



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ SHAGGY-LIKE ΚΙΝΑΣΗΣ
LSK1 ΣΤΙΣ ΡΙΖΕΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *LOTUS JAPONICUS* ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ
ΣΤΗ ΦΥΜΑΤΙΟΓΕΝΕΣΗ**

ΑΒΡΑΜΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑΝΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2017

OVEREXPRESSION OF SHAGGY-LIKE KINASE *LSK1* GENE IN *Lotus*.
japonicus ROOTS- EFFECT ON NODULATION

Τριμελής επιτροπή:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Καρπούζας Δημήτριος: Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries,
is not “Eureka” but “That’s funny” ...

Isaac Asimov

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετέχω στο εργαστήριο της. Ευχαριστώ για τον χρόνο και τις συμβουλές που μου δώσατε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον κ. Γκαραγκούνη Κώστα ο οποίος ήταν δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας. Ευχαριστώ για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές, για την αμέριστη βοήθεια και εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Ευχαριστώ πολύ και όλη την υπόλοιπη ομάδα του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την βοήθεια, την υπομονή και την ανοχή τους σε όλο το διάστημα παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, το πιο σημαντικό ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου για την υποστήριξη, την αγάπη και την βοήθεια τους όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Abstract	7
Περίληψη	8
1. Εισαγωγή	
1.1. Λειτουργίες και δομή των ζωικών <i>GSK3/SHAGGY-like kinase</i> (SK)	9
1.2. Ρόλος της GSK3	
1.2.1. Μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης	11
1.2.2. Μονοπάτι μεταγωγής σήματος Wnt/β-κατενίνης	12
1.2.3. Μονοπάτι μεταγωγής σήματος Hedgehog (Hh)	13
1.3. Λειτουργίες των SKs στα φυτά	13
1.3.1. Μονοπάτι μεταγωγής σήματος των μπρασσινοστεροειδών	14
1.3.2. Απόκριση στο αβιοτικό στρες	16
1.3.3. Οι κινάσες SHAGGY-LIKE (SKs) στο <i>Lotus japonicus</i>	17
1.4. Το φυτό μοντέλο <i>Lotus japonicus</i>	19
1.5. Φυματογένεση: φυσιολογία και μοριακά μονοπάτια	20
1.6. Τεχνολογία Gateway cloning	27
1.7. Μετασχηματισμός με το <i>Agrobacterium rhizogenes</i> και “Hairy Root” φαινότυπος	30
1.8. Στόχοι	31
2. Υλικά και μέθοδοι	32
2.1. Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση	32
2.2. Ενίσχυση του γονιδίου LSK1 για χρήση σε GATEWAY φορείς	32
2.3 Κατασκευή entry clone με το γονίδιο LSK1	33
2.4 Ανάπτυξη των αποικιών σε υγρές καλλιέργειες LB	33
2.5 Απομόνωση του entry clone και διαγνωστικές πέψης για επιβεβαίωση της επιτυχής σύνδεσης του γονιδίου LSK1 με τον φορέα pDONR 207	33

2.6 Δημιουργία φορέα υπερέκφρασης pUB-HYG μέσω της LR αντίδραση	34
2.7 Απομόνωση του φορέα υπερέκφρασης και διαγνωστικές πέψης για επιβεβαίωση της επιτυχής σύνδεσης του γονιδίου LSK1 με τον φορέα PUB-GW-HYG	35
2.8 Εισαγωγή του φορέα υπερέκφρασης, LSK1 STOP in pUB-HYG στο <i>Agrobacterium</i> για μετέπειτα μόλυνση των φυτών	35
2.9 Γενικό πρωτόκολλο μετασχηματισμού των φυτών <i>Lotus japonicus</i> μέσω του βακτηρίου <i>Agrobacterium rhizogenes</i> LBA1334	36
2.10 Συλλογή φυτών	38
2.11 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων	38
2.12 Ανίχνευση των μετασχηματισμένων ριζών	39
2.13 Σύνθεση cDNA	39
2.14 Ημιποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)	40
2.15 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	41
3. Αποτελέσματα	42
4. Συζήτηση	54
5. Βιβλιογραφία	58
6. Παράρτημα	62

ABSTRACT

GSK3 / SHAGGY-like kinases are serine / threonine protein kinases. Animal glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) has been studied for more than 20 years, whereas plant glycogen synthase kinase 3/ SHAGGY-like kinases (SKs) have only recently entered the scene. The best studied role of plant SKs to date is their involvement as negative regulators in the signal transduction pathway through brassinosteroid (BR). In *L. japonicus*, six GSKs have been found, called LSKs. Recent studies have shown that LSK1 plays a role in nodulation. This project examines the effect of overexpression of *LSK1* in nodulation of *L. japonicus*. In plants overexpressing *LSK1*, the number of nodules formed was reduced relative to control plants. The nodules showed the characteristic pink color of functional nodules, while plant shoots did not show altered phenotypic characteristics. The above results, combined with the previous results caused by silencing of *LSK1*, confirm the involvement of *LSK1* in *L. japonicus* nodulation, indicating that it participates in this process as a negative regulator. Obviously LSKs perform important roles as regulatory molecules, corresponding to roles that have been described for SKs of other plants. In addition, these findings highlight the need for further study of all members of the family in *L. japonicus*.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

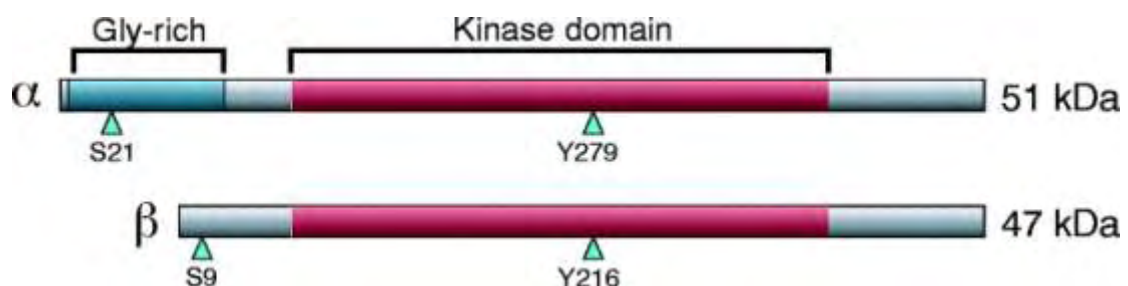
Οι GSK3/SHAGGY-like είναι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Η GSK3 των θηλαστικών είναι ένα από τα πιο μελετημένα μόρια καθώς μελετάται για πάνω από 20 χρόνια. Σε αντίθεση οι ομόλογες shaggy like-κινάσες (SKs) στα φυτά μελετούνται για το φυσιολογικό τους ρόλο σχετικά πρόσφατα. Ο πιο καλά μελετημένος ρόλος μέχρι σήμερα των φυτικών SKs είναι η συμμετοχή τους ως αρνητικοί ρυθμιστές στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω των μπρασσινοστεροειδών (brassinosteroid, BR). Στο φυτό μοντέλο *L. japonicus* έχουν βρεθεί 6 μέλη GSKs, τα οποία ονομάστηκαν LSKs. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η *LSK1* διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη διαδικασία της φυματιογένεσης. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, στη παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζεται η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου *LSK1* στη φυματιογένεση του φυτού *L. japonicus*. Στα φυτά με υπερέκφραση του γονιδίου *LSK1* παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός των φυματίων στη ρίζα τους σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Τα φυμάτια εμφάνισαν το χαρακτηριστικό ροζ χρώμα των λειτουργικών φυματίων ενώ το υπέργειο τμήμα των φυτών δεν παρουσίασε αλλοιωμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό και με προηγούμενα αποτελέσματα από τη σίγηση του γονιδίου *LSK1*, επιβεβαίωσαν την εμπλοκή της *LSK1* στη φυματιογένεση, δείχνοντας ότι συμμετέχει στην αρνητική ρύθμισή της. Προφανώς οι LSKs επιτελούν σημαντικούς ρόλους ως ρυθμιστικά μόρια, σε αντιστοιχία με ρόλους που έχουν περιγραφεί για SKs άλλων φυτών. Επιπλέον τα ευρήματα αυτά τονίζουν την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη όλων των μελών της οικογένειας στο *L. japonicus*.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1: ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΖΩΙΚΩΝ GSK3/SHAGGY-LIKE KINASE (SK)

Η πρωτεΐνη Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3)/SHAGGY, αρχικά χαρακτηρίστηκε στην οδό σηματοδότησης της ινσουλίνης ως η κινάση σερίνης/θρεονίνης υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση της συνθάσης του γλυκογόνου, του τελικού ενζύμου για τη σύνθεση του γλυκογόνου (Cohen *et al.*, 1982). Ωστόσο, η πρωτεϊνική κινάση δεν συμμετέχει μόνο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου αλλά σε ευρείες κυτταρικές διεργασίες. Ομόλογες της GSK3 έχουν βρεθεί σε όλους τους ευκαρυώτες (Jonak & Hirt, 2002). Η GSK3 των θηλαστικών είναι ένα από τα πιο μελετημένα μόρια καθώς μελετάτε για πάνω από 20 χρόνια, σε αντίθεση με την GSK3 των φυτών η οποία πρόσφατα εμφανίστηκε στο προσκήνιο.

Η GSK3 των θηλαστικών κωδικοποιείται από δύο γονίδια, GSK3α και GSK3β (Woodgett, 1990) τα οποία εκφράζονται σε όλους τους ιστούς (Εικόνα 1). Η GSK3β μπορεί να παράγει δύο διαφορετικές πρωτεΐνες, GSK3β1 και GSK3β2 μέσω διαφορετικού ματίσματος. Η GSK3α έχει βάρος 51kDa ενώ η GSK3β έχει 47kDa η διαφορά αυτή οφείλεται σε μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνη στο αμινο-τελικό άκρο της GSK3α. Η περιοχή κινάσης των GSK3α (51kDa, 483 α.α.) και GSK3β (47kDa, 433 α.α.) είναι πολύ συντηρημένη και παρουσιάζει 98% ομοιότητα, αλλά οι δύο ισομορφές αποκλίνουν στις αμινο- και καρβοξυτελικές περιοχές τους, οι οποίες είναι σημαντικές για την ρύθμιση της λειτουργίας τους (Kim, L. and Kimmel, A.R.,2006). Αποτελούνται από μια αμινοτελική επικράτεια και την επικράτεια με λειτουργία κινάσης (Dajani *et al.*, 2001). Η ισομορφή GSK3β εκφράζεται σε κάθε ιστό αν και το πρότυπο έκφρασης διαφέρει σε κάθε ιστό, ενώ η GSK3α εκφράζεται κυρίως σε νευρώνες.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των GSK-3α και GSK-3β θηλαστικών. Οι θέσεις φωσφορυλίωσης σερίνης και τυροσίνης υποδεικνύονται με μπλε βέλη. Το πλούσιο σε γλυκίνη

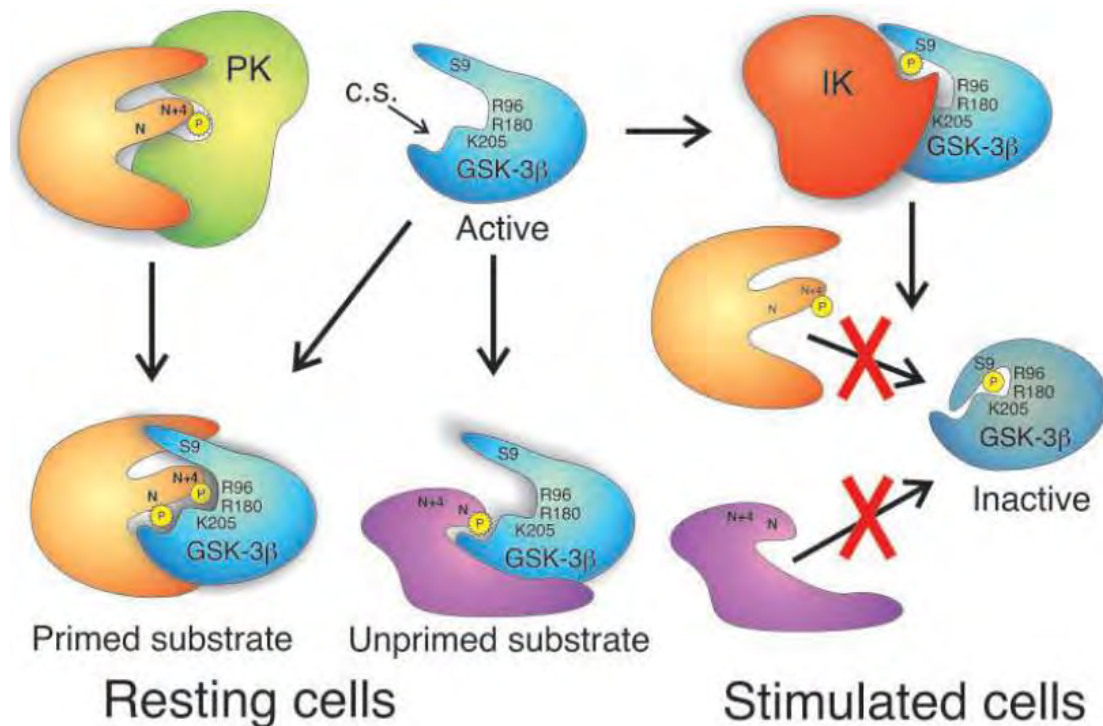
αμινο-τελικό άκρο μοναδικό για την GSK-3α και η συντηρημένη περιοχή κινάσης που μοιράζονται και οι δύο ισομορφές επισημαίνονται επίσης.

Η GSK-3 είναι ασυνήθιστη καθώς είναι κανονικά ενεργή στα κύτταρα και ρυθμίζεται κυρίως μέσω αναστολής της δραστηριότητάς της. Μια άλλη ιδιαιτερότητα της σε σύγκριση με άλλες πρωτεϊνικές κινάσες είναι η προτίμησή της για τα αρχικά υποστρώματα, δηλαδή «προτιμάει» υποστρώματα που προηγουμένως φωσφορυλιώθηκαν από άλλη κινάση (Doble, B.W. and Woodgett, J.R. ,2003).

Οι πρωτείνες-υποστρώματα των ζωικών GSK3s περιέχουν το μοτίβο Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ). Η φωσφορυλίωση συμβαίνει στο πρώτο κατάλοιπο του πεπτιδίου, μετά από φωσφορυλίωση του τέταρτου καταλοίπου Ser/Thr (priming position) από άλλη κινάση (primed substrate) (Thomas *et al.*, 1999). Το ήδη φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο προσδένεται σε μια θέση που δημιουργείται από τα συντηρημένα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα Arg96, Arg180, και Lys205 (στην ανθρώπινη GSK3β) (Dajani *et al.*, 2001). Επίσης η δράση της GSK3 ρυθμίζεται από την πρόσδεσή της σε πρωτείνες ικριώματα (scaffold proteins) αλλά και μέσω της διαφορετικής υποκυτταρικής εντόπισης των ισοενζύμων (Kaidanovich-Beilin & Woodgett, 2011) .

Η φωσφορυλίωση της GSK3 ρυθμίζεται μέσω δύο μηχανισμών: θετική ρύθμιση μέσω της φωσφορυλίωσης ενός καταλοίπου τυροσίνης στην περιοχή ενεργοποίησης (T-loop) και αρνητική ρύθμιση μέσω της αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης της σερίνης 9 και 21 των GSK3β και GSK3α αντίστοιχα.

Θετική ρύθμιση προκαλεί η φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου τυροσίνης (Tyr279 για την GSK3α /Tyr216 για την GSK3β, Hughesetal, 1993, Lochhead *et al.*, 2006) μέσα στην περιοχή ενεργοποίησης (T-loop). Η φωσφορυλιωμένη Tyr ενδέχεται να διευκολύνει τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος αλλά δεν απαιτείται αυστηρά για την δράση της ως κινάση (Dajani *et al.*, 2001). Αρνητική ρύθμιση προκαλούν εξωτερικά ερεθίσματα, όπως η ινσουλίνη μέσω της κινάσης Akt/PKB που προκαλούν ταχεία, αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της GSK3 στην Ser9 (GSK3α) και στην Ser21 (GSK3β) του αμινοτελικού της άκρου (Sutherland *et al.*, 1993). Η φωσφορυλίωση δημιουργεί ένα «ψευδοϋπόστρωμα» που καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του φωσφορικού στην ενεργή περιοχή της κινάσης και αποκλείει την πρόσδεση κανονικών υποστρωμάτων (Frame *et al.*, 2001)(εικόνα 2).



Εικόνα 2: Ρύθμιση της δραστηριότητας της GSK-3b μέσω φωσφορυλίωσης της σερίνης. Στο κύτταρο ηρεμίας, η GSK-3b είναι δραστήρια. Αμφότερα τα μη φωσφορυλιωμένα υποστρώματα και τα υποστρώματα που φωσφορυλιώνονται από μια κινάση εκκίνησης (PK) είναι ικανά να φωσφορυλιώνονται από την ενεργό GSK-3b. Το αρχικό φωσφο-κατάλοιπο στη θέση N + 4, δεσμεύει ένα θύλακα θετικού φορτίου που προκύπτει από τα κατάλοιπα αργινίνης (R) και λυσίνης (K) που υποδεικνύονται. Αυτό κατευθύνει μια σερίνη ή θρεονίνη στη θέση N στην ενεργό καταλυτική θέση (C.S.). Όταν η αδρανοποιητική κινάση (IK) όπως η PKB / Akt φωσφορυλιώνει την GSK-3b στη σερίνη 9 (S9), το φωσφορυλιωμένο N-άκρο γίνεται ένα αρχικό ψευδο-υπόστρωμα που καταλαμβάνει τον θετικό θύλακα πρόσδεσης και την ενεργό θέση του ενζύμου, για πραγματικά υποστρώματα. Αυτό αποτρέπει τη φωσφορυλίωση οποιονδήποτε υποστρωμάτων.

Όσον αφορά τις λειτουργίες της GSK3 στα ζώα, μέχρι σήμερα έχειδειχθεί ότι ρυθμίζει ποικίλες φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες όπως ο μεταβολισμός του γλυκογόνου, η ρύθμιση του κυτταροσκελετού, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου, η μεταβολική ομοιόσταση, η εμβρυακή ανάπτυξη, η νευρωνική διαφοροποίηση και η απόπτωση (Doble & Woodgett, 2003, Kim and Kimmel, 2006, Hur & Zhou, 2010).

