειτα, έγινε προσθήκη 250μl διαλύματος λύσης A2, ανάδευση 6-8 φορές ήπια, ώστε να μη δημιουργηθούν θραύσματα γενωμικού DNA και αναμειχθούν με το πλασμιδιακό, και επώση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η προσθήκη 300μl διαλύματος εξουδετέρωσης A3 (Buffer A3) και ήπια ανάδευση (6-8φορές).
- 3) Φυγοκέντρωση για 5-10 min σε 11.000 xg.
- 4) Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μεταφορά του υπερκειμένου σε κολώνα NucleoSpinR Plasmid/Plasmid (NoLid) (750μl) και τοποθέτηση της σε δοχείο συλλογής χωρητικότητας 2ml. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 1min σε 11.000 x g, αφαίρεση της ποσότητας που έπεσε στο δοχείο συλλογής και επανατοποθέτηση της στήλης στο δοχείο συλλογής.
- 5) Προσθήκη 600μl διαλύματος έκπλυσης A4 (Buffer A4), στο οποίο πριν τη χρήση έχει προστεθεί αιθανόλη 80%, και φυγοκέντρωση για 1min σε 11.000 xg. Αφαίρεση της ποσότητας που έπεσε στο δοχείο συλλογής και επανατοποθέτηση της στήλης στο δοχείο.
- 6) Φυγοκέντρωση για 2min σε 11.000 x g
- 7) Η κολώνα τοποθετήθηκε σε νέο σωλήνα eppendorf (1,5ml) και προστέθηκαν 25μl προθερμασμένου διαλύματος έκλυσης AE (Buffer AE) στο κέντρο της μεμβράνης. Πραγματοποιήθηκε επώση για 1min σε συνθήκες δωματίου και έπειτα φυγοκέντρωση για 1min σε 11.000 xg. Τέλος, προστέθηκαν επιπλέον 25μl διαλύματος AE και ακολουθήθηκαν τα ίδια βήματα. Η επιτυχία της διαδικασίας επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ακολουθώντας το παραπάνω πρωτόκολλο για high copy πλασμίδια, πραγματοποιήθηκε αρχικά απομόνωση του φορέα pJET1.2 από το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* Omnimax, ο οποίος περιείχε ολόκληρο το γονίδιο SAH7, τον υποκινητή του pSAH7 (σε διαφορετική κατασκευή), καθώς και άλλα τρία αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα του συγκεκριμένου υποκινητή. Σε δεύτερη φάση απομονώθηκε από το ίδιο βακτηριακό στέλεχος *E. coli* ο πλασμιδιακός φορέας pGBKT7, που περιείχε το γονίδιο SAH7, και ο φορέας pCambia1301, που περιείχε τον υποκινητή του γονιδίου και τα επιμέρους τμήματά του.

2.2.6 Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Πολλά βακτήρια παράγουν ένζυμα που ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν τα βακτήρια αποικοδομώντας “ξένο” προς αυτά DNA (π.χ. DNA φάγων), αναστέλλοντας έτσι την ικανότητά του να μολύνει το βακτηριακό κύτταρο.

Κάθε ένζυμο περιορισμού αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων. Αυτές οι αλληλουχίες όπου υπάρχουν στο γενετικό υλικό του ίδιου του βακτηρίου προστατεύονται χάρη στη μεθυλίωση. Πολλές τέτοιες ενδονουκλεάσες, που έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη βακτηρίων και αναγνωρίζουν διαφορετικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, είναι διαθέσιμες εμπορικά. Μια συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση θα κόψει σε μια σειρά συγκεκριμένων τμημάτων οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA που έχει απομονωθεί από ένα κύτταρο. Τα τμήματα αυτά ονομάζονται τμήματα περιορισμού (restriction fragments). Συγκρίνοντας το μέγεθος των τμημάτων περιορισμού που έχουν παραχθεί από μια συγκεκριμένη γενετική περιοχή μετά την επεξεργασία της με έναν συνδυασμό διαφορετικών περιοριστικών ενζύμων, δημιουργείται ένας χάρτης περιορισμού (restriction map) της συγκεκριμένης γενετικής περιοχής, ο οποίος θα δείχνει την ακριβή τοποθεσία καθενός σημείου περιορισμού (restriction site), δηλαδή του σημείου που αναγνωρίζεται από ένα ένζυμο, σε σχέση με τα γειτονικά του σημεία περιορισμού, που αναγνωρίζονται αντίστοιχα από άλλες ενδονουκλεάσες. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί εκατοντάδες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες αποτελούν ένα από τα βασικότερα εργαλεία των τεχνολογιών του ανασυνδυασμένου DNA. Στην παρούσα εργασία η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των επιθυμητών προς ένθεση τμημάτων DNA και των αντίστοιχων πλασμιδιακών φορέων, ώστε να γίνει η λήψη από αυτούς των τμημάτων μετά από ηλεκτροφόρηση και για την διάγνωση της επιτυχίας των μετασχηματισμών, την εξακρίβωση δηλαδή της εισόδου των κατασκευών στα μετασχηματισμένα κύτταρα.

Επεξεργασία πλασμιδιακών φορέων και επιθυμητών τμημάτων DNA ώστε να γίνει λήψη ένθετου τμήματος DNA κατόπιν ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης

Ένθετο τμήμα/ πλασμιδιακός φορέας	Περιοριστικές ενδονουκλεάσ ες	Ρυθμιστικό διάλυμα NEBuffer	Αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA)	Αριθμός και όγκος αντιδράσεων	Χρόνος επώασης
SAH7 pGBKT7	EcoRI BamHI-HF	Cutsmart	-	8, 20μl	1.30 h
pSAH7 pCambia1301	BamHI HF NcoI	Cutsmart	-	2, 20μl	1.30 h
pSAH7/Fragment 2 pCambia1301	BamHI HF NcoI	NEBuffer 4	-	1, 20μl	1.30 h
pSAH7/Fragment 3 pCambia1301	BamHI HF NcoI	NEBuffer 4	-	1, 20μl	1.30 h
pSAH7/Fragment 4 pCambia1301	BamHI HF NcoI	NEBuffer 4	-	1, 20μl	1.30 h

Οι συνθήκες για τις αντιδράσεις των πέψεων των απομονωμένων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pJET1.2::SAH7 και pJET1.2::pSAH7 από βακτηριακά κύτταρα *E. coli* (omnimax) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Σημειώνεται πως τα ένζυμα για τη διπλή πέψη των διαφορετικών ανασυνδυασμένων πλασμιδίων επιλέχθηκαν ώστε να αναγνωρίζουν μοναδικές θέσεις περιορισμού εκτός των γονιδίων.

Υπό μελέτη γονίδιο	Περιοριστικές ενδονουκλεάσ ες	Ρυθμιστικό διάλυμα NEBuffer	Αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA)	Αριθμός και όγκος αντιδράσεων	Χρόνος επώασης
SAH7	EcoRI BamHI HF	cutsmart	-	4 αντιδράσεις των 20μl	1.30 h
pSAH7	NcoI XhoI	Cutsmart	-	2 αντιδράσεις των 20μl	1.30 h και με τα δύο ένζυμα
pSAH7/Fragme nt 2	BamHI HF NcoI HF	NEBuffer 4	-	1 αντίδραση των 20μl	1.30 h και με τα δύο ένζυμα

pSAH7/fragment 3	BamHI HF NcoI HF	NEBuffer 4	-	1 αντίδραση των 20μl	1.30 h και με τα δύο ένζυμα
pSAH7/fragment 4	BamHI HF NcoI HF	NEBuffer 4	-	1 αντίδραση των 20μl	1.30 h και με τα δύο ένζυμα

Υπό μελέτη γονίδιο	Περιοριστικές ενδονουκλεάσες	Ρυθμιστικό διάλυμα NEBuffer	Αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA)	Αριθμός και όγκος αντιδράσεων	Χρόνος επώασης
SAH7	BglII	NEBuffer 3	BSA	2 αντιδράσεις των 20μl	1.30 h
pSAH7	Nde Hind III	Buffer 2 (homemade)	-	2 αντιδράσεις των 20μl	1.30 h και με τα δύο ένζυμα

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης των επιθυμητών τμημάτων στους επόμενους πλασμιδιακούς φορείς (pGBKT7::SAH7, pCambia1301::pSAH7), ακολούθησαν δύο κύκλοι αντιδράσεων. Ένας χρησιμοποιώντας ένζυμα περιορισμού που κόβουν στα άκρα των ενθεμάτων και ένας με ένζυμα που κόβουν μέσα στα εισαχθέντα τμήματα όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες.

Υπό μελέτη γονίδιο	Περιοριστικές ενδονουκλεάσες που κόβουν στα άκρα του ενθέματος	Ρυθμιστικό διάλυμα NEBuffer	Αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA)	Αριθμός και όγκος αντιδράσεων	Χρόνος επώασης
SAH7	EcoRI BamHI HF	NEBuffer 4	-	1 αντίδραση των 20μl	1.30 h
pSAH7	Kpn I Bgl II	NEBuffer 2	BSA	3 αντιδράσεις των 20μl	1.30 h
pSAH7/Fragment 2	BamHI HF Nco I	NEBuffer 4	-	1 αντίδραση των 20μl	1.30 h
pSAH7/fragment 3	BamHI HF Nco I	NEBuffer 4	-	1 αντίδραση των 20μl	1.30 h
pSAH7/fragment 4	BamHI HF Nco I	NEBuffer 4	-	6 αντιδράσεις των 20μl	1.30 h

Υπό μελέτη γονίδιο	Περιοριστικές ενδονουκλεάσες που κόβουν μέσα στο ένθεμα	Ρυθμιστικό διάλυμα NEBuffer	Αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA)	Αριθμός και όγκος αντιδράσεων	Χρόνος επώασης
SAH7	EcoRV	NEBuffer 3	BSA	1 αντίδραση των 20μl	1.30 h
pSAH7	Pack I	NEBuffer 1	BSA	3 αντιδράσεις των 20μl	1.30 h
pSAH7/Fragmen t 2	Pack I	NEBuffer 1	BSA	1 αντίδραση των 20μl	1.30 h
pSAH7/Fragmen t 3	Pack I	NEBuffer 1	BSA	1 αντίδραση των 20μl	1.30 h
pSAH7/Fragmen t 4	Pack I NcoI HF	NEBuffer 4	BSA	1 αντίδραση των 20μl	1.30 h

Ο απαιτούμενος αριθμός, όγκος και χρόνος των αντιδράσεων επιλέχθηκε σε κάθε περίπτωση μετά από επαναλήψεις διαφοροποιημένων πρωτοκόλλων. Για την επιλογή των ενζύμων για τις δοκιμαστικές πέψεις χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Nebcutter V2.0 της διαδικτυακής πύλης της εταιρίας New England Biolabs (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2>). Η επιτυχία της διαδικασίας επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.2.7 Απομόνωση DNA από ζώνη πηκτής αγαρόζης (Gel Extraction) βάσει του πρωτοκόλλου NucleoSpinR Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel (2012)

Η διαδικασία επιτρέπει την ανάκτηση τμημάτων DNA από ένα πήκτωμα αγαρόζης. Η επιθυμητή ζώνη DNA κόβεται από το πήκτωμα με την βοήθεια μεταλλικού ξυραφιού και υπόκειται σε θέρμανση ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη. Παρουσία χαστροπικών αλάτων το DNA δεσμεύεται στην μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου της κολώνας μέσω υδρογονικών δεσμών (Leung *et al.*, 2009). Τμήματα μεγάλου μοριακού βάρους προσδέονται πιο ισχυρά και εκλούνται δυσκολότερα από μικρού μοριακού βάρους τμήματα. Το καθαρό DNA αποδεσμεύεται από την μεμβράνη και εκλύεται υπό την επίδραση χαμηλής ιονικής ισχύος και ελαφρώς αλκαλικού διαλύματος.

Στη περίπτωση απομόνωσης ζωνών DNA από πήκτωμα αγαρόζης (προϊόντα PCR, προϊόντα πέψης πλασμιδιακών φορέων) πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Nucleospin Extract της εταιρείας Macherey-Nagel.

- 1) Τοποθέτηση του πηκτώματος αгарόζης σε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και έπειτα σε UV (70%) για την οπτικοποίηση του αποτελέσματος. Αφαίρεση της επιθυμητής ζώνης DNA από το πήκτωμα με την χρήση καθαρού μεταλλικού ξυραφιού και μεταφορά της σε νέο erpendorf. Έπειτα ακολουθεί η ζύγιση της σε αναλυτικό ζυγό (μετρώ τη διαφορά βάρους απο ένα άδειο erpendorf)
- 2) 2:1 προσθήκη διαλύματος δέσμησης NTI(Binding Buffer NT1):δείγμα (Για κάθε 100mg αгарόζης προστέθηκαν 200μl διαλύματος NTI)
- 3) Επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 50°C για 10min (με ανακίνηση κάθε 2min)
- 4) Μεταφορά του υπερκειμένου της επώασης σε κολώνα (των 700μl) για 30sec σε 11.000 x g, αφαίρεση της ποσότητας που περνάει σε δοχείο συλλογής, και επανατοποθέτηση της κολόνας στο δοχείο συλλογής
- 5) Προσθήκη 700μl διαλύματος έκπλυσης NT3 (Wash Buffer NT3) στο οποίο έχει προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα αιθανόλης. Φυγοκέντρηση για 30sec σε 11.000 x g, και αφαίρεση της ποσότητας που περνάει στο δοχείο συλλογής. Επανατοποθέτηση της κολόνας στο δοχείο συλλογής και φυγοκέντρηση για 1min σε 11.000 x g. Ακολουθεί η τοποθέτηση της κολόνας σε νέο δοχείο συλλογής και επώαση στους 70°C με ανοικτά καπάκια για την εξάτμιση της περίσσειας αιθανόλης που περιέχει το διάλυμα έκπλυσης.
- 6) Μεταφορά της κολόνας σε νέο erpendorf (1,5ml) και προσθήκη 15μl διαλύματος έκλουσης NE (Elution Buffer NE) προθερμασμένου στους 70°C και επώαση για 5min στους 70°C. Στην συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1min σε 11.000 x g. Επανάληψη του βήματος άλλες δύο φορές και μεταφορά 30μl στην κολώνα και επώαση για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 1min σε 11.000 x g. Προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση της διαδικασίας το Διάλυμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε είχε προθερμανθεί στους 70°C.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του γονιδίου SAH7, του υποκινητή του, pSAH7, και των επιμέρους τμημάτων του (fragments 2-4). Αρχικά απομονώθηκαν από τους φορείς στους οποίους είχαν εισαχθεί (pJET1.2::SAH7, pJET1.2::pSAH7, pJET1.2::Frag2, pJET1.2::Frag3, pJET1.2::Frag4 και pGBKT7::SAH7, pCambia1301::pSAH, pCambia1301::Frag2, pCambia1301::Frag3, pCambia1301::Frag4) και έπειτα μετασχηματίσει βακτηριακά κύτταρα *E. coli* (Omnimax).

2.2.8 Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA μετά από πέψεις βάσει του πρωτόκολλου NucleoSpinR Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel (2012)

Η μέθοδος περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.7. Η διαδικασία ακολουθήθηκε για τον καθαρισμό των φορέων pCambia1301 και pGBKT7 μετά την πέψη με το κάθε περιοριστικό ένζυμο, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι: Κομμένος πλασμιδιακός φορέας μετά από πέψη, Διάλυμα δέσμευσης NT1 (Binding Buffer NT1), Διάλυμα έκλυσης NT3 (Wash Buffer NT3) στο οποίο είχε προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα αιθανόλης, Διάλυμα έκλυσης NE (Elution Buffer NE). Στις περιπτώσεις που ο όγκος της αντίδρασης ήταν μικρότερος από 50 μl, έγινε προσθήκη ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να είναι τουλάχιστον 50 μl. Έπειτα, έγινε προσθήκη διπλάσιου όγκου διαλύματος δέσμευσης NT1, δηλαδή 100 μl. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε κολώνα και φυγοκεντρήθηκε για 30 sec, με ταχύτητα 11000 xg. Το διάλυμα που πέρασε στο σωλήνα συλλογής, απορρίφθηκε. Προστέθηκαν 700 μl διαλύματος έκλυσης NT3, έγινε επώαση για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση για 30 sec με ταχύτητα 11000 xg και το διάλυμα που πέρασε στο σωλήνα συλλογής απορρίφθηκε. Το βήμα επαναλήφθηκε με 250 μl διαλύματος NT3. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min με ταχύτητα 11000 xg και επώαση για 5 min στους 70 °C. Στη συνέχεια, η κολώνα τοποθετήθηκε σε σωλήνα erpendorf 1.5 ml και προστέθηκαν 15 μl προθερμασμένου διαλύματος έκλυσης NE στο κέντρο της μεμβράνης. Έγινε επώαση για 5 min στους 70 °C και στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 1 min, σε ταχύτητα 100 xg και για 1 min, σε ταχύτητα 11000 xg. Ακολούθησε επανάληψη του βήματος με την προσθήκη επιπλέον 15 μl διαλύματος NE. Τέλος, έγινε μεταφορά των 30 μl δείγματος πίσω στην κολώνα, επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 1 min στα 11000 xg. Η επιτυχία της διαδικασίας επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.

2.3 Μετασχηματισμός χημειοδεκτικών κυττάρων

2.3.1 Κλωνοποίηση γονιδίων σε πλασμιδιακό φορέα με την Αντίδραση Λιγάσης

Τμήματα DNA με συμβατά άκρα (ομόλογα ή συμπληρωματικά), μπορούν να συνδεθούν και να δημιουργήσουν ένα ενιαίο τμήμα, *in vitro*, με την δράση κυρίως του ενζύμου T4 DNA λιγάση. Το μόριο DNA λιγάση έχει την ικανότητα να συνδέει μόρια DNA καταλύοντας την δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 5' φωσφορικής ομάδας και του παρακείμενου 3' υδροξυλίου (Lehman, 1974, Rossi *et al.*, 1997). Υπάρχουν πολλοί τρόποι σύνδεσης τεχνητών άκρων των τμημάτων DNA με τεχνητά μόρια DNA, όπως “προσαρμοστές”, “συνδετήρες” οι οποίοι έχουν συμβατά άκρα με συγκεκριμένη αλληλουχία ως προς τις θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού αλλά και η δυνατότητα να συνδεθούν μεταξύ τους διαφορετικά (ως προς το μέγεθος ή την

προέλευση) τμήματα DNA. Τα άκρα, εάν προεξέχουν, για να συνδεθούν θα πρέπει να είναι συμβατά, αλλιώς αν είναι τυφλά απλώς συνδέονται μεταξύ τους. Η λιγάση, που η δράση της εξαρτάται από το ATP, αναγνωρίζει άκρα, όχι όμως προέλευση ούτε και μέγεθος του DNA.

Πολλές φορές δημιουργούνται τεχνητά άκρα των τμημάτων, ώστε να είναι συμπληρωματικά ή συμβατά. Η DNA λιγάση είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται κατά την αντιγραφή του DNA στην σύνδεση των κομματιών Okazaki. Τα τμήματα του DNA με τα ίδια άκρα (που έχουν προέλθει από πέψη με το ίδιο ένζυμο) ή συμβατά άκρα (πέψη με διαφορετικά ένζυμα αλλά με συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα) ενώνονται και δημιουργούν ένα τμήμα χίμαιρα DNA, το οποίο έχει και τις δύο ιδιότητες των τμημάτων του DNA. Το πλασμίδιο, ένα κυκλικό και αυτόνομο μόριο DNA, μετά από πέψη με κάποια ενδονουκλεάση περιορισμού δημιουργεί ένα γραμμικό πλασμίδιο. Το τμήμα αυτό μπορεί να ενώσει τα δύο του άκρα ή να ενωθεί με ένα άλλο τμήμα DNA (π.χ. ένα γονίδιο φυτού). Τότε το DNA που προκύπτει είναι ένα κυκλικό μόριο χίμαιρα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μετασχηματισμό βακτηρίων. Έτσι το γονίδιο του φυτού και οι ιδιότητές του μεταβιβάζονται συνέχεια στις επόμενες γενιές των βακτηρίων, δηλαδή κλωνοποιείται.

Η αντίδραση επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που επηρεάζουν την δράση του ενζύμου, όπως η συγκέντρωση του ενζύμου και των αντιδραστηρίων, η θερμοκρασία της αντίδρασης ή η διάρκεια της επώασης.

Στην παρούσα εργασία η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εισαγωγή επιλεγμένου θραύσματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή του υπό μελέτη γονιδίου, SAH7, καθώς και για τον υποκινητή του (pSAH7), αλλά και θραύσματα του (συνολικά τέσσερα άνισα κομμάτια, που το καθένα περιείχε το αμέσως μικρότερό του). Τα συγκεκριμένα θραύσματα DNA προέρχονται από αντίδραση PCR με την χρήση Phusion High-Fidelity DNA πολυμεράσης, η οποία παράγει προϊόντα με “τυφλά άκρα” (blunt-end), αφού προηγήθηκε ο καθαρισμός τους μέσω Gel Extraction.

Αρχικά, ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το πλασμίδιο pJET1.2 από το CloneJET™ PCR Cloning Kit, που προσδίδει υψηλή απόδοση στην κλωνοποίηση PCR προϊόντων που προέρχονται από θερμοσταθερές DNA πολυμεράσες, όπως η *Taq* DNA Polymerase, που χρησιμοποιήθηκε για αυτήν την εργασία. Το πλασμίδιο αυτό αποτελεί ένα γραμμικό φορέα κλωνοποίησης, ο οποίος δέχεται κομμάτια μεγέθους από 6bp μέχρι 10kb. Εφαρμόστηκε το blunt-end πρωτόκολλο, χρησιμοποιώντας DNA λιγάση (T4 DNA Ligase 25 U/μl, Takara) και το ρυθμιστικό διάλυμα DNA λιγάσης (T4 DNA Ligase Buffer 10x, Takara). Οι τελικές συγκεντρώσεις του διαλύματος T4 DNA Ligase Takara Buffer και του ενζύμου T4 DNA Ligase Takara ήταν αντίστοιχα 1x και 1 U/μl σε τελικό όγκο 10 μl. Οι ποσότητες σε μl του φορέα και του κάθε γονιδίου υπολογίστηκαν κατά προσέγγιση μετά από ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης και σύγκριση της έντασης της κάθε ζώνης με την ένταση της ζώνης των 1636 bp του μοριακού δείκτη 1kb DNA Ladder

(Invitrogen) που αντιστοιχούσε σε 50 ng. Υπολογίστηκαν έτσι κατά προσέγγιση τα ng DNA που περιέχονται σε 1 μl δείγματος που ηλεκτροφορήθηκε με απλή μέθοδο των τριών. Για τον υπολογισμό των moles του κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκε ο τύπος $n=m/Mr$, όπου m είναι τα ng DNA/μl δείγματος και Mr το μέσο μοριακό βάρος των τεσσάρων νουκλεοτιδικών βάσεων A, T, G, C (Μέσο $Mr_{\text{βάσεων}}=660$) πολλαπλασιασμένο με τον αριθμό των ζευγών βάσεων του DNA. Ακολούθησε μετατροπή των moles σε fmoles (1 fmole= 10^{-15} moles). Χρησιμοποιώντας ως δεδομένο πως σε μια τυπική αντίδραση λιγάσης η επιθυμητή συγκέντρωση DNA του φορέα και του γονιδίου είναι 30 fmoles/10 μl αντίδρασης, υπολογίστηκαν τα μl που αντιστοιχούσαν σε κάθε περίπτωση.