1.2: ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ GSK3

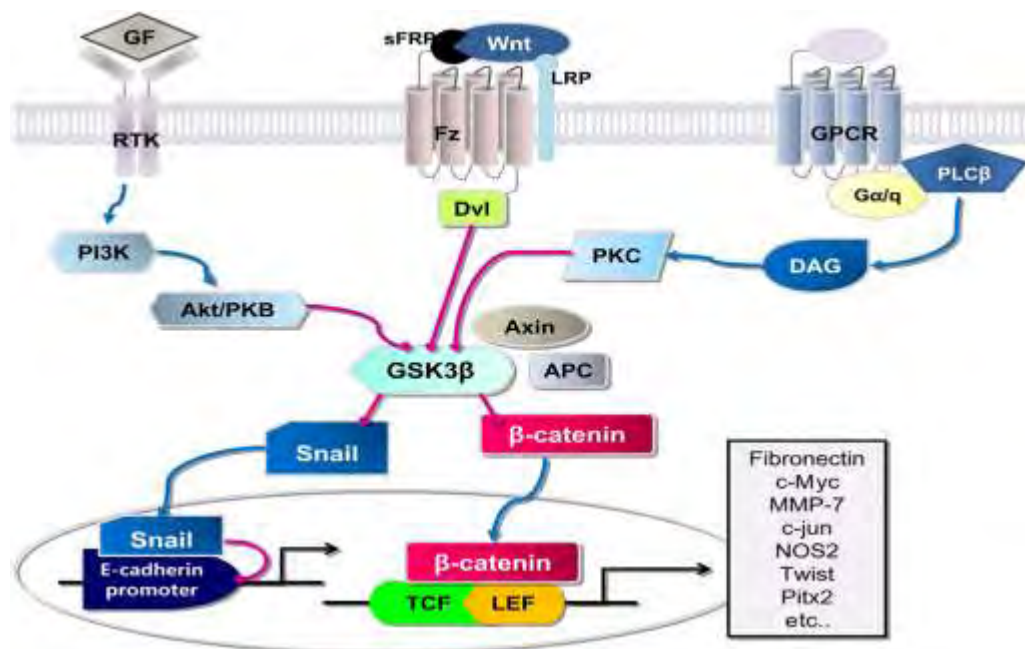
1.2.1: Μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η GSK χαρακτηρίστηκε αρχικά ως τμήμα της οδού σηματοδότησης της ινσουλίνης ως η κινάση σερίνης/θρεονίνης υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση της συνθάσης του γλυκογόνου, του τελικού ενζύμου για τη σύνθεση του γλυκογόνου. Η

ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΙΝΑΣΗ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΘΡΕΟΝΙΝΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΝΕΤΑΙ ΚΑΙ ΕΠΟΜΕΝΩΣ ΑΝΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΗ ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ. Η ΑΡΧΙΚΗ ΕΚΚΙΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΤΑΣΗΣ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΔΙΕΞΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ CKII (casein kinase II) ΣΤΗ Ser656 ΠΟΥ ΚΑΘΙΣΤΑ ΔΥΝΑΤΗ ΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΜΕ GSK3 ΣΕ ΜΙΑ ΣΕΙΡΑ ΘΕΣΕΩΝ. ΚΑΘΕ ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΈΧΕΙ ΠΡΟΣΘΕΤΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ.

1.2.2: Μονοπάτι μεταγωγής σήματος Wnt/β-κατενίνης

Οι πιο καλά μελετημένοι ρόλοι της αφορά στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος Wnt/β-κατενίνης. Συνοπτικά όταν δεν υπάρχει ενεργοποίηση του μονοπατιού μέσω της πρόσδεσης της πρωτεΐνης Wnt στον υποδοχέα της, η GSK3 βρίσκεται προσδεσμένη στην πρωτεΐνη axin συμμετέχοντας σε ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τις β-κατενίνη (b-cat), casein kinase I (CKI) και adenomatous polyposis coli protein (APC). Η CKI παρέχει την πρώτη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης, επιτρέποντας την ακόλουθή της φωσφορυλίωση από την GSK3, οδηγώντας την β-κατενίνη σε αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος. Όταν το κύτταρο διεγερθεί μέσω της πρόσδεσης της Wnt στους υποδοχείς της εμποδίζεται η δράση της GSK3 μέσω διάλυσης του συμπλόκου από τις πρωτεΐνες FRAT (frequently arranged in T cell lymphomas) και disheveled (dvl).



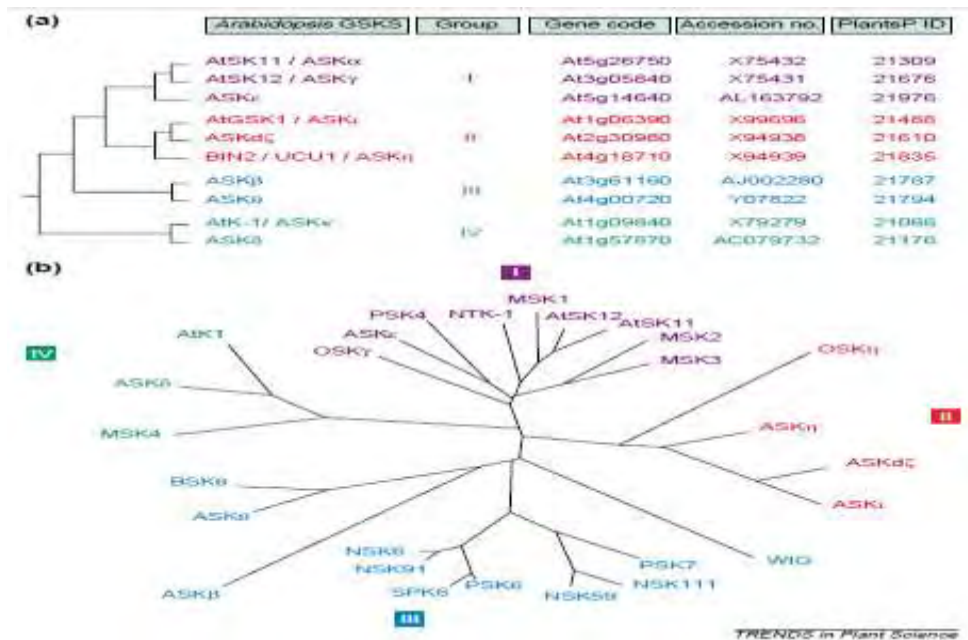
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού της Wnt/β-κατενίνης.

1.2.3: Μονοπάτι μεταγωγής σήματος Hedgehog (Hh)

Η οδός Hedgehog(Hh) ελέγχει τόσο την ανάπτυξη της *Drosophila*, όσο και την εξέλιξη των σπονδυλωτών. Ένα μόριο γνωστό ως Ci (*Cubitus interruptus*) είναι υπεύθυνο για την πρόληψη της ακατάλληλης ενεργοποίησης της οδού Hh. Όταν ο υποδοχέας Hedgehog receptor patched (Ptc) είναι ανενεργός ο μεταγραφικός παράγοντας cubitus interruptus (Ci) σχηματίζει σύμπλεγμα με τις costal2 (Cos) και fused (Fus), που βρίσκεται προσδεμένο στους μικροσωληνίσκους. Σε αυτό το σύμπλεγμα η Ci φωσφορυλιώνεται από τις protein kinase A (PKA), CKI και GSK3, οδηγώντας στην πρωτεόλυση του Ci στο μεταγραφικό καταστολέα Ci75.

1.3. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ SKS ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Σε αντίθεση με την GSK3β των θηλαστικών, για τις SKs στα φυτά γνωρίζουμε πολύ λίγα. Η μελέτη στα φυτά έχει ξεκινήσει πρόσφατα και οι πρώτες ενδείξεις δείχνουν ότι η SK εμπλέκεται σε διαφορετικές διεργασίες όπως η ανάπτυξη και ο σχηματισμός της ρίζας και του αγγειακού συστήματος, η ανάπτυξη των ανθέων και των στομάτων, και συμμετοχή στις αποκρίσεις του φυτού σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως το βιοτικό και αβιοτικό στρες (Yoon & Kim, 2015). Οι SKs των φυτών κωδικοποιούνται από μια οικογένεια πολυγονιδίων, στο *A. thaliana* έχουν βρεθεί 10 μέλη αυτής της οικογένειας (*AtSK s*) και στο ρύζι 9 (*OsSKs*) (Yoo *et al.*, 2006). Σε αντίθεση με τις εξαιρετικά διατηρημένες περιοχές κινάσης, οι N- και O-τελικές περιοχές των φυτικών GSK διαφέρουν σημαντικά, υποδηλώνοντας ότι οι διάφορες SK εμπλέκονται σε διαφορετικές βιολογικές διεργασίες. Στο *A. thaliana* η καρβοξυτελική περιοχή των *AtSKs* είναι συντηρημένη και παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα. Αντίθετα η αμινοτελική τους περιοχή συνήθως διαφέρει και επηρεάζει την υποκυτταρική τους τοποθέτηση (Kim *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2013). Με βάση την ομολογία της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, οι SKs των φυτών μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις κατηγορίες (I-IV) (Jonak & Hirt, 2002). Η προτεινόμενη ονοματολογία τους και η ομάδα στην οποία αντιστοιχεί το κάθε μέλος φαίνεται στην Εικόνα 4.

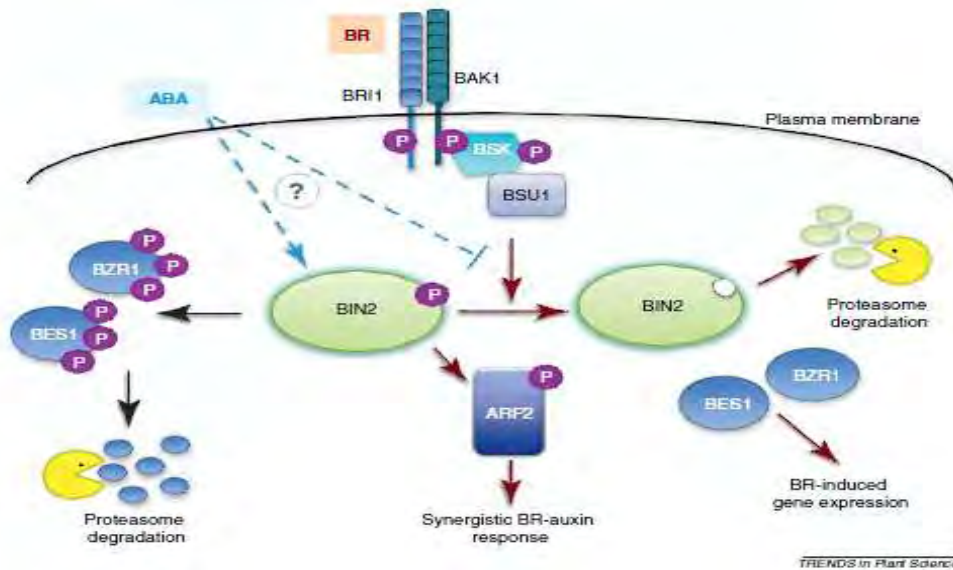


Εικόνα 4: Οι ομάδες (A) και το φυλογενετικό δέντρο (B) των SHAGGY-like κινασών που έχουν απομονωθεί από το *A. thaliana*. Η φυλογενετική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα ClustalX χρησιμοποιώντας τη μέθοδο neighbor-joining. Χρησιμοποιήθηκε ως εξω-ομάδα το Arabidopsis MPK1 (Q39021) και το δέντρο σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα TreeView program.

1.3.1. Μονοπάτι μεταγωγής σήματος των μπρασσινοστεροειδών (BR)

Η σηματοδότηση των στεροειδών ορμονών εντοπίζεται σε φυτά, ζώα μύκητες και επομένως μπορεί να προβλεφθεί ότι έχουν αρχαία εξελικτική προέλευση (Li, J. *et al.*, 1997). Η σηματοδότηση μπρασσινοστεροειδών (BR) ρυθμίζει μια σειρά φυσιολογικών αποκρίσεων σε φυτά ανθοφορίας, συμπεριλαμβανομένης της επέκτασης κυττάρων, πράσινου χρώματος, χρόνου άνθησης, γονιμότητας και διαφοροποίησης αγγειακού ιστού (Kim, T.W. and Wang, Z.Y., 2010, Clouse, S.D., 2011, Yang, C.J. *et al.*, 2011, Gudesblat, G.E. and Russinova, E., 2011). Στο *A. thaliana* τα BRs αναγνωρίζονται από τη μεμβανική κινάση υποδοχέα την BR-INSENSITIVE 1 (BR1). Σε αυτή τη μεταγωγή σήματος συμμετέχει η πρώτη φυτική SK που χαρακτηρίστηκε λειτουργικά, η BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2). Οι κυριότερες μεταλλάξεις στο BIN2 καταλήγουν σε φυτά νάνους, που δεν είναι ευαίσθητα στα μπρασσινοστεροειδή. Το ενεργό κέντρο κινάσης της BIN2 παρουσιάζει 70% ομοιότητα με τη ζωική GSK3 β (Li *et al.*, 2001, Li & Nam, 2002). Οι σημειακές μεταλλάξεις κέρδους στο BIN2 και η υπερέκφραση του BIN2 προκαλούν τον ίδιο φαινότυπο μη ευαισθησίας στα BR επιβεβαιώνοντας ότι το BIN2 δρα ως αναστολέας της σηματοδότησης των BR (Li, J. *et al.*, 2001, Perez-Perez, J.M. *et al.*, 2002). Απουσία ενός σήματος BR, το BIN2 είναι ενεργό και ρυθμίζει αρνητικά τους ειδικούς για το BR μεταγραφικούς παράγοντες που είναι το BRASSINAZOLE RESISTANT 1 (BZR1) και το bri1-EMS SUPPRESSOR 1

(BES1 / BZR2). Το BIN2 φωσφορυλιώνει το BZR1 / BES1 σε πολλά υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης, γεγονός που οδηγεί στην πρωτεασωματική αποικοδόμησή τους και την έξοδό τους από τον πυρήνα καταστέλλοντας έτσι την πρόσδεσή τους στο DNA (Ryu *et al.*, 2007, 2010) , κάτι που θυμίζει το ρόλο της GSK3 κατά τη διάρκεια της σηματοδότησης Wnt και Hedgehog (Logan, C.Y. and Nusse, R. ,2004. Ingham, P.W. *et al.* ,2011). Παρουσία BR, η δραστικότητα BIN2 προς την BES1 / BZR1 αναστέλλεται και, κατά συνέπεια, τα μη φωσφορυλιωμένα BZR1 και BES1 δεν αποικοδομούνται πλέον και μπορούν να κατευθύνουν τη μεταγραφή γονιδίων που αποκρίνονται σε BR. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο μεταδίδεται το σήμα BR από τη μεμβράνη του πλάσματος στο BIN2 έχει πρόσφατα διευκρινιστεί (Kim, T.W. and Wang, Z.Y. ,2010, Peng, P. *et al.* ,2008, Jaillais, Y. *et al.* ,2011). Η σύνδεση BR με BRI1 καθιστά δυνατή τη διαφωσφορυλίωση των BRI1 και BAK1 και την ενεργοποίηση του BRI1. Το BRI1 φωσφορυλιώνει τις κινάσες σηματοδότησης BR (BSKs) στην πλασματική μεμβράνη. Οι φωσφορυλιωμένες BSK δεσμεύουν και ενεργοποιούν τις BSU1 φωσφατάσες, οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν την τυροσίνη 200 (Y200) στην BIN2, απενεργοποιώντας τη δράση της κινάσης (Εικόνα 5). Το BIN2 φωσφορυλιώνει επίσης τον μεταγραφικό καταστολέα ARF2, έναν παράγοντα απόκρισης στην αυξίνη (auxin response factor, ARF) και οδηγεί σε μια συνεργατική απόκριση μεταξύ BR-αυξίνης. Το ABA αναστέλλει την σηματοδότηση BR και ενισχύει τη φωσφορυλιωμένη κατάσταση του BES1. Εκτός από την ASKη (BIN2), δύο περισσότερες κινάσες, ASKz και ASKi, φαίνεται να εμπλέκονται στη σηματοδότηση BR. Σε μια προσπάθεια να προσδιοριστεί αν εμπλέκονται περισσότερες κινήσεις του τύπου shaggy, αναγνωρίστηκε μια από την ομάδα III-GSK, η ASKΘ (Rozhon *et al.*, 2010). Αρκετά στοιχεία δείχνουν ότι η ASKΘ είναι αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης BR με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, η ASKΘ πιστεύεται ότι λειτουργεί καθοδικά από το σύμπλεγμα υποδοχέα BRI1 και ρυθμίζεται αρνητικά από τη BRI1-εξαρτώμενη BR-διεγερμένη σηματοδότηση. Φαίνεται ότι τα ASKΘ, BIN2, ASK1 και ASKz έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενα αλλά διακριτά πρότυπα έκφρασης (Dornelas *et al.*, 1999) και τα ASKΘ και BIN2 εμφανίζουν διαφορετική εξειδίκευση μέσω της διαφορετικής συγγένειας πρόσδεσης που έχει η κάθε μια με τα 6 μέλη της οικογένειας BZR.



Εικόνα 5: Ο κεντρικός ρόλος της BIN2 στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω των μπρασσινοστεροειδών και η αλληλεπίδρασή της με μονοπάτια που εκκινούνται από τις ορμόνες αυξίνη και αμπισκισικό οξύ (ABA). Το ABA προκαλεί καταστολή της απόκρισης στα μπρασσινοστεροειδή και ενισχύει τη φωσφορυλίωση του BES1, χωρίς να είναι γνωστό εάν αυτό γίνεται μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με την BIN2 ή με κάποιο άλλο στοιχείο του μονοπατιού ανοδικά της.

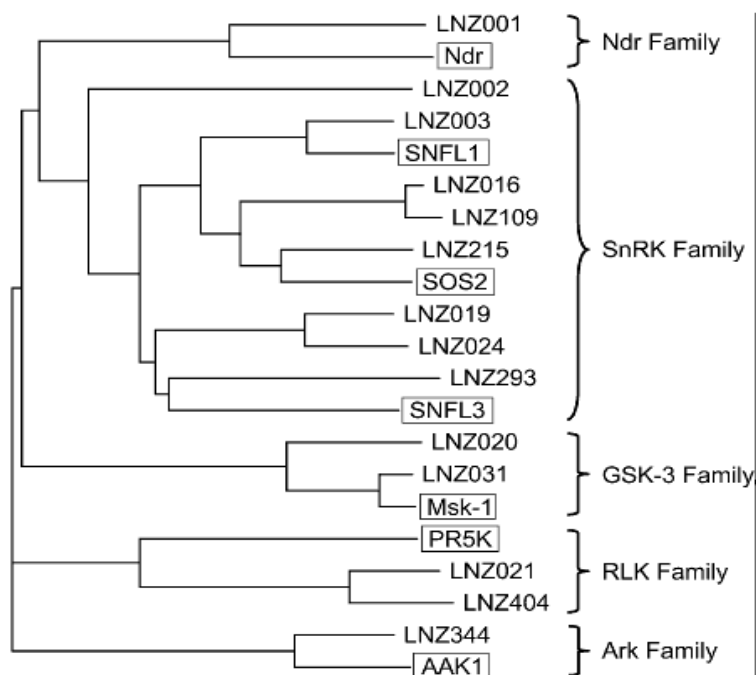
1.3.2. Απόκριση στο αβιοτικό στρες

Οι φυτικές SKs φαίνεται να συμμετέχουν και σε μονοπάτια απόκρισης σε βιοτικό και αβιοτικό στρες. Σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας παρατηρείται αύξηση των δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), το οποίο μπορεί να οδηγήσει και σε οξειδωτική βλάβη. Επίσης μετά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας και οσμωτικής πίεσης αυξάνονται τα μεταγράφα κάποιων SKs. Ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν έχει διελευκανθεί για την *AtSK11* (Del Santo *et al.*, 2012). Η *AtSK11* ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης την αφυδρογονάση της δ-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) στη θέση Thr-467, ένα ένζυμο που επηρεάζει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, οδηγώντας σε ανοχή του *Arabidopsis* σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Η ενισχυμένη δραστηριότητα της G6PD παρέχει αρκετό NADPH για το αντιοξειδωτικό σύστημα προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια ROS. Η αναγωγή του H_2O_2 σε νερό μπορεί στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί μέσω του κύκλου υπεροξειδάσης γλουταθειόνης ή μέσω του κύκλου ασκορβικού-γλουταθειόνης (Dal Santo *et al.*, 2012) Συμμετοχή των φυτικών SKs έχει βρεθεί και στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος MAPK που επάγονται από παθογόνα (βιοτικό στρες). Η MsK1 του *M. sativa* παρουσιάζει μείωση των επιπέδων και της ενεργότητά της όταν το φυτό εκτεθεί σε παράγοντες που επάγουν τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών όπως το βακτηριακό ένζυμο cellulase (Wrzaczek *et al.*, 2007). Διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis* με

υπερέκφραση της MsK1 έδειξαν ενισχυμένη ευαισθησία στο παθογόνο *Pseudomonas syringae* και μειωμένη ενεργοποίηση των MAP κινασών AtMPK3/6 που επάγουν την φυτική άμυνα. Γίνεται,επομένως, προφανές από τα προηγούμενα παραδείγματα ότι τουλάχιστον κάποιες φυτικές SKs εμπλέκονται και στις αποκρίσεις σε βιοτικές και αβιοτικές πιέσεις.

1.3.3. Οι κινάσες SHAGGY-LIKE (SKs) στο *Lotus japonicus*

Στο φυτό *Lotus japonicus* δεν γνωρίζουμε αρκετά για τις κινάσες SHAGGY-LIKE (SKs) που εμπλέκονται σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Σύμφωνα με τους Kameshita et al., το 2004, βρέθηκαν 164 cDNA κλώνοι που κωδικοποιούν πιθανές Ser / Thr κινάσες ή πρωτεΐνες παρόμοιες με κινάση και αυτά τα cDNA αποδόθηκαν σε 15 διαφορετικά γονίδια που δεν έχουν αναφερθεί προηγουμένως. Μια ακολουθούμενη φυλογενετική ανάλυση ταξινόμησε τις υποτιθέμενες κινάσες σε πέντε διαφορετικές οικογένειες κινασών Ser/Thr μεταξύ των οποίων δύο ανήκαν στην οικογένεια κινασών GSK3/SHAGGY-like, (i) οικογένεια Ndr, (ii) οικογένεια SnRK, (iii) οικογένεια RLK, (iv) οικογένεια ARK και (v) οικογένεια GSK3(εικόνα 6). Η οικογένεια GSK3 είχε δύο μέλη, το LNZ020 και το LNZ031. Ο κλώνος LNZ020 αντιστοιχεί στην αλληλουχία AB113573.1 (GenBank, GI:62857011), με ομολογία 76% με την AtSKθ κινάση του *A. thaliana* και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με 467 αμινοξικά κατάλοιπα. Ο κλώνος LNZ031 αντιστοιχεί στην αλληλουχία AB113574.1 (GI:62857013) και παρουσιάζει 89% ομοιότητα με την AB113573.1 και 78% ομοιότητα με την AtSKα κινάση του *A. thaliana*. Στην παρούσα εργασία τα παραπάνω γονίδια ονομάζονται Lotus SHAGGY-Like 1 (*LSK1*) (κλώνος LNZ020) και *LSK2* (κλώνος LNZ031), σε συμφωνία με τον τρόπο ονομασίας που έχει επικρατήσει για τις SHAGGY/GSK3 - like κινάσες στο *A. thaliana* και ρύζι (*Oryza sativa*) (Youn & Kim, 2015)



Εικόνα 6: Φυλογενετική ανάλυση των υποτιθέμενων κινασών Ser/Thr βάση της αμινοξικής τους αλληλουχίας με βάση την αλληλουχία των cDNA κλώνων που απομονώθηκαν από τους Kameshita et al, 2004. Σε κουτί παρουσιάζονται οι συγγενικές κινάσες από άλλα είδη φυτών.

Έχουν βρεθεί μέσω BLAST άλλοι 4 cDNA κλώνοι που φαίνεται να κωδικοποιούν για SHAGGY-like κινάσες και ανήκουν στην ίδια οικογένεια στο *L. jaronicus*, όμως η δραστηριότητα κινάσης και ο λειτουργικός τους ρόλος δεν έχει μελετηθεί ακόμα (Garagounis C., unpublished). Η *LSK1* επιβεβαιώθηκε ως κινάση μέσω πειραμάτων αυτοφωσφορυλίωσης και η ενεργότητά της μειώνεται παρουσία του τερπενοειδούς λουπεόλη. Επιπλέον, προκαταρκτικά δεδομένα δείχνουν πιθανή εμπλοκή της *LSK1* στη διαδικασία της φυματογένεσης. Η έκφρασή της *LSK1*, ποσοτικοποιημένη μέσω ημιποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR), αυξάνεται σημαντικά 1 ώρα μετά τον εμβολιασμό ριζών του *L. jaronicus* με το συμβιωτικό του βακτήριο *Mesorhizobium loti*, αλλά μειώνεται μετά από 48 ώρες υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης. Επίσης, τα επίπεδα έκφρασής της επηρεάζονται από την εφαρμογή λουπεόλης στις εμβολιασμένες ρίζες (Psarrakou I., MSc Thesis, 2014).

1.4. Το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*

Το φυτό *Lotus japonicus* [Βασίλειο: *Plantae*, Order: *Fabales* (*Leguminosae*) Family: *Fabaceae*, Subfamily: *Faboideae*, Tribe: *Loteae*, Genus: *Lotus*] ανήκει στην τάξη των Ψυχανθών και στην οικογένεια *Leguminosae* (*Fabaceae*), η οποία είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια των αγγειοσπέρμων. Είναι ένα διπλοειδές αυτογαμικό είδος, με σχετικά μικρό γονιδίωμα (περίπου 470 MB), ένα χρόνο παραγωγής περίπου 3 μηνών και μεγάλο αριθμό σπόρων. Εκτός από τις διάφορες άλλες χρήσεις τους (ως καλλωπιστικά φυτά, για την παραγωγή ξυλείας κτλ), η τάξη των ψυχανθών περιλαμβάνει μια σειρά από καλλιεργήσιμα είδη. Είναι η δεύτερη σε σημασία κατηγορία καλλιεργούμενων φυτών μετά τα σιτηρά, καθώς αποτελούν πηγή τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα, ενώ χρησιμεύουν και ως πρώτες ύλες για τη βιομηχανία (Graham & Vance, 2003). Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό, όμως, αυτής της τάξης και το οποίο τα καθιστά σημαντικά για τους ερευνητές είναι η δημιουργία ειδικών συμβιωτικών δομών στις ρίζες τους με βακτήρια του γένους *Rhizobium*. Τα φυμάτια, όπως αποκαλούνται αυτές οι χαρακτηριστικές δομές, έχουν την ικανότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου, σε μορφή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα φυτά. Αυτή η συμβιωτική σχέση επιτρέπει τον εμπλουτισμό των εδαφών σε νιτρικά και την παραγωγή πλούσιων σε πρωτεΐνών σπόρων των ψυχανθών (Oldroyd *et al*, 2011). Η οικονομική σημασία και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ψυχανθών οδήγησε στην αναζήτηση ενός φυτού μοντέλου, το οποίο να δημιουργεί συμβιωτικές σχέσεις, διαφορετικές από το *Arabidopsis thaliana*. Η ανάγκη για την κατανόηση της βασικής βιολογίας της ομάδας των ψυχανθών και της διαδικασίας της φυματογένεσης, με απώτερο σκοπό τη γενετική βελτίωση των καλλιεργήσιμων ειδών οδήγησε στην επιλογή του φυτού *Lotus japonicus*. Δύο είδη, το *L. japonicus* (Handberg και Stougaard, 1992) και το *Medicago truncatula* (Barker *et al.*, 1990) έχουν επιλεγεί ως μοντέλα για την έρευνα των ψυχανθών. Το είδος *L. japonicus*, αν και φυτό μικρής οικονομικής σημασίας, παρέχει μια σειρά πλεονεκτημάτων, τα οποία αναφέρθηκαν παραπάνω, έναντι των καλλιεργούμενων ειδών που καθιστούν την γενετική και

γονιδιωματική μελέτη τους ιδιαίτερα δύσκολη (Udvardi *et al*, 2005).



Εικόνα 7: Το φυτό –μοντέλο *Lotus japonicus*.

1.5. Φυματιογένεση: φυσιολογία και μοριακά μονοπάτια

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των ψυχανθών το οποίο τα καθιστά σημαντικά για τους ερευνητές είναι η δημιουργία ειδικών συμβιωτικών δομών στις ρίζες τους με βακτήρια των γενών *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium* (Martinez-Romero & Caballero-Mellado, 1996). Κατά την ανάπτυξη της συμβιωτικής αυτής σχέσης σχηματίζεται ένα νέο φυτικό όργανο με ιδιαίτερα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, το οποίο όπως αναφέρθηκε, ονομάζεται φυμάτιο. Εντός του φυματίου, οι διαφοροποιημένες μορφές των ριζοβίων, που ονομάζονται πλέον βακτηριοειδή, βρίσκουν το κατάλληλο περιβάλλον για να φέρουν σε πέρας τη βιοχημική μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αμμωνία. Η παραπάνω σχέση αποβαίνει αμοιβαία επωφελής και για τους δύο συμβιώτες, αφού το φυτό παρέχει στα ριζόβια ένα περιβάλλον πλούσιο σε πηγές φωτοσυνθετικού οργανικού άνθρακα και απαλλαγμένο από τον ανταγωνισμό άλλων μικροοργανισμών, ενώ με τη σειρά τους τα ριζόβια καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος των αναγκών του φυτού σε αφομοιώσιμο άζωτο (Udvardi and Poole, 2013, Udvardi and Day, 1997, White *et al.*, 2007).

Για την προσαρμογή των ριζοβίων στο νέο τους ρόλο ως μικροσυμβιώτες απαιτείται η ενεργοποίηση ενός περιορισμένου συνόλου μεταβολικών

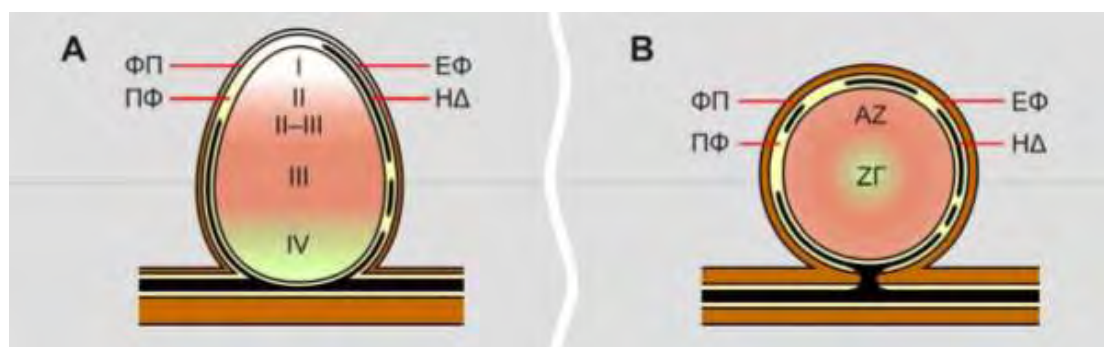
μονοπατιών και η καταστολή κάποιων άλλων. Σε αυτή τη διαφοροποίηση έχουν μεγάλη σημασία οι φυσιολογικές και βιοχημικές συνθήκες που επιβάλλονται από το φυτό. Και το ίδιο το φυτό όμως υφίσταται κάποια διαφοροποίηση στο μεταβολισμό του κατά τη διαδικασία δημιουργίας των φυματίων (Kahn *et al.*, 1998).

Τα φυμάτια χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, σύμφωνα με μορφολογικά και λειτουργικά κριτήρια. Συγκεκριμένα, στη φύση υπάρχουν τα καθορισμένα και τα μη καθορισμένα φυμάτια.

Στα καθορισμένα φυμάτια, το πρωτογενές μερίστωμα (primordium) προέρχεται από το εξωτερικό και το ενδιάμεσο τμήμα του φλοιού. Η κυτταρική διαίρεση στο πρωτογενές μερίστωμα σταματά πολύ γρήγορα και δε σχηματίζεται μόνιμο μερίστωμα. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι ο αριθμός των φυτικών κυττάρων δε μεταβάλλεται. Παρόλα αυτά το μέγεθος του φυματίου αυξάνεται, διότι τα βακτήρια που βρίσκονται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή διαιρούνται συνεχώς και γι' αυτό το λόγο τα κύτταρα διογκώνονται ώστε να τα «φιλοξενήσουν». Συνεπώς, το μέγεθος του φυματίου εξαρτάται κυρίως από την αύξηση του μεγέθους των μολυσμένων κυττάρων. Η αζωτοδέσμευση ξεκινά ταυτόχρονα σε όλα τα μολυσμένα κύτταρα, πριν ακόμα ολοκληρωθεί η διόγκωση των κυττάρων. Όταν τελειώσει η διαφοροποίηση του φυματίου, σταματά και η ανάπτυξη του, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σφαιρικού φυματίου που θα περιέχει μια ομοιογενή ζώνη αζωτοδέσμευσης. Επειδή τα αζωτοδεσμευτικά κύτταρα δεν ανανεώνονται, η φάση της αζωτοδέσμευσης είναι προσωρινή, και γι' αυτό το λόγο το φυμάτιο οδηγείται κάποια στιγμή στη γήρανση. Τελικά, ενώ τα φυτικά κύτταρα αποσυντίθενται, μέρος του πληθυσμού των βακτηριοειδών επιβιώνει μετά την απελευθέρωσή του από ένα γερασμένο φυμάτιο (Purpo *et al.*, 2005).

Στα μη καθορισμένα φυμάτια, το πρωτογενές μερίστωμα προέρχεται από το εσωτερικό τμήμα του φλοιώδους παρεγχύματος της ρίζας. Η κυτταρική διαίρεση συνεχίζεται στην ακραία περιοχή του πρωτογενούς μεριστώματος το οποίο δημιουργεί το ακραίο μερίστωμα που παραμένει ενεργό καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του φυματίου. Αυτά τα φυμάτια αυξάνουν συνεχώς σε μέγεθος λόγω της σταθερής αύξησης του κυτταρικού αριθμού, αλλά και της διόγκωσης των μολυσμένων κυττάρων. Έτσι, αποκτούν ένα επίμηκες σχήμα και διαχωρίζονται σε τέσσερις διαφορετικές ζώνες ανάλογα με τη φάση στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στο σχήμα διαθέτουν τις ζώνες του ακραίου μεριστώματος, της μόλυνσης και της διαφοροποίησης, της αζωτοδέσμευσης και της γήρανσης. Γίνεται αντιληπτό ότι για να διατηρηθεί αυτή η δομή του μη καθορισμένου φυματίου θα πρέπει να υπάρχει μια απόλυτη ισορροπία μεταξύ του ρυθμού διαίρεσης του μεριστώματος και του ρυθμού μόλυνσης των μετα-μιτωτικών κυττάρων (Maunoury *et al.*, 2008). Όταν ένα φυμάτιο παύσει να είναι ενεργό, τότε μαζί

με την αυτόλυση του κυτταροπλάσματος του φυτικού κυττάρου, πεθαίνει και ολόκληρος ο πληθυσμός των βακτηριοειδών.



Εικόνα 8: Μορφολογία μη καθορισμένων (Α) και καθορισμένων φυματίων (Β). Οι ιστοί από τους οποίους αποτελούνται και οι δύο τύποι φυματίων είναι οι εξής: φλοιώδες παρέγχυμα (ΦΠ), ενδοδερμίδα του φυματίου (ΕΦ), ηθμαγγειώδης δεσμίδα του φυματίου (ΗΔ), παρέγχυμα του φυματίου (ΠΦ). Στα μη καθορισμένα φυμάτια οι διαδοχικές ζώνες του κεντρικού ιστού είναι: μεριστωματική ζώνη (I), ζώνη μόλυνσης (II), ενδιάμεση ζώνη μεταξύ της ζώνης μόλυνσης και της αζωτοδεσμευτικής ζώνης (II-III), αζωτοδεσμευτική ζώνη (III), ζώνη γήρανσης (IV), ενώ στα καθορισμένα φυμάτια είναι: αζωτοδεσμευτική ζώνη (ΑΖ) και ζώνη γήρανσης (ΖΓ)

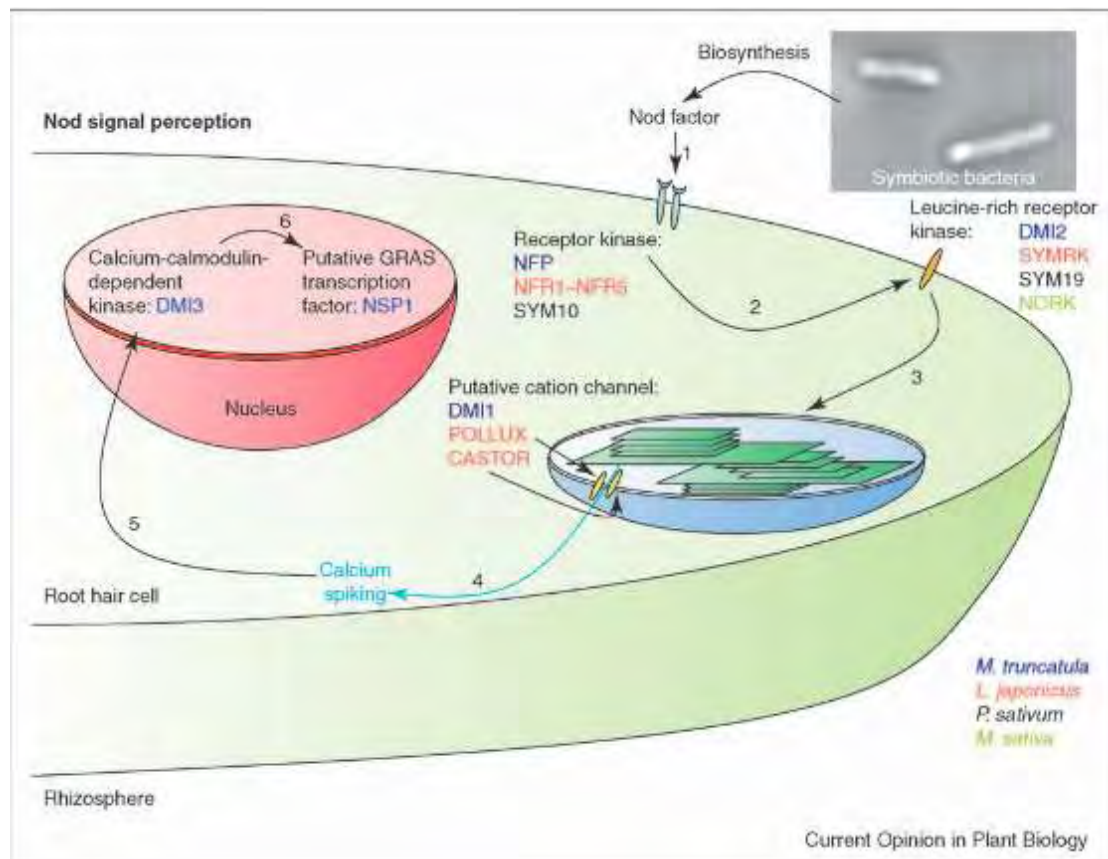
Στο παρελθόν, για τη μελέτη τη συμβιωτικής σχέσης μεταξύ φυτών και ριζοβίων είχαν χρησιμοποιηθεί πολλά από τα γνωστά ψυχανθή, όμως πλέον η έρευνα έχει εστιάσει σε δύο συγκεκριμένα ζεύγη συμβιωτών. Πρόκειται για το *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* και για το *Lotus japonicus-Mesorhizobium loti*. Το πρώτο ζεύγος χρησιμοποιείται ως σύστημα αναφοράς στην περίπτωση δημιουργίας μη καθορισμένων φυματίων, ενώ το δεύτερο στην περίπτωση των καθορισμένων φυματίων (Van den Bosch and Stacey, 2003). Το *M. loti* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο της ριζόσφαιρας του εδάφους και ανήκει στο γένος *Mesorhizobium* της οικογένειας *Phyllobacteriaceae*. Το *M. loti* μπορεί και υιοθετεί δύο διαφορετικούς τρόπους διαβίωσης. Αρχικά, μπορεί να αναπτυχθεί ελεύθερα στο έδαφος αλλά όταν δεν υπάρχει άφθονο διαθέσιμο άζωτο μπορεί και αποικίζει στις ρίζες του *L. Japonicus* σχηματίζοντας φυμάτια μέσω των οποίων γίνεται η αζωτοδέσμευση.