Ο συνολικός όγκος της κάθε αντίδρασης που πραγματοποιήθηκε ήταν 20μl, συμπληρώνοντας κάθε φορά με τις αντίστοιχες ποσότητες νερού, ενώ μετά από κάθε αντίδραση ακολουθούσε σύντομο vortex και φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα. Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.

Σε δεύτερη φάση, όσον αφορά το γονίδιο SAH7, ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pGBKT7, ο οποίος είχε προηγουμένως επεξεργαστεί με πέψη με τα ένζυμα περιορισμού EcoR1 και BamH1, και καθαριστεί μέσω PCR Clean Up KIT. Για τον υποκινητή pSAH7, ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pCambia1301, αφού επεξεργάστηκε με τα ένζυμα BamH1 και Nco1, και καθαριστεί και αυτός μέσω PCR Clean Up KIT. Έτσι τόσο τα επιλεγμένα τμήματα DNA όσο και τα πλασμίδια όπου θα κλωνοποιούνταν είχαν σε κάθε περίπτωση τα ίδια άκρα. Επώαση του μίγματος για 12 ώρες στους 16°C.

Εκτός από τα δείγματα, σε έναν σωλήνα συλλογής, ο οποίος αποτελούσε Control, τοποθετούνταν στη θέση του DNA δείγματος και σε αντίστοιχη ποσότητα ddH₂O.

Τα γονίδια είχαν εισαχθεί στις εξής θέσεις κλωνοποίησης του φορέα pJET1.2:

SAH7	EcoRI/BamHI
pSAH7	Nde/Hind III
Fragment 2	BamHI/NcoI
Fragment 3	BamHI/NcoI
Fragment 4	BamHI/NcoI

Τα γονίδια είχαν εισαχθεί στις εξής θέσεις κλωνοποίησης του φορέα pCambia1301:

pSAH7	Nde/Hind III
Fragment 2	BamHI/NcoI
Fragment 3	BamHI/NcoI
Fragment 4	BamHI/NcoI

Τέλος το γονίδιο SAH7 μπήκε στην θέση κλωνοποίησης EcoRI/BamHI-HF του φορέα pGBKT7.

2.3.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

Ο όρος μετασχηματισμός αναφέρεται στη διαδικασία εισαγωγής και διατήρησης ξένου γενετικού υλικού στο βακτηριακό κύτταρο, η οποία μπορεί να γίνει με μεθόδους όπως η θερμική καταπόνηση (Hanahan, 1983, Hanahan *et al.*, 1991) και η ηλεκτροδιάτρηση (Solioz & Bienz, 1990). Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων με τη μέθοδο της θερμικής καταπόνησης (Hanahan *et al.*, 1991). Ο θερμικός παλμός (από τους 0°C στους 42°C) μειώνει τη ρευστότητα της μεμβράνης, ενώ η ψυχρή καταπόνηση (από τους 42 °C στους 0 °C) την αυξάνει σε τιμή μεγαλύτερη της αρχικής (Panja *et al.*, 2006).

- 1) Μεταφορά δεκτικών κυττάρων E.coli Omnimax από τους -80°C στον πάγο έως ότου να ξεπαγώσουν
- 2) Short spin των ligation mix
Προσθήκη ligation mix(όλο ή ½, εδώ προστέθηκε όλη η ποσότητα), στα tubes των κυττάρων και ήπια ανακίνηση. Επώαση για 15min σε πάγο
- 3) Heat shock (θερμικό σοκ) με τοποθέτηση των tubes για 45sec στους 42°C (υδατόλουτρο), κατά το οποίο τα πλασμίδια-φορείς εισέρχονται στα βακτηριακά κύτταρα
- 4) Προσθήκη 1ml υγρού θρεπτικού LB, προθερμασμένου στους 37°C, ήπια ανακίνηση και επώαση για 1h στους 37°C (shake)
- 5) Επίστρωση 100μl/tube (για ligation mix και 50μl/tube για plasmid) σε τρυβλία με LB-agar (και αντιβιοτικό) κάτω απο στείρες συνθήκες.
Φυγοκέντρηση υπολοιπούμενης ποσότητας (900μl) για 2min σε 3.000rpm
- 6) Αφαίρεση του υπερκειμένου, προσθήκη υγρού θρεπτικού LB (80-100μl) στα tubes για επαναιώρηση (ήπια ανακίνηση) και επίστρωση σε τρυβλία με LB-agar (και αντιβιοτικό)
- 7) Τοποθέτηση των τρυβλίων σε μεμβράνη (ή αλουμινόχαρτο αν περιέχουν αμικικίνη)
Επώαση τρυβλίων στους 37°C overnight

Το κάθε ένθεμα, ενσωματώθηκε στον κατάλληλα κομμένο πλασμιδιακό φορέα (pGBKT7, pCambia1301) με αντίδραση λιγάσης. Τα άκρα που προέκυψαν από τις πέψεις τόσο των γονιδίων όσο και του φορέα επέτρεψαν τη δράση του μορίου T4 DNA Ligase (Takara) και την κατάλυση της δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 5' φωσφορικής ομάδας και του παρακείμενου 3' υδροξυλίου στο κομμένα σημεία, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

Η αντίδραση έγινε μεταξύ του εκάστοτε ενθέματος (pSAH7, Fragments 2-4) με τον φορέα pCambia1301 και του SAH7 με τον φορέα pGBKT7, για 18-20 h στους 16 °C. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό με θερμική καταπόνηση (τροποποιημένο πρωτόκολλο Hanahan *et al.*, 1991) χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* OmniMax, τα οποία στην συνέχεια επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό επιλογής LB-Amp100.

Ταυτόχρονα, οι κομμένοι φορείς pCambia1301 και pGBKT7, με άκρα BamHI/NcoI και EcoRI/BamHI-HF αντίστοιχα, επώαστηκαν χωρίς κάποιο από τα γονίδια, παρουσία και απουσία λιγάσης και χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό χημειοδεκτικών κυττάρων *E. coli* OmniMax. Στην περίπτωση της επώασης με λιγάση, τα πλασμίδια που έχουν κοπεί μερικώς καθώς και όσα δεν έχουν κοπεί, αποκτούν την κυκλική τους μορφή με αποτέλεσμα να εισάγονται επιτυχώς στα κύτταρα *E. coli* OmniMax και αυτά να αναπτύσσονται στο θρεπτικό LB-Amp100. Με το δείγμα αυτό ελέγχεται το ποσοστό της μερικής ή και καθόλου πέψης του φορέα από κάποιο από τα ένζυμα. Στην περίπτωση της επώασης χωρίς λιγάση, τα κομμένα πλασμίδια δεν έχουν τη δυνατότητα να ξανακλείσουν και υπό κανονικές συνθήκες τα κύτταρα *E. coli* OmniMax δεν αναπτύσσονται στο θρεπτικό LB Amp100, αφού δε φέρουν στο DNA τους την επιλογή του αντιβιοτικού. Με το δείγμα αυτό ελέγχεται το ποσοστό της πλήρους πέψης του φορέα και από τα δύο ένζυμα.

Σημειώνεται πως σε κανένα δείγμα ελέγχου δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών, γεγονός που επιβεβαιώνει πως η πέψη του φορέα με τα περιοριστικά ένζυμα ήταν πλήρης σε κάθε περίπτωση.

2.3.3 Έλεγχος επιτυχίας μετασχηματισμού μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης Colony PCR

Η Colony PCR αποτελεί μια υψηλής απόδοσης μέθοδο που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της παρουσίας (ή απουσίας) ένθετου τμήματος DNA στον πλασμιδιακό φορέα που είχε εισαχθεί σε κάποιο βακτηριακό στέλεχος κατά τη διαδικασία του μετασχηματισμού. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη λήψη μονής αποικίας, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο tip, από τα τρυβλία των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων και τη προσθήκη της στο μίγμα διαλυμάτων της αντίδρασης PCR. Κατά τη διάρκεια του αρχικού βήματος θέρμανσης, τα κύτταρα υφίστανται λύση με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του πλασμιδιακού DNA το οποίο και θα χρησιμοποιηθεί στην συνέχεια ως μήτρα για την αντίδραση ενίσχυσης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ίδιοι με εκείνους της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση των τμημάτων, είναι δηλαδή ειδικοί για τα άκρα των DNA εισαχθέντων τμημάτων στους πλασμιδιακούς φορείς. Η παρουσία ή απουσία των PCR ενισχυόμενων τμημάτων και το μέγεθος των προϊόντων της αντίδρασης PCR προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης παρουσία μάρτυρα DNA γνωστού μεγέθους. Για τη πραγματοποίηση της μεθόδου Colony PCR, χρησιμοποιούνται οι εξής παράγοντες:

- Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer (Invitrogen)
- Διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου (MgCl₂)
- Ελεύθερα 5' τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTP's)
- Εκκινητής Forward (T7)
- Εκκινητής Reverse (1-8)
- DNA πολυμεράση (Taq Invitrogen Polymerase)
- Μονή αποικία από τρυβλίο LB μετασχηματισμένων κυττάρων
- ddH₂O

Συστατικά	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος Αντίδρασης (μl)
Invitrogen PCR Buffer	10x	1x	5
MgCl ₂	50mM	1,5mM	1,5
dNTP's	10mM	1mM	1
Forward Primer	10μM	2,5μM	2,5
Reverse Primer	10μM	2,5μM	2,5
Taq Invitrogen Polymerase	5 u/μl	0,75 u/μl	0,15
ddH ₂ O			Μέχρι 50 (37,35)

Στάδια επώασης σε θερμικό κυκλοποιητή:

Αρχική Αποδιάταξη	95	5min
Αποδιάταξη	92	1min
Αναδιάταξη	Θ* ¹	40sec
Επέκταση	72	T* ²
Τελική Επέκταση	72	5min

Θ*¹: Πρόκειται για την θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών, η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών, το μήκος τους και την περιεκτικότητά τους σε GC νουκλεοτιδικές βάσεις.

T*²: Ο χρόνος επέκτασης, ο οποίος εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας των βάσεων που οριοθετείται από την απόσταση των δύο αρχικών εκκινητών, με βάση την γενική αρχή 0,5-1Kb/1λεπτό.

2.4 Σταθερός μετασχηματισμός φυτών

2.4.1 Πρότυποι οργανισμοί

Οι επιστήμονες διαχρονικά έχουν επικεντρώσει την προσοχή τους σε έναν μικρό σχετικά αριθμό οργανισμών, των λεγόμενων πρότυπων οργανισμών ή οργανισμών-μοντέλων (model organisms). Μεταξύ των σημαντικότερων πρότυπων οργανισμών, με σειρά αυξανόμενης πολυπλοκότητας, συγκαταλέγονται το βακτήριο *Escherichia coli*, οι βακτηριοφάγοι T και λ, η μαγιά της αρτοποιίας *Saccharomyces cerevisiae*, το αγριόχορτο *Arabidopsis*, ο νηματώδης σκόληκας *Caenorhabditis elegans*, η μύγα των φρούτων *Drosophila melanogaster* και ο ποντικός *Mus musculus*. Τα αποτελέσματα των ερευνών που γίνονται σε αυτούς προσδοκάται ότι θα παρέχουν πληροφορίες και για άλλους οργανισμούς (Watson *et al.*, 2011). Ένα από τα σημαντικότερα γνωρίσματα των πρότυπων οργανισμών είναι η μεγάλη διαθεσιμότητα ισχυρών εργαλείων κλασικής και μοριακής γενετικής, τα οποία επιτρέπουν τη γενετική διαχείριση και μελέτη των εν λόγω οργανισμών. Εξίσου σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το χαμηλό κόστος συντήρησης και ανάπτυξης των οργανισμών καθώς και ο μικρός χρόνος μεταξύ των διαδοχικών γενεών. Η μελέτη του εκάστοτε πρότυπου συστήματος προσέλκυσε μια κρίσιμη μάζα επιστημόνων, καθιστώντας έτσι δυνατή την διακίνηση ιδεών, μεθόδων, πειραματικών εργαλείων και στελεχών, επιταχύνοντας την επιστημονική πρόοδο (Watson *et al.*, 2011). Η επιλογή του πρότυπου οργανισμού μελέτης εξαρτάται κάθε φορά από το ερευνητικό ερώτημα που τίθεται. Για παράδειγμα, στην περίπτωση που μελετώνται θεμελιώδη ζητήματα της μοριακής βιολογίας, είναι συχνά πρακτικό να μελετώνται απλούστεροι μονοκύτταροι οργανισμοί ή ιοί. Βασικό πλεονέκτημα των οργανισμών αυτών είναι ότι μπορούν να αυξηθούν γρήγορα και σε μεγάλες ποσότητες, ενώ παράλληλα επιτρέπουν το συνδυασμό γενετικών και βιοχημικών πειραματικών προσεγγίσεων. Άλλα ερωτήματα, όπως αυτά που αφορούν την ανάπτυξη (οντογένεση), μπορούν να εξεταστούν συχνά μόνο με πιο πολύπλοκα συστήματα οργανισμών-μοντέλων. Για παράδειγμα, ως μοντέλα για την ανάλυση της ανάπτυξης των φυτών χρησιμοποιούνται από την κατηγορία των μονοκοτυλήδων φυτών το καλαμπόκι (*Zea mays*) και το ρύζι (*Oryza sativa*). Στην κατηγορία των δικοτυλήδων φυτών χρησιμοποιούνται κυρίως τα *Lotus japonicus* και *Medicago truncatula*, ενώ κυρίαρχος εκπρόσωπος είναι το *Arabidopsis thaliana* (Watson *et al.*, 2011, Καλαντίδης κ.ά., 2009, Russell, 2009).

2.4.2 *Arabidopsis thaliana*

Σημαντικό ρόλο στην μελέτη των αναπτυξιακών διεργασιών των φυτών διαδραματίζει η ανάλυση μεταλλαγμένων ή/και διαγονιδιακών φυτικών σειρών. Φυτών δηλαδή, που παρουσιάζουν μερική ή ολική απώλεια λειτουργίας ενός ή περισσότερων γονιδίων, αυξημένη ή μειωμένη επαγωγή ενός γονιδίου και φυτών που εκφράζουν συντηγμένες κατασκευές με γονίδια μάρτυρες ή “αναγνωριστικές ακολουθίες” (tags). Κάποια αλλαγή λειτουργίας ενός αναπτυξιακού γονιδίου ή η έκφραση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ενός συντηγμένου γονιδίου μάρτυρα οδηγούν

συνήθως σε μια τροποποίηση του αντίστοιχου φαινότυπου (phenotypes) του διαγονιδιακού φυτού. Η μελέτη των φαινοτύπων των φυτών αυτών αποτελεί το “κλειδί” της μοριακής και γενετικής ανάλυσης και τα πλέον κατάλληλα είδη για το σκοπό αυτό ονομάζονται “φυτά μοντέλα”.

Όσον αφορά τα μονοκοτυλήδονα, σαν φυτά μοντέλα χρησιμοποιούνται κυρίως το καλαμπόκι (*Zea mays*) και το ρύζι (*Oryza sativa*). Στην κατηγορία των δικοτυλήδονων, ως φυτά μοντέλα χρησιμοποιούνται το *Lotus japonicus*, το *Medicago truncatula* ενώ κυρίαρχος εκπρόσωπος είναι το *Arabidopsis thaliana*. Τα συγκεκριμένα φυτά μοντέλα έχουν σχετικά απλό γονιδίωμα, χαμηλό κόστος συντήρησης και ανάπτυξης, καθώς και μικρό χρόνο μεταξύ των διαδοχικών γενεών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το πρότυπο φυτό *Arabidopsis thaliana*, που υπό την επίδραση συνεχούς φωτός στους 22°C μπορεί να καλλιεργηθεί σε πυκνότητα 10.000 φυτά/m² και να ολοκληρώσει τον κύκλο ζωής του μέσα σε 8-10 εβδομάδες, δίνοντας έτσι την δυνατότητα ανάπτυξης μέχρι και 4-5 γενεών κάθε χρόνο.

Το *Arabidopsis thaliana* είναι ένα ζιζάνιο της οικογένειας Brassicaceae. Οι οικότυποι που χρησιμοποιούνται στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι η Landsberg erecta (Ler), η Columbia (Col) και η Wassilewskija (Ws). Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο οικότυπος Columbia. Καθώς το ύψος του δεν ξεπερνά τα 30-40 cm, μπορεί να καλλιεργηθεί στο εργαστήριο σε σχετικά μικρό χώρο σε θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών. Τα άνθη των φυτών αυτών είναι ερμαφρόδιτα και υπό κανονικές συνθήκες αυτογονιμοποιούνται, (αποφυγή σταυρογονιμοποίησης μεταξύ φυτών με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο) παράγοντας έναν μεγάλο αριθμό σπερμάτων. Ένα ακόμα πλεονέκτημα του *Arabidopsis* είναι ο εύκολος και γρήγορος μετασχηματισμός του με την χρήση του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*. Αν και τα φυτά της M1 γενιάς είναι μωσαϊκά και ετερόζυγα, οι γαμέτες που θα προκύψουν από μια μεταλλαγμένη περιοχή θα δημιουργήσουν μετά από αυτογονιμοποίηση απογόνους που θα φέρουν την μετάλλαξη σε ετερόζυγη ή ομόζυγη κατάσταση.



Φυτό *Arabidopsis thaliana* οικότυπου Columbia (Col-0) (Ponnu *et al.*, 2011).

2.4.3 Καλλιέργεια φυτών *Arabidopsis thaliana* οικότυπου Columbia (Col-0)

Προκειμένου να καλλιεργηθούν τα φυτά *Arabidopsis thaliana*, είναι απαραίτητο να προηγηθεί άρση ληθάργου (stratification) που πραγματοποιείται με την διάβρεξη των σπερμάτων (imbibition). Τα σπέρματα παραμένουν σε dH₂O στους 4°C για δύο έως τέσσερις μέρες έτσι ώστε να απορροφηθεί το νερό και να διασταλούν, να ενεργοποιηθούν ένζυμα του μεταβολισμού τους και να παραχθεί η απαραίτητη ενέργεια για τις μετέπειτα διαδικασίες ανάπτυξης. Στην συνέχεια τα σπέρματα πρέπει να αποστειρωθούν και να μεταφερθούν κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS (Murashige & Skooge, 1962). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται θάλαμος νηματικής ροής, όπου πρώτα λαμβάνει χώρα η αφαίρεση του dH₂O που χρησιμοποιήθηκε για την ενυδάτωση των σπερμάτων και έπειτα προστίθεται 1ml διαλύματος αιθανόλης (75%), στην οποία παραμένουν για 2 min με παράλληλη ανάδευση. Το διάλυμα της αιθανόλης αφαιρείται, προστίθεται 1ml διαλύματος χλωρίνης (25%) και γίνεται ανακίνηση για 4 min. Ακολουθεί αφαίρεση του διαλύματος χλωρίνης και προσθήκη 1ml αποστειρωμένου dH₂O, με ταυτόχρονη ανακίνηση για 2 min, διαδικασία που επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές. Τέλος,

έγινε διαμοίραση των σπερμάτων, ένα προς ένα, σε στερεό θρεπτικό MS με τη βοήθεια αποστειρωμένης βελόνας. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν κάθετα σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22 °C, υγρασία 40%, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι).

2.4.4 Χρήση του συστήματος του *Agrobacterium tumefaciens*

Κάτω από συνθήκες εργαστηριακής καλλιέργειας, η T-DNA περιοχή μεταξύ του LB και RB συνοριακού μπορεί να απαλειφθεί, χωρίς αυτό να επηρεάζει την ανάπτυξη του *Agrobacterium*. Επιπρόσθετα έχει δειχτεί ότι τα βακτηριακά κύτταρα διατηρούν την μολυσματική τους ικανότητα εφόσον παραμείνει ανέπαφη η Vir περιοχή του Ti πλασμιδίου. Με αυτά τα δεδομένα, οι ερευνητές προχώρησαν στην δημιουργία μιας πληθώρας γενετικά τροποποιημένων αγροβακτηριακών στελεχών, τα οποία φέρουν Ti-πλασμίδια απαλλαγμένα από την ενδογενή T-DNA περιοχή, διατηρώντας όμως τα γονίδια της Vir περιοχής (αφοπλισμένα Ti-πλασμίδια, disarmed Ti-plasmids).

i. Μετασχηματισμός Αγροβακτηρίων

Ξεκινώντας το πρωτόκολλο είναι απαραίτητο το ξεπάγωμα δεκτικών κυττάρων GV3101, που διατηρούνται στους -80°C σε σωλήνες συλλογής των 1,5 ml, τοποθετώντας τα σε πάγο. Έπειτα ακολουθεί η προσθήκη περίπου 5μl του μετασχηματισμένου πλασμιδιακού φορέα (pCambia1301, pGBKT7) και η άμεση τοποθέτησή του σε υγρό άζωτο. Ακολουθεί επώαση για 5min σε 37°C και μετέπειτα η προσθήκη 1μl θρεπτικού YEB ανά σωλήνα συλλογής. Στην συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στους 28°C για δύο ώρες με ταυτόχρονη ανακίνηση, φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 30 sec σε 11.000xg, αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση τους σε 100μl YEB. Τέλος γίνεται επίστρωση σε τρυβλία YEB agar παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών, ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα, και επώαση στους 28°C για δύο μέρες. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης ακολουθεί η επιλογή μονής αποικίας από τα τρυβλία και η ανακαλλιέργεια της σε υγρό θρεπτικό YEB για περίπου 36 ώρες. Το πλασμιδιακό DNA απομονώνεται και μετασχηματίζονται με αυτό ξανά στελέχη Omnimax των *E. coli* (Back Transformation). Μετά την απομόνωσή τους, πραγματοποιείται ο μετασχηματισμός των φυτών.

ii. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *Agrobacterium tumefaciens*, Miniprep

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα βακτήριο εδάφους που προκαλεί στα φυτά την ασθένεια του κορωνωτού κάλλου. Είναι ένα κατά gram αρνητικό βακτήριο και ανήκει στην οικογένεια των Rhizobiaceae. Μπορεί να προσβάλλει σχεδόν όλα τα δικοτυλήδονα φυτά και μερικά μονοκοτυλήδονα της οικογένειας Lilaceae και Amaryllideae.

Η παθογενετικότητα του αγρίου τύπου του βακτηρίου αυτού εξαρτάται άμεσα από την ύπαρξη σε αυτό ενός μεγάλου πλασμιδίου, του πλασμιδίου Ti. Γενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι, δύο περιοχές του Ti-πλασμιδίου (Vir και T-DNA περιοχή) είναι υπεύθυνες για την ικανότητά του να μολύνει

φυτικά κύτταρα. Η Vir περιοχή περιέχει έναν αριθμό γονιδίων που όταν επάγονται παράγουν τις Vir πρωτεΐνες, οι οποίες με την σειρά τους μεταφέρουν και ενσωματώνουν ένα αντίγραφο του DNA της T-DNA περιοχής στο γονιδίωμα του φυτού. Αυτά τα γονίδια ρυθμίζονται από ένα πολύπλοκο σύστημα χημειοποδοχέων, που είναι ικανό να αναγνωρίζει φυτικούς μεταβολίτες που παράγονται κατά την διάρκεια βιοσύνθεσης των λιγνινών των κυτταρικών τοιχωμάτων, ενώ η T-DNA περιοχή του πλασμιδίου περιέχει γονίδια υπεύθυνα για τη σύνθεση ή τροποποίηση βασικών αυξητικών παραγόντων. Η ρυθμιστική έκφραση αυτών των γονιδίων τροποποιεί την κανονική διαφοροποίηση των φυτικών κυττάρων και οδηγεί σε νεοπλασία. Η μεταφορά του T-DNA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις δύο συνοριακές ακολουθίες που βρίσκονται στα δύο άκρα του T-DNA.