Για την εδραίωση της αζωτοδεσμευτικής συμβίωσης είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν τρία βασικά γεγονότα. Αυτά είναι η ενδοκυτταρική μόλυνση των κυττάρων του ξενιστή από τον μικροσυμβιώτη, η οργανογένεση του φυματίου και η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης. Γενικά, κατά το σχηματισμό του φυματίου, η μόλυνση και η οργανογένεση συμβαίνουν ταυτόχρονα, ενώ αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται μόνο αφού ολοκληρωθεί

η οργανογένεση, υπό την προϋπόθεση ότι η βακτηριακή μόλυνση είναι επιτυχής (Maunougy *et al.*, 2008).

Οι συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν τη μοριακή επικοινωνία μεταξύ του φυτού-ξενιστή και του μικροσυμβιώτη στη ριζόσφαιρα (Oldroyd *et al.*, 2005). Κατά τη διαδικασία έναρξης της μόλυνσης, τα φυτά εκκρίνουν από τις ρίζες τους φαινορικά μόρια-σήματα, και κυρίως ειδικές φλαβονοειδείς ενώσεις, οι οποίες γίνονται αντιληπτές από ορισμένους υποδοχείς των ριζοβίων που υπάρχουν στη ριζόσφαιρα και ονομάζονται πρωτεΐνες NodD. Οι υποδοχείς αυτοί είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές των οπερονίων που ευθύνονται για τη δημιουργία των φυματίων (γονίδια *nod*, *noI* ή *noE*) και βρίσκονται στο γενετικό υλικό των ριζοβίων. Τα γονίδια αυτών των οπερονίων κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση εξειδικευμένων μορίων-σημάτων από τα ριζόβια. Αυτά τα μόρια-σήματα δεν είναι άλλα από τους λιποχιτινικούς ολιγοσακχαρίτες (LCOs) (Lerouge *et al.*, 1990; Spaink *et al.*, 1991), οι οποίοι ονομάζονται παράγοντες Nod (NFs). Αυτά τα μόρια σήματα ενεργοποιούν τα ριζικά κύτταρα του ξενιστή (Matthysse and Kijne, 1998). Από τη στιγμή που οι υποδοχείς του φυτού θα αναγνωρίσουν τους παράγοντες Nod του ριζοβίου, μπορεί να ξεκινήσει η ουσιαστική διαδικασία της μόλυνσης. Οι παράγοντες Nod ακινητοποιούνται τοπικά στο κυτταρικό τοίχωμα (Goedhart *et al.*, 2000). Η αναγνώρισή τους εξαρτάται από κάποιες ετεροδιμερή κινάσες σερίνης/θρεονίνης που μοιάζουν με μεμβρανικούς υποδοχείς και περιέχουν έναν τομέα LysM στην εξωκυττάρια περιοχή τους (LysM RLKs, Radutoiu *et al.*, 2003) όπως οι NFR5/1 στο *L. japonicus*. Οι διάφορες πλευρικές ομάδες των λιποχιτινο-ολιγοσακχαριτών αναγνωρίζονται από διαφορετικούς LysM RLKs, εξηγώντας γιατί ένα Ψυχανθές μπορεί να επικοιστεί από ένα περιορισμένο εύρος ριζοβίων (host specificity). Επιπλέον, φαίνεται ότι ένα δευτερογενές σήμα από την αναγνώριση των Nod παραγόντων προσλαμβάνεται από υποδοχείς παρόμοιους με υποδοχείς τύπου κινάσες με περιοχές πλούσιες σε κατάλοιπα λυσίνης (Leucine-rich-repeat domains RLKs) όπως ο υποδοχέας *LjSYMRK* στο *L. japonicus* (Oldroyd & Downie, 2004). Η αναγνώριση των NFs οδηγεί σε μια σειρά γεγονότων που βασίζονται στην μεταγωγή σήματος μέσω ασβεστίου στην οποία εμπλέκονται κανάλια κατιόντων [CASTOR στο *L.*

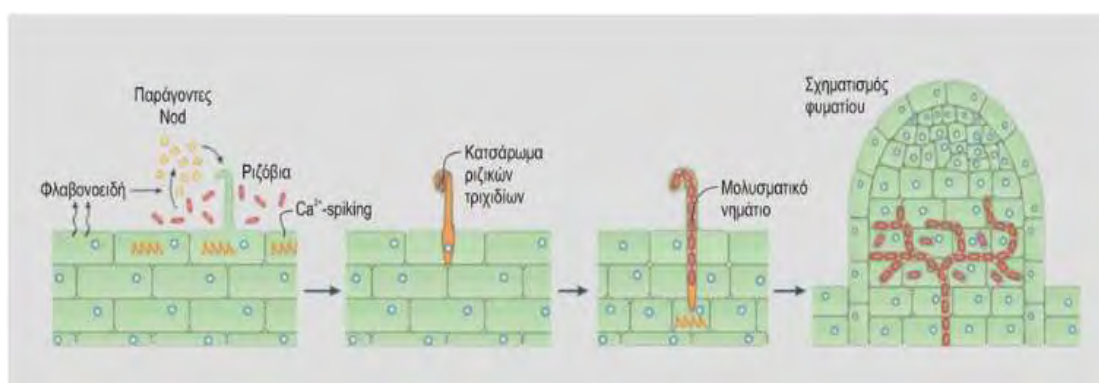
japonicus (Imaizumi-Anraku *et al.*, 2004)] και νουκλεοπορίνες [NUP133, NUP85 (Kanamori *et al.*, 2006, Saito *et al.*, 2007)]. Η αύξηση της ενδοκυτταρικής συγγκέντρωσης ασβεστίου (Calcium spiking) οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός κεντρικού ρυθμιστή, μιας κινάσης εξαρτώμενης από ασβέστιο/καλμοδουλίνη, CCaMK στο *L. japonicus* (Levy *et al.*, 2004) και μιας πρωτεΐνης που περιέχει μια δομή coiled coil που φωσφορυλιώνεται από την CCaMK (CYCLOPS, Yano *et al.*, 2008). Η ενεργοποίηση του CCaMK μέσω των LysM RLKs και του μονοπατιού του SYMRK, είναι το κεντρικό σημείο της οργανογένεσης του φυματίου. Ακολουθεί η ενεργοποίηση μιας σειράς γονιδίων όπως των GRAS μεταγραφικών παραγόντων NSP1 and NSP2 (Heckmann *et al.*, 2006; Hirsch *et al.*, 2009), του γονιδίου *NIN* που λειτουργεί ως μεταγραφικός ρυθμιστής (Schauser *et al.*, 1999), και μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων ERF τα οποία επάγουν την έκφραση γονιδίων που επιτελούν την βακτηριακή επιμόλυνση στην ριζική επιδερμίδα και την φυματιογένεση στον ριζικό φλοιό (Εικόνα 8). Τα γονίδια που εκφράζονται στα πρώτα στάδια της φυματιογένεσης ονομάζονται πρώιμα (early nodulin genes) ενώ τα γονίδια που εκφράζονται στα τελευταία στάδια και η έναρξη της έκφρασή τους συμπίπτει με την έναρξη της αζωτοδέσμευσης ονομάζονται όψιμα γονίδια (late nodulin genes) (van Kammen, 1984).



Εικόνα 9: Η θέση και αλληλεπίδραση μεταξύ των στοιχείων της οδού αναγνώρισης του σήματος Nod. Τα χρώματα υποδεικνύουν τα διάφορα είδη από τα οποία εντοπίστηκε το συγκεκριμένο γονιδιακό προϊόν.

Μορφολογικά παρατηρούνται μια σειρά αλλαγών σε κυτταρικό επίπεδο (Patriarca *et al.*, 2004, Hayashi *et al.*, 2005 για επισκόπηση). Η πρόσδεση των ριζοβίων κοντά στο άκρο του ριζικού τριχιδίου προκαλεί μια αλλαγή στην κατεύθυνση της ανάπτυξής του. Σε πολλά ριζοβιακά στελέχη, την πρόσδεση ακολουθεί ένα δεύτερο στάδιο που είναι αυτό της δημιουργίας ινιδίων κυτταρίνης από τα βακτήρια, με σκοπό να συνεισφέρουν στη διαμόρφωση βακτηριακών συσσωματωμάτων πάνω στην επιφάνεια του ριζικού τριχιδίου. Το αποτέλεσμα είναι να αρχίσει να κατσαρώνει το ριζικό τριχίδιο γύρω από τα ριζόβια, ώστε να δημιουργήσει μια κλειστή κοιλότητα και να παγιδεύσει τη ριζοβιακή μικροαποικία. Τα ριζόβια οδηγούνται μέσα στο φυτικό ιστό μέσω ειδικής σωληνοειδούς δομής που ξεκινά από το σημείο της κοιλότητας και αναπτύσσεται κατά μήκος του στελέχους του ριζικού τριχιδίου. Η δομή αυτή ονομάζεται μολυσματικό νημάτιο και δημιουργείται από το ίδιο το φυτό. Συνεπώς, για να δημιουργηθεί το μολυσματικό νημάτιο είναι απαραίτητη η παρουσία ζωντανών βακτηρίων. Ταυτόχρονα, οι παράγοντες Nod ενεργοποιούν τα κύτταρα του φλοιώδους παρεγχύματος που βρίσκονται απέναντι από το σημείο της μόλυνσης και με αυτό τον τρόπο προκαλούν την

αποδιαφοροποίηση και τη διαίρεσή τους, ώστε να σχηματιστεί το πρωτογενές μερίστωμα του φυματίου. Όταν το γεμάτο από πολλαπλασιαζόμενα ριζόβια μολυσματικό νημάτιο φτάσει στα κύτταρα του πρωτογενούς μεριστώματος, απελευθερώνει ενδοκυτταρικά δομές που ονομάζονται μολυσματικά σταγονίδια, τα οποία δε διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα και η μεμβράνη τους βρίσκεται σε άμεση επαφή με τα βακτήρια. Λόγω της άμεσης επαφής, ακολουθεί πρόσληψη των ριζοβίων με ενδοκύτωση μέσα σε ένα νέο κυτταροπλασματικό διαμέρισμα, το συμβιόσωμα. Στο συμβιόσωμα, μια μεμβράνη που προέρχεται από το πλασματόλημμα περικλείει ένα ή περισσότερα ριζόβια, αναλόγως με το αν πρόκειται για μη καθορισμένα ή καθορισμένα φυμάτια, αντίστοιχα (Maunoury *et al.*,2008). Η μεμβράνη αυτή ονομάζεται μεμβράνη του συμβιοσώματος ή περιβακτηριακή μεμβράνη (Kijne, 1992), και ρόλος της είναι να διαχωρίζει τα βακτηριοειδή από το κυτταρόπλασμα του ξενιστή και παράλληλα να ελέγχει την κυκλοφορία των θρεπτικών μεταξύ τους (Oldroyd *et al.*,2005). Η μόλυνση συνεχίζεται διακυτταρικά, καθώς όταν το μολυσματικό νημάτιο φτάσει στη βάση του τριχιδίου, αρχίζει να διακλαδίζεται και να εξαπλώνεται από κύτταρο σε κύτταρο, μεταφέροντας με αυτό τον τρόπο τα ριζόβια στο υπό σχηματισμό φυμάτιο. Η διέλευση του μολυσματικού νηματίου από το ένα κύτταρο στο άλλο σημαίνει ότι το κυτταρικό τοίχωμα αποδομείται τοπικά, το νημάτιο ενώνεται με το κυτταρικό τοίχωμα και η επιμήκυνση του νηματίου συνεχίζεται στο γειτονικό κύτταρο (Van Spronsen *et al.*,1994). Τα βακτήρια που βρίσκονται εντός αυτών των κυττάρων ονομάζονται βακτηριοειδή. Τα κύτταρα του ξενιστή που έχουν πλέον μολυνθεί σταματούν να διαιρούνται, όμως αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε αζωτοδεσμευτικά συμβιωτικά κύτταρα, σε συνεργασία με το μικροσυμβιώτη τους. Μετά το πέρας της λειτουργικής ζωής του φυματίου ακολουθεί η φάση της γήρανσης και ο θάνατος (Purro *et al.*, 2005).

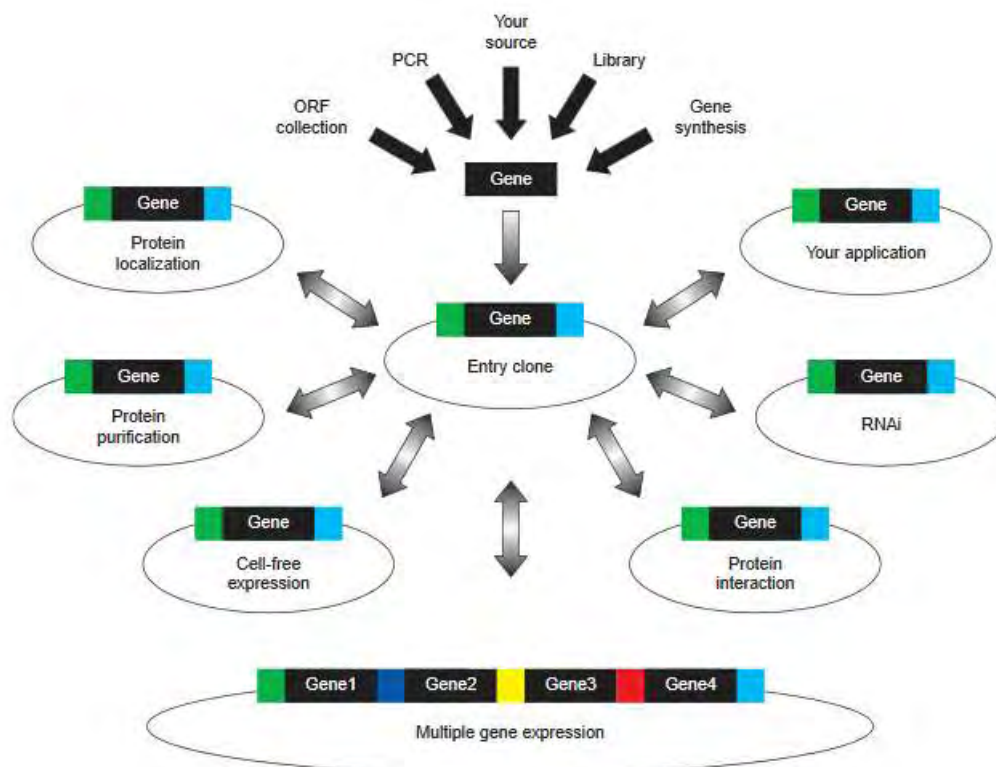


Εικόνα 10: Η διαδικασία της μόλυνσης της ρίζας ενός ψυχανθούς από τα ριζόβια. Τα ριζόβια ανιχνεύονται από τα ριζικά τριχίδια, τα οποία αρχίζουν να κατσαρώνουν και δημιουργούν ένα μολυσματικό νημάτιο. Τα ριζόβια περνούν στο εσωτερικό του ριζικού τριχιδίου μέσω του νεοσχηματισμένου μολυσματικού νηματίου και μολύνουν τα κύτταρα του φλοιού. Μέσα στα

μολυσμένα κύτταρα του φλοιού δημιουργούνται τα βακτηριοειδή, τα οποία τελικά οδηγούν στη δημιουργία του φυματίου.

1.6. Τεχνολογία Gateway cloning

Η μέθοδος κλωνοποίησης Gateway είναι μια γενική μέθοδος κλωνοποίησης βασισμένη στις τοποειδικές ιδιότητες ανασυνδυασμού του βακτηριοφάγου λάμδα και μπορεί να παρέχει την δυνατότητα για τη εισαγωγή και μεταφορά αλληλουχιών DNA σε πολλαπλούς πλασμιδιακούς φορείς για λειτουργική μελέτη και πρωτεϊνική έκφραση (Katzen, 2007).



Εικόνα 11: Διαγραμματική προσέγγιση των δυνατοτήτων της τεχνολογίας Gateway. Το γονίδιο-στόχος μπορεί να ανασυνδυαστεί σε αρχικό φορέα και στη συνέχεια να εντεθεί μέσω ανασυνδυασμού σε πολλαπλά συστήματα έκφρασης.

Η μέθοδος αξιοποιεί την τοποειδική ανασυνδυαστική ιδιότητα του φάγου επιτρέποντας την ενσωμάτωσή του στο χρωμόσωμα της *E. coli* και την επακόλουθη μεταβολή μεταξύ του λυτικού και λυσιγονικού κύκλου του βακτηρίου. Στη μέθοδο αυτή, τα στοιχεία του συστήματος λ ανασυνδυασμού, έχουν τροποποιηθεί προς τη βελτίωση της τοποειδικής εκλεκτικότητας και

αποτελεσματικότητας. Η εισαγωγή του φάγου λ στο χρωμόσωμα της *E. coli* λαμβάνει χώρα μέσω ενδομοριακού ανασυνδυασμού DNA ρυθμιζόμενου από μίγμα λ και *E. coli* κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών, όπως το μίγμα της κλωνάσης. Τα χαρακτηριστικά του λ ανασυνδυασμού είναι:

- ο ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα μεταξύ εξειδικευμένων θέσεων πρόσδεσης (attachment sites, att sites) πάνω στα αντιδρώντα μόρια DNA.
- ο ανασυνδυασμός είναι συντηρητικός (δεν υπάρχει απώλεια νουκλεοτιδίων) και δεν απαιτεί τη σύνθεση DNA. Τα τμήματα DNA φέρουν τα άκρα του ανασυνδυασμού και αλλάζουν θέση ούτως ώστε, μετά τον ανασυνδυασμό τα att τμήματα να είναι υβριδικές αλληλουχίες αποτελούμενες από αλληλουχίες παρεχόμενες από κάθε μητρικό φορέα. Για παράδειγμα, τα attL τμήματα αποτελούνται από αλληλουχίες των attB και attP τμημάτων.
- η ανταλλαγή κλώνων λαμβάνει χώρα μέσα σε μια κεντρική περιοχή, κοινή για όλα τα att τμήματα.
- ο ανασυνδυασμός μπορεί να ολοκληρωθεί μεταξύ DNA οποιασδήποτε τοπολογίας, ακόμα και με υπερελικωμένα μόρια.

Ο λ ανασυνδυασμός συμβαίνει μεταξύ εξειδικευμένων τμημάτων πρόσδεσης (att): attB στο χρωμόσωμα της *E. coli* και attP στο χρωμόσωμα του λ φάγου. Τα att τμήματα χρησιμεύουν σαν τμήματα πρόσδεσης για ανασυνδυασμένα γονίδια και έχουν μελετηθεί ενδελεχώς. Κατά την ενσωμάτωση του φάγου, ο ανασυνδυασμός συμβαίνει μεταξύ attB και attP τμημάτων προς σχηματισμό attL και attR θέσεων. Η εν γένει νουκλεοτιδική διασταύρωση (ανασυνδυασμός) λαμβάνει χώρα μεταξύ ομόλογων κεντρικών περιοχών 15bp στα δυο τμήματα, ωστόσο απαιτούνται οι περιβάλλουσες αλληλουχίες καθώς περιέχουν τα σημεία δέσμευσης για τα ανασυνδυασμένα γονίδια.

Ο λ ανασυνδυασμός καταλύεται από μίγμα ενζύμων που δεσμεύονται στα att τμήματα, φέρνουν σε επαφή τα τμήματα-στόχους, τα πέπτουν και επισυνάπτουν ομοιοπολικά το DNA. Ο ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα ακολουθούμενος από την ανταλλαγή δυο ζευγών κλώνων και την σύνδεση των μορίων DNA σε νέα μορφή. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που ενέχονται στην αντίδραση διαφέρουν στις περιπτώσεις όπου ο λ φάγος χρησιμοποιεί το λυτικό ή το λυσογονικό μονοπάτι (πίνακας 1). Ο λυσογονικός κύκλος καταλύεται από την ανασυνδυασμένη ιντεγκράση του βακτηριοφάγου λ (Int) και τον Integration Host Factor (IHF) της *E. coli* (συστατικά του ενζυμικού μίγματος της BP κλωνάσης), ενώ ο λυτικός κύκλος καταλύεται από τις ίδιες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες καθώς και την Excisionase (Xis), συστατικά του ενζυμικού μίγματος της LR κλωνάσης.

Κύκλος	Αντίδραση	Κατάλυση από
Λυσογονικός	$attB \times attP \rightarrow attL \times attR$	BP κλωνάση (Int, IHF)
Λυτικός	$attL \times attR \rightarrow attB \times attP$	LR κλωνάση (Int, Xis, IHF)

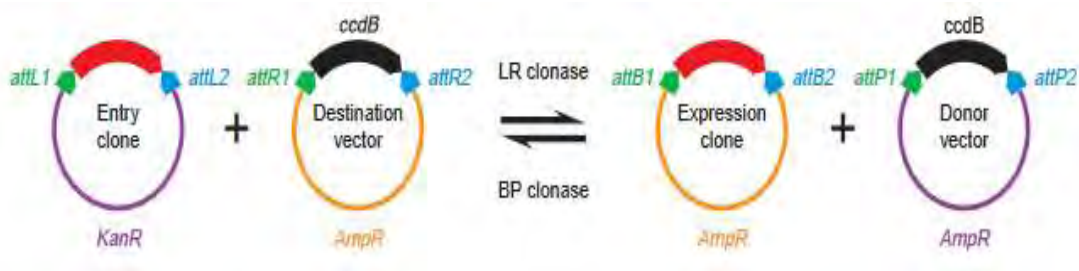
Πίνακας 1: Μεταβολικοί κύκλοι του λ φάγου που αξιοποιούνται κατά τον λ ανασυνδυασμό και η κατάλυσή τους.

Η μέθοδος ανασυνδυασμού Gateway αξιοποιεί το σύστημα ανασυνδυασμού του λ φάγου για τη μεταφορά ετερόλογων αλληλουχιών DNA, που φέρουν ειδικά σχεδιασμένα att τμήματα, μεταξύ πλασμιδιακών φορέων. Δυο βασικές αντιδράσεις αποτελούν τη βάση της μεθόδου:

α) αντίδραση BP: διευκολύνει τον ανασυνδυασμό ενός attB υποστρώματος (attB-προϊόν PCR ή γραμμικό attB φορέα έκφρασης) με ένα attP υπόστρωμα (πλασμιδιακός φορέας-δότης) προς σχηματισμό ενός αρχικού κλώνου που περιέχει attL τμήματα. Η αντίδραση καταλύεται από το ενζυμικό μίγμα της BP κλωνάσης (Invitrogen) (εικόνα 12).

β) αντίδραση LR: διευκολύνει τον ανασυνδυασμό ενός attL υποστρώματος (αρχικός κλώνος) με ένα attR υπόστρωμα (φορέας προορισμού) προς σχηματισμό ενός φορέα (κλώνο) έκφρασης που περιέχει attB τμήματα. Η αντίδραση καταλύεται από το ενζυμικό μίγμα της LR κλωνάσης (Invitrogen) (εικόνα 12).

A.



B.

Τμήμα att	Μήκος	Βρίσκεται στο
attB	25bp	Φορέα προορισμού Κλώνο έκφρασης
attP	200bp	Φορέα δότη
attL	100bp	Αρχικό φορέα Αρχικό κλώνο
attR	125bp	Φορέα προορισμού

Εικόνα 12: Α) Οι αντιδράσεις κλωνοποίησης Gateway. Το σχήμα δείχνει τους τέσσερις τύπους πλασμιδίων και τα mix των ενζύμων που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις κλωνοποίησης. Με κόκκινο βέλος αντιπροσωπεύεται το τμήμα του γονιδίου–ενδιαφέροντος. Β) Στον πίνακα παρατίθενται τα μήκη των τμημάτων att καθώς και βρίσκονται.

1.7. Μετασχηματισμός με το *Agrobacterium rhizogenes* και “Hairy Root” φαινότυπος

Το *Agrobacterium rhizogenes* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο το οποίο προκαλεί την ασθένεια hairy root στα περισσότερα δικοτυλήδονα φυτά, δηλαδή επάγει την παραγωγή περισσότερων διακλαδισμένων και μικρότερων σε μήκος ριζών. Αυτό οφείλεται στο πλασμίδιο Ri (Root inducing), το οποίο προκαλεί κορωνοτούς κάλλους (Terfer, 1984). Όταν το αγροβακτήριο μολύνει το φυτό, τότε το πλασμίδιο εισέρχεται στον πυρήνα και εκεί μπορεί να ενσωματωθεί στο φυτικό γονιδίωμα προς παραγωγή πολυαδενυλιωμένων mRNAs. Συγκεκριμένα η παθογένεια του βακτηρίου οφείλεται σε μια περιοχή του πλασμιδίου που ονομάζεται T-DNA η οποία ενσωματώνεται στο DNA του φυτού (Chilton *et al.*, 1982). Η περιοχή του T-DNA φέρει γονίδια που προσδίδουν στα μετασχηματισμένα κύτταρα την ικανότητα να μεγαλώνουν χωρίς ορμόνες και γονίδια σύνθεσης οπινίων (τροποποιημένα αμινοξέα) που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά από τα βακτήρια (Sinkar *et al.*, 1987). Ο φαινότυπος “Hairy root” οφείλεται στα γονίδια *rol* A, B, C, D (White *et al.*, 1985) τα οποία εντοπίζονται στην περιοχή του T-DNA. Συγκεκριμένα, το γονίδιο *Roll* A είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό αυτού του φαινότυπου, το γονίδιο *Roll* B επάγει τη ριζογένεση και το σχηματισμό των κάλλων, το γονίδιο *Roll* C προωθεί την ανάπτυξη της ρίζας και το *Roll* D καταστέλλει την ανάπτυξη του κάλλου. Το T-DNA καθορίζεται από αλληλουχίες μήκους 25 ζευγών βάσεων με *cis* δράση και ονομάζονται συνοριακά άκρα LB (Left Border= αριστερό όριο) και RB (Right Border= δεξί όριο) (Yadav *et al.*, 1982). Παρατηρείται πολικότητα στη μεταφορά και ενσωμάτωση του T-DNA, η οποία κατευθύνεται και ξεκινά από το δεξί συνοριακό (Wang *et al.*, 1984). Η αποκοπή, η μεταφορά και η ενσωμάτωση του T-DNA γίνεται με τη μεσολάβηση ενός άλλου τμήματος του πλασμιδίου που ονομάζεται περιοχή τοξικότητας *vir* (Bevan, 1984). Τα γονίδια *vir* έχουν *trans* δράση και αυτό το γεγονός μας δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε δυαδικό σύστημα φορέων, όπου το ένα πλασμίδιο περιέχει τα γονίδια *vir* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για τη μεταφορά του T-DNA, ενώ το άλλο περιέχει ένα γονίδιο της επιλογής μας στη θέση του T-DNA, με μήκος μικρότερο των 15 kbp (Stouggard *et al.*, 1987). Η εισαγωγή φαίνεται να γίνεται τυχαία αλλά κυρίως σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές του φυτικού γονιδιώματος. Η μέθοδος μετασχηματισμού με το *A. rhizogenes* παρουσιάζει πλεονεκτήματα έναντι του μετασχηματισμού μέσω του *A. tumefaciens*, τα πλεονεκτήματα είναι: η ταχύτητα και η απλότητα της διαδικασίας, δυνατότητα μετασχηματισμού με

μεγάλη απόδοση και εξέτασης ταυτόχρονα μεγάλου αριθμού ριζών (Stiller *et al.*, 1997), δυνατότητα δημιουργίας σύνθετων αναγεννημένων φυτών (αγρίου τύπου βλαστός) με μετασχηματισμένες λειτουργικές ρίζες σε ένα μήνα και τέλος αναγέννηση ολόκληρων μετασχηματισμένων φυτών από Hairy root μέσα σε 5-6 μήνες (Stiller *et al.*, 1997).

Το πρώτο πρωτόκολλο μετασχηματισμού του *L. japonicus* με στέλεχος του *A. rhizogenes* για την επαγωγή "Hairy roots", περιγράφηκε από τους Handberg & Stougaard το 1992. Οι μετασχηματισμένες "Hairy Roots" του *L. japonicus* μπορούν να αναπτύξουν φυσιολογικά φυμάτια 3-4 εβδομάδες μετά τον σχηματισμό τους. Η μέθοδος αυτή συνίσταται για τη μελέτη γονιδίων που εκφράζονται ή που επιδρούν σε γενετικό επίπεδο στο ριζικό σύστημα των φυτών (Martinari *et al.* 1999).

1.8. Στόχος

Μετά την επιβεβαίωση της λειτουργίας της LSK1 ως μία κινάση η οποία δρα στα πρώτα στάδια της συμβιωτικής σχέσης, η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό να διερευνήσει το ρόλο του γονιδίου *LSK1* στη διαδικασία της φυματογένεσης στο φυτό *L. japonicus*. Συγκεκριμένα διερευνήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού λειτουργικών φυματίων, 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*. Οι παράμετροι που ελέγχθηκαν ήταν η επιβεβαίωση και ποσοτικοποίηση της υπερέκφρασης μέσω RT-qPCR, ο φαινότυπος των φυματίων, ο αριθμός των φυματίων, το μήκος και το βάρος της ρίζας σε φυτά μετασχηματισμένα με το στέλεχος *A. rhizogenes* LBA1334 που έφερε το δυαδικό φορέα *LSK1stop* in pUB-HYG.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα μετασχηματισμένα φυτά με τον φορέα υπερέκφρασης ο αριθμός των φυματίων είναι μειωμένος σε σχέση με τα φυτά ελέγχου.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1:ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΛΥΣΗ

Αρχικά προετοιμάστηκε μια προ-καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο pGEX, το οποίο φέρει το γονίδιο *LSK1* σε 5ml υγρής καλλιέργειας LB (10g/L bacteriological peptone, 5g/L yeast extract, 10g/L NaCl, 15 g/L agar για υγρό θρεπτικό). Το δείγμα μοιράζεται σε 2 σωληνάκια των 1,5ml, φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα στα 13,3rpm και 17g και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Προσθήκη 300μl Buffer P1 (50mM Tris, 10mM EDTA, pH 8 HCL, 3 mg/ml RNase) και ανάδευση. Ακολουθεί προσθήκη 300μl Buffer P2 (200mM NaOH, 1% w/v SDS) και ήπια ανάδευση πάνω-κάτω. Έπεται προσθήκη 300μl Buffer P3 (3M Potassium acetate, pH 5,5 glacial acetic acid) και ήπια ανάδευση. Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις ίδιες συνθήκες. Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό tube. Προσθήκη 600μl 2-προπανόλης και ήπια ανάδευση. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις παραπάνω συνθήκες και αφαίρεση του υγρού προσεκτικά. Προσθήκη 500μl 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις ίδιες συνθήκες. Αφαίρεση του υπερκείμενου και ξήρανση του ιζήματος στους 37°C. Επαναδιάλυση του ιζήματος με 20μl νερό.

2.2:ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *LSK1* ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΕ GATEWAY ΦΟΡΕΙΣ

Απαραίτητη είναι η ενίσχυση του γονιδίου *LSK1* (1.169Kb) καθώς και η προσθήκη των attB1 στο 5' άκρο και attB2 στο 3' άκρο ώστε να χρησιμοποιηθεί για την τεχνολογία του Gateway™ cloning. Πραγματοποιείται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για ενίσχυση του γονιδίου και προσθήκη στα άκρα των attB αλληλουχιών μεγέθους 25 bp. Πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις PCR, η μία περιείχε reverse εκκινητή με το φυσιολογικό κωδικόνιο λήξης της *LSK1* (*LSK1 stop*) και η άλλη reverse εκκινητή χωρίς κωδικόνιο λήξης (*LSK1 no stop*) για μελλοντική χρήση. Η αντίδραση της PCR, έγινε με την Phusion High-fidelity DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific) με τελικό όγκο 20μl και εκκινητές για την *LSK1stop* R:5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAACTCCTTGCATGCTC-3' και για την *LSK1nostop* R:5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAA GCTGGGTCACTCCTTGCATGCTCAG-3' ενώ ο εκκινητής forward είναι κοινός και για τις δύο αντιδράσεις και είναι F:5'-GGGGAC AAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGAACATGATGAGACGG-3'. Για την

ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1%, χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους 2-log DNA ladder της New England Biolabs.

2.3:ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ENTRY CLONE ΜΕ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *LSK1*

Μέσω της αντίδρασης BP-clonase μεταφέρεται το προϊόν της PCR με τα attB-άκρα στον pDONR 207 φορέα (Thermo Fischer-Life technologies). Πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις BP- κλωνάσης , μία για κάθε ένα από τα προϊόντα PCR (*LSK1 stop* ,*LSK1 no stop*). Σε κάθε ένα από τα δύο σωληνάκια των 1,5ml προσθέτονται 75ng pDONR 207, 3μl προϊόντος PCR (στο ένα *LSK1 stop* και στο δεύτερο *LSK1 no stop*) και 1 μl από το ένζυμο BP-clonase και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου όλο το βράδυ. Προσθήκη 0,5μl πρωτεΐνάσης K. Επώαση στους 37°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, 2,5 μl από την παραπάνω αντίδραση προσθέτονται σε έτοιμα δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5α.(χρησιμοποιείτε και ένα επιπλέον σωληνάκι με έτοιμα δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5α ως αρνητικό μάρτυρα). Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Μεταφορά στους 42°C για 50 δευτερόλεπτα και πάλι στον πάγο. Ενώ βρίσκονται στον πάγο προστίθενται 920μl LB και επωάζονται για 45 λεπτά στους 37°C. Σύντομη φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα και αφαίρεση 800μl. Τα υπόλοιπα 200μl επιστρώνονται σε τρυβλία LB με 10μg/ml αντιβιοτικού γενταμικίνης. Επώαση στους 37°C όλο το βράδυ.

2.4:ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΣΕ ΥΓΡΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ LB

Από τα τρυβλία στα οποία παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών ακολούθησε απομόνωση και ανάπτυξη σε υγρή καλλιέργεια LB. Η διαδικασία απομόνωσης είναι η παρακάτω: άναμμα της φλόγα από το γκαζάκι και σημείωση της αποικία που είναι επιθυμητή για απομόνωση, άνοιγμα του τρυβλίου προσεκτικά κοντά στη φωτιά και απομόνωση της αποικίας με τη βοήθεια μιας πιπέτας. Στη συνέχεια, το tip τοποθετείται μέσα στο σωληνάκι με τα 5 ml LB με 10 μg/ml γενταμικίνης. Ακολουθεί επώαση όλο το βράδυ στους 37°C στα 210rpm.

2.5:ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ENTRY CLONE ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΕΨΗΣ ΓΙΑ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΥΧΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *LSK1* ΜΕ ΤΟΝ ΦΟΡΕΑ pDONR 207

Στις υγρές καλλιέργειες στις οποίες παρατηρήθηκε ανάπτυξη ακολούθησε εκ νέου απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση όπως στην παράγραφο 2.1. Για την επιβεβαίωση του φορέα ακολούθησε πέψη από το NEB cloner με τελικό όγκο 25μl. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα EcoRV και BamHI, τα οποία κόβουν από μία φορά το καθένα. Το ένζυμο EcoRV κόβει τον φορέα ενώ το BamHI το γονίδιο *LSK1*. Σε σωληνάκια των 1,5 ml προσθέτονται 2 μl από το πλασμίδιο που απομονώθηκε, 2,5 μl NEB Buffer 3.1, 0.5 μl από κάθε περιοριστικό ένζυμο και 19,5 μl υπερκάθαρο αποστειρωμένο H₂O. Ακολουθεί επώαση για 2 ώρες στους 37°C. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 0.8%, χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους 2-log DNA ladder της NewEnglandBiolabs.

2.6:ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΦΟΡΕΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ pUB-HYG ΜΕΣΩ ΤΗΣ LR ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Μέσω της αντίδρασης κλωνάσης LR πραγματοποιείται η μεταφορά του γονιδίου *LSK1 stop* στον φορέα υπερέκφρασης pUB-HYG (Maekawa *et al.*, 2008). Για κάθε μία από τις υγρές καλλιέργειες στις οποίες υπήρξε ανάπτυξη πραγματοποιείται αντίδραση κλωνάσης. Συγκεκριμένα, σε κάθε σωληνάκι των 1,5ml προσθέτετε 1 μl από την αντίστοιχη υγρή καλλιέργεια, 1 μl από τον φορέα pUB-HYG, 1 μl από το ένζυμο LR κλωνάση και 2 μl υπερκάθαρο αποστειρωμένο H₂O. Χρησιμοποιείται ένα σωληνάκι των 1,5 ml για θετικό μάρτυρα προσθέτοντας τις ίδιες ποσότητες με την μόνη διαφορά ότι αντί για 1 μl υγρής καλλιέργειας προσθέτετε 1 μl pENTR-gus. Ακολουθεί επώαση στους 25°C για 48 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης επακολουθεί ο μετασχηματισμός όπου 2,5 μl από την παραπάνω αντίδραση προσθέτονται σε έτοιμα δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5α.(χρησιμοποιείται και ένα επιπλέον σωληνάκι με έτοιμα δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5α ως αρνητικό μάρτυρα). Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Μεταφορά στους 42°C για 50 δευτερόλεπτα και πάλι στον πάγο. Ενώ βρίσκονται στον πάγο προστίθενται 920μl LB και επωάζονται για 45 λεπτά στους 37°C. Φυγοκέντρηση για 30 δεύτερα και αφαίρεση 800μl. Τα υπόλοιπα 200μl επιστρώνονται σε τρυβλία LB με 50μg/ml αντιβιοτικού καναμικίνης. Επώαση στους 37°C όλο το βράδυ. Εν συνεχεία, αναπτύσσετε τις αποικίες που δημιουργήθηκαν στα τρυβλία σε υγρές καλλιέργειες LB με 50μg/ml αντιβιοτικού καναμικίνης με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παράγραφο 2.4. Αν μετά από 48 ώρες επώαση στους 37°C παρατηρείται ανάπτυξη, επιβεβαιώνεται η ανάπτυξη των σωστά μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli*.