Στο έδαφος το *Agrobacterium tumefaciens* απαντάται συνήθως στη ριζόσφαιρα, αλλά έχει βρεθεί και μέσα στο αγγειακό σύστημα πολλών φυτών. Όπως πολλά άλλα βακτήρια έτσι και αυτό έλκεται χημειοτακτικά από ένα ευρύ φάσμα σακχάρων και αμινοξικών συστατικών, ενώ έχει και την ικανότητα να αναγνωρίζει και μια σειρά δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού (π.χ. ενδιάμεσα προϊόντα βιοσύνθεσης λιγνίνης).

Στην παρούσα εργασία για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από *Agrobacterium* ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- 1) Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους *Agrobacterium* αναπτύσσεται σε 8ml υγρού θρεπτικού μέσου YEB παρουσία των αντίστοιχων αντιβιοτικών για 36 ώρες σε 28-30 °C
- 2) Χρησιμοποιήθηκαν 1,5 ml της καλλιέργειας και φυγοκεντρήθηκαν για 2min σε 12000xg. Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου και επανάληψη του βήματος.
- 3) Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου, προστέθηκαν 100μl διαλύματος διαλυτοποίησης P1, για την επαναδιάλυση του ιζήματος, και στην συνέχεια προστέθηκαν 10μl από διάλυμα λυσοζύμης 40mg/ml. Πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση (vortex) για 20sec και επώαση στους 37°C για 15min, ώστε να δράσει το ένζυμο.
- 4) Έπειτα έγινε προσθήκη 200μl διαλύματος λύσης (ανάλογο του P2, 0,2M NaOH, 1% SDS) με έντονη ανάδευση για 20sec και προσθήκη 50μl φαινόλης.
- 5) Στην συνέχεια προστέθηκαν 200μl διαλύματος εξουδετέρωσης (3M Na Acetate/ sodium, pH: 5,2), έγινε έντονη ανάδευση και φυγοκέντριση για 5min σε 12.000xg
- 6) Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο δοχείο συλλογής, όπου προστέθηκε διπλάσιος όγκος 100% αιθανόλης σε σχέση με τον όγκο του δείγματος. Αναμίχθηκαν και επώαστηκαν για 10min στον πάγο και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 10min σε 12.000xg.

7) Μετά από απόρριψη του υπερκειμένου, προστέθηκαν 300ml EtOH 75% και φυγοκεντρήθηκαν για 10min σε full speed από όπου τελικά αφαιρέθηκε εκ νέου το υπερκείμενο.

iii. Σταθερός μετασχηματισμός φυτών

Αν και παραμένουν ακόμη και σήμερα αναπάντητα ερωτήματα όσον αφορά την διαδικασία μεταφοράς του T-DNA από το *Agrobacterium tumefaciens* στο φυτό, το σύστημά του συνεχίζει να αποτελεί ένα από τα πιο ισχυρά “εργαλεία” στα χέρια των μοριακών γενετιστών. Όσον αφορά το *Arabidopsis thaliana*, η μεθοδολογία μετασχηματισμού του περιλαμβάνει την εμφύτευση ανώριμων ανθικών στελεχών σε καλλιέργεια αγκροβακτηρίου που φέρει την υπό μελέτη “κατασκευή” (μέθοδος αγροεμποτισμού – *Agrobacterium infiltration method*). Στην παρούσα μελέτη έγινε εμφύτευση των *A. thaliana* με την κατασκευή pCambia1301::pSAH7, καθώς και με τις κατασκευές που περιείχαν τα μικρότερα τμήματα του υποκινητή (deletions 2, 3, 4) σε φορείς pCambia1301. Κάτω από συνθήκες εργαστηριακής καλλιέργειας, η T-DNA περιοχή μεταξύ του LB και του RB συνοριακού μπορεί να απαλειφθεί, χωρίς να επηρεαστεί η ανάπτυξη του *Agrobacterium* και διατηρώντας την μολυσματική του ικανότητα (αφού η περιοχή Vir παραμένει ανέπαφη). Για την εκτέλεση του πρωτοκόλλου του μετασχηματισμού προηγήθηκε ανάπτυξη του αγροβακτηριακού στελέχους σε 8ml YEB παρουσία αντιβιοτικού (kan 40μg/ml). Έπειτα ακολούθησε μεταφορά 3ml καλλιέργειας σε 300ml YEP, που επώαστηκαν για 36 ώρες σε 28°C με ανάδευση 200rpm. Ακολούθησε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD₆₀₀) η οποία θα πρέπει να είχε φτάσει σε τιμή περίπου 1,2 προκειμένου να συνεχισθεί το πρωτόκολλο. Στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν 300ml από κάθε καλλιέργεια σε 4000rpm για 15min. Ακολούθησε επαναιώρηση των κυττάρων σε 2-3ml IM και μετρήθηκε εκ νέου η οπτική πυκνότητα και έλαβαν χώρα διαδοχικές αραιώσεις μέχρι να επιτευχθεί επιθυμητή OD₆₀₀= 0,5-0,9. Στη συνέχεια προστέθηκαν τα διαλύματα BAP (0.01 mg/ml) και Silvett L-77 (200 μ l/l) και έγινε εμφύτευση των φυτών σε αυτά για περίπου ένα λεπτό. Αφού επαναλήφθηκε το βήμα αυτό, τα φυτά κλείστηκαν σε πλαστικές σακούλες, προκειμένου να αυξηθεί η υγρασία και η απόδοση του μετασχηματισμού, για λιγότερο από 24h.

2.4.5 GUS staining

Στη δημιουργία των παραπάνω “κατασκευών” πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν τα γονίδια “αναφοράς” που χρησιμοποιούνται στην μοριακή γενετική. Σε μεταγραφική ή/και μεταφραστική σύντηξη με υποκινητές γονιδίων ή/και ενδογενή γονίδια αποτελούν ένα πανίσχυρο εργαλείο στη μελέτη της επαγωγής και έκφρασης γονιδίων, του τοπολογικού εντοπισμού των αντίστοιχων πρωτεϊνών και των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων in planta. Ένα από τα πιο συχνά

χρησιμοποιούμενα γονίδια μάρτυρες είναι το uidA της *E. coli* το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο της β-γλυκουρονιδάσης (GUS).

Η ανίχνευση της GUS πρωτεΐνης μπορεί να γίνει τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά, ανάλογα με το υπόστρωμα του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί. Το X-GlcA, 5-βρωμο -4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γλυκουρονικό οξύ είναι ένα υπόστρωμα για την β-D-γλυκουρονιδάση που κωδικοποιείται από το γονίδιο gusA. Το υπόστρωμα αυτό χρησιμοποιείται ως ποιοτικός ιστοχημικός δείκτης της ειδικής GUS έκφρασης στα κύτταρα και τους ιστούς. Το X-GlcA διασπάται από την GUS μέσω υδρόλυσης. Η ενζυμική διάσπαση του X-GlcA έχει σαν αποτέλεσμα την κατακρήμνιση ενός αδιάλυτου στο νερό, μπλε ιζήματος. Ο σχηματισμός χρώματος απαιτεί τρεις ξεχωριστές αντιδράσεις. Μετά την ενζυματική του κύκλου εργασιών, το κυκλοφόρησε σε δοξυλ παράγωγο διμερίζεται και είναι υπο-συνεχεία

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ποιοτική ανίχνευση της GUS πρωτεΐνης (ενζυμική διάσπαση υποστρώματος X-Gluc) η οποία οδηγεί στην ανάπτυξη μπλε χρώματος ήταν η εξής:

1. Τοποθέτηση ιστών ή ολόκληρων φυτών σε erpendorf (1.5 ml) και προσθήκη παγωμένης ακετόνης 90% για 30sec με ταυτόχρονη ανάδευση κάθε 5-10min.
2. Αφαίρεση ακετόνης και προσθήκη παγωμένου RGS Buffer για 5-10min. Επανάληψη 2-4 φορές.
3. Αφαίρεση RGS Buffer και προσθήκη παγωμένου GUS staining Buffer
4. Επώαση στους 37°C overnight. Ο χρόνος επώασης εξαρτάται από την κατασκευή(?) και την συγκέντρωση του X-Gluc
5. Αφαίρεση GS Buffer και προσθήκη διαδοχικών συγκεντρώσεων EtOH (20%, 35%, 50%, 70%, 90%, 100%) για 30min κάθε φορά.
6. Περαιτέρω επώαση με Chloral Hydrate, προσθήκη EtOH 90% και στην συνέχεια Chloral Hydrate/Glycerol/dH₂O (8g/1ml/2ml)

Overnight και αποθήκευση σε RT, εναλλακτικά προσθέτω 90% και 70% EtOH και αποθήκευση στους 4°C.

2.5 Απομόνωση RNA από φυτικούς ιστούς

2.5.1 Απομόνωση RNA

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ψύξη και πολτοποίηση των δειγμάτων (φυτικοί ιστοί από φύλλα, ρίζες, άνθη, σπόρους και αρτίβλαστα τριών και δέκα ημερών) σε υγρό άζωτο, με την βοήθεια αποστειρωμένων πλαστικών εμβόλων. Κατά την διάρκεια του πρωτοκόλλου γίνεται χρήση γαντιών και τα δείγματα παραμένουν στον πάγο, διότι σε θερμοκρασία δωματίου δρουν ένζυμα που διασπούν το RNA (Rnases).

Στην συνέχεια προστέθηκαν 300μl διαλύματος κυτταρικής λύσης (Cell Lysis Solution 1) με έντονη ανάδευση και επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.

Έπειτα έγινε προσθήκη 100μl (protein-dna prep Sol II) και επώαση 15min στους 4°C και φυγοκέντριση για 10min σε full speed σε ψυχόμενη φυγόκεντρο.

Ακολούθησε μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο αποστειρωμένο δοχείο συλλογής των 1,5ml και η προσθήκη 300μl ισοπροπανόλης με έντονη ανάδευση.

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 4min σε full speed και μετά από απόρριψη του υπερκειμένου, προστέθηκαν 300μl EtOH 70%, για τον καθαρισμό του ιζήματος, και φυγοκέντριση για 4min σε full speed.

Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου πραγματοποιήθηκε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου με ανοικτά καπάκια για την εξάτμιση της περίσσειας αιθανόλης που περιέχει το διάλυμα έκπλυσης και επαναδιαλυτοποίηση σε 25μl διπλά απεσταγμένου αποστειρωμένου νερού.

*Σε αυτό το στάδιο υπάρχει η δυνατότητα αποθήκευσης των δειγμάτων σε καταψύκτη (-80°C) έως και για μία εβδομάδα.

2.5.2 Θεραπεία με Dnase (Biolabs)

Συστατικά	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος Αντίδρασης 100μl
DNase I Biolabs Buffer (10x)	1x	10μl
RNA δείγμα	10μg	*
DNaseI Biolabs (2U/μl)	2U	1μl
ddH ₂ O έως 100μl	*	*

Ακολούθησε επώαση για 7 min στους 37°C

Προσθήκη 1μl EDTA 0,5 M

Επώαση για 4 min στους 75°C

Μετά το πέρας της θεραπείας με DNase ακολουθεί προσθήκη 50μl διαλύματος 7,5M CH₃COONH₄ και 400μl διαλύματος EtOH (100%) με έντονη ανακίνηση.

Έπειτα φυγοκεντρούμε για 20 min σε full speed σε ψυχόμενη φυγόκεντρο.

Μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου ξεπλένεται το ίζημα με 300μl διαλύματος EtOH (70%), φυγοκεντρείται για 10 min σε full speed στους 4°C και αφαιρείται εκ νέου το υπερκείμενο. Τέλος το ίζημα επαναιωρείται σε 20μl ddH₂O.

2.5.3 RT-PCR (Reverse transcription-PCR)

Στην RT-PCR ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το RNA αντί του DNA. Το RNA μετατρέπεται σε cDNA, με το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Για την μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή, ολιγοdT_s ή ειδικοί εκκινητές συμπληρωματικοί ως προς την αλληλουχία στόχο και το cDNA που θα παραχθεί λειτουργεί ως εκμαγείο για την DNA πολυμεράση στην συνήθη τεχνική της PCR. Η RT-PCR αποτελεί ένα πολύτιμο και ευαίσθητο εργαλείο για την μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο RNA διότι χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ταχύτητα και ευαισθησία. Εξελίξεις στην RT-PCR περιλαμβάνουν την ανάπτυξη απλών πρωτοκόλλων στα οποία η σύνθεση cDNA και η αντίδραση PCR εκτελούνται σε ένα στάδιο (one step RT-PCR). Τα πρωτόκολλα αυτά βασίζονται στην αξιοποίηση της διπλής ιδιότητας ορισμένων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών να μεταγράφουν αντίστροφα RNA παρουσία Mn²⁺, ενώ ταυτόχρονα δρουν και ως DNA πολυμεράσες. Τα πρωτόκολλα αυτά προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα λόγω απλούστερης διαδικασίας αλλά κυρίως της προστασίας από κίνδυνο επιμόλυνσης.

Διαδικασία:

- Επώαση στους 70°C κατά την διάρκεια της οποίας μετουσιώνεται η δευτεροταγής δομή του RNA
- Επώαση στους 42°C : κατά την διάρκεια της επώασης η αντίστροφη μεταγραφάση μετατρέπει το RNA στο αντίστοιχο του μονόκλωνο συμπληρωματικό DNA (cDNA). Αυτό πραγματοποιείται όταν τα εκκινητικά μόρια DNA και η αντίστροφη μεταγραφάση προσκολλώνται στο RNA και παράγουν το cDNA.
- Στο τέλος της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιείται μια τελευταία επώαση σε υψηλή θερμοκρασία για μερικά λεπτά, με σκοπό την απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης πριν την εφαρμογή της PCR.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Smart MMLV RT Protocol σύμφωνα με το οποίο:

1. Προσθήκη 2,5μl 20μM εκκινητών (τελική συγκέντρωση 2,5μM) στο δείγμα RNA. Προσθήκη ddH₂O σε συνολικό όγκο 11,5μl και σύντομο spin.

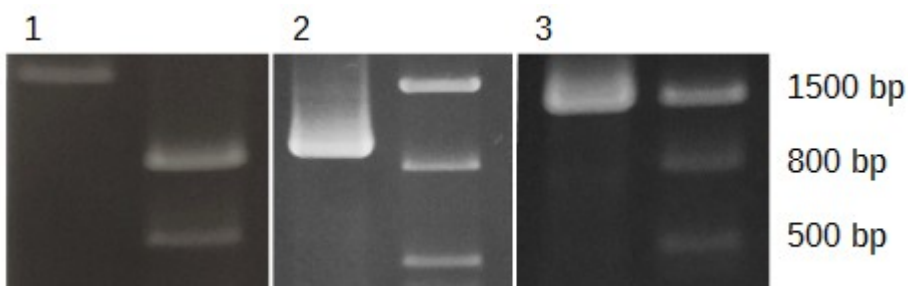
2. Επώαση στους 70°C για 3min, και άμεση τοποθέτηση σε πάγο
3. Σύντομη φυγοκέντριση και προσθήκη:
 - 4μl 5x First Strand Buffer
 - 2μl dNTP Mix
 - 2μl 100mM DTT
4. Ήπια ανακίνηση με πιπέτα και προσθήκη 0,5μl Smart MMLV RT και ανακίνηση.
5. Επώαση στους 42 °C για 60min
6. Τερματισμός αντίδρασης με επώαση στους 70°C για 15min

Κεφάλαιο 3:

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

3.1 Απομόνωση ενθεμάτων

Με σκοπό να μελετηθεί η λειτουργία του υποκινητή του γονιδίου SAH7, ο εν λόγω υποκινητής (pSAH7 3.200bp) χωρίστηκε σε τέσσερα άνισα και αλληλοεπικαλυπτόμενα τμήματα (DEL 1-4, deletions) για να μελετηθεί η ικανότητα έκφρασης του γονιδίου υπό την επίδραση καθενός από αυτών. Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με την χρήση τεσσάρων διαφορετικών ζευγών εκκινητών, προκειμένου να ενισχυθούν τα τέσσερα διαφορετικού μεγέθους τμήματα του υποκινητή. Στην συνέχεια, τα δείγματα που προέκυψαν από τις αντιδράσεις PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%, υπό τάση 90-100 V και το αποτέλεσμα οπτικοποιήθηκε με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Το αναμενόμενο μέγεθος των τμημάτων σε ζεύγη βάσεων ήταν 3435 bp για ολόκληρο τον υποκινητή pSAH7, 2477 bp για το δεύτερο μεγαλύτερο τμήμα του (Fragment 2), 1420 bp για το τρίτο (Fragment 3) και 993 bp για το τέταρτο και μικρότερο κομμάτι (Fragment 4). Για την ενίσχυση του υποκινητή pSAH7 (χρησιμοποιώντας τους εκκινητές pSAH7F AgeI-pSAH7R NcoI) και των επιμέρους τμημάτων του, χρησιμοποιήθηκε ως DNA μήτρα γονιδιωματικό DNA, εφόσον πρόκειται για υποκινητή γονιδίου.



Εικόνα 3.1: Αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας εσωτερικούς για τον υποκινητή εκκινητές προκειμένου να ενισχυθούν τα τρία επιμέρους και αλληλοεπικαλυπτόμενα τμήματά του, με την χρήση γονιδιωματικού DNA (**α**) 1. Phusion PCR Fragment 2 (2477 bp) 2. DNA Ladder (1500 bp, 800 bp) (**β**) 1. Phusion PCR Fragment 3 (1420 bp) 2. DNA Ladder (1500 bp, 800 bp, 500 bp) (**γ**) 1. Phusion PCR Fragment 4 (993 bp) 2. DNA Ladder (1500 bp, 800 bp, 500 bp).

Παράλληλα, η συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε για να ενισχυθεί το φυτικό γονίδιο SAH7 (480 bp), χρησιμοποιώντας ως DNA μήτρα cDNA του πρότυπου οργανισμού *Arabidopsis thaliana* (At col) με ταυτόχρονη εξέταση του γονιδίου AtCXIPI ως μάρτυρα για την επαλήθευση της σωστής λειτουργίας της μεθόδου (χρησιμοποιώντας ως εκκινητές για το συγκεκριμένο γονίδιο τους CXIPIF NdeI-CXIPIR BamHI). Και πάλι τα αποτελέσματα της διαδικασίας επαληθεύτηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%, υπό τάση 90-100 V και οπτικοποιήθηκαν με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

3.2 Κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pJET1.2 και απομόνωση πλασμιδίων

Στην συνέχεια τα τμήματα αυτά κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pJET1.2 μέσω αντίδρασης λιγάσης. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μετασχημάτισαν βακτηριακά κύτταρα *E. coli* DH5a. Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (pJET1.2::SAH7, pJET1.2::pSAH7, pJET1.2::Frag2, pJET1.2::Frag3, pJET1.2::Frag4) από τα κύτταρα αυτά πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης των Birnboim και Doly, 1979 (τροποποιημένο πρωτόκολλο). Κύτταρα *E. coli* DH5a που έφεραν τις κατασκευές επώαστηκαν σε υγρό θρεπτικό LB-Amp100 και μέσω της αλκαλικής λύσης τα κυτταρικά στοιχεία καθώς και το χρωμοσωμικό DNA απομακρύνθηκαν, ενώ το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε και καθαρίστηκε. Τα πλασμίδια αυτά ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%, υπό τάση 90-100 V και το αποτέλεσμα οπτικοποιήθηκε με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Το αναμενόμενο μέγεθος των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε ζεύγη βάσεων (bp) ήταν 3550 bp για το pJET1.2::SAH7, 6409 bp για το pJET1.2::pSAH7, 5451 bp για το pJET1.2::Frag2, 4394 bp για το pJET1.2::Frag3, 3967 bp για το pJET1.2::Frag4.

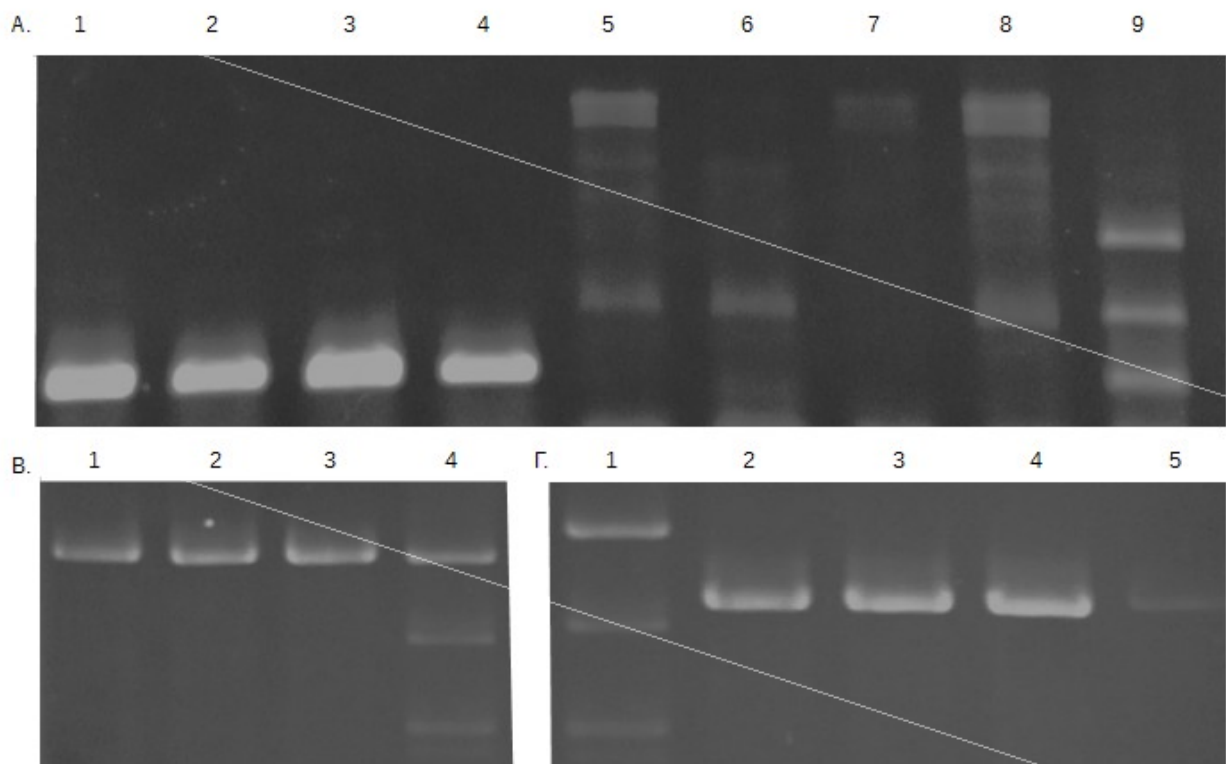
#1 #2 #3 #4 #5 #6



6409 bp

Εικόνα 3.2: Ενδεικτική απομόνωση (1, 2, 3, 4, 5, 6) από κύτταρα *E. coli* DH5a των πλασμιδίων pJET1.2::pSAH7 (6409 bp).

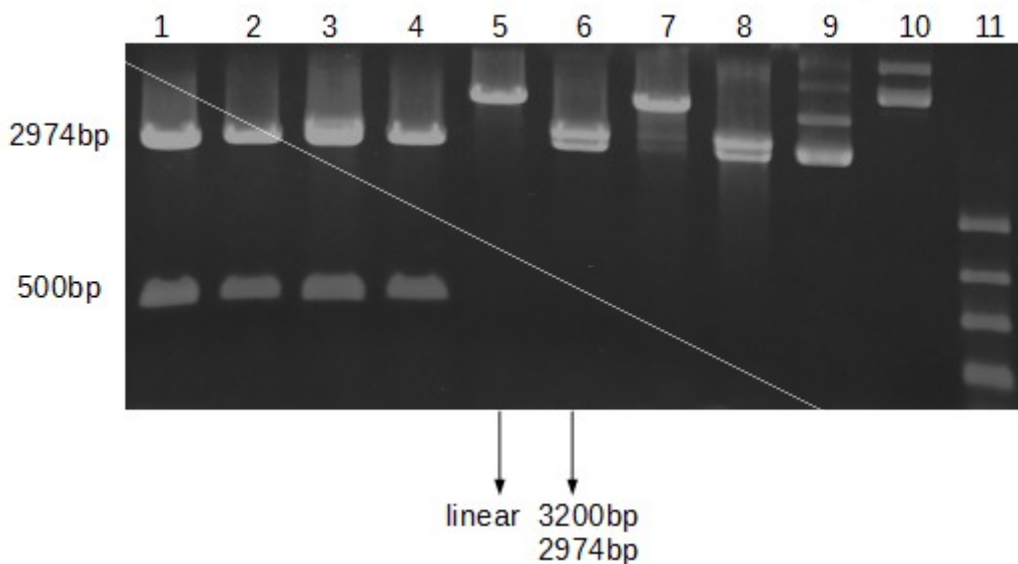
Ακολούθησε colony PCR για την επιβεβαίωση της επιτυχημένης έκβασης των μετασχηματισμών, χρησιμοποιώντας ως μήτρα τις αποικίες *E. coli*, που αναπτύχθηκαν σε στερεό υπόστρωμα LB παρουσία του αντιβιοτικού αμικιλίνη, μετά τους μετασχηματισμούς. Η αποθήκευση των αποικιών που βρέθηκαν θετικές ως προς τα υπό μελέτη ενθέματα έγιναν σε universal στους 4°C, παρουσία του αντιβιοτικού αμικιλίνη (Amp 100).



Εικόνα 3.3: (A) 1a-4a. colony PCR μονών αποικιών *E. coli* OmniMax του ανασυνδυασμένου φορέα pJET1.2::SAH7, 1b-4b. colony PCR μονών αποικιών *E. coli* OmniMax του ανασυνδυασμένου φορέα pJET1.2::pSAH7, διαδρομή 9. DNA Ladder (1500 bp, 800 bp, 500 bp). (B) 1-3 colony PCR μονών αποικιών *E. coli* OmniMax του ανασυνδυασμένου φορέα pJET1.2::F3, 4. DNA Ladder (1500 bp, 800 bp, 500 bp). (Γ) 1. DNA Ladder (1500 bp, 800 bp, 500 bp), 2-5. colony PCR μονών αποικιών *E. coli* OmniMax του ανασυνδυασμένου φορέα pJET1.2::F4.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχία της ένθεσης αλλά και ο προσανατολισμός (3'-5' ή 5'-3') των ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pJET1.2 (blunt ends) πραγματοποιήθηκε restriction analysis για το γονίδιο και τον υποκινητή του. Πραγματοποιήθηκαν δηλαδή δοκιμαστικές πέψεις

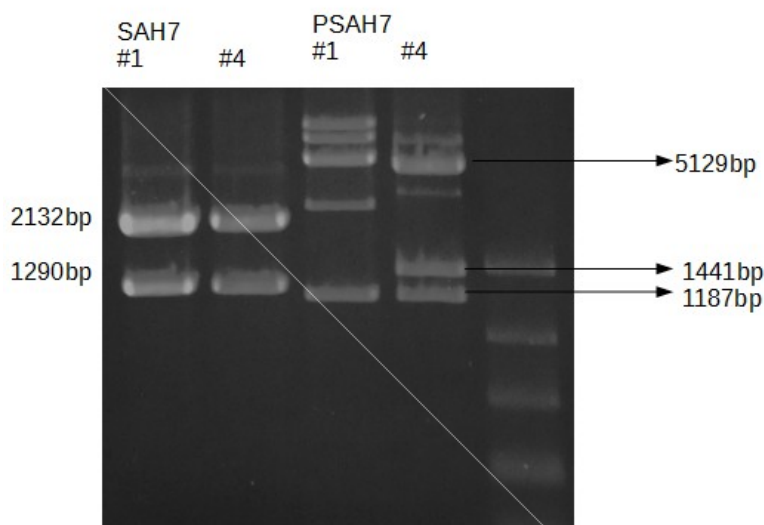
πρώτα με ένζυμο που κόβανε κοντά στα άκρα των ενθεμάτων και έπειτα με ένζυμο που κόβανε μέσα στα ενθέματα, και υπολογίστηκαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα σε ζεύγη βάσεων μετά από ηλεκτροφόρηση, και για τις δύο περιπτώσεις για κάθε ένθεμα. Όσον αφορά το γονίδιο, κόπηκε με ένζυμο περιορισμού (EcoRI, BamHI) που αναγνώριζαν θέσεις κοπής στα άκρα του και έτσι τα αναμενόμενα αποτελέσματα σε ζεύγη βάσεων ανεξαρτήτως του προσανατολισμού του ήταν δύο μπάντες, μια 2974 bp και μία 500 bp. Όσον αφορά τον υποκινητή, κατά την πέψη του με τα περιοριστικά ένζυμα NcoI και NcoI/ XhoI στην περίπτωση που ο προσανατολισμός του ήταν 5'-3' το αναμενόμενο αποτέλεσμα για την πρώτη πέψη θα ήταν μία μπάντα 6200 bp ενώ για την δεύτερη 2974 bp και 3.200 bp. Στην περίπτωση που ο υποκινητής είχε μπει με φορά 3'-5' το αναμενόμενο αποτέλεσμα και για τις δύο πέψεις θα ήταν δύο μπάντες 2974 bp και 3.200 bp.



Εικόνα 3.4: 1. Πέψη του pJET1.2::SAH7, αποικίες 1-4, με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI, BamHI (2974 bp, 500bp), 2. Πέψη του pJET1.2::pSAH7, αποικίες 1 και 4, με NcoI και NcoI, XhoI, 3. Αρνητικός δείκτης με άκοπο πλασμίδιο pJET1.2::SAH7 δ. Αρνητικός δείκτης με άκοπο πλασμίδιο pJET1.2::pSAH7, 4. DNA ladder

Στην συνέχεια, χρησιμοποιώντας τις αποικίες #1 και #4 από κάθε ένθεμα ακολούθησε δεύτερος κύκλος πέψεων. Για το γονίδιο πραγματοποιήθηκαν πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο BglII, αναμένοντας μια μπάντα 2132 bp και μια 1290 bp, στην περίπτωση που ο προσανατολισμός του ήταν 5'-3', και μια 1762 bp και 1690 bp στην περίπτωση που ήταν 3'-5'. Όσον αφορά τον υποκινητή, κατά την πέψη με NdeI/ HindIII, τα αναμενόμενα αποτελέσματα μετά από ηλεκτροφόρηση ήταν οι μπάντες 1187 bp, 1020 bp, και 3942 bp, αν ο προσανατολισμός ήταν 5'-3' και 5129 bp, 1441 bp, και 1187 bp στην περίπτωση που ο προσανατολισμός του ήταν 3'-5'.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πέψεων όπως αυτά φαίνονται και στην εικόνα 3.5, το γονίδιο έχει εισαχθεί με φορά 3'-5', ενώ για τον υποκινητή το πείραμα συνεχίστηκε χρησιμοποιώντας την αποικία #4 όπου φαίνεται ξεκάθαρα πως ο προσανατολισμός του ενθέματος είναι 5'-3'.



Εικόνα 3.5: 1. Πέψη του pJET1.2::SAH7, αποικίες 1 και 4, με BglI (2132 bp, 1290 bp), 2. Πέψη του pJET1.2::pSAH7, αποικίες 1 και 4, με τα ένζυμα NdeI, HindIII (5129 bp, 1441 bp, 1187 bp) 3. DNA Ladder.

Για να αποφευχθούν τυχόν ψευδώς θετικά αποτελέσματα για τα επιμέρους τμήματα του υποκινητή, ακολούθησαν δοκιμαστικές πέψεις στα απομονωμένα πλασμίδια, γνωρίζοντας πλέον τον προσανατολισμό του ενθέματος. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πέψεις με ένζυμα που κόβανε κοντά στα άκρα των ενθεμάτων και στην συνέχεια με ένζυμα που κόβανε μέσα σε αυτά. Τα αποτελέσματα όλων των δοκιμαστικών πέψεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%, υπό τάση 60-80 V και οπτικοποιήθηκαν με τη χρήση EtBr και UV. Για κάθε ένα ένθεμα υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες βάσεις των τμημάτων στα οποία αναμενόταν να είχε κοπεί και η αντιστοιχία των βάσεων στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαιώθηκε σε σχέση με τον δείκτη μοριακών βαρών.

3.3 Καθαρισμός ενθεμάτων

Ακολούθησε η πέψη του κάθε απομονωμένου πλασμιδίου με περιοριστικά ένζυμα με σκοπό την απομόνωση και τον καθαρισμό των ενθεμάτων. Τα ένζυμα για τη διπλή πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων επιλέχθηκαν κάθε φορά ώστε να αναγνωρίζουν μοναδικές θέσεις περιορισμού εκτός του πλαισίου ανάγνωσης του εκάστοτε ενθέματος. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν οι πέψεις των πλασμιδίων:

- pJET1.2::SAH7 με τα ένζυμα EcoRI και BamHI-HF
- pJET1.2::pSAH7 με τα ένζυμα BglIII, HindIII και NcoI

- pJET1.2::Frag2, pJET1.2::Frag3, pJET1.2::Frag4 με τα ένζυμα NcoI και BamHI-HF.

Το προϊόν της κάθε πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αгарόζης 0.8%, υπό τάση 60-80 V και πραγματοποιήθηκε οπτικοποίηση του αποτελέσματος με τη χρήση EtBr και UV. Στη συνέχεια έγινε καθαρισμός των ενθεμάτων από το πήκτωμα (Gel Extraction) βάσει του πρωτοκόλλου NucleoSpinR Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel. Η επιτυχία της διαδικασίας επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση των καθαρών ενθεμάτων σε πήκτωμα αгарόζης 0.8%, υπό τάση 90-100 V και οπτικοποίηση με EtBr και UV. Στο πήκτωμα εμφανίστηκε η ζώνη του εκάστοτε ενθέματος σε σημείο ανάλογο των ζευγών βάσεων (bp) του καθενός, σε σχέση με το δείκτη μοριακών βαρών.

3.4 Καθαρισμός φορέων έκφρασης pCambia1301 και pGBKT7

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς έκφρασης τα πλασμίδια pCambia1301 και pGBKT7 (Novagen). Οι εν λόγω φορείς χρησιμοποιήθηκε αρχικά για το μετασχηματισμό των χημειοδεκτικών βακτηριακών στελεχών *E. coli* OmniMax. Τα συγκεκριμένα στελέχη είχαν υποστεί κατεργασία με χλωριούχο ρουβίδιο (τροποποιημένο πρωτόκολλο Hanahan *et al.*, 1991). Τα χημειοδεκτικά κύτταρα που προέκυψαν υπολογίστηκε πως είχαν αποδοτικότητα μετασχηματισμού 107-108 cfu/μg πλασμιδιακού DNA, τιμή ικανοποιητική για τους σκοπούς του πειράματος. Ο μετασχηματισμός των στελεχών *E. coli* OmniMax με τους συγκεκριμένους φορείς πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της θερμικής καταπόνησης (Hanahan *et al.*, 1991). Μετά από επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό LB-Amp100, απομονώθηκαν οι φορείς βάσει του πρωτοκόλλου NucleoSpinR Plasmid DNA Purification, Macherey-Nagel και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 0.8%, υπό τάση 90-100 V και οπτικοποίηση με EtBr και UV.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πέψεις και Gel Extraction (με την μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω) για τους φορείς στους οποίους θα κλωνοποιούνταν τα ενθέματα, προσέχοντας ο εκάστοτε φορέας να έχει συμπληρωματικά άκρα με το αντίστοιχο ένθεμα.

Ο καθαρισμός των πλασμιδίων μετά από την πέψη με το κάθε περιοριστικό ένζυμο έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο NucleoSpinR Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel. Η επιτυχία της διαδικασίας επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση των κομμένων, γραμμικών πλασμιδιακών φορέων σε πήκτωμα αгарόζης 0.8%, υπό τάση 90-100 V και οπτικοποίηση με EtBr 63 και UV.

3.5 Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Το κάθε ένθεμα, ενσωματώθηκε στον κατάλληλα κομμένο πλασμιδιακό φορέα με αντίδραση λιγάσης. Τα άκρα που προέκυψαν από τις πέψεις τόσο των γονιδίων όσο και του φορέα επέτρεψαν τη δράση του μορίου T4 DNA Ligase (Takara) και την κατάλυση της δημιουργίας

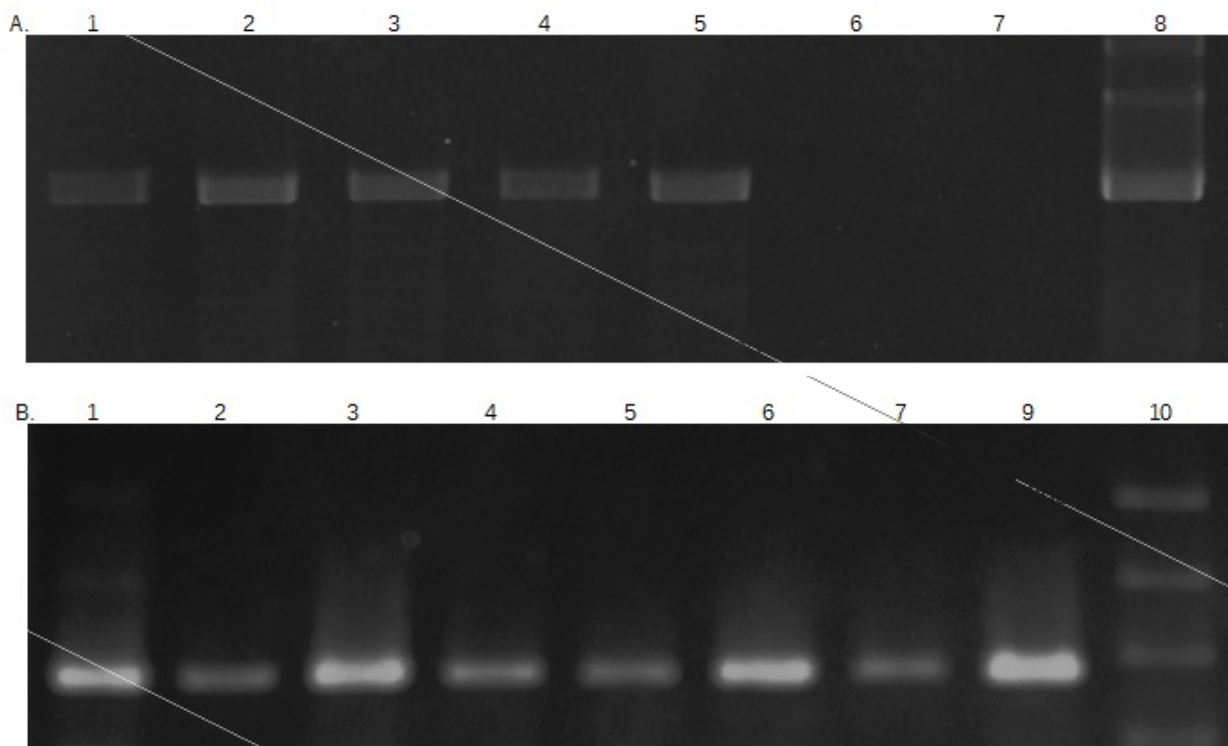
φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 5' φωσφορικής ομάδας και του παρακείμενου 3' υδροξυλίου στα κομμένα σημεία, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Η αντίδραση έγινε μεταξύ του εκάστοτε τμήματος pSAH7 (BglII/NcoI), *Fragment 2* (NcoI/BamHI-HF), *Fragment 3* (NcoI/BamHI-HF), *Fragment 4* (NcoI/BamHI-HF) με τον φορέα pCambia1301 (NcoI/BamHI-HF) και του γονιδίου SAH7 (EcoRI/BamHI-HF) με τον φορέα pGBKT7 (EcoRI BamHI-HF), για 18-20 h στους 16 °C. Όσον αφορά το ένθεμα ολόκληρου του υποκινητή του γονιδίου, ήταν αδύνατο να εκτελεστεί πέψη με τα ίδια ακριβώς περιοριστικά ένζυμα με εκείνα με τα οποία είχε σχεδιαστεί η πέψη του φορέα (XbaI, NcoI) καθώς ένα από αυτά (XbaI) είχε θέση αναγνώρισης μέσα στην αλληλουχία του συγκεκριμένου τμήματος. Για τον λόγο αυτό ακολουθήθηκε πέψη του υποκινητή με διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα (BglII, HindIII, NcoI) τα οποία όμως αφήνανε συμβατά άκρα (Compatible ends) με αυτά των περιοριστικών ενζύμων του φορέα (BamHI-HF, NcoI). Με αυτή την μέθοδο, μετά τον μετασχηματισμό των πλασμιδίων (pCambia1301) χανόταν η θέση κοπής του ενζύμου περιορισμού BamHI-HF, και για την επιβεβαίωση της ένθεσης χρειάστηκε να γίνουν δοκιμαστικές πέψεις με διαφορετικά ένζυμα.

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό με θερμική καταπόνηση (τροποποιημένο πρωτόκολλο Hanahan *et al.*, 1991) χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* OmniMax, τα οποία επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό επιλογής LB-Km50. Ταυτόχρονα, ο κομμένος φορέας pCambia1301 με άκρα BamHI-HF/NcoI, επώαστηκε χωρίς κάποιο από τα ενθέματα, παρουσία και απουσία λιγάσης και χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό χημειοδεκτικών κυττάρων *E. coli* OmniMax με τη μέθοδο της θερμικής καταπόνησης. Στην περίπτωση της επώασης με λιγάση, τα πλασμίδια που έχουν κοπεί μερικώς καθώς και όσα δεν έχουν κοπεί, αποκτούν την κυκλική τους μορφή με αποτέλεσμα να εισάγονται επιτυχώς στα κύτταρα *E. coli* OmniMax και αυτά να αναπτύσσονται στο θρεπτικό LB. Με το δείγμα αυτό ελέγχεται το ποσοστό της μερικής ή και καθόλου πέψης του φορέα από κάποιο από τα ένζυμα. Στην περίπτωση της επώασης χωρίς λιγάση, τα κομμένα πλασμίδια δεν έχουν τη δυνατότητα να ξανακλείσουν και υπό κανονικές συνθήκες τα κύτταρα *E. coli* OmniMax δεν αναπτύσσονται στο θρεπτικό LB-Amp100, αφού δε φέρουν στο DNA τους την επιλογή του αντιβιοτικού. Με το δείγμα αυτό ελέγχεται το ποσοστό της πλήρους πέψης του φορέα και από τα δύο ένζυμα. Οι καλλιέργειες των μετασχηματισμένων πλασμιδίων αποθηκεύτηκαν παρουσία του αντιβιοτικού καναμικίνη (Km 50 mg/ml).

Η επιτυχία του μετασχηματισμού των χημειοδεκτικών κυττάρων *E. coli* OmniMax με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια ελέγχθηκε με τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Mullis *et al.*, 1986, Mullis & Faloona, 1987). Για κάθε ένθεμα ελέγχθηκαν μονές αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων (Colony PCR) με τη χρήση του ενζύμου TaqPol II (Invitrogen), των κατάλληλων εκκινητών (primers) και υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Τα

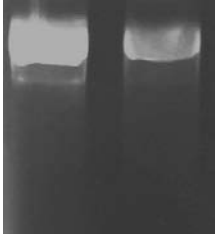
προϊόντα των επιμέρους αντιδράσεων Colony PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 0.8%, υπό τάση 90-100 V και οπτικοποιήθηκαν με EtBr και UV.

Την ίδια περίοδο πραγματοποιήθηκε φύτεμα των φυτών *Arabidopsis thaliana* COL (WIT) σε χώμα, ώστε να είναι στο κατάλληλο στάδιο για τον σταθερό μετασχηματισμό, μετά το πέρας του μετασχηματισμού των ακροβακτηρίων.



Εικόνα 3.6: A. 1-7, colony PCR μονών αποικιών *E. coli* OmniMax του ανασυνδυασμένου φορέα pSAH7::pCambia1301, 8, DNA ladder. B. 1-8, colony PCR μονών αποικιών *E. coli* OmniMax του ανασυνδυασμένου φορέα SAH7::pGBKT7, 9, DNA ladder.

Οι αποικίες που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στην αντίδραση πολυμεράσης Colony PCR, επώστηκαν σε υγρό θρεπτικό LB παρουσία του αντιβιοτικού καναμικίνη, στους 37 °C για 16 h υπό συνεχόμενη ανακίνηση στις 180-200 rpm. Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από τα βακτηριακά κύτταρα *E. coli* OmniMax έγινε με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης και το αποτέλεσμα ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 0.8%, όπως προαναφέρθηκε. Το αναμενόμενο μέγεθος των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων ήταν 7780 bp για το pGBKT7::SAH7, 15.285 bp για το pCambia1301::pSAH7, 14.327 για το pCambia1301::Frag2, 13.270 για το pCambia1301::F3 και 12.843 για το pCambia1301::F4.



Εικόνα 3.7: Ενδεικτική απομόνωση από κύτταρα *E. coli* Omnimax των πλασμιδίων pCambia1301::F3 και pCambia1301::F4.

Μετά τα θετικά αποτελέσματα της Colony PCR ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και κατά τον μετασχηματισμό του φορέα pJET1.2. Για την επιβεβαίωση της απομόνωσης του επιθυμητού πλασμιδίου από τα βακτηριακά κύτταρα *E. coli* OmniMax, πραγματοποιήθηκαν ξανά δοκιμαστικές πέψεις με περιοριστικά ένζυμα με παρόμοιο τρόπο (αρχικά με ένζυμα που κόβουν κοντά στα άκρα των ενθεμάτων και έπειτα μέσα στα ενθέματα) για κάθε ένα από τα εισαχθέντα τμήματα προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα ενός λανθασμένα θετικού αποτελέσματος. Τα ένζυμα επιλέχθηκαν ώστε να προκύπτει μοναδικό πρότυπο ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ανάλογα με το εκάστοτε γονίδιο. Μετά από ηλεκτροφόρηση και οπτικοποίηση των δειγμάτων, όσον αφορά τις δοκιμαστικές πέψεις που πραγματοποιήθηκαν με ένζυμα που οι θέσεις αναγνώρισής τους βρίσκονταν στα άκρα των ενθεμάτων, οι αναμενόμενες ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης θα αντιστοιχούσαν στο μέγεθος των ενθεμάτων αυτών.