2.7:ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΦΟΡΕΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΕΨΗΣ ΓΙΑ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΥΧΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *LSK1* ΜΕ ΤΟΝ ΦΟΡΕΑ *pUB-GW-HYG*

Στις υγρές καλλιέργειες στις οποίες παρατηρήθηκε ανάπτυξη ακολούθησε εκ νέου απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση όπως στην παράγραφο 2.1. Για την επιβεβαίωση του φορέα ακολούθησε πέψη σύμφωνα με το πρωτόκολλο NEB cloneer με τελικό όγκο 25μl. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα PstI-HF και BamHI-HF, τα οποία κόβουν από μία φορά το καθένα. Το ένζυμο PstI-HF κόβει τον φορέα ενώ το BamHI-HF το γονίδιο *LSK1*. Σε σωληνάκια των 1,5 ml προσθέτετε 2 μl από το πλασμίδιο που απομονώθηκε, 2,5 μl Buffer Cut Smart, 0.5 μl από κάθε περιοριστικό ένζυμο και 19,5 μl υπερκάρθαρo αποστειρωμένο H₂O. Ακολουθεί επώαση για 2 ώρες στους 37°C. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτική αгарόζης 1%, χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους 2-log DNA ladder της New England Biolabs.

2.8:ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΦΟΡΕΑ ΥΠΕΚΕΦΡΑΣΗΣ *LSK1 STOP IN pUB-HYG* ΣΤΟ *AGROBACTERIUM* ΓΙΑ ΜΕΤΕΠΕΙΤΑ ΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Αρχικά, προετοιμάστηκε μία προ-καλλιέργεια του στελέχους LBA1334 του *Agrobacterium*. Ανάπτυξη του στελέχους LBA1334 (Rifampicin 15-25μgml⁻¹, Spectinomycin 100μgml⁻¹) σε 5ml LB θρεπτικού μέσου συν αντιβιοτικό για 48 ώρες στους 28°C. Προσθήκη 2ml από αυτήν την καλλιέργεια σε 50ml LB μέσα σε μία φλάσκα των 250ml και επώαση στους 28°C με γρήγορη ανάδευση μέχρι να φτάσει η τιμή OD₆₀₀=0.5-1.0. Στη συνέχεια τοποθέτηση των καλλιεργειών στον πάγο. Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 λεπτά στους 4°C στα 3000g. Τέλος, επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1ml διαλύματος CaCl₂ τελικής συγκέντρωσης 20mM. Σε 10 σωληνάκια των 1,5ml προσθέτοντας στο καθένα 0,1ml από το διάλυμα των κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά ψύχονται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80 °C. Ο μετασχηματισμός γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο Freeze-Thaw. Σε έτοιμα δεκτικά κύτταρα LBA 1334 προστίθενται 1μg του πλασμιδιακού DNA και παγώνονται σε υγρό άζωτο. Επώαση των κυττάρων στους 37°C για 5 λεπτά μέχρι τα κύτταρα να λιώσουν. Προσθήκη 1ml LB θρεπτικό στα κύτταρα και επώαση στους 28°C για 4 ώρες στα 180 rpm. Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στα 11000g. Αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση των κυττάρων με 0,1ml LB θρεπτικό μέσο. Τέλος, επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία με LB άγαρ θρεπτικό με 50μg/ml αντιβιοτικού καναμυκίνης και 100μg/ml αντιβιοτικού στρεπταμυκίνης.

Σφράγιση των τριβλίων με πάραφιλμ και επώαση στους 28°C για 2-3 μέρες. Μετά το πέρας των 3 ημερών θα παρατηρείτε την ανάπτυξη αποικιών. Ακολούθησε απομόνωση των αποικιών που αναπτύχθηκαν και ανάπτυξη τους σε υγρό θρεπτικό μέσο LB με 50μg/ml αντιβιοτικού καναμυκίνης με 100 μg/ml αντιβιοτικού στρεπταμυκίνης. Από τις υγρές καλλιέργειες που παρατηρήθηκε ανάπτυξη δημιουργήθηκαν stock γλυκερόλης των φορέων υπερέκφρασης. Η διαδικασία είναι η εξής: σε ένα σωληνάκι των 1,5ml προσθέτετε 700μl υγρής καλλιέργειας και 300μl γλυκερόλης. Η διαδικασία πραγματοποιείτε κοντά σε αναμμένο γκαζάκι και έπειτα τα κύτταρα τα παγώνετε σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80°C.

2.9: ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Lotus japonicus* ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334

Περίπου 300 σπόροι *L. japonicus* ποικιλίας Gifu χωρισμένοι σε 4 σωλήνες τύπου errendorf 1,5ml, αρχικά εμβαπτίστηκαν σε πυκνό H₂SO₄ για 10 λεπτά, ακολούθησε 3 φορές έκπλυση με 1ml παγωμένο dH₂O και επιφανειακή απολύμανση με προσθήκη 1 ml BUF I (20% χλωρίνη , 0,1% Tween 20). Οι σπόροι παρέμειναν στο διάλυμα χλωρίνης για 20 λεπτά υπό συνεχή, ήπια, ανάδευση. Έπειτα ακολούθησαν 6 πλύσεις με 1ml ddH₂O. Μετά τις πλύσεις προστέθηκε επιπλέον αποστειρωμένο νερό στο οποίο οι σπόροι παραμείνανε 24 ώρες στους 4°C τυλιγμένα με αλουμινόχαρτο. Την επόμενη ημέρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία με 0,8% water agar- 30 σπόρους σε κάθε τρυβλίο. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm και οι σπόροι παρέμειναν για ένα βράδυ στους 4°C τυλιγμένα με αλουμινόχαρτο. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής. Οι σπόροι την επόμενη μέρα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (16h φως/8h σκοτάδι, 23°C) και τοποθετήθηκαν κάθετα για 2 επιπλέον ημέρες. Έπειτα αφαιρέθηκε το αλουμινόχαρτο από τα τρυβλία.

Παράλληλα έγινε η ανάπτυξη καλλιεργειών του *A. rhizogenes* για την μόλυνση των φυτών. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 2 στελέχη του βακτηρίου, ένα με άδειο φορέα ρUB-GW-HYG (Maekawa *et al.*, 2008), με το οποίο μολύνθηκαν τα φυτά μάρτυρες (control) και ένα με τον φορέα ρUB-LSK1stop4-HYG με τον οποίο μολύνθηκαν τα φυτά με την υπερέκφραση.

Αρχικά έγινε επίστρωση των επιθυμητών ήδη μετασχηματισμένων στελεχών *A. rhizogenes* σε θρεπτικό υπόστωμα LB με τα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη (250μg/ml) και καναμυκίνη (50μg/ml) για επιλογή των δυαδικών πλασμιδίων. Τα τρυβλία αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 3 ημέρες στους 28°C και 120rpm. Μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων επιλέχθηκαν μεμονωμένες αποικίες με τις οποίες εμβολιάστηκαν υγρές καλλιέργειες LB που περιείχαν τα αντιβιοτικά

στρεπτομυκίνη και καναμυκίνη σε τελικές συγκεντρώσεις 100μg/ml. Οι υγρές καλλιέργειες αφέθηκαν για επώαση 2 ημέρες στους 28°C υπό συνεχή ανάδευση (120rpm). Μια ημέρα πριν την μόλυνση των φυτών, 500μL από την κάθε καλλιέργεια επιστρώθηκαν εκ νέου σε τρυβλία με LB με καναμυκίνη (50μg/ml) και στρεπτομυκίνη (250μg/ml)– 1 τριβλίο για κάθε 15 φυτά. Τα τρυβλία αφέθηκαν για ανάπτυξη στους 28°C μέχρι την μόλυνση

Η διαδικασία της μόλυνσης πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής. Στα τρυβλία με τα ανεπτυγμένα βακτήρια προστέθηκαν 2-4ml αποστειρωμένου dH₂O, προκειμένου να δημιουργηθεί ένα γαλακτώδες διάλυμα. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε σε άδειο τρυβλίο Petri που περιείχε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί. Στο ίδιο τρυβλίο μεταφέρονταν τα φυτά που είχαν αναπτύξει ικανοποιητικό μέγεθος ρίζας (περίπου 1cm). Αφού κοβόταν η ρίζα τους λίγο κάτω από το υποκοτύλιο στη μεταβατική ζώνη μεταξύ βλαστού και ρίζας, ακολουθούσε ελαφριά πίεση του σημείου τραυματισμού με τη λαβίδα. Μετά από περίπου 5 λεπτά παραμονής στο τρυβλίο με το βακτήριο, τα φυτά μεταφέρονταν σε νέα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα ½ x MS. Τα τρυβλία με τα μολυσμένα φυτά, καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο για 2 ημέρες και τοποθετήθηκαν οριζόντια στο θάλαμο ανάπτυξης. Μετά τις 2 ημέρες αφαιρέθηκε το αλουμινόχαρτο και εκτέθηκαν σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης. Από τον συνολικό αριθμό φυτών χρησιμοποιήθηκαν τα μισά για κάθε μεταχείριση.

Μετά από συνολικά 5 ημέρες συγκαλλιέργειας με το βακτήριο, έγινε μεταφορά σε φρέσκο θρεπτικό ½ x MS με 300μg/ml σεφοταξάμη. Μετά από μια εβδομάδα στο παραπάνω θρεπτικό, ακολούθησε νέα μεταφορά σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα ½ x MS με 300μg/ml σεφοταξάμη στο οποίο παρέμειναν επιπλέον μια εβδομάδα πριν τη φύτευσή τους.

Φυτά με αναγεννημένες ρίζες μεταφέρθηκαν σε γλάστρες που περιείχαν άμμο με βερμικουλίτη σε αναλογία 2 προς 1, το οποίο είχε αποστειρωθεί στους 121°C για 30 λεπτά. Σε κάθε γλάστρα φυτεύτηκε ένα φυτό. Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης και ποτίστηκαν με 50% θρεπτικό διάλυμα Hoagland (με άζωτο) μια φορά πριν τη φύτευση και στη συνέχεια ποτίζονταν ανά 2 ημέρες εναλλάξ με θρεπτικό διάλυμα Hoagland, χωρίς άζωτο, ή με απιονισμένο νερό. Η ανάπτυξη των φυτών έγινε σε σταθερές συνθήκες μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος.

Πέντε ημέρες μετά την μεταφορά των φυτών σε γλάστρες έγινε ο εμβολιασμός με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* στέλεχος R7A. Καλλιέργεια του ριζοβίου που είχε αναπτυχθεί για 4 ημέρες σε υγρό θρεπτικό YMB με αντιβιοτικό επιλογής ρυμφαμπικίνη, αραιώθηκε σε αποστειρωμένο νερό μέχρι OD₆₀₀ 0,02. Οι ρίζες των φυτών εμβολιάστηκαν με 1 ml της αραιωμένης καλλιέργειας. Η εφαρμογή του εμβολίου έγινε με απευθείας ριζοπότισμα με τη χρήση πιπέτας.

Μετά από 3 εβδομάδες από την μόλυνση πραγματοποιείται η πρώτη δειγματοληψία. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε 3 φορές σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

2.10:ΣΥΛΛΟΓΗ ΦΥΤΩΝ

Από τον μετασχηματισμό επιβίωσαν μέχρι το τέλος του πειράματος και έπειτα από 21 μέρες μετά τον εμβολιασμό, 62 φυτά ελέγχου και 54 φυτά με υπερέκφραση της *LSK1*. Η συλλογή των ριζών έγινε με την εξής διαδικασία: προσεκτική αφαίρεση του φυτού από την γλάστρα, καθάρισμα της ρίζας με νερό ώστε να απομακρυνθούν όσο το δυνατόν καλύτερα τα υπολείμματα άμμου και βερμικουλίτη. Στη συνέχεια τοποθέτηση του φυτού σε μία φωτιζόμενη επιφάνεια και καταγραφή του μήκους της ρίζας Έπειτα, ζύγισμα των ριζών και αποθήκευση σε σωληνάκια των 1,5ml και τοποθέτηση σε υγρό άζωτο ώστε να παγώσουν. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C.

2.11:ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Οι ρίζες των φυτών που είχαν αποθηκευτεί στους -80°C λειοτριβήθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένου εμβόλου και μέρος του δείγματος χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση γενωμικού DNA με τη χρήση της μεθόδου CTAB ενώ το υπόλοιπο μέρος των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή ολικού RNA. Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε με το ISOLATE II RNA Plant Kit της BIOLINE.

Σύμφωνα με τη μέθοδο CTAB, σε λειοτριβημένα δείγματα προστέθηκαν 100μL προθερμασμένου (65°C) διαλύματος CTAB (100mM Tris-Cl pH=8.0, 20mM EDTA pH=8, 1,4M NaCl, 2% w/v CTAB, 1% w/v PVP 40000). Ακολούθησε προσθήκη 1μL β-μερκαπτοαιθανόλης και τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 65°C για 15 λεπτά με περιοδική ανάδευση. Έπειτα έγινε προσθήκη 150μL διαλύματος 1:25 ισοαμυλική αλκοόλη σε χλωροφόρμιο και ανάδευση με vortex για 30 δευτερόλεπτα. Ακολουθούσε: φυγοκέντρηση στις 13.000g για 5 λεπτά, μεταφορά της επάνω φάσης σε νέο σωλήνα erppendorf, προσθήκη 0,7X του όγκου του δείγματος ισοπροπανόλη, ήπια ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Έπειτα φυγοκέντρηση σε 13.000g για 15 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδύαση του pellet σε 500μl παγωμένη 70% αιθανόλη, φυγοκέντρηση στις 13.000g για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Ακολουθεί στέγνωμα του pellet που περιέχει το απομονωμένο DNA σε 50°C για 15 λεπτά. Η επαναδύαση του pellet έγινε σε 15μl υπερκάθαρου

αποστειρωμένου H₂O με RNase (1μl RNase σε 50μl ddH₂O). Επώαση στο πάγο για 10 λεπτά, vortex και quick spin για 10 δευτερόλεπτα.

2.12:ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΡΙΖΩΝ

Το γενωμικό DNA που εξήχθει με τη μέθοδο του CTAB χρησιμοποιείτε για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του T-DNA ενθέματος στις αναγεννημένες ρίζες. Η επιβεβαίωση έγινε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση εκκινητών για το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη που περιέχεται στο T-DNA ένθεμα. Οι εκκινητές είναι οι εξής: hygRTF: GACCAATGCGGAGCATATACG hygRTR: CAGCTTCGATGTAGGAGGGC. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του kit KAPATaqPCR της εταιρίας KAPABIOSYSTEMS. Ο σχεδιασμός της έγινε σύμφωνα με της οδηγίες του προμηθευτή: αρχική αποδιάταξη 95°C για 5', αποδιάταξη 95°C για 30'', υβριδισμός εκκινητών 58°C για 30'', επιμήκυνση 72°C για 40'', επανάληψη για 35 κύκλους και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5', σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μL. Το αναμενόμενο προϊόν ενίσχυσης ήταν περίπου 600bp.

2.13:ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

Το ολικό RNA που απομονώθηκε για κάθε δείγμα ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Qubit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή και υποβλήθηκε σε επεξεργασία με DNase προκειμένου να απομακρυνθούν οποιαδήποτε υπολλείματα γενωμικού DNA. Η κατεργασία έγινε με το kit DNase I, RNase-free της Thermo Fisher Scientific σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Μετά το πέρας της κατεργασίας ελέγχθηκε η παρουσία υπολειμμάτων DNA μέσω PCR με εκκινητές ειδικούς για το γενωμικό γονίδιο της *Ubiquitin* του *L. japonicus* με θερμοκρασία υβριδισμού (T_m) 56°C (Delis *etal.*, 2011). Οι εκκινητές είναι UBIF:5'-TTCCACCA TCCTGAAGGTTA-3' και UBIR:5'-CTTGAGCTTGTGGCCAGTAT-3'. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του kit της KAPABIOSYSTEMS όπως περιγράφεται στη προηγούμενη παράγραφο, με τη διαφορά της προσθήκης 1μL δείγματος ολικού RNA ως αρχική μήτρα, σε τελικό όγκο 20μL. Το πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης σχεδιάστηκε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή (αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5', αποδιάταξη στους 95°C για 30'', υβριδισμός εκκινητών στους 56°C για 30'', επιμήκυνση στους 72°C για 40'', επανάληψη για 30 κύκλους και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5'). Τα δείγματα ,στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε 1% πηκτή αγαρόζης με μάρτυρα μοριακού βάρους 2-log DNA ladder της εταιρείας NewEnglandBiolabs

Η σύνθεση της πρώτης αλυσίδας cDNA έγινε με χρήση του PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit της εταιρείας Takara σύμφωνα με της οδηγίες της εταιρείας.

2.14: ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (RT-qPCR)

Η μέτρηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *LSK1* έγινε με τη μέθοδο της ημιποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).

Η real-time PCR ή PCR πραγματικού χρόνου είναι μία ποσοτική αντίδραση PCR κατά την οποία η ενίσχυση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, διότι το προϊόν που παράγεται συνδέεται με τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη real-time PCR. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της ενίσχυσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά το ποσό του συντιθέμενου νέου DNA. Έτσι μπορεί να μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA. Ο προσδιορισμός της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων μπορεί να γίνει είτε με σχετική ποσοτικοποίηση μετρώντας παράλληλα και τη συγκέντρωση ενός γονιδίου αναφοράς είτε απόλυτα με τη χρήση πρότυπης καμπύλης.

Στην παρούσα εργασία η έκφραση του γονιδίου *LSK1* μετρήθηκε με σχετική ποσοτικοποίηση (RT-qPCR) μετρώντας τα αντίγραφα cDNA του γονιδίου στο ολικό cDNA που απομονώθηκε παράλληλα με τους τίτλους της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A (PP2A). Σε όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της ουβικουιτίνης του *L. japonicus*, χρησιμοποιώντας ως εμπρόσθιο εκκινητή UBQrtF: 5'-TTCACCTTGTGCTCCGTCTTC-3' και ως αντίστροφο UBQrtR: 5'- AACAACAGCACACAGCCAATCC-3' (Delis *et al.*, 2011) και το γονίδιο της PP2A με εμπρόσθιο εκκινητή PP2ArtF: 5'-GTAAATGCGTCTAAAGATAGGGTCC-3' και ως αντίστροφο PP2ArtR: 5'-ACTAGACTGTAGTGCTTGAGAGGC-3'.

Πριν την τελική αντίδραση qPCR έγινε έλεγχος της ποιότητας των cDNA μέσω realtimePCR με την ενίσχυση μόνο του cDNA της ουβικουιλίνης. Ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που θα φθάσει σε αυτό το κατώφλι χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct) Στόχος αυτής της πρώτης αντίδρασης qPCR είναι εκτός από τον έλεγχο της ποιότητας είναι και η επεξεργασία των δειγμάτων ώστε να έχουν όλα τον ίδιο περίπου αριθμό Ct (~24). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν περιείχονταν στο kit KAPA SYBR® FAST Master Mix 2X qPCR της εταιρίας KAPABIOSYSTEMS. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 1μL cDNA μήτρας και ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10μL. Οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων προστέθηκαν με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που έλαβε χώρα η αντίδραση σχεδιάστηκε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή, θέτωντας ως T_m τους 58°C και επανάληψη των βημάτων της αποδιάταξης (95°C για 15"), υβριδισμού των εκκινητών (58°C για 20") και επιμήκυνσης (72°C για 11") για 40 κύκλους. Για τη μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου LSK1 χρησιμοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις από κάθε δείγμα με τους εκκινητές LSK1-1 και 2 τεχνικές επαναλήψεις με τους εκκινητές PP2A. Οι εκκινητές της LSK1-1 είναι LSK1qRTF: 5'-CCTATTGGTTAATCCCCAGACA-3' και LSK1qRTR:5'-ACAACCAACAGACCACATATCG-3'.

2.15:ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

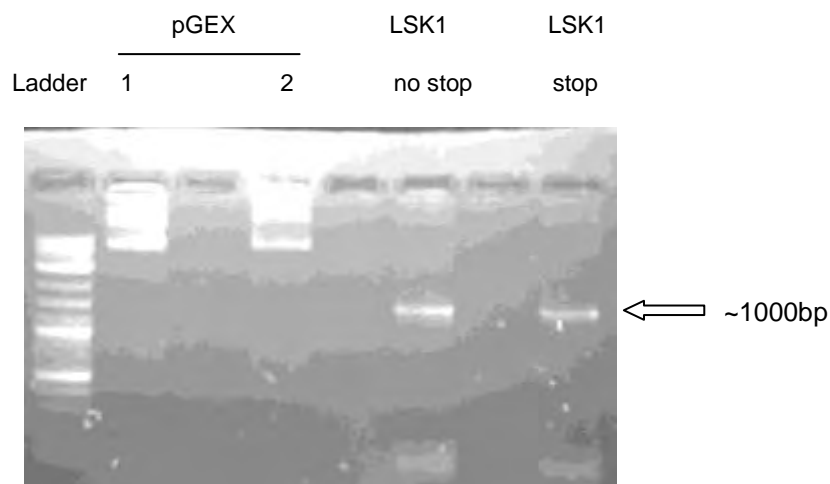
Η ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Excel και του προγράμματος StatPlus.

Ο υπολογισμός της σχετικής έκφρασης των μεταγράφων μέσω qRT PCR, έγινε μετά από κανονικοποίηση με τον γεωμετρικό μέσω του τίτλου έκφρασης των γονιδίων αναφοράς της UBQ και PP2A. Η τιμή δείχνει το λόγο (U) της έκφρασης των δύο γονιδίων, ως $(1+E)^{-\Delta\text{Ct}}$ όπου $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}^X - \text{Ct}^U$ (Livak & Schmittigen, 2001). Η απόδοση της αντίδρασης (E) ορίστηκε ως 1. Για την κάθε τιμή υπολογίζεται ο μέσος όρος των δύο τεχνικών επαναλήψεων καθώς και η τυπική απόκλιση.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1:ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΗΣ *LSK1* ΜΕΣΩ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

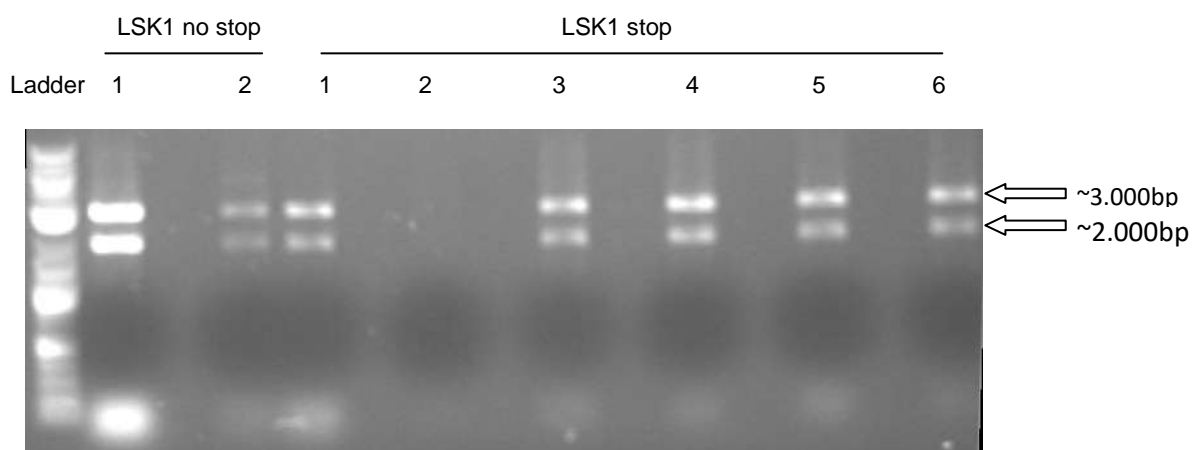
Με στόχο την υπο-κλωνοποίηση της σε δυαδικό φορέα υπερέκφρασης σε φυτά, η αλληλουχία της *LSK1* (κλωνοποιημένη στο φορέα pGEX, Ψαράκου Ι. Μεταπτυχιακή Διατριβή, 2013, Garagounis et al., unpublished), απομονώθηκε από καλλιέργεια *E. coli* με αλκαλική λύση και στη συνέχεια ενισχύθηκε με εκκινητές που εισήγαγαν στα 5' και 3' άκρα τις αλληλουχίες attB1 και attB2, αντίστοιχα, για να χρησιμοποιηθεί σε κλωνοποίηση με την τεχνολογία Gateway. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση, με κατάλληλο μάρτυρα μοριακού βάρους, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται παρακάτω στην Εικόνα 3.1 και είναι ~1000bp όπως ήταν αναμενόμενο. Τα δύο πρώτα δείγματα αντιστοιχούν στον πλασμιδιακό φορέα pGEX που απομονώθηκε με αλκαλική λύση, ενώ τα άλλα δύο δείγματα αντιστοιχούν στην ενίσχυση της αλληλουχίας *LSK1*. Το δείγμα 3 δεν περιέχει κωδικόνιο λήξης ενώ το δείγμα 4 περιέχει κωδικόνιο λήξης.



Εικόνα 3.1: Ενίσχυση αλληλουχίας της *LSK1* εισάγοντας στα άκρα attB αλληλουχίες για χρήση στη τεχνολογία Gateway cloning μέσω αντίδρασης PCR. Θέση 1: πλασμιδιακός φορέας pGEX:LSK1-1, θέση 2: πλασμιδιακός φορέας pGEX:LSK1-2, θέση 3: προϊόν ενίσχυσης της *LSK1* χωρίς κωδικόνιο λήξης, θέση 4: προϊόν ενίσχυσης της *LSK1* με κωδικόνιο λήξης. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1%.

3.2:ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΕΨΕΙΣ ΣΤΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ pDONR207-*LSK1*STOP ΚΑΙ pDONR207-*LSK1*NOSTOP.

Αρχικά έγινε απομόνωση του φορέα pDONR207 και ανάπτυξη σε υγρές καλλιέργειες LB με σκοπό την κατασκευή ενός πλασμιδιακού φορέα Entry. Η μία καλλιέργεια περιείχε το αντιβιοτικό γενταμικίνη με τελική συγκέντρωση 10μg/ml ενώ η δεύτερη καλλιέργεια περιείχε εκτός από γενταμικίνη και χλωραμφενικόλη με τελική συγκέντρωση 25μg/ml. Μετά την αντίδραση BP-κλωνάσης μεταξύ του φορέα pDONR207 και της αλληλουχίας *LSK1*, έγινε επιτυχώς ο μετασχηματισμός *E. coli* στέλεχος DH5α και επιλογή σε γενταμικίνη. Ακολούθησαν αντιδράσεις διαγνωστικών πέψεων στα απομονωμένα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη της αλληλουχίας της *LSK1* στον φορέα pDONR207. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το EcoRV και το BamHI, τα οποία κόβουν την κατασκευή από μία φορά το καθένα. Το EcoRV κόβει τον φορέα ενώ το BamHI εντός του γονιδίου *LSK1*. Το αποτέλεσμα των διαγνωστικών πέψεων σε πηκτή αγαρόζης έδειξε ότι η αλληλουχία *LSK1*, ενσωματώθηκε επιτυχώς, καθώς η πέψη του κάθε πλασμιδίου έδωσε 2 ζώνες στα μεγέθη 3.000 και 2.000bp, όπως υποδεικνύονται με βέλη στην Εικόνα 3.2. Δύο πλασμίδια από αυτά ελέγχθηκαν με αλληλούχιση πριν να χρησιμοποιηθούν παρακάτω, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι δεν προέκυψαν τυχαίες μεταλλάξεις στην κωδική αλληλουχία της *LSK1*.

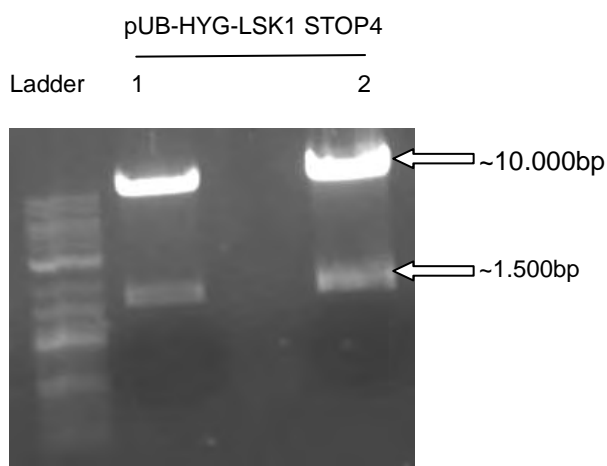


Εικόνα 3.2: Αποτελέσματα διαγνωστικών πέψεων των pDONR207-LSK1stop και pDONR207-LSK1nostop. Θέση 1: Μάρτυρας Μοριακού Βάρους, θέσεις 2,3: pDONR207-LSK1nostop 1,2, θέσεις 4,5,6,7,8,9: pDONR207-LSK1stop 1, 2, 3, 4, 5, 6. Αποτελέσματα σε πηκτή αγαρόζης 1%.

3.3:ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΕΨΕΙΣ ΣΤΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ pUB-HYG-LSK1STOP4 ΚΑΙ pUB-HYG-LSK1STOP5

Ακολούθησε αντίδραση LR-κλωνάσης μεταξύ του φορέα υπερέκφρασης pUB-HYG και του φορέα pDONR207-*LSK1stop4* με σκοπό την μεταφορά του

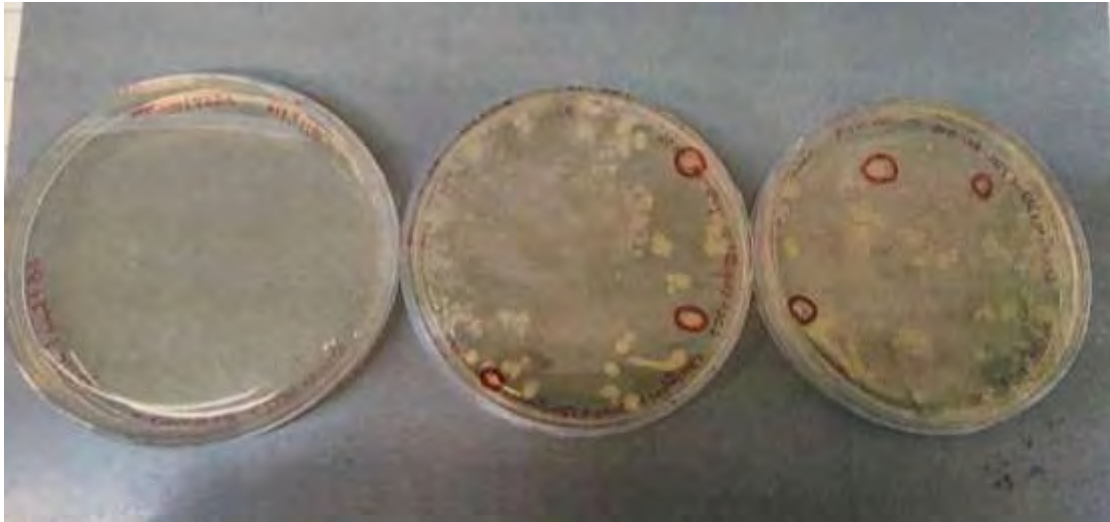
γονιδίου *LSK1* στον φορέα υπερέκφρασης. Έγινε επιτυχώς ο μετασχηματισμός βακτηρίων DH5a. Ακολούθησαν αντιδράσεις διαγνωστικών πέψεων, για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη της αλληλουχίας *LSK1* στον φορέα ρUB-HYG. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το BamHI-HF και το PstI-HF. Το BamHI-HF κόβει το γονίδιο *LSK1* και το PstI-HF κόβει τον φορέα ρUB-HYG. Το αποτέλεσμα των διαγνωστικών πέψεων σε πηκτική αгарόζης 1% έδειξε ότι η αλληλουχία *LSK1* ενσωματώθηκε επιτυχώς όπως φαίνεται παρακάτω στην Εικόνα 3.3 καθώς η πέψη του κάθε πλασμιδίου έδωσε 2 ζώνες στα μεγέθη 10.000bp και 1.500bp που περιμέναμε, τα οποία υποδεικνύονται με βέλη στην Εικόνα 3.3.



Εικόνα 3.3: Αποτελέσματα διαγνωστικών πέψεων των ρUB-HYG-LSK1STOP4 /1 και ρUB-HYG-LSK1STOP4 /2. Θέση 1: Μάρτυρας Μοριακού Βάρους, θέση 2: ρUB-HYG-LSK1STOP4 /1 και θέση 3: ρUB-HYG-LSK1STOP4 /2. Αποτελέσματα σε πηκτική αгарόζης 1%.

3.4:ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΦΟΡΕΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ LSK1STOP IN ρUB-HYG ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ *Agrobacterium* LBA1334.

Ο μετασχηματισμός του φορέα υπερέκφρασης LSK1STOP in ρUB-HYG στο στέλεχος του *A. rhizogenes* LBA1334 έγινε με τη μέθοδο Freeze-Thaw. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε τρυβλία LB με καναμυκίνη (50μg/ml) και στρεπτομυκίνη (100μg/ml) τα οποία επιλέγουν τον ρUB και το βοηθητικό, “helper” πλασμίδιο του αγροβακτηρίου, αντίστοιχα (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4: Ανάπτυξη των αποικιών αγροβακτηρίου μετά απο 3 μέρες στους 28°C σε τρυβλία LB με καναμυκίνη (50μg/ml) και στρεπτομυκίνη (100μg/ml). Το πρώτο τρυβλίο είναι ο αρνητικός μάρτυρας (μη μετασχηματισμένο αγροβακτήριο).

3.5:ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *L. japonicus* ΜΕ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *A. rhizogenes* LBA1334

Φυτά *L. japonicus* ηλικίας μιας εβδομάδας, τραυματίστηκαν μέσω αποκοπής της πρωτογενούς ρίζας (Handberg & Stougaard, 1992, Stiller *et al.*, 1997, Martirani *et al.*, 1999) και μολύνθηκαν με το στέλεχος *A. rhizogenes* LBA1334 που έφερε τον άδειο δυαδικό φορέα pUB-GW-HYG για τα φυτά μάρτυρες (control) και pUB-LSK1-HYG για υπερέκφραση της *LSK1*. Μετά από αναγέννηση ριζών στα μολυσμένα φυτά (Εικόνα 3.5) για τρεις εβδομάδες έγινε μεταφορά σε γλάστρες με άμμο και βερμικουλίτη και μόλυνση με ριζόβιο *Mesorhizobium loti* R7A WT.

Συνολικά, δημιουργήθηκαν/συλλέχθηκαν 62 control και 54 LSK1 overexpression φυτά με αναγεννημένη ρίζα. Την ημέρα της συλλογής, οι ρίζες των φυτών ελέγχθηκαν κάτω από στερεοσκόπιο για την ανίχνευση ή μη φυματίων. Στην Εικόνα 3.6 παρουσιάζονται ενδεικτικές φωτογραφίες φυτών την ημέρα της συλλογής τους και των φυματίων τους κάτω από το στερεοσκόπιο.

A.



B.



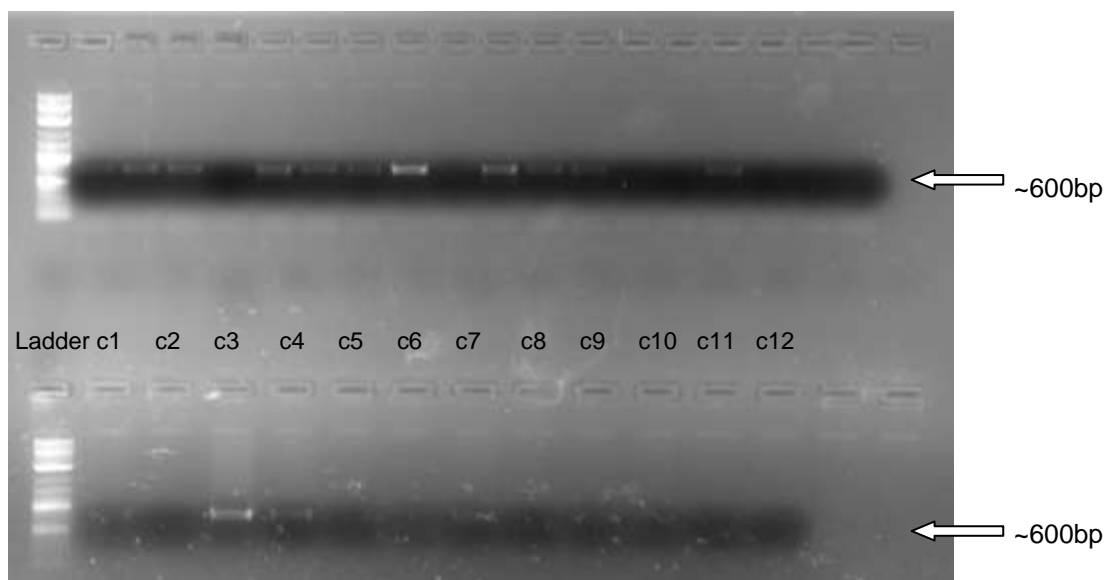
Εικόνα 3.5: Φυτά μετασηματισμένα με τον δυαδικό φορέα υπερέφρασης *LSK1 stop4* in *pUB-HYG* (A) και με τον άδειο δυαδικό φορέα *pUB-GW-HYG* (control) (B) που αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο $\frac{1}{2}$ x MS + 300 μ g/ml σεφοταξάμη. Παρατηρείται ο φαινότυπος “Hairy Roots” στις αναγεννημένες ρίζες 14 ημέρες μετά την μόλυσή τους με το αγροβακτήριο.