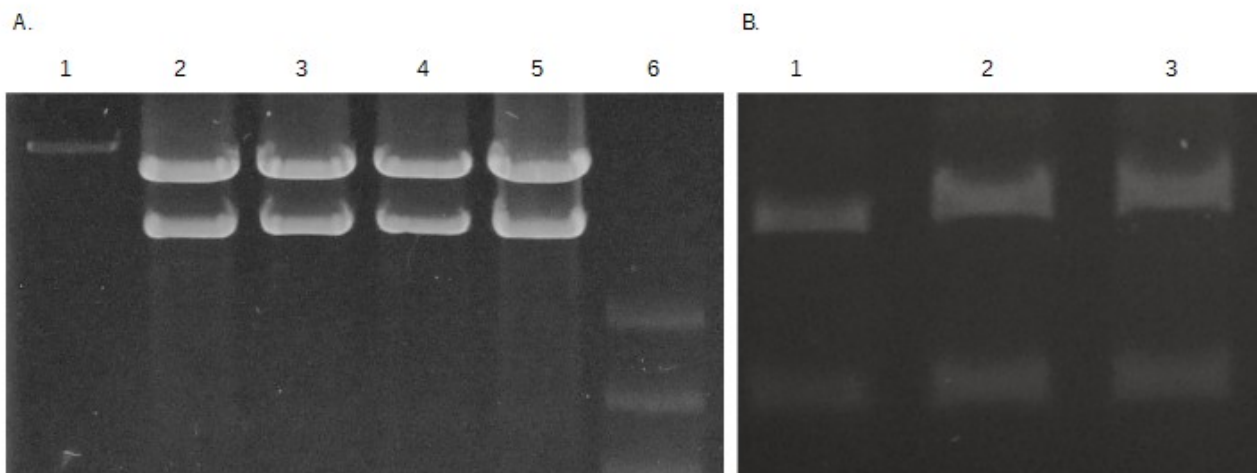
Επομένως, στην περίπτωση του πλασμιδίου pGBKT7::SAH7 η διπλή πέψη με τα ένζυμα EcoRI και BamHI-HF έδωσε μία ζώνη 480 bp (ζώνη του γονιδίου) και μία 7.300 bp (ζώνη του φορέα). Η πέψη με το ένζυμο EcoRV έδωσε

Στην περίπτωση του πλασμιδίου pCambia1301::pSAH7 η διπλή πέψη με τα ένζυμα Kpn I και Bgl II έδωσε μία ζώνη 3435 bp (ζώνη του υποκινητή) και μία 11.850 bp (ζώνη του φορέα).

Στην περίπτωση του πλασμιδίου pCambia1301::Fragment2 η διπλή πέψη με τα ένζυμα BamHI-HF και NcoI έδωσε μία ζώνη 14.327 bp (ζώνη του ενθέματος) και μία 11.850 bp (ζώνη του φορέα).

Στην περίπτωση του πλασμιδίου pCambia1301::Fragment3 η διπλή πέψη με τα ένζυμα BamHI-HF και NcoI έδωσε μία ζώνη 13.270 bp (ζώνη ενθέματος) και μία 11.850 bp (ζώνη του φορέα).

Στην περίπτωση του πλασμιδίου pCambia1301::Fragment4 η διπλή πέψη με τα ένζυμα BamHI-HF και NcoI έδωσε μία ζώνη 12.843 bp (ζώνη ενθέματος) και μία 11.850 bp (ζώνη του φορέα).



Εικόνα 3.8: A. 1, Δείγμα μάρτυρας με άκοπο πλασμίδιο pGBKT7 (7300 bp), 2-5, Πέψη του πλασμιδίου pGBKT7::SAH7 (αποικίες 1,3,6,8) με EcoRV (5000 bp, 2750 bp), 6, DNA ladder. B. 1-3, Πέψη του πλασμιδίου pCambia1301::pSAH7 με PacI (1205 bp, 500 bp), 4, DNA ladder.

Μετά την ολοκλήρωση των δοκιμαστικών πέψεων με ένζυμο που αναγνώριζαν θέσεις κοπής κοντά στα άκρα τους, ακολούθησαν πέψεις με ένζυμο που αναγνώριζαν θέσεις κοπής εσωτερικά των ενθεμάτων, έτσι ώστε να προκύψει και πάλι μοναδικό πρότυπο ζωνών ανάλογα με το ένθεμα.

Επομένως, στην περίπτωση του πλασμιδίου pGBKT7::SAH7 η δοκιμαστική πέψη με το ένζυμο EcoRV έδωσε δύο ζώνες, μία 2750 bp και μία 5000 bp, ενώ παράλληλα ηλεκτροφορήθηκε και άκοπο πλασμίδιο pGBKT7 και έδωσε μια αναμενόμενη ζώνη 7300 bp.

Στην περίπτωση του πλασμιδίου pCambia1301::pSAH7 η δοκιμαστική πέψη με το ένζυμο PacI έδωσε, όπως είχε υπολογιστεί, δύο ζώνες, μία 1205 bp και μια 500 bp.

Στην περίπτωση του πλασμιδίου pCambia1301::Fragment2 η διπλή πέψη με το ένζυμο PacI έδωσε δύο ζώνες, μία 1000 bp και μία 500 bp.

Στην περίπτωση του πλασμιδίου pCambia1301::Fragment3 η διπλή πέψη με το ένζυμο PacI έδωσε μία ζώνη 504 bp.

Στην περίπτωση του πλασμιδίου pCambia1301::Fragment4 η διπλή πέψη με το ένζυμο PacI και NcoI έδωσε μία ζώνη 334 bp.

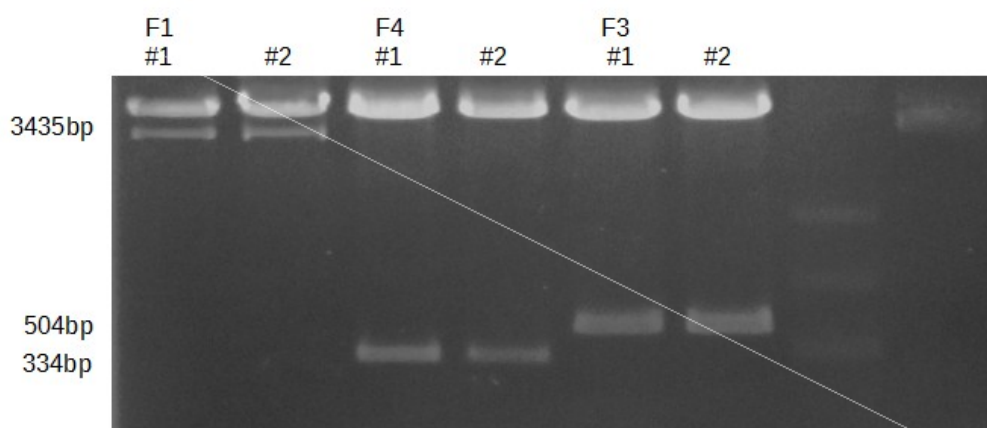
3.6 Μετασχηματισμός Αγροβακτηρίων (*Agrobacterium tumefaciens*) και Σταθερός Μετασχηματισμός φυτών (*Arabidopsis thaliana*)

Ακολούθησε η απομόνωση και ο καθαρισμός των μετασχηματισμένων πλασμιδίων από πήκτωμα αγαρόζης (Gel Extraction) βάσει του πρωτοκόλλου Nucleospin Gel and PCR clean-up, Macherey

Nagel (2012) για τον μετέπειτα μετασχηματισμό των αγροβακτηριακών στελεχών *Agrobacterium tumefaciens* (competent cells GV3101). Αφού ελέγχθηκε η επιτυχία της έκβασης όλων των κατασκευών μέσω Colony PCR αλλά και πέψεων με περιοριστικά ένζυμα ακολούθησε ο μετασχηματισμός των αγροβακτηριακών στελεχών. Μετά το πέρας του μετασχηματισμού των αγροβακτηρίων με την μέθοδο που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, πραγματοποιήθηκε εκ νέου μετασχηματισμός των πλασμιδίων που περιείχαν τα ενθέματα σε βακτήρια *E. coli* (Back Transformation) προκειμένου να επαληθευτεί η επιτυχία και η σωστή έκβαση του μετασχηματισμού τους. Μετά την επαλήθευση της διαδικασίας μέσω δοκιμαστικών πέψεων με την συνακόλουθη ηλεκτροφόρηση και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με EtBr και UV, πραγματοποιήθηκε ο σταθερός μετασχηματισμός των φυτών *Arabidopsis thaliana*.

Όσον αφορά τα την επαλήθευση της διαδικασίας του μετασχηματισμού των αγροβακτηρίων, οι πέψεις που έλαβαν χώρα πραγματοποιήθηκαν με ένζυμα από τα οποία να προκύπτει μοναδικό πρότυπο ζωνών για κάθε ένθεμα.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά ολόκληρο το τμήμα του υποκινητή, χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα BglII, KpnI, οι θέσεις αναγνώρισης των οποίων βρίσκονταν στα άκρα του ενθέματος δίνοντας μια ζώνη 3435 bp που αντιστοιχεί στο μέγεθος του υποκινητή. Για τα επιμέρους κομμάτια του ακολούθησαν οι ίδιες πέψεις με τις οποίες είχε επιβεβαιωθεί εξ αρχής η ένθεσή τους στα ανασυνδυασμένα κύτταρα *E. coli* με τον φορέα pCambia1301. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του πλασμιδίου pCambia1301::Fragment2 η δοκιμαστική πέψη με το ένζυμο PacI έδωσε δύο ζώνες, μία 1000 bp και μία 500 bp, στην περίπτωση του πλασμιδίου pCambia1301::Fragment3 η δοκιμαστική πέψη με το ένζυμο PacI έδωσε μία ζώνη 504 bp και τέλος για το πλασμίδιο pCambia1301::Fragment4 η διπλή πέψη με τα ένζυμα PacI και NcoI έδωσε μία ζώνη 334 bp.



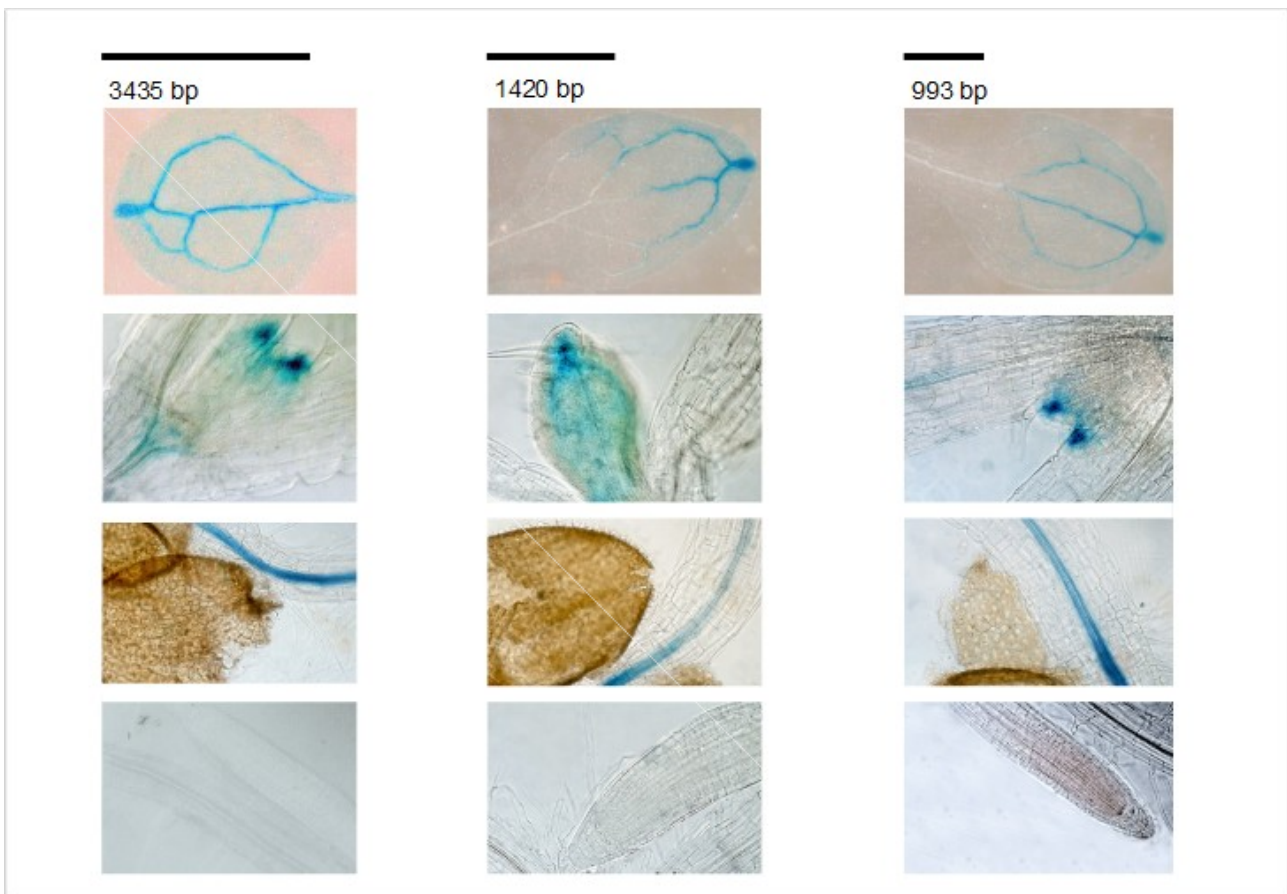
Εικόνα 3.9: 1-2, Πέψη pCambia1301::pSAH7 με BglII, KpnI (3435 bp), 3-4 πέψη pCambia1301::Fragment4 με PacI, NcoI (334 bp) , 5-6, πέψη του πλασμιδίου

pCambia1301::Fragment3 με PacI (504 bp), 7, DNA ladder, 8, δείγμα μάρτυρας με άκοπο πλασμίδιο pCambia1301.

Ο μετασχηματισμός έγινε με την εμφάνιση ανώριμων ανθικών στελεχών, ανά ομάδες των δώδεκα φυτών για κάθε ένθεμα, σε καλλιέργεια αγροβακτηρίων που έφερε την αντίστοιχη υπό μελέτη “κατασκευή”. Ακολούθησε η συγκομιδή των σπερμάτων, μετά την αποξήρανση των φυτών, και η αποθήκευσή τους σε μικρά δοχεία συλλογής ξεχωριστά για την κάθε κατασκευή. Πραγματοποιήθηκε εκ νέου φύτεμα σε χώμα των σπόρων των μετασχηματισμένων φυτών με σκοπό την συλλογή σπερμάτων από φυτά δεύτερης γενιάς. Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιούνται σπέρματα φυτών δεύτερης γενιάς για να μην παρουσιαστεί αλλοιωμένο πρότυπο έκφρασης που μπορεί να οφείλεται στην παρουσία των αντιβιοτικών του διαλύματος εμφάνισης που χρησιμοποιήθηκε κατά την μόλυνση των φυτών της πρώτης γενιάς. Αυτή την φορά ακόμα και τα σπέρματα των φυτών εκείνων που είχαν μετασχηματιστεί με το ίδιο ένθεμα συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε ξεχωριστά δοχεία συλλογής, δημιουργώντας έτσι για το καθένα ξεχωριστές σειρές φυτών (lines). Ακολούθησε η άρση ληθάργου των σπερμάτων με την παραμονή τους σε dH₂O στους 4°C για δύο μέρες και η καλλιέργεια τους σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS (Murashige & Skooge, 1962), ώστε να μελετηθούν στην συνέχεια με χρώση GUS, μετά από τον καθαρισμό τους με αιθανόλη, γλωρίνη και αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό, κάτω από ασηπτικές συνθήκες.

3.7 Αποτελέσματα πρωτοκόλλου χρώσης GUS

Μετά από περίπου μία εβδομάδα τα νεαρά φυτά απομονώθηκαν από το θρεπτικό ώστε να ακολουθήσει το πρωτόκολλο χρώσης με GUS. Μετά από επώαση μιας ημέρας τα νεαρά φυτά ήταν σε θέση να μελετηθούν σε στερεοσκόπιο και οπτικό μικροσκόπιο. Το πρότυπο χρώσης ήταν όμοιο για τις τρεις από τις τέσσερις κατασκευές, δηλαδή για τα φυτά που μετασχηματίστηκαν με το κομμάτι ολόκληρου του υποκινητή, καθώς και για τα δύο μικρότερα επιμέρους τμήματά του (Fragment 3, Fragment 4), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία χρώση των φυτών τα οποία είχαν μετασχηματιστεί με το δεύτερο μεγαλύτερο τμήμα του υποκινητή (Fragment 2). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.10.



Εικόνα 3.10: Αποτελέσματα χρώσης GUS. Τόσο σε ολόκληρο τον υποκινητή όσο και στο μικρότερο κομμάτι στο οποίο μελετήθηκε η έκφρασή του, παρατηρήθηκε χρώση του αγωγού συστήματος και των υδατοδίων των κοτυληδόνων, των νεαρών φύλλων και του μεγαλύτερου μέρους του αγωγού συστήματος της ρίζας, η χρώση του οποίου σταματά αρκετά πριν το ακραίο μερίστωμά της.

Χρώση παρατηρήθηκε στο μεγαλύτερο μέρος του αγωγού ιστού των φυτών, από τα υδατόδια και το αγωγό σύστημα των κοτυληδόνων αλλά και των νεαρών φύλλων, μέχρι και το μεγαλύτερο μέρος της ρίζας, ενώ η χρώση του αγωγού συστήματος της ρίζας σταματούσε αρκετά πριν το ακραίο μερίστωμά της.

Ο αγωγός ιστός είναι ο ιστός που είναι υπεύθυνος για την κυκλοφορία και την μεταφορά του νερού και των θρεπτικών ουσιών κατά μήκος του φυτικού άξονα στα διάφορα όργανα. Υπάρχουν δύο τύποι αγωγού ιστού: το ξύλωμα (xylem), που μεταφέρει νερό και μεταλλικά άλατα με κυρίως ανοδική κίνηση από τις ρίζες προς τα φύλλα, και το φλοίομα (phloem), που μεταφέρει οργανικές ουσίες με καθοδική ή ανοδική κίνηση από τα φύλλα προς όλα τα μη φωτοσυνθετικά ή νεαρά μέρη του φυτού. Οι δύο αυτές ομάδες συνυπάρχουν στο βλαστό σε διακριτές ομάδες, τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, δημιουργώντας στα δικοτύλα φυτά έναν κεντρικό κύλινδρο, την στήλη (stele). Το μεσόφυλλο (mesophyll), το κύριο σώμα του φύλλου, διαπερνάται από μεγάλο αριθμό ηθμαγγειωδών δεσμίδων ή νεύρων, που αποτελούν συνέχεια των ηθμαγγειωδών δεσμίδων του

βλαστού. Κάθε τέτοια δεσμίδα αποτελείται από ξύλωμα και φλοιώμα. Το ξύλωμα της δεσμίδας είναι στραμμένο προς την πάνω επιδερμίδα του φύλλου ενώ το φλοιώμα προς τα κάτω.

Όσον αφορά το ξύλωμα, η κύρια λειτουργία του, όπως αναφέρθηκε, είναι η μεταφορά νερού και ανόργανων αλάτων από τις ρίζες προς τα άλλα τμήματα του φυτού. Περιέχει επίσης κύτταρα που εξυπηρετούν αποταμιευτικές λειτουργίες και άλλα που έχουν στηρικτικό ρόλο. Το ξύλωμα εκτείνεται από τις ρίζες, στο βλαστό, στους μίσχους και στις νευρώσεις των φύλλων, μέσω ενός συστήματος μικροσκοπικών αγωγών όπου μεταφέρει ένα υδατικό διάλυμα μεταλλικών στοιχείων, τον χυμό του ξυλώματος (xylem sap).

Το φλοιώμα μεταφέρει τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης από τα ώριμα φύλλα, στα οποία γίνεται κυρίως η σύνθεση, και τα προϊόντα που είναι αποταμιευμένα στα αποταμιευτικά όργανα (κοτυληδόνας, ενδοσπέρμια, κόνδυλους κλπ.) προς τους βλαστικούς ιστούς, την ρίζα, το βλαστό, τα άνθη και τους καρπούς. Όπως το ξύλωμα είναι ο αγωγός ιστός που μεταφέρει νερό και μεταλλικά άλατα, το φλοιώμα είναι ο αγωγός ιστός που μεταφέρει τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης (υδατάνθρακες) μέσα σε υδατικό διάλυμα, που ονομάζεται χυμός του φλοιώματος (phloem sap). Ο χυμός του φλοιώματος, παρότι διαφέρει από είδος σε είδος, αποτελείται κυρίως από απλά σάκχαρα. Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τα διαλυμένα φωτοσυνθετικά προϊόντα βρίσκεται ο δισακχαρίτης σακχαρόζη ή παράγωγά της. Εκτός από τα σάκχαρα, ο χυμός περιέχει και άζωτο σε υψηλά επίπεδα υπό μορφή αμινοξέων και αμιδίων, κυρίως ως γλουταμινικό και ασπαραγινικό οξύ, και τα αντίστοιχα αμιδιά τους, γλουταμίνη και ασπαραγίνη. Τα επίπεδα των αμινοξέων και των οργανικών οξέων ποικίλλουν ακόμη και για το ίδιο είδος, αλλά συνήθως είναι χαμηλά, συγκρινόμενα με τους υδατάνθρακες. Ο χυμός περιέχει και φυτοορμόνες, συμπεριλαμβανομένων των αυξινών, γιββερελλινών, κυτοκινών και αβιζινικού οξέος. Έχουν βρεθεί επίσης φωσφορικά νουκλεοτίδια και πρωτεΐνες. Εκτός από τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης, διαμέσου του φλοιώματος ανακατανέμονται επίσης από τα ώριμα φύλλα στο υπόλοιπο φυτικό σώμα συστατικά τα οποία φτάνουν στα φύλλα δια μέσου του ξυλώματος. Ανόργανες διαλυμένες ουσίες που διακινούνται στο φλοιώμα συμπεριλαμβάνουν κάλιο, μαγνήσιο, φώσφορο και χλώριο. Αντίθετα, νιτρικά άλατα, ασβέστιο, θείο και σίδηρος αποκλείονται πλήρως από το φλοιώμα. (Ζίφα κ.α., 2008). Εκτός από μικρομοριακές ενώσεις (σάκχαρα, αμινοξέα κ.λπ.) και ιόντα, στον χυμό του φλοιώματος έχουν εντοπιστεί και μακρομοριακές ενώσεις, όπως πρωτεΐνες και RNA. Το RNA που έχει εντοπιστεί στο φλοιώμα είναι ή ενδογενές ή ιικό RNA. Στον ηθμόδη χυμό έχουν αναγνωριστεί διάφορες πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους, μεταξύ 20 και 60 kD. Ορισμένες από αυτές τις πρωτεΐνες είναι η β-αμυλάση, η γλουταρεδοξίνη, η ουβικιτίνη, η θειορεδοξίνη, καθώς και διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες, ενώ ο ρόλος των περισσοτέρων από αυτές δεν είναι γνωστός, το ίδιο και η σταθερότητά τους (Γαλάτης κ.α., 2009)

Χρώση παρατηρήθηκε και σε ένα είδος εσωτερικού εκκριτικού σχηματισμού των φυτών, τα υδατόδια. Η έκκριση είναι ένα βιολογικό φαινόμενο που έχει σχέση με την σύνθεση και την αποταμίευση ή την αποβολή διαφόρων υλικών. Χαρακτηρίζει το σύνολο σχεδόν των φυτικών κυττάρων συχνά όμως είναι αποτέλεσμα εξειδικευμένων μεταβολικών διαδικασιών που εξελίσσονται μέσα σε κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης τα εκκριτικά κύτταρα. Τα εκκριτικά κύτταρα μπορεί να υπάρχουν μεμονωμένα ή να σχηματίζουν ομάδες ή πολύπλοκες δομές. Απαντούν σε όλα τα φυτικά όργανα και σε όλους τους ιστούς (με εξαίρεση τον στηρικτικό) παράγοντας και διοχετεύοντας το έκκριμα στο περιβάλλον. Οι εκκριτικοί σχηματισμοί εξυπηρετούν φυσιολογικές ανάγκες του φυτού (π.χ. αποβάλλουν νερό ή διαλύματα αλάτων) και συμμετέχουν σε μηχανισμούς αλληλεπίδρασης του φυτού με το περιβάλλον και άλλους οργανισμούς, ενώ ανάλογα με την θέση τους στο φυτικό σώμα διακρίνονται σε εσωτερικούς και εξωτερικούς. Τα υδατόδια είναι πολυκύτταροι σχηματισμοί, που ανήκουν στην δεύτερη κατηγορία, οι οποίοι ξεκινούν από τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και καταλήγουν συνήθως στα φύλλα όπου, μέσω κάποιων στομάτων που έχουν χάσει την ικανότητά της κίνησής τους και παραμένουν μονίμως ανοικτά, αποβάλλουν νερό προς το περιβάλλον. Τα υδατόδια είναι κοινά σε τροπικά φυτά και στο προϊόν της έκκρισης τους μπορεί να περιέχονται μικρές ποσότητες σακχάρων, οργανικών οξέων, βιταμίνες κ.α..

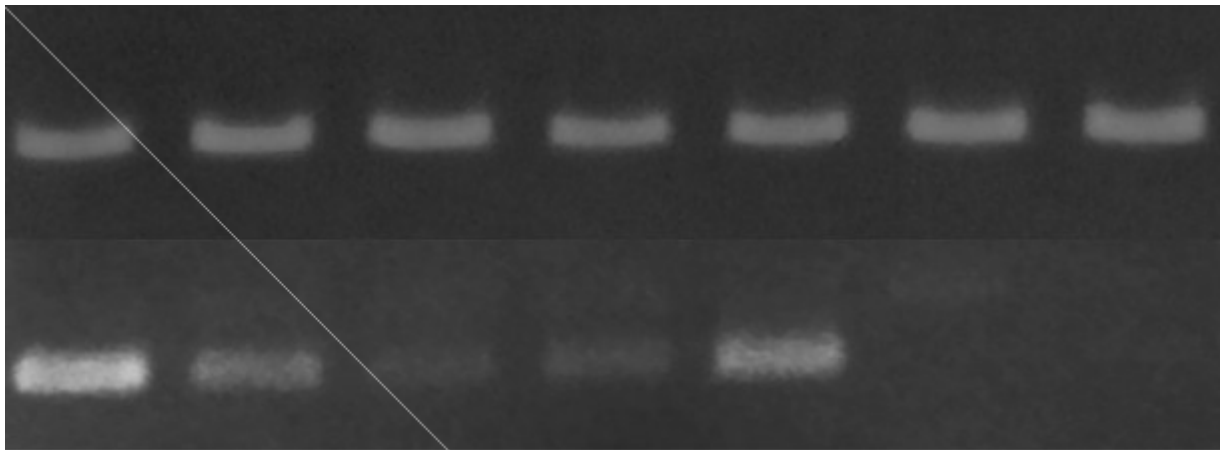
3.8 Αναπτυξιακό προφίλ γονιδίου SAH7

Παράλληλα με τους μετασχηματισμούς, μελετήθηκε το αναπτυξιακό προφίλ του γονιδίου SAH 7. Για τον σκοπό αυτό, απομονώθηκε RNA από τους πρότυπους φυτικούς οργανισμούς *Arabidopsis thaliana*. Πιο συγκεκριμένα απομονώθηκε RNA από αρτίβλαστα τριών και δέκα ημερών, RNA από ρίζα, κοτυληδόνας και βλαστό δέκα ημερών, και από φύλλα ροζέτας και άνθη από φυτά τεσσάρων έως πέντε εβδομάδων. Τα συγκεκριμένα φυτά φυτεύτηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες και αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB. Αφού απομονώθηκαν τα δείγματα (φυτικοί ιστοί), ήταν απαραίτητο να τοποθετηθούν κατευθείαν σε υγρό άζωτο, αφού σε θερμοκρασία δωματίου δρουν ένζυμα (Rnases) που διασπούν το RNA, όπου και παρέμειναν μέχρι το πέρας της διαδικασίας. Στην συνέχεια τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν και μετά από μια σειρά ρυθμιστικών διαλυμάτων και φυγοκεντρήσεων, προκειμένου να διαλυθούν τα κυτταρικά τοιχώματα και να διαχωριστεί και απομονωθεί το RNA από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος (DNA, πρωτεΐνες), ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της μεθόδου.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε RT-PCR, για τα επτά RNA δείγματα, χρησιμοποιώντας αντίστροφη μεταγραφή και ως εκκινητές ολιγοdTs (για να συνδεθούν με την πολυA ουρά των δειγμάτων), με σκοπό την μετατροπή τους στο αντίστοιχο μονόκλωνο συμπληρωματικό τους DNA (cDNA). Στην συνέχεια, ήταν απαραίτητο να γίνει ημι-ποσοτικοποίηση της έκφρασης των δειγμάτων, οπότε ακολούθησαν διαδοχικές PCR με την χρήση του 18S υποκινητή. Στις διαδοχικές PCR και

ηλεκτροφορήσεις που πραγματοποιήθηκαν, δοκιμάζονταν διάφορες ποσότητες δειγμάτων κάθε φορά, προκειμένου να επιτευχθεί μια όσο το δυνατόν ακριβέστερη ποσοτικοποίηση με την χρήση του υποκινητή ενός συστατικού γονιδίου, ώστε να αποφευχθούν αποκλίσεις στα επίπεδα έκφρασης που θα οφείλονται σε διαφορές στις συγκεντρώσεις του DNA των δειγμάτων λόγω της RT-PCR. Η σχετική αφθονία των mRNA των διαφόρων γονιδίων επηρεάζει τον σχετικό αριθμό αντιγράφων τους (cDNA). Επομένως ανάμεσα στα διάφορα δείγματα θα υπάρχουν κάποια που θα περιέχουν πολύ περισσότερα cDNA καθώς θα προέρχονται από ένα mRNA που έχει μεγάλη αφθονία, παρά από ένα σπάνιο mRNA που συναντάται στα κύτταρα σε πολύ μικρό αριθμό αντιγράφων. Θα υπάρχουν έτσι αναλογικά πολύ περισσότεροι κλώνοι του πρώτου παρά του δεύτερου. Έτσι απαιτείται κανονικοποίηση των δειγμάτων, ώστε να μειωθεί το ποσοστό των κλώνων που αντιστοιχούν σε mRNA υψηλής αφθονίας.

Αφού ολοκληρώθηκε η ποσοτικοποίηση ακολούθησε ακόμα μια PCR με την χρήση των εκκινητών του γονιδίου SAH7 και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για να μελετηθεί η έκφρασή του στους διάφορους ιστούς των φυτών.



Εικόνα 3.11: Α. Ποσοτικοποίηση RNA με την χρήση του εκκινητή 18s 1.RNA ρίζας, 2.RNA At (COL) τριών ημερών, 3. RNA At (COL) δέκα ημερών, 4. RNA κοτυληδόνας, 5. RNA φύλλων, 6. RNA άνθεων, 7. RNA φύλλων 4-5 εβδομάδων Β. Δείγματα PCR με την χρήση του εκκινητή του γονιδίου SAH 7, RNA: 1. ρίζας, 2. At (COL) τριών ημερών, 3. At (COL) δέκα ημερών, 4.κοτυληδόνας, 5. φύλλων, 6. άνθεων, 7. φύλλων 4-5 εβδομάδων.

3.9 Αποτελέσματα αναζητήσεων σε βάσεις δεδομένων

Παράλληλα, αναζητήσεις σε βάσεις δεδομένων (PlantCare) έδειξαν την ύπαρξη ορισμένων δομικών στοιχείων στον υποκινητή του γονιδίου υπεύθυνα για μια πληθώρα λειτουργιών όπως για παράδειγμα περιοχές πλούσιες σε AT υπεύθυνες για την δέσμευση πρωτεϊνών (AT-rich element), στοιχεία απόκρισης στο φως (I-box, G-box, 3-AF1 binding site, κ.α.), στοιχεία που εμπλέκονται

στην απόκριση σε άμυνα και στρες (TC-rich repeats), άλλα που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κirkαδικού ελέγχου (circadian), στοιχεία που εμπλέκονται στην απόκριση του αμψισικού οξέος (ABRE) του αιθυλενίου (ERE), της αυξίνης (TGA-element), καθώς και διάφορα άλλα όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Όνομα τύπου	Λειτουργία
AT-rich element	Σημείο πρόσδεσης πλούσιων σε AT πρωτεϊνών (ATBP-1)
ATGCAAAT motif	Cis-ενεργό στοιχείο ρύθμισης που σχετίζεται με το μοτίβο TGAGTCA
I-box	Μέρος στοιχείου απόκρισης στο φως
3-AF1 binding site	Στοιχείο απόκρισης στο φως
ACE	Cis-ενεργό στοιχείο απόκρισης στο φως
ATCT-motif	Μέρος ενός συντηρημένου DNA μορίου που εμπλέκεται στην απόκριση στο φως
Box 4	Μέρος ενός συντηρημένου DNA μορίου που εμπλέκεται στην απόκριση στο φως
Box 1	Στοιχείο απόκρισης στο φως
GT1-motif	Στοιχείο απόκρισης στο φως
MNF1	Στοιχείο απόκρισης στο φως
G-box	Cis-ενεργό στοιχείο ρύθμισης που εμπλέκεται στην απόκριση στο φως
TCT-motif	Μέρος στοιχείου απόκρισης στο φως
MRE	MYB σημείο πρόσδεσης εμπλεκόμενο στην απόκριση στο φως
MBSI	MYB σημείο πρόσδεσης εμπλεκόμενο στην ρύθμιση των γονιδίων βιοσύνθεσης φλαβονοειδών
TC-rich repeats	Cis-ενεργό στοιχείο που εμπλέκεται στην απόκριση σε άμυνα και στρες
HSE	Cis-ενεργό στοιχείο που εμπλέκεται στην απόκριση σε θερμικό στρες
Unnamed__6	Σημείο πρόσδεσης του παράγοντα SEF4
circadian	Cis-ενεργό στοιχείο που εμπλέκεται στην ρύθμιση του κirkαδικού ελέγχου
TGA-element	Αποκριτικό στοιχείο στην αυξίνη
TCA-element	Cis-ενεργό στοιχείο που εμπλέκεται στην απόκριση του σαλυκλικού οξέος
ABRE	Στοιχείο που εμπλέκεται στην απόκριση του αμψισικού οξέος
ERE	Αποκριτικό στοιχείο στο αιθυλένιο
Box III	Σημείο πρόσδεσης πρωτεϊνών
Unnamed__1	Σημείο πρόσδεσης 60K πρωτεϊνών
TGACG-motif	Cis-ενεργό ρυθμιστικό στοιχείο που εμπλέκεται στην απόκριση του μεθυλικού εστέρα του γιασμονικού οξέος (MeJA-responsiveness)

Skn-1_motif	Cis-ενεργό ρυθμιστικό στοιχείο απαραίτητο για την έκφραση του ενδοσπερμίου
O2-site	Cis-ενεργό ρυθμιστικό στοιχείο που εμπλέκεται στην ρύθμιση του μεταβολισμού της προλαμίνης του καλαμποκιού
TATA-box	Βασικό συστατικό του υποκινητή, περίπου 30 βάσεις πριν το σημείο έναρξης μεταγραφής
CAAT-box	Κοινό cis-ενεργό συστατικό σε περιοχές υποκινητών και ενισχυτών
CAT-box	Cis-ενεργό ρυθμιστικό στοιχείο συσχετιζόμενο με την ανάπτυξη του μεριστώματος
CGTCA-motif	Cis-ενεργό ρυθμιστικό στοιχείο που εμπλέκεται στην απόκριση του μεθυλικού εστέρα του γιασμονικού οξέος (MeJA-responsiveness)
HD-Zip 1	Στοιχείο που εμπλέκεται στην διαφοροποίηση των κυττάρων του τοιχώματος (palisade) του μεσόφυλλου
MBS	MYB σημείο πρόσδεσης επαγωγής στην ξηρασία

Πίνακας 3.1: Cis-ρυθμιστικά στοιχεία του pSAH7 όπως προέκυψαν από αναζήτηση στη βάση δεδομένων PlantCare.

3.10 Συμπεράσματα - Συζήτηση

Ένας πιθανός ρόλος του προϊόντος του γονιδιακού τόπου SAH7 μπορεί να είναι η συμμετοχή του στην μεταφορά προϊόντων μέσω του ξυλώματος και του φλοιώματος. Τα αποκριτικά στοιχεία του υποκινητή του για διάφορες φυτο-ορμόνες, όπως η αυξίνη, το αιθυλένιο και το αμπισισικό οξύ, καθώς και για βιομόρια με ορμονική δράση όπως το γιασμονικό και το σαλυκυλικό οξύ, μπορεί να υποδηλώνουν μια πιθανή αλληλεπίδραση με τα συγκεκριμένα μόρια. Συγκεκριμένα η αυξίνη μεταφέρεται μέσα στο φυτικό σώμα μέσω των παρεγχυματικών κυττάρων του αγωγού ιστού, ενώ το αμπισισικό οξύ έχει επίσης εντοπισθεί στα αγγεία του ξύλου και στον φλοιό καθώς και σε όλα τα φυτικά όργανα. Ενδεχομένως να παίζει κάποιο ρόλο στην μεταφορά ορμονών (αυξίνη, αμπισισικό οξύ) και πρωτεϊνών μέσω του φλοιώματος. Μπορεί επίσης να παίζει έμμεσα ρόλο σε φυτικές διεργασίες, όπως στην αύξηση και στην ανάπτυξη, αλλά και στην αντοχή σε διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις και στην αντοχή σε παθογόνα. Τον πιθανό του ρόλο στις συγκεκριμένες φυτικές καταπονήσεις, υποδεικνύουν τα δομικά cis στοιχεία που έχουν βρεθεί στον υποκινητή του, που εμπλέκονται σε αποκρίσεις άμυνας, θερμικής καταπόνησης και στρες του φυτού. Στοιχεία που δείχνουν τον πιθανό του ρόλο στις αναπτυξιακές διαδικασίες είναι η παρουσία cis-ενεργών ρυθμιστικών στοιχείων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του μεριστώματος, στην ρύθμιση της έκφρασης του ενδοσπερμίου καθώς και στην διαφοροποίηση των κυττάρων του μεσόφυλλου. Επιπλέον σημαντική είναι η ύπαρξη και διαφόρων τύπων υπεύθυνων για την πρόσδεση πρωτεϊνών.

Αξίζει να σημειωθεί η παρουσία πάρα πολλών cis-στοιχείων που εμπλέκονται στην απόκριση στο φως. Τέτοια μοτίβα απόκρισης περιέχονται και στις πρωτεΐνες SBP, επομένως είναι πιθανή μια αλληλεπίδραση των μορίων αυτών (πρωτεϊνικό προϊόν του SAH7 - πρωτεΐνες SBP) στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην απόκριση στο φως.

3.11 Μελλοντικοί στόχοι

Ένας πιθανός μελλοντικός στόχος για την καλύτερη κατανόηση της έκφρασης και του ρόλου, του πρωτεϊνικού προϊόντος του γονιδιακού τόπου SAH7, είναι η διεξαγωγή πειραμάτων στα οποία θα φαίνεται το αναπτυξιακό του πρότυπο και σε άλλους ιστούς και κατά την διάρκεια της άνθισης και της ανάπτυξης της γύρης, μιας και είναι γνωστή από βάσεις δεδομένων η ομοιότητά του με άλλα γνωστά αλλεργιογόνα, με κυριότερο αυτό του μείζονος αλλεργιογόνου της γύρης της ελιάς, Ole e 1. Ακόμα, στόχος αποτελεί η ανάλυση των πρωτεϊνών SBP – SAH7 με το σύστημα δύο υβριδίων στις ζύμες. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε η ένθεση του γονιδίου SAH7 στον φορέα κλωνοποίησης pGBKT7, που σε στελέχη ζυμομύκητων παρουσιάζει υψηλότερη αποδοτικότητα μετασχηματισμού σε σχέση με άλλους φορείς, έτσι ώστε να εξακριβωθεί η αλληλεπίδραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων, η οποία προς το παρόν έχει βρεθεί μόνο μετά από σάρωση βιβλιοθηκών, χωρίς να έχει πραγματοποιηθεί ο αντίστοιχος έλεγχος πειραματικά.

Κεφάλαιο 4: Βιβλιογραφία

4.1 Άρθρα σε επιστημονικά περιοδικά

Agalou, A., Roussis, A., and Spaink, H.P. 2005. The *Arabidopsis* selenium binding protein confers tolerance to toxic levels of selenium. *Funct. Plant Biol.* 32: 881-890.

Agalou, A., Spaink, H.P., and Roussis, A. 2006. Novel interaction of selenium-binding protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and fructose-bisphosphate aldolase of *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology* 33: 847-856.

Alché, J.D., Castro, A.J., Olmedilla, A., Fernández, M.C., Rodríguez, R., Villalba, M. and Rodríguez-García, M.I. (1999) *The major olive pollen allergen (Ole e I) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. J. Cell Sci.* 112: 2501–2509.

Alché, J.D., M. M'rani-Alaoui, A.J. Castro, M.I. Rodríguez-García, *Plan Cell Physiol.* 45 (2004) 1149–1157.

Alché, J.D, A.J. Castro, J.C. Jimenez-López, S. Morales, A. Zafra, A.M. Hamman- Khalifa, M.I. Rodríguez-García, *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 17 (2007) 69–75.

Baldo, B.A., R.C. Panzani, D. Bass, R. Zerboni, *Mol. Immunol.* 29 (1991) 1209–1218.

Batanero, E., Villalba, M., López-Otín, C. and Rodríguez, R. (1994a) *Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen. Sequence analysis of three cDNA encoding protein isoforms. Eur. J. Biochem.* 221: 187–193.

Batanero E, Gonzalez De La Pena MA, Villalba M, Monsalve RI, Martin-Esteban M, Rodriguez R. *Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen. Clin Exp Allergy* 1996;26:1401–1410.

Batanero E., M. Villalba, R.I. Monsalve, R. Rodríguez, *J. Allergy Clin. Immunol.* 97 (1996) 1264–1271.

Batanero, E., Villalba, M. and Rodríguez, R. (1994b) Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbohydrate moiety. *Mol. Immunol.* 31: 31–37.

Batanero E., J.F. Crespo, R.I. Monsalve, M. Martín-Esteba, M. Villalba, R. Rodríguez, *Allergy Clin. Immunol.* 103 (1999) 147–153.

Batanero E., P. Barral, M. Villalba, R. Rodríguez, *J. Immunol. Methods* 259 (2002) 87–94.

Batanero E., P. Barral, M. Villalba, R. Rodríguez, *J. Control. Rel.* 92 (2003) 395–398.

Barber D., J. Carpizo, M.C. García-Rumbao, F. Polo, F. Juan, *Ann. Allergy* 64 (1990) 43–46

Barber D., F. de la Torre, F. Feo, F. Florido, P. Guardia, C. Moreno, J. Quiralte, M. Lombardero, M. Villalba, G. Salcedo, R. Rodríguez, *Allergy* 63 (2008) 1550–1558.

Barderas R, Purohit A, Papanikolaou I, Rodriguez R, Pauli G, Villalba M. *Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. J Allergy Clin Immunol* 2005;115:351–357.

Barral, Patricia, Mayte Villalba, Rosalfa Rodriguez, και Eva Batanero. ‘The Role of Major Olive Pollen Allergens Ole E 1, Ole E 9, and Ole E 10 on Mice Sensitization’. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 96, (2006) 3: 466–71.

G. Bartolini, G. Prevost, C. Messeri, G. Carignani, *Olive Germplasm: Cultivars and World-Wide Collections*, FAO, Roma, 1998.

Behne, D., and Kyriakopoulos, A. 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 21: 453-473.

Bansal, M.P., Mukhopadhyay, T., Scott, J., Cook, R.G., Mukhopadhyay, R., and Medina, D. 1990. DNA sequencing of a mouse liver protein that binds selenium: implications for selenium’s mechanism of action in cancer prevention. *Carcinogenesis* 11: 2071-2073.

Baum, M. K., Campa, A, Miguez-Burbano, M.J., Burbano, X.,and Shor-Posner, G, *Role of selenium in HIV/AIDS*, 2001, p. 247–255. In D. L. Hatfield (ed.), *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Mass

Beck, M. A., Nelson, H. K., Shi, Q., Van Dael, P., Schiffrin, E. J., Blum, S., Barclay, D. & Levander, O. A., *Selenium deficiency increases the pathology of an influenza virus infection*. *FASEB J*, 2001, **15**: p. 1481–1483

Berry, T. 1994. A selenium transport protein model of a sub-type of schizophrenia. *Med Hypotheses* 43: 409-416.

Blanca, M., P. Boulton, J. Brostoff, I. González-Reguera, *Clin. Allergy* 13 (1983) 473–478

Boluda, L., E. Fernández-Caldas, J. Sastre, M. Casanovas, J. *Allergy Clin. Immunol.* 101 (1998), S169.

Boluda L., J. Sastre, M. Casanovas, E. Fernández-Caldas, J. *Immunol. Methods* 223 (1999) 17–26.

Bond, J.F., Garman, R.D., Keating, K.M., Briner, T.J., Rafnar, T., Kappler, D.G. and Rogers, B.L. (1991) Multiple Amb a I allergens demonstrate specific reactivity with IgE and T cells from ragweed-allergic patients. *J. Immunol.* 146: 3380–3385.

Bousquet, J., Guerin, B., Hewitt, B., Lim, S. and Michel, F.B. (1985) Allergy in the Mediterranean area. III: Cross-reactivity among Oleaceae pollens. *Clin. Allergy* 15: 439–448.

Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A *et al*. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 2008;63(Suppl 86):8–160.

Cárdaba B., V. Del Pozo, A. Jurado, S. Gallardo, I. Cortegano, I. Arrieta, A. Del Amo, P. Tramón, F. Florido, J. Sastre, P. Palomino, C. Lahoz, *Clin. Exp. Allergy* 28 (1998) 413–422.

Cárdaba B., E. Llanes, M. Chacártogui, B. Sastre, E. López, R. Mollá, V. del Pozo, F. Florido, J. Quiralte, P. Palomino, C. Lahoz, *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 17 (2007) 83–87

Casey, W., Anderson, S., Fox, T., Dold, K., Colton, H., and Morgan, K. 2002. Transcriptional and physiological responses of HepG2 cells exposed to diethyl maleate: time course analysis. *Physiological Genomics* 8: 115-122.

Castro A.J., J.D. Alché, J. Cuevas, P.J. Romero, V. Alché, M.I. Rodríguez-García, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 131 (2003) 164–173.

Castro A.J., J.D. Alché, B. Calabozo, M.I. Rodríguez-García, F. Polo, J. *Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 17 (2007) 93–99.

Chang, P.W., Tsui, S.K., Liew, C., Lee, C.C., Waye, M.M., and Fung, K.P. 1997. Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein. *J. Cell Biochem.* 64: 217-24.

Chen, G., Wang, H., Miller, C.T., Thomas, D.G., Gharib, T.G., Misek, D.E., Giordano, T.J., Orringer, M.B., Hanash, S.M., and Beer, D.G. 2004. Reduced selenium-binding protein 1 expression is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas. *J. Pathol.* 202: 321–329.

Clark, L.C., Combs, G.F.Jr., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Chalker, D.K., Chow, J., Davis, L.S., Glover, R.A., Graham, G.F., Gross, E.G., Krongrad, A., Lesher, J.L.Jr, Park, H.K., Sanders, B.B.Jr., Smith, C.L., and Taylor, J.R. 1996. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *Jama* 276: 1957-1963.

Combs, G.F., and Combs, S.B. 1984. The nutritional biochemistry of selenium. *Annual Review of Nutrition* 4: 257-280.

Coppinger, R. J., and Diamond, A.M., *Selenium deficiency and human disease*, 2001, p. 219–233. In D. L. Hatfield (ed.), *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Mass.

De Cesare, F., C. Pini, G. Di Felice, M.F. Caiaffa, L. Macchia, A. Tursi, R. Tinghino, S. Palumbo, F. Salluso, R. Federico, *Allergy* 48 (1993) 248–254.

de Dios Alché J¹, M'rani-Alaoui M, Castro AJ, Rodríguez-García MI. (2004) Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen, increases its expression and is released to the culture medium during in vitro germination. *Plant Cell Physiol.* 45(9):1149-57.

Dhyani A, Arora N, Gaur SN, Jain VK, Sridhara S, Singh BP. Analysis of IgE binding proteins of mesquite (*Prosopis juliflora*) pollen and cross-reactivity with predominant tree pollens. *Immunobiology* 2006;211:733–740.

DiDonato, M., Hsu, H.F., Narindrasorasak, S., Que, L., and Sarkar, B. 2000. Copper-induced conformational changes in the N-terminal domain of the Wilson disease copper-transporting ATPase. *Biochemistry* 39: 1890-1896.

Doolittle, R.F. 1992. Reconstruction history with amino acids sequences. *Protein Sci.* 1: 191-200.

Dutilleul, C., Jourdain, A., Bourguignon, J., and Hugouvieux, V. 2008. The Arabidopsis putative Selenium-Binding Protein family: Expression study and characterization of SBP1 as a potential new player in cadmium Detoxification processes. *Plant Physiol.* 147: 239-251.

Ellis, D.R., and Salt, D.E. 2003. Plants, selenium and human health. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 6: 273-227.

Emard, J.F., Thouez, J.P., and Gauvreau, D. 1995. Neurodegenerative diseases and risk factors: A literature review. *Soc. Sci. Med.* 40: 847-858.

Esteve C, Montealegre C, Marina ML, Garcia MC. Analysis of olive allergens. *Talanta* 2012;92:1–14.

Fajardo, I., Svensson, L., Bucht, A., and Pejler, G. 2004. Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170: 477-484.

Fang, W., Goldberg, M.L., Pohl, N.M., Bi, X., Tong, C., Xiong, B., Koh, T.J., Diamond, A.M., and Yang, W. 2010. Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein. *Carcinogenesis* 31: 1360-1366.

Fernández-Caldas E., J. Carnés, V. Iraola, M. Casanovas, *Ann, Allergy Asthma Immunol.* 89 (2007) 464–470.

Florido, J.F., Gonzalez-Delgado, P., Saenz de San Pedro, B., Quiralte, J., Arias de Saavedra, J.M., Peralta, V. and Ruiz Valenzuela, L. (1999) *High levels of Olea europaea pollen and relation with clinical findings. Int. Arch. Allergy Immunol.* 119: 133–137.

Flemetakis, E., Agalou, A., Kavroulakis, N., Dimou, M., Martsikovskaya, A., Slater, A., Spink, H.P., Roussis, A., and Katinakis, P. 2002. *Lotus japonicus* gene Ljsbp is highly conserved among plants and animals and encodes a homologue to the mammalian seleniumbinding proteins. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 15: 313-322.

Fu, L.H., Wang, X.F., Eyal, Y., She, Y.M., Donald, L.J., Standing, K.G., and Ben Hayyim, G. 2002. A selenoprotein in the plant kingdom. Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 277: 25983-25991.

Gallois P, Makishima T, Hecht V, Despres B, Laudie' M, Nishimotot T and Cooke R, *An Arabidopsis thaliana cDNA complementing a hamster apoptosis suppressor mutant.* *Plant J*, 1997, 11: p. 1325–1331.

Geller-Bernstein, C. , G. Arad, N. Keynan, C. Lahoz, B. Cardaba, Y. Waisel, *Allergy* 51 (1996) 356–359.

Gioulekas, D., Chatzigeorgiou, G., Likogiannis, S., Papakosta, D., Mpalafoutis, C. and Spieksma, F.Th.M. (1991) *Olea europaea* 3-year pollen record in the area of Thessaloniki (Greece) and its sensitizing significance. *Aerobiology* 7: 57–61.

Glatt, S.J., Everall, I.P., Kremen, W.S., Corbeil, J., Sasik, R., Khanlou, N., Han, M., Liew, C.C., and Tsuang, M.T. 2005. Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 upregulation in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 15533-15538.

Goldhaber, S.B. 2003. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 38: 232-242.

Gonzalez E, Villalba M, Rodriguez R. Immunological and molecular characterization of the major allergens from lilac and privet pollens overproduced in *Pichia pastoris*. *Clin Exp Allergy* 2001;31:313–321.

González E, M. Villalba, J. Quiralte, E. Batanero, F. Roncal, J.P. Albar, R. Rodríguez, *Mol. Immunol.* 43 (2006) 570–578.

Gracey, A.Y., Troll, J.V., and Somero, G.N. 2001. Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 1993-1998.

Griffith, I.J., Pollock, J., Klapper, D.G., Rogers, B.L. and Nault, A.K. (1991) Sequence polymorphism of Amb a and Amb a II, the major allergens in *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed). *Int. Arch. Allergy Immunol.* 96: 296–304.

Hamman-Khalifa A., A.J. Castro, J.C. Jiménez-López, M.I. Rodríguez-García, J.D. Alché, *BMC Plant Biol.* 8 (2008) 10–18.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.

Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F.R. 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology* 20: 63-113.

He, Q.Y., Cheung, Y.H., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Chu, K.M., and Chiu, J.F. 2004. Diverse proteomic alterations in gastric adenocarcinoma. *Proteomics* 4: 3276-3287.

Huang, C., Ding, G., Gu, C., Zhou, J., Kuang, M., Ji, Y., He, Y., Kondo, T., and Fan, J. 2012. Decreased selenium-binding protein 1 enhances glutathione peroxidase 1 activity and downregulates HIF-1alpha to promote hepatocellular carcinoma invasiveness. *Clin. Cancer Res.* 18: 3042-3053.

Huang, K.C., Park, D.C., Ng, S.K., Lee, J.Y., Ni, X., Ng, W.C., Bandera, C.A., Welch, W.R., Berkowitz, R.S., Mok, S.C., and Ng, S.W. 2006. Selenium binding protein 1 in ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 118: 2433-2440.

Huecas S., M. Villalba, E. González, A. Martínez-Ruiz, R. Rodríguez, *Eur. J. Biochem.* 261 (1999) 539–545.

Hugouvieux, Véronique, Christelle Dutilleul, Agnès Jourdain, Florie Reynaud, Véronique Lopez, και Jacques Bourguignon. ‘Arabidopsis Putative Selenium-Binding Protein1 Expression Is Tightly Linked to Cellular Sulfur Demand and Can Reduce Sensitivity to Stresses Requiring Glutathione for Tolerance’. *Plant Physiology* 151, 2009 (2): 768–81. doi:10.1104/pp.109.144808.

Ishida, T., Tasaki, K., Fukuda, A., Ishii, Y., and Oguri, K. 1998. Induction of a cytosolic 54 kDa protein in rat liver that is highly homologous to selenium-binding protein. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 6: 249-255.

Ishida, T., Fukuda, A., Yoshioka, Y., Maji, D., Ishii, K., and Oguri, K. 1999. An improved method for the purification and characterization of a 54 kDa protein in rat liver which has recently been identified as a selenium-binding protein. *Journal of Health Science* 45: 203-208.

Ishii, Y., Hatsumura, M., Ishida, T., Ariyoshi, N., and Oguri, K. 1996a. A coplanar PCB induces a selenium binding protein as a major cytosolic protein in rat liver. *Chemosphere* 32: 509-515.

Ishii, Y., Hatsumura, M., Ishida, T., Ariyoshi, N., and Oguri, K. 1996b. Significant induction of a 54-kDa protein in rat liver with homologous alignment to mouse selenium binding protein by a coplanar polychlorinated biphenyl, 3,4,5,3,4-pentachlorobiphenyl and 3-methylcholanthrene. *Toxicology Letters* 87: 1-9.

Jamba, L., Nehru, B., and Bansal, M.P. 1997. Redox modulation of selenium binding proteins by cadmium expose in mice. *Mol. Cell Biochem.* 177: 169-175.

Jeong, J.Y., Wang, Y., and Sytkowski, A.J. 2009. Human selenium binding protein-1 (hSP56) interacts with VDU1 in a selenium-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379: 583-588.

Johnson, P. and Marsh, D.G. (1965) “Isoallergens” from rye grass pollen. *Nature* 206: 935–937.

Kim, H., Kang, H.J., You, K.T., Kim, S.H., Lee, K.Y., Kim, T.I., Kim, C., Song, S.Y., Kim, H.J., Lee, C., and Kim, H. 2006. Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival. *Proteomics* 6: 3466-3476.

Kirmaz, C., H. Yuksel, P. Bayrak, Φ. Yilmaz, J. Investig, Allergol. Clin. Immunol. 15 (2005) 140–145.

Lacourciere, G.M., Levine, R.L., and Stadtman, T.C. 2002. Direct detection of potential selenium delivery proteins by using an *Escherichia coli* strain unable to incorporate selenium from selenite into proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 9150-9153.

Lafer, E.M. 2002. Clathrin-protein interactions. *Traffic* 3: 513-520.

Lauchli, A. 1993. Selenium in plants: uptake, functions, and environmental toxicity. *Bot. Acta.* 106: 455- 468.

Lauzurica, P., Gurbindo, C., Maruri, N., Galocha, B., Díaz, R., González, J., García, R. and Lahoz, C. (1988) Olive (*Olea europaea*) pollen allergens I. immunochemical characterization by immunoblotting, CRIE and immunodetection by a monoclonal antibody. *Mol. Immunol.* 25: 329–335.

Lauzurica, P., Maruri, N., Galocha, B., González, J., Díaz, R., Palomino, P., Hernández, D., García, R. and Lahoz, C. (1988) Olive (*Olea europaea*) pollen allergens II. Isolation and characterization of two major antigens. *Mol. Immunol.* 25: 337–344.

Lee, S.O., Nadiminty, N., Wu, X.X., Lou, W., Dong, Y., Ip, C., Onate, S.A., and Gai, A.C. 2005. Selenium disrupts estrogen signaling by altering estrogen receptor expression and ligand binding in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 65: 3487 3492.

Lehman, I.R. 1974. DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science* 186: 790-797.

Leung, K., Nielsen, I.M., and Criscenti, L.J. 2009. Elucidating the bimodal acid-base behavior of the watersilica interface from first principles. *J Am. Chem. Soc.* 131:18358-18365

Li, T., Yang, W., Li, M., Byun, D.S., Tong, C., Nasser, S., Zhuang, M., Arango, D., Mariadason, J.M., and Augenlicht, L.H. 2008. Expression of selenium-binding protein 1 characterizes intestinal cell maturation and predicts survival for patients with colorectal cancer. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 1289-1299.

Liccardi, G., M. D'Amato, G. D'Amato, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 111 (1996) 210–217.

Liu, Y.S., and Stadtman, C. T. 1997. Heparin-binding properties of selenium-containing thioredoxin reductase from HeLa cells and human lung adenocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:6138-6141.

Lombardero, M., S. Quirce, O. Duffort, D. Barber, J. Carpizo, M.J. Chamorro, A. Lezaun, J. Carreira, *J. Allergy Clin. Immunol.* 89 (1992) 884–894.

Lombardero, M., Barbas, J.A., Moscoso del Prado, J. and Carreira, J. (1994) cDNA sequence analysis of the main olive allergen, Ole e I. *Clin. Exp. Allergy* 24: 765–770.

Lu, Y., Zhang, A., Li, C., Zhang, P., Su, X., Li, Y., Mu, C., and Li, T. 2013. The link between selenium binding protein from *Sinonovacula constricta* and environmental pollutions exposure. *Fish Shellfish Immunol.* 35: 271-217.

Mandal J, Roy I, Gupta-Bhattacharya S. Clinical and immunobiochemical characterization of airborne *Peltophorum pterocarpum* (yellow gulmohar tree) pollen: a dominant avenue tree of India. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011;106:412–420.

Marazuela, E. G., R. Rodríguez, D. Barber, M. Villalba, και E. Batanero. (2007) 'Hypoallergenic Mutants of Ole E 1, the Major Olive Pollen Allergen, as Candidates for Allergy Vaccines'. *Clinical & Experimental Allergy* Feb;37(2):251-60.

Marazuela E. G., N. Prado, E. Moro, H. Fernández-García, M. Villalba, R. Rodríguez, E. Batanero, *Allergy* 38 (2008) 520–528.

Marsh, M., and McMahon, H.T. 1999. The structural era of endocytosis. *Science* 285: 215-220.

Martín-Orozco, E., Cárđaba, B., del Pozo, V., de Andrés, B., Villalba, M., Gallardo, S., Rodríguez-García, M.I., Fernández, M.C., Alché, J.D., Rodríguez, R., Palomino, P. and Lahoz, C. (1994) Ole e I: epitope mapping, cross-reactivity with other Oleaceae pollens and ultrastructural localization. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 104: 160–170.

Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Yamaya T, Takahashi H. 2005. Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* 42: 305–314.

Mascarenhas, J.P. (1975) The biochemistry of angiosperm pollen development. *Bot. Rev.* 41: 259 – 314.

Mayland HF. Selenium in plant and animal nutrition. In: Frankenberger Jr WT, Benson S, editors. *Selenium in the environment*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1994. p. 29–45.

McKenzie, R. C., Rafferty, T.S., Beckett, G.J., and Arthur, J.R., *Effects of selenium on immunity and aging*, 2001, p. 257–272. In D. L. Hatfield (ed.), *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Mass

Meyer, Y., Verdoucq, L., and Vignol, F. 1999. Plant thioredoxins and gluredoxins: Identity and its putative roles. *Trends Plant Sci.* 4: 388-394.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

Muschietti, J., Dircks, L., Vancanney, G. and McCormick, Sh. (1994) LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *Plant J.* 6: 321–338.

Napoli A., D. Aiello, L. Di Donna, A. Sajjad, E. Perri, G. Sindona, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3434–3443

Neuzil, J., Danielson, H., Welch, G. R. & Ovadi, J., *Cooperative effect of fructose bisphosphate and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on aldolase action*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1037: p. 307–312

Novoselov, S.V., Rao, M., Onoshko, N.V., Zhi, H., Kryukov, G.V., Xiang, Y., Weeks, D.P., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. 2002. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO Journal* 21: 3681-3693.

Obispo, R.M., Melero, J.A., Carpizo, J.A., Carreira, J. and Lombardero, M. (1993) *The main allergen of Olea europaea (Ole e I) is also present in other species of the Oleaceae family*. *Clin. Exp. Allergy* 23: 311–316.

Pajarón, M.J., L. Vila, I. Prieto, A. Resano, M.L. Sanz, A.K. Oehling, *Allergy* 52 (1997) 829–835.

Palomares, O., I. Swodoba, M. Villalba, N. Balic, S. Spitzauer, R. Rodríguez, R. Valenta, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 141 (2006) 110–118.

Panja, S., Saha, S., Jana, B., and Basu, T. 2006. Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *J Biotechnol.* 127: 14-20.

Papp, L.V., Lu, J., Holmgren, A., and Khanna, K.K. 2007. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid. Redox Signal* 9: 775-806.

Pass, H.I., *et al.*, *Gene expression profiles predict survival and progression of pleural mesothelioma*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2004. 10(3): p. 849-59.

Pastorello E.A., C. Ortolani, in: D.D. Metcalfe, H.A. Sampson, R.A. Simon (Eds.), *Adverse Reactions to Foods and Food Additives*, Blackwell Scientific, Oxford, 1997, pp. 221–233.

Patteson, K.G., Trivedi, N., and Stadtman, T.C. 2005. *Methanococcus vannielii* selenium-binding protein (SeBP): chemical reactivity of recombinant SeBP produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 12029-12034.

Pohl, N.M., Tong, C., Fang, W., Bi, X., Li, T., and Yang, W. 2009. Transcriptional regulation and biological functions of selenium-binding protein 1 in colorectal cancer in vitro and in nude mouse xenografts. *PLoS One* 4: e7774.

Ponnu, J., Wahl, V., and Schmid, M. 2011. Trehalose-6-Phosphate: Connecting plant metabolism and development front plant. *From Plant Sci.* 2: 70.

Porat, A., Sagiv, Y., and Elazar, Z. 2000. A 56-kDa Selenium-binding Protein participates in intra-Golgi protein transport. *J. Biol. Chem.* 275: 14457-14465.

Price, N.M., Thompson, P.A., Harrison, P.J., *Selenium: an essential element for growth of the coastal marine diatom Thalassiosira pseudonana (Bacillariophylaceae)*, *J Phycol*, 1987, **23**: p. 1-9.

Quiralte J., E. González, J.M. Arias de Saavedra, M. Villalba, J.F. Florido, B. Sáenz de San Pedro, R. Rodríguez, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122 (2000) 101–107.

Radice, P., Pensotti, V., Jones, C., Perry, H., Pierotti, M.A., and Tunnacliffe, A. 1995. The human arcain gene, ARC1, has highly conserved homologs in rice and Drosophila. *Genomics* 26: 101-106.

Rodriguez, C.M., Freire, M.A., Camillieri, C., and Robaglia, C. 1998. The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant J.* 13: 465-473.

Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., González, E.M., Monsalve, R.I., Huecas, S., Tejera, M.L. and Ledesma, A. (2002) *Allergenic diversity of the olive pollen. Allergy* 57 (Suppl. 71): 6–16.

Rodriguez R, Villalba M, Monsalve RI, Batanero E. *The spectrum of olive pollen allergens. Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:185–195.

Rossi, R., Montecucco, A., Ciarrocchi, G., and Biamonti, G. 1997. Functional characterization of the T4 DNA ligase: a new insight into the mechanism of action. *Nucleic Acids Research* 25: 2106-2113.

Russell, P.J. 2009. iGenetics. Μια μεντελική προσέγγιση, 1η ελ. εκδ. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.: Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα.

Sarry, J.E., Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A., Junot, C., Hugouvieux, V., Jourdain, A., Bastien, O., Fievet, J.B., Vailhen, D., Amekraz, B., Moulin, C., Ezan, E., Garin, J., and Bourguignon, J. 2006.

The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* 6: 2180-2198.

Sawada, K., Hasegawa, M., Tokuda, L., Kameyama, J., Kodama, O., Kohchi, T., Yoshida, K., and Shinmyo, A. 2004. Enhanced resistance to blast fungus and bacterial blight in transgenic rice constitutively expressing OsSBP, a rice homologue of mammalian selenium-binding proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 873-880.

Schild, F., Kieffer-Jaquinod, S., Palencia, A., Cobessi, D., Sarret, G., Zubieta, C., Jourdain, A., Dumas, R., Forge, V., Testemale, D., Bourguignon, J., and Hugouvieux, V. 2014. Biochemical and biophysical characterization of the selenium-binding and reducing site in *Arabidopsis thaliana* homologue to mammals selenium-binding protein 1. *J Biol. Chem.* 289:31765-31776.

Scortegagna, M., Martin, R.J., Kladney, R.D., Neumann, R.G., and Arbeit, J.M. 2009. Hypoxia-inducible factor-1 {alpha} suppresses squamous carcinogenic progression and epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 69: 2638-2646.

Self, W.T., Pierce, R., and Stadtman, T.C. 2004. Cloning and heterologous expression of a *Methanococcus vannielii* gene encoding a selenium-binding protein. *IUBMB Life* 56: 501-507.

Shrift, A., and Ulrich, J. 1969. Transport of selenate and selenite into *Astragalus* roots. *Plant Physiol.* 44: 893-896.

Solioz, M., and Bienz, D. 1990. Bacterial genetics by electric shock. *Trends Biochem. Sci.* 15: 175-177.

Song, L., Zou, H., Chang, Y., Xu, W., and Wu, L. 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of a potential selenium-binding protein gene in the scallop *Chlamys farreri*. *Dev. Comp. Immunol.* 30: 265-273.

Suzuki, M., Lee, D.Y., Inyamah, N., Stadtman, T.C., and Tjandra, N. 2008. Solution NMR Structure of Selenium-binding Protein from *Methanococcus vannielii*. *J. Biological Chemistry* 283: 25936-25943.

Swoboda, I., Jilek, A., Ferreira, F., Engel, E., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breiteneder, H., Pittenauer, E., Schmid, *et al.* (1995) Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 270: 2607–2613.

Tang, W., Ezcurra, I., Muschietti, J. and McCormick, S. (2002) A cysteine-rich extracellular protein, LAT52, interacts with the extracellular domain of the pollen receptor kinase LePRK2. *Plant Cell* 14: 2277–2287.

Tapiero, H., Townsend, D.M., and Tew, K.D. 2003. The antioxidant role of selenium and selenocompounds. *Biomed. Pharmacother* 57: 134-144.

Tejera, M.L., M. Villalba, E. Batanero, R. Rodrvquez, J. Allergy Clin. Immunol. 104 (1999) 797–802.

ter Haar, E., Musacchio, A., Harrison, S.C., and Kirchhausen, T. 1998. Atomic structure of clathrin: a β propeller terminal domain joins an α zigzag linker. *Cell* 95: 563-573.

Terry, N., Zayed, A.M., De Souza, M.P., and Tarun, A.S. 2000. Selenium in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 51: 401-432.

Urvoas, A., Amekraz, B., Moulin, C., Le Clainche, L., Stocklin, R., and Moutiez, M. 2003. Analysis of the metal-binding selectivity of the metallochaperone CopZ from *Enterococcus hirae* by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17: 1889-1896.

Vela, C., C. Platas, C. Gubrinde, L. Tricas, E. Subiza, R. Garcva, C. Lahoz, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 68 (1982) 289–294.

Villalba, M., C. López-Otín, E. Martín-Orozco, R.I. Monsalve, P. Palomino, C. Lahoz, R. Rodríguez, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172 (1990) 523–528

Villalba, M., Batanero, E., López-Otín, C., Sánchez, L.M., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A., Lahoz, C. and Rodríguez, R. (1993) *The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (Olea europaea) pollen.* *Eur. J. Biochem.* 216: 863–869.

Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A., Lahoz, C. and Rodríguez, R. (1994) *Cloning and Expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. J. Biol. Chem.* 269: 15217–15222.

Villalba M, Rodriguez R, Batanero E. The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment. *Methods* 2014;66:44–54.

Waisel Y., C. Geller-Bernstein, N. Keynan, G. Arad, *Allergy* 51 (1999) 819–825

Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., and Losick, R. 2011. Μοριακή βιολογία του γονιδίου, 1η ελ. εκδ. Utopia Εκδόσεις ΕΠΕ: Αθήνα, Ελλάδα.

Watson, J.D., Caudy, A.A., Myers, R.M., and Witkowski, J.A. 2007. Ανασυνδρασμένο DNA. Γονίδια και γονιδιώματα- Μία συνοπτική παρουσίαση, 1η ελ. εκδ. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.: Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα.

Wengier, D., Valsecchi, I., Cabanas, M.L., Tang, W.H., McCormick, S. and Muschiatti, J. (2003) The receptor kinases LePRK1 and LePRK2 associate in pollen and when expressed in yeast, but dissociate in the presence of style extract. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100: 6860–6865.

Wernimont, A.K., Huffman, D.L., Lamb, A.L., O’Halloran, T.V., and Rosenzweig, A.C. 2000. Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes /Wilson disease proteins. *Nature Structural Biology* 7: 766-771.

Wheeler, A.W., B.E. Hickman, B. Fox, *Mol. Immunol.* 27 (1990) 631–636.

Wheeler, A.W. (1992) *Hypersensitivity to the allergens of the pollen from the olive tree (Olea europaea). Clin. Exp. Allergy* 22: 1052–1057.

Wilber, C.G. 1980. Toxicology of selenium: a review. *Clinical Toxicology* 17: 171-230.

Yang, H., Nevo, E., and Tashian, R.E. 1998. Unexpected expression of carbonic anhydrase I and seleniumbinding protein as the only major nonheme proteins in erythrocytes of the subterranean mole rat (*Spalax ehrenbergi*). *FEBS Letters* 430: 343-347.

Yang, M., and Sytkowski, A.J. 1998. Differential expression and androgen regulation of the human selenium-binding protein gene hSP56 in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 58: 3150-3153.

Yang, W., and Diamond, A.M. 2013. Selenium-binding protein 1 as a tumor suppressor and a prognostic indicator of clinical outcome. *Biomark Res.* 1: 15.

Zeng, H., and Combs, G.F.Jr. 2008. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J. Nutr. Biochem Fish Shellfish Immunol.* 19: 1-7.

Zimmerman, M.B., and Kohrle, J. 2002. The impact of iron and selenium deficiencies on iodine and thyroid metabolism: biochemistry and relevance to public health. *Thyroid* 12: 867-878.

Esteve C, Montealegre C, Marina ML, García MC Analysis of olive allergens. *Talanta* [2012 Apr 15;92:1-14]

Dhyani A, Arora N, Gaur SN, Jain VK, Sridhara S, Singh BP. Analysis of IgE binding proteins of mesquite (Prosopis juliflora) pollen and cross-reactivity with predominant tree pollens. Immunobiology 2006;211:733–740.

4.2 Βιβλία

Γαλάτης Β., Γανωτάκης Δ., Γκαντή-Σπυροπούλου Κ., Καραμπουρνιώτης Γ., Κοτζαμπάσης Κ., Κωνσταντινίδου Ε.-Ι., Μανέτας Ι., Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Κ.Α., 2009. Φυσιολογία Φυτών από το μόριο στο περιβάλλον. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Ζίφα Α., Ζήσης Μ., Μούτου Κ., 2008. Βιολογία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας.

Καλαντίδης, Κ., Μηλιώνη, Δ., Παπαδοπούλου, Κ., Ρήγας, Σ., Ρούσσης, Α., Χαραλαμπίδης, Κ., και Χατζόπουλος, Π. 2009. Αναπτυξιακή μοριακή βιολογία φυτών. Έμβρυο: Αθήνα, Ελλάδα.

Κεφάλαιο 5: Παράρτημα

5.1 Θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας βακτηρίων και φυτών

5.1.1 Υγρό θρεπτικό διάλυμα LB (Lysogeny Broth, Bertani, 1951)

Για τη παρασκευή 100ml χρησιμοποιούνται:

NaCl	1g
Tryptone	1g
Yeast Extract	0,5g

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού LB απαιτείται η προσθήκη Agar Agar 1,4g

NaCl: Sodium Chloride, εταιρεία Duchefa, άλας για ανάπτυξη και μεταβολισμό

Tryptone: μίγμα, προσφέρει αμινοξέα και μικρά πεπτίδια για ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων *E.coli*

Yeast Extract: μίγμα, πηγή C, N, Sugar, ανόργανων και οργανικών στοιχείων

Το θρεπτικό χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών *E. coli* OmniMax και DH5a.

5.1.2 Υγρό θρεπτικό διάλυμα ½ MS

Για την παρασκευή ενός λίτρου (1L) χρειάζονται:

2,2 gr MS (4°C) (Murashige & Skoog medium-Duchefa)

0,5gr MES (Sigma)

20gr Sucrose Ultra Pure (MP Biomedicals)

1000μl Vitamins B5 (1000x) (Διάλυμα 1000x Vitamins B5: 1000 mg ινοσιτόλη, 100 mg θειαμίνη, 10 mg νικοτινικό, 10 mg πυροδοξίνη, dH₂O)

Η ρύθμιση του pH γίνεται με διάλυμα KOH (pH 5,7)

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού MS απαιτείται η προσθήκη 0.9% w/v Plant Agar (Duchefa) (0,8gr plant Agar σε 100ml)

Το θρεπτικό μέσο MS παρέχει τα απαραίτητα για την ανάπτυξη μακροστοιχεία, μικροστοιχεία, βιταμίνες και οργανικά οξέα. Οι βιταμίνες είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών και δρουν ως ενδιάμεσα ή καταλύτες του μεταβολισμού.

5.2 Διαλύματα

5.2.1 Διάλυμα παρείσφρησης για τον σταθερό μετασχηματισμό φυτών IM (1000ml)

2,2 gr MS Basal Salt

50 gr Sucrose
1 ml Vitamine B₅ (x1000)
1000 ml dH₂O
Ρύθμιση pH 5,7 με KOH
0,01 mg/L BAP 10mg/ml
200μl Silwet* L-77 για την ενίσχυση της διαβροχής και διασποράς του διαλύματος

5.2.2 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης και χρώσης πηκτώματος

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης SB (1x):
Για ένα λίτρο προστίθενται 950ml dH₂O και 50ml SB(20x).

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης SB (20x):
Για ένα λίτρο χρησιμοποιούνται 8g καυστικό νάτριο (NaOH) και 45g Boric Acid.

Διάλυμα αγαρόζης 0.8% : 0.8% w/v Agarose (Sigma), 1x SB.

Χρωστική Orange G 6x:

10Mm Tris-HCl Ph 7,6

60% Glycerol

60Mm EDTA

0,15% Orange G

ddH₂O

Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) (Sigma):

10mg/ml

ddH₂O

Φυλάσσεται σε σκοτεινό δοχείο.

5.2.3 Υλικά απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με KIT της εταιρείας Macherey Nagel (high-copy)

A1: χρησιμεύει για επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος, περιέχει RNase (για αυτό φυλάσσεται σε 4⁰C)

A2: χρησιμεύει για λύση κυτταρικού τοιχώματος

περιέχει SDS (απορρυπαντικό, λύση κυτταρικού τοιχώματος και πρωτεϊνών)

περιέχει NaOH (αποδιάταξη πρωτεϊνών και άνοιγμα αλυσίδων DNA

λόγω αύξησης της τιμής του pH)

σε συνδυασμό με A1 χρησιμεύουν σε άνοιγμα κυττάρου και DNA

A3: ελαττώνει την τιμή του pH

χρησιμεύει στην επανασύνδεση αλυσίδων (επειδή το πλασμιδιακό DNA είναι πιο μικρό, έχει περισσότερες πιθανότητες να επανασυνδεθεί

A4: χρησιμεύει για ξέπλυμα

περιέχει αιθανόλη που ξεπλένει απο άλατα και μεταβολίτες

AE: χρησιμεύει για έκλουση

αλκαλικό pH

5.2.4 Υλικά αλκαλικής λύσης πλασμιδιακού DNA, Miniprep

P1: TE Resuspension Buffer

25mM Tris HCl pH 8,0 (ρυθμιστικό, διατηρεί pH στο 8)

10mM EDTA (χηλικό μόριο, μεταφέρει δισθενή ανιόντα-κατιόντα,

προσδένεται σε δισθενή κατιόντα της εξωτερικής πλευράς της μεμβράνης για τη σταθεροποίηση της)

50 mM Glucose

P2: Lysis Buffer

1% SDS (απορρυπαντικό, λύση κυτταρικού τοιχώματος και πρωτεϊνών)

200mM NaOH

dH₂O

Αφού προστεθεί το P2, το pH γίνεται αλκαλικό(~12), έχουμε αποδιάταξη

DNA (χρωμοσωμικό και πλασμιδιακό)

P3: Neutralization KoAc Buffer

2,8M Potassium Acetate (KoAc)

προσαρμόζω το pH σε 5,1 με Glacial Acetic Acid

5.2.5 Αντιδραστήρια PCR

Ένζυμα: Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

Taq Invitrogen Polymerase 5u/μl

dNTPs: 10mM

Invitrogen

MgCl₂: 50mM

Invitrogen

Ρυθμιστικά Διαλύματα Πολυμεράσης:

Phusion HF Buffer 5X

Invitrogen PCR Buffer 10X: 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl

5.2.6 Διαλύματα αντίδρασης λιγάσης

Ένζυμα: T4 DNA Ligase 5u/μl

Ligase Takara 350u/μl

Ρυθμιστικά διαλύματα: T4 ligase Buffer Takara 10x

Reaction Buffer 2x (Thermo Scientific)

5.2.7 Αντιδραστήρια πέψεων περιοριστικών ενδονουκλεασών

Ένζυμα: Χρησιμοποιήθηκαν περιοριστικές ενδονουκλεάσες της εταιρείας New England Biolabs (NEB) : NdeI, EcoRV, BamHI HF (high fidelity), Hind III, KpnI, NcoI HF, BglII, EcoRI, PaeI

Ρυθμιστικά διαλύματα: Ανάλογα με το συνδυασμό των ενδονουκλεασών των επιμέρους ενζυμικών πέψεων επιλέγεται το κατάλληλο 10x ρυθμιστικό διάλυμα σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας NEB. Πιο συγκεκριμένα:

NEBuffer 1 (1x): 10 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.0 (25°C).

NEBuffer 2 (1x): 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.9 (25°C).

NEBuffer 3 (1x): 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.9 (25°C).

NEBuffer 4 (1x): 50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 1 mM DTT, pH 7.9 (25°C).

Διάλυμα BSA (Bovine serum albumin):100x με τελική συγκέντρωση 1x, της εταιρείας NEB. Προστέθηκε σε όσες αντιδράσεις το ένα από τα δύο ένζυμα το απαιτούσε, δεδομένου ότι δεν επηρεάζεται η δραστηρότητά τους.

5.2.8 Αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου GUS staining

GUS Staining Buffer 100ml

1mM Ferro: 1ml από stock 100mM Ferro (-20°C)

1mM Ferri: 1ml από stock 100mM Ferri (-20°C)

50mM NaPO₄: 50ml από stock 100mM NaPO₄ (4°C)

0,2% Triton-X: 2ml από stock 10% Triton-X (4°C)

46ml ddH₂O για X-Gluc Buffer/ dH₂O για rinse Buffer

Stock:

100mM NaPO₄ pH 7,2 200ml
28mM NaH₂PO₄: 28ml 0,2M NaH₂PO₄
72ml 0,2M Na₂HPO₄: 72ml 0,2M Na₂HPO₄
100ml ddH₂O

0,2M NaH₂PO₄: (FW 119,98) 4,8g σε 200ml
0,2M Na₂HPO₄: (FW 141,96) 5,68g σε 200ml
100mM Potassium Ferricyanidine: 329,4mg σε 10ml ddH₂O (FW 329,1)
100mM Potassium Ferrocyanidine: 422,4mg σε 10ml ddH₂O (FW 422,4)
10% Triton-X: 1ml Triton-X και 9ml ddH₂O

5.2.9 Διαλύματα πρωτοκόλλου απομόνωσης RNA από φυτικούς ιστούς

Cell lysis Solution1

Για την παρασκευή 50ml:

20%SDS: 5ml από 2%SDS

1M Sodium Citrate: 3,4ml από stock 68mM Sodium Citrate

1M Citric Acid: 6,6ml από 132mM Citric Acid

0,5M EDTA: 0,1ml από 1mM EDTA

Protein-DNA prep Solution2 (50ml)

5M NaCl : 40ml από 4M NaCl 5M

1M Sodium Citrate: 0,8ml από 16mM Sodium Citrate

1M Citric Acid: 1,6ml 32mM Citric Acid

5.3 Αντιβιοτικά

Αμπικιλίνη (Amp) 100mg/ml

Γενταμυκίνη (Gen) 30mg/ml

ΡΙφαμυκίνη (Rif) 50mg/ml

Καναμυκίνη (Kan) 40μg/ml

5.4 Χάρτες πλασμιδιακών φορέων

Από τους πιο αρχικούς και βασικούς φορείς κλωνοποίησης είναι τα πλασμίδια. Είναι αυτόνομα εξωχρωμοσωμικά στοιχεία προκαρυωτικής προέλευσης και κυκλικής διαμόρφωσης. Ο φορέας αυτός φέρει τρεις βασικές ιδιότητες: την αρχή αντιγραφής, ένα γονίδιο μάρτυρα για επιλογή

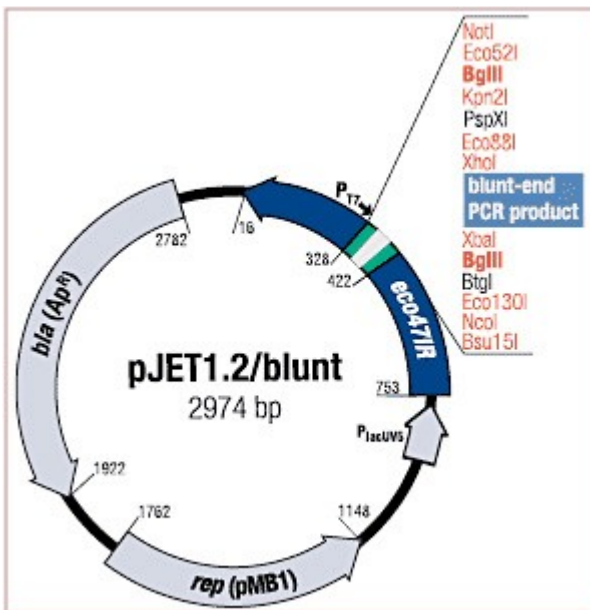
(συνήθως ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό) και ορισμένες θέσεις περιοριστικών ενζύμων που απαντώνται μόνο μια φορά. Το μέγεθος του DNA που μπορεί να κλωνοποιηθεί σε ένα πλασμίδιο κυμαίνεται από μερικές δεκάδες έως αρκετές χιλιάδες βάσεις. Παρ' όλα αυτά όμως η αποδοτικότητα του μετασχηματισμού είναι πολύ μεγαλύτερη για τα μικρά πλασμίδια, που έχουν πολύ μεγαλύτερη πιθανότητα να εισέλθουν και να μετασχηματίσουν ένα δεκτικό βακτήριο, απ' ό,τι τα μεγαλύτερα. Εάν υπάρχει κάποιος ετερογενής πληθυσμός ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (ως προς το μέγεθος της ενσωμάτωσης του DNA και όχι ως προς την προέλευση), τότε τα μικρά ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισέρχονται με μεγαλύτερη ευκολία, όπως φάνηκε και κατά την διάρκεια της πειραματικής εργασίας.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής πλασμιδιακοί φορείς:

5.4.1 Πλασμιδιακός φορέας pJET1.2/blunt (Thermo scientific)

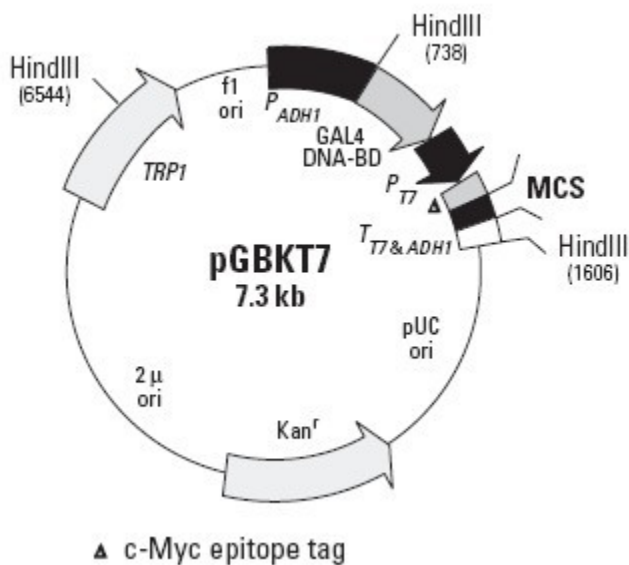
Ο πλασμιδιακός φορέας pJET1.2 έχει μέγεθος 2974 ζευγών βάσεων (base pairs, bp).

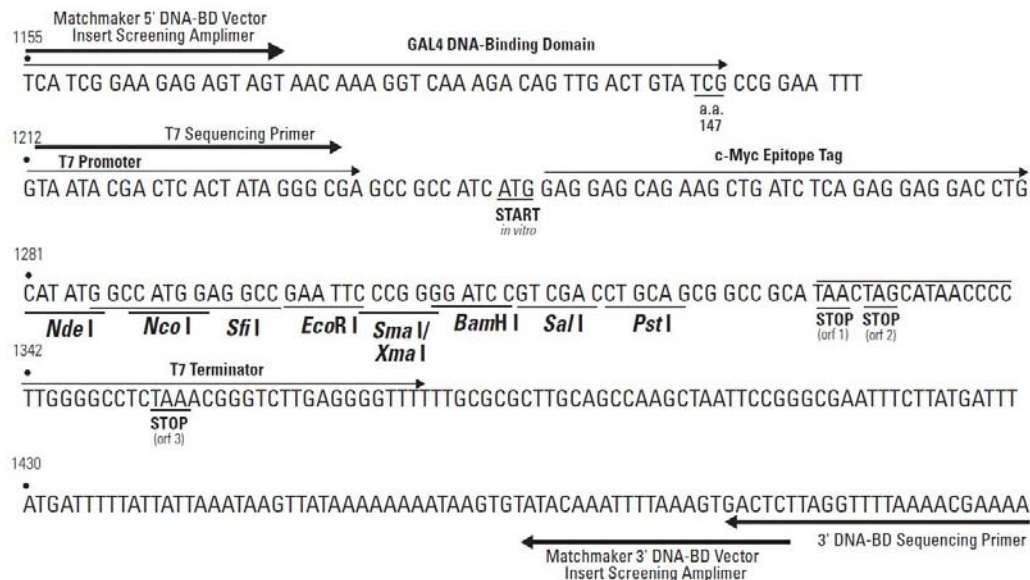
Το CloneJET PCR σετ κλωνοποίησης περιέχει έναν έτοιμο προς χρήση φορέα θετικής επιλογής με "τυφλά" άκρα τον pJET1.2/blunt. Ο φορέας αυτός περιέχει ένα θνησιγόνο γονίδιο ενός περιοριστικού ενζύμου, η ακολουθία του οποίου διακόπτεται με την ένθεση ενός τμήματος DNA στην θέση κλωνοποίησης, με αποτέλεσμα, μόνο τα βακτηριακά κύτταρα με ανασυνδυασμένα πλασμίδια να είναι ικανά να σχηματίσουν αποικίες. Επανακυκλοποιημένα μόρια φορέων, στους οποίους δεν έχει λάβει χώρα η ένθεση κάποιου τμήματος DNA, εκφράζουν ένα θανατηφόρο περιοριστικό ένζυμο που σκοτώνει τα κύτταρα ξενιστές (*E. Coli*) μετά από τον μετασχηματισμό τους. Αυτή η θετική επιλογή επιταχύνει δραστικά τη διαδικασία της διαλογής των αποικιών και εξαλείφει το πρόσθετο κόστος που απαιτείται για την επιλογή τους. Για να διευκολυνθεί η χαρτογράφηση και ο χειρισμός του ενθέματος, ο συγκεκριμένος φορέας κλωνοποίησης περιέχει δύο BglIII αλληλουχίες αναγνώρισης, οι οποίες βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης εισαγωγής. Επιπλέον, ο φορέας περιέχει έναν T7 υποκινητή για *in vitro* και *in vivo* μεταγραφή ή για την αλληλούχιση του ενθέματος.



5.4.2 Πλασμιδιακός φορέας pGBKT7

Ο φορέας pGBKT7 εκφράζει πρωτεΐνες συγχωνευμένες με τα αμινοξέα 1-147 της GAL4 περιοχής δέσμησης DNA (DNA-BD). Στην ζύμη, οι πρωτεΐνες σύντηξης εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα από τον συστατικό υποκινητή ADH1 (PADH1). Η μεταγραφή τερματίζεται με τα σήματα τερματισμού της μεταγραφής T7 και ADH1 (TT7 & ADH1). Ο φορέας pGBKT7 περιέχει επίσης τον υποκινητή T7, μία ετικέτα επιτόπου c-Myc και μια περιοχή MCS (Multiple Cloning Site). Ο pGBKT7 αντιγράφεται αυτόνομα σε *E. coli* και *S. cerevisiae* από τις θέσεις έναρξης pUC και 2 μ, αντίστοιχα. Ο φορέας φέρει τον δείκτη Kan^r για επιλογή σε *E. coli* και το θρεπτικό δείκτη TRP1 για την επιλογή σε ζύμη. Τα στελέχη ζυμομυκήτων που περιέχουν τον pGBKT7 παρουσιάζουν υψηλότερη αποδοτικότητα μετασχηματισμού από στελέχη που φέρουν άλλους φορείς. Χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου SAH7 για μετέπειτα μελέτες μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων σε ζύμες.





5.4.3 Πλασμιαδικός φορέας pCambia1301

Ο κεντρικός άξονας του φορέα pCambia προέρχεται από τους φορείς pPZP (κατασκευάστηκε από Hajdukiewicz, Svab & Maliga). Αν και έχουν κάποιους τεχνικούς περιορισμούς, οι pCambia φορείς προσφέρουν:

- υψηλό αριθμό αντιγράφων σε *E. coli* για υψηλές αποδόσεις DNA
- ρεπλικόνιο pVS1 για υψηλή σταθερότητα σε *Agrobacterium*
- μικρό μέγεθος, 7-12kb ανάλογα με το πλασμίδιο
- θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού για κλωνοποίηση
- βακτηριακή επιλογή με χλωραμφαινικόλη ή καναμυκίνη
- επιλογή των φυτών με υδρομυκίνη B ή καναμυκίνη
- απλά μέσα ώστε να κατασκευάσει κανείς μεταγραφικές συγχωνεύσεις σε γονίδια μάρτυρες *gusA*

Ο συγκεκριμένος φορέας χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου SAH7 καθώς και των επιμέρους τμημάτων του (Dels 1-3).