Η ένθεση του T-DNA στις αναγεννημένες ρίζες ελέγχθηκε με PCR μετά από απομόνωση του DNA. Στην αντίδραση συμπεριλήφθηκαν όλα τα δείγματα. Εκτός από το DNA που απομονώθηκε από τα δείγματα στην αντίδραση συμπεριλήφθηκαν ένας αρνητικός και ένας θετικός μάρτυρας . Στον αρνητικό προστέθηκε μόνο νερό, αντί για DNA. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο πλασμίδιο pUB. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3.7, όπου τα περισσότερα δείγματα ήταν θετικά για το ένθεμα. Το προϊόν της αντίδρασης εμφανίστηκε περίπου στα 600bp, όπως ήταν αναμενόμενο.

Ladder (+) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



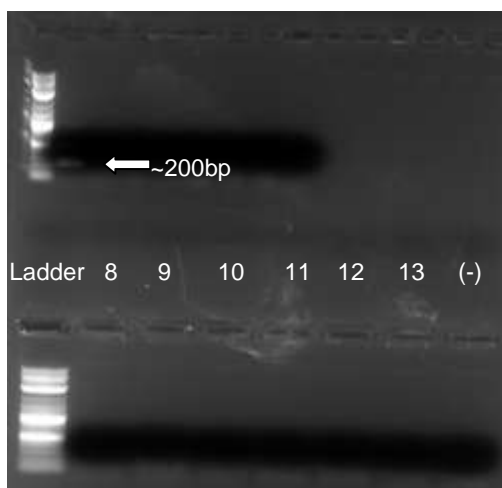
Ladder 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 (-)



Εικόνα 3.7: Αποτελέσματα της PCR για την ανεύρεση των φυτών που μετασηματίστηκαν επιτυχώς με τον φορέα υπερέκφρασης. Ladder: μάρτυρας μοριακού βάρους, θέση 2: θετικός μάρτυρας, θέσεις 3-20, 22-38: φυτά μετασηματισμένα με τον φορέα υπερέκφρασης *LSK1*, θέση 39: αρνητικός μάρτυρας και θέσεις 41-53: φυτά control. Αποτελέσματα σε πηκτή αгарόζης 1%.

Στη συνέχεια έγινε απομόνωση RNA για να ακολουθήσει cDNA σύνθεση. Η επιβεβαίωση απαλοιφής του γενωμικού DNA από τα δείγματα RNA έγινε με PCR με εκκινητές γονιδιωματικού DNA ουβικουϊνής. Εφόσον έχει αφαιρεθεί επιτυχώς το γονιδιωματικό DNA στις ηλεκτροφορήσεις δεν αναμένεται καμία ζώνη μετά από αυτή την PCR. Γεγονός που επιβεβαιώθηκε (Εικόνα 3.8).

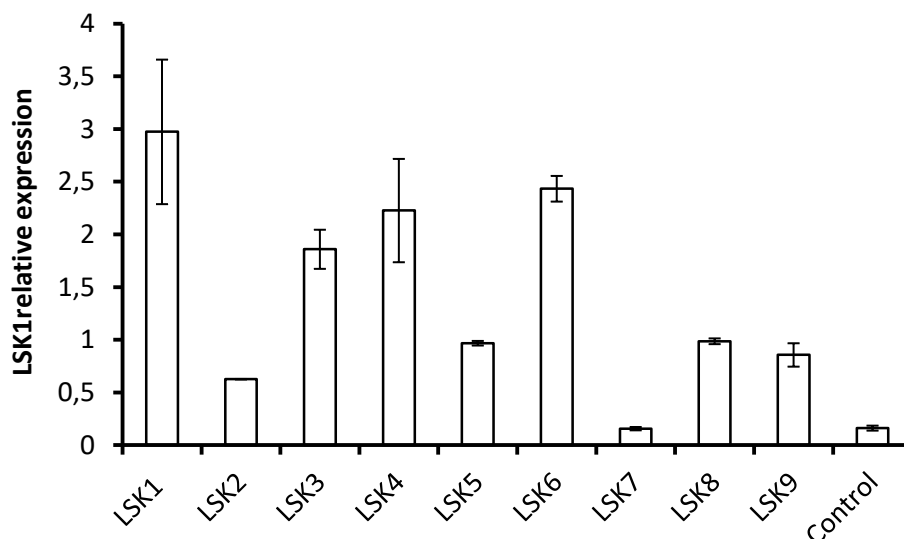
Ladder + 1 2 3 4 5 6 7



Εικόνα 3.8: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για την επιβεβαίωση απομάκρυνσης DNA από δείγματα RNA. Θέση 1, 10: μάρτυρας μοριακού βάρους, θέση 2: θετικός μάρτυρας (δείγμα γενωμικού DNA), θέση 3-9, 11-16: δείγματα RNA μετά από επεξεργασία με DNase I , θέση 17: αρνητικός μάρτυρας. Αποτελέσματα σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Τέλος, η σχετική έκφραση του mRNA του γονιδίου *LSK1* στα φυτά μάρτυρες και στις σειρές υπερέκφρασης επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο της Real-Time PCR. Με την ταυτόχρονη μέτρηση των επιπέδων των γονιδίων της PP2A (protein phosphatase 2A) και της UBQ (ubiquitin) στα ίδια δείγματα έγινε κανονικοποίηση του αριθμού των μεταγράφων του *LSK1* στο κάθε δείγμα. Η ανάλυση έδειξε σημαντικά αυξημένη σχετική έκφραση του γονιδίου της *LSK1* στις ρίζες κάποιων φυτών που μετασχηματίστηκαν με τον φορέα υπερέκφρασης. Στην Εικόνα 3.9 παρουσιάζονται αυτά τα αποτελέσματα σε κάποια από τα δείγματα που ελέγχθηκαν. Σημειώνεται ότι δεν επιτεύχθηκε σε όλες τις ρίζες υπερέκφραση του *LSK1* στον ίδιο βαθμό καθώς επίσης και ότι κάποια φυτά είχαν μικρότερη ή και ίση σχετική έκφραση με το μέσο όρο των φυτών ελέγχου. Παράδειγμα, όπως φαίνεται και στο γράφημα τα φυτά 1,3,4,6 έχουν πολύ αυξημένα τα επίπεδα έκφρασης της *LSK1*, τα φυτά 2,5,9 λιγότερο

αυξημένα, ενώ το φυτό 7 παρουσιάζει φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης *LSK1*. Με το ίδιο τρόπο ελέγχθηκε η σχετική έκφραση της *LSK1* σε όλα τα μετασχηματισμένα φυτά. Τα συνολικά αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 1. Συνολικά μολύνθηκαν και έδωσαν αναγεννημένες ρίζες 62 φυτά εκ των οποίων ελέγχθηκαν τα 22 με την κατασκευή μάρτυρα και 54 φυτά με την κατασκευή υπερέκφρασης με ποσοστό % μετασχηματισμού 54% και 55%, αντίστοιχα. Από αυτά ανιχνεύθηκαν 12 και 30 φυτά μετασχηματισμένα με την κατασκευή μάρτυρα και την κατασκευή υπερέκφρασης *LSK1* αντίστοιχα. Από τα τελευταία, τα 11 είναι μετασχηματισμένα φυτά με αυξημένα επίπεδα *LSK1* σε σχέση με τα φυτά ελέγχου (Πίνακας 1).



Εικόνα 3.9: Σχετική έκφραση του γονιδίου *LSK1* σε ρίζες control φυτών και φυτών που μετασχηματίστηκαν με τον φορέα υπερέκφρασης *LSK1* in pUB-HYG που μετρήθηκε με τη μέθοδο της RT-qPCR. Για τα control φυτά παρουσιάζεται ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση τριών βιολογικών δειγμάτων ($n=3$), για τα υπόλοιπα ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση δύο τεχνικών επαναλήψεων της RT-qPCR.

	Φυτά που μολύνθηκαν	Φυτά που επιβίωσαν μέχρι την δειγματοληψία	Ποσοστό μετασχηματισμού	Φυτά με υπερέκφραση της LSK1
Ελέγχου (Control)	66	62	54%	-
LSK1	60	54	55%	11

Πίνακας 1: Συνοπτικά αποτελέσματα του μετασχηματισμού Hairy root και ο τελικός αριθμός των φυτών με υπερέκφραση του γονιδίου *LSK1*.

A.
LSK1 overexpression



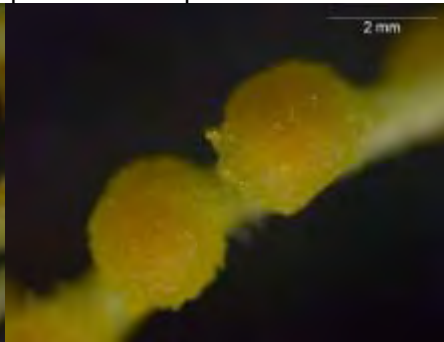
Control



B. α. Control



β. LSK1 overexpression



α.

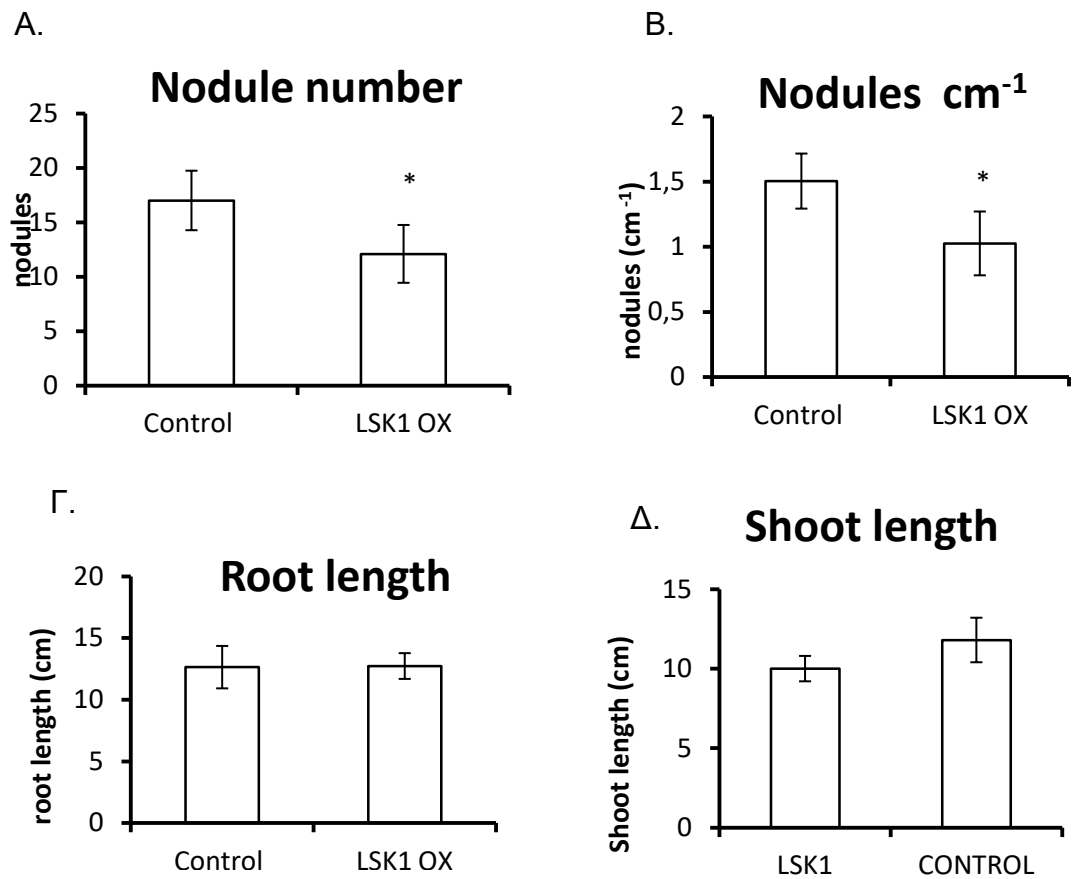


β.



Εικόνα 3.10: Α) ολόκληρα φυτά την μέρα της συλλογής τους και ένδειξη του μήκους της ρίζας τους. Β) φωτογραφίες των φυματίων κάτω από το στερεοσκόπιο. Τα φυτά στις εικόνες (α) είναι φυτά ελέγχου ενώ τα φυτά στις εικόνες (β) είναι μετασχηματισμένα φυτά με υπερέκφραση του *LSK1*.

Τέλος, έγινε σύγκριση μεταξύ του μέσου όρου του μήκους της ρίζας, του απόλυτου αριθμού φυματίων, του μήκους του βλαστού καθώς και του αριθμού φυματίων ανά εκατοστό ρίζας των φυτών, τα οποία είχαν αυξημένα επίπεδα του γονιδίου *LSK1* και του μέσου όρου των φυτών ελέγχου. Όπως φαίνεται στα γραφήματα της Εικόνας 3.11, φυτά με αυξημένη έκφραση του *LSK1* είχαν σημαντικά μειωμένο αριθμό φυματίων σε σχέση με τα control φυτά, τόσο ως απόλυτο αριθμό φυματίων ανά ρίζα όσο και ως αριθμό φυματίων ανά εκατοστό ρίζας, με τα control φυτά να παρουσιάζουν μεγαλύτερο αριθμό φυματίων. Επίσης, έγινε κανονικοποίηση του αριθμού των φυματίων ως προς το μήκος της ρίζας. Στο διάγραμμα κανονικοποίησης των φυματίων ως προς το μήκος της ρίζας φαίνεται και πάλι ότι στα control φυτά ο αριθμός των φυματίων είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τα φυτά υπερέκφρασης. Στο γράφημα του μέσου όρου του μήκους του βλαστού δεν φαίνεται κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κατασκευών. Να τονιστεί ότι η εξωτερική μορφολογία των φυματίων δεν διέφερε μεταξύ των control και των υπερεκφρασμένων φυτών και παρουσίαζαν το χαρακτηριστικό ροζ χρώμα των λειτουργικών φυματίων ενώ μερικά φυτά και των δυο κατηγοριών διέθεταν πέραν των ροζ φυματίων και λευκά/κίτρινα φυμάτια. Επίσης ο βλαστός τους παρουσίαζε υγιή χαρακτηριστικά, με πράσινο χρώμα και κανονική εμφάνιση (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11: Μέσος αριθμός φυματίων ανά ρίζα (Α), μέσος αριθμός φυματίων ανά εκατοστό ρίζας (Β), μέσος όρος μήκους ρίζας (Γ), μέσος όρος μήκους βλαστού (Δ) σε φυτά control και σε φυτά με υπερέκφραση του γονιδίου *LSK1* ($n=10$ φυτά για κάθε ομάδα). Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου. Στατιστικά σημαντική διαφορά (* $P<0.1$) κάνοντας Student's t-test.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου *LSK1* στη φυματογένεση με σκοπό να εξετάσει τον πιθανό ρόλο της κινάσης σερίνης/θρεονίνης SHAGGY-like στη διαδικασία της δημιουργίας των πολύ εξειδικευμένων συμβιωτικών δομών, των φυματίων. Η καταγραφή των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών έγινε μέχρι το σχηματισμό ώριμων φυματίων 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με ριζόβιο. Η αρχική υπόθεση ήταν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *LSK1* θα είχε τα αντίστροφα αποτελέσματα από την σίγηση του γονιδίου. Πιο συγκεκριμένα, η σίγηση του γονιδίου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των φυματίων στις σειρές σίγησης σε σχέση με τις control σειρές (Plitsi, MSc Thesis, 2016). Επομένως, στόχος της εργασίας είναι να εξετάσει αν η υπερέκφραση του γονιδίου επιφέρει το σχηματισμό μικρότερου αριθμού φυματίων.

Η υπερέκφραση του *LSK1* μετρήθηκε με τη μέθοδο της RT-qPCR. Όπως φάνηκε και στα αποτελέσματα κάποια φυτά αν και μετασχηματίστηκαν δεν έφεραν αυξημένα επίπεδα του γονιδίου της *LSK1*, πιθανόν λόγω της ενσωμάτωσης της σε μεταγραφικά ανενεργή περιοχή του γονιδιώματος. Στις υπόλοιπες σειρές υπερέκφρασης, επετεύχθησαν διαφορετικά ποσοστά υπερέκφρασης, δείχνοντας ότι η κατασκευή ήταν αρκετά αποτελεσματική.

Τα υψηλά επίπεδα του γονιδίου *LSK1* είχαν λίγα φυμάτια έως και καθόλου. Ωστόσο το φυσιολογικό ροζ χρώμα αυτών που σχηματίζονται και η ικανότητα αύξησης των μετασχηματισμένων φυτών χωρίς την προσθήκη αζώτου δείχνουν ότι πρόκειται για φυσιολογικά φυμάτια ικανά για αζωτοδέσμευση. Ο μειωμένος αριθμός φυματίων στις σειρές υπερέκφρασης επιβεβαιώνει την εμπλοκή της *LSK1* στη διαδικασία της φυματογένεσης, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να έχει ρόλο στη ρύθμιση του αριθμού των φυματίων που θα σχηματιστούν. Όπως γίνεται κατανοητό από τα αποτελέσματα, η διαφορά στον αριθμό των φυματίων μεταξύ των υπερέκφρασμένων και των control φυτών είναι μικρή, περίπου 0,5 φυμάτια/cm και δεν οδηγεί σε πλήρη αναστολή της δημιουργίας φυματίων. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η *LSK1* από μόνη της δεν αρκεί για να καθορίσει τον αριθμό των φυματίων αλλά πιθανόν να δρα σε συνεργασία με άλλα σηματοδοτικά μόρια ή να μοιράζεται αυτόν το ρόλο με μία από τις άλλες *LSK* που δεν έχουμε εξετάσει ακόμα.

Έχει προταθεί ο πιθανός ρόλος της *LSK1* στο μηχανισμό αυτορρύθμισης του αριθμού των φυματίων (autoregulation of nodulation, AON) με βάση τα αποτελέσματα της σίγησης του γονιδίου της *LSK1* (Plitsi, MSc Thesis, 2016).

Κατά τη σίγηση του γονιδίου φάνηκε να επηρεάζεται το γονίδιο *ENOD40*, του οποίου η έκφραση εμφανίστηκε σημαντικά αυξημένη (Plitsi, MSc Thesis, 2016) ενώ η έκφραση του *NIN* (Nodule Inception) εμφανίστηκε μειωμένη. Το γονίδιο *ENOD40* επάγεται κατά τις πρώτες κυτταροδιαίρέσεις του σχηματισμού της καταβολής του φυματίου μέσω της κυτοκίνης και συνεχίζει να εκφράζεται καθ'όλη τη διάρκεια της οργανογένεσης (Delis *et al.*, 2011). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται η *LSK1* να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον μηχανισμό αυτορρύθμισης του αριθμού των φυματίων (autoregulation of nodulation). Ο μηχανισμός αυτός ελέγχει μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης τον τελικό αριθμό των φυματίων που θα σχηματιστούν, διατηρώντας την ισορροπία ανάμεσα στις ενεργειακές ανάγκες του φυτού σε άζωτο και την «σπατάλη» υδατανθράκων σε επιπλέον φυμάτια (Ryu *et al.*, 2012). Το μοντέλο που προτείνεται για τη δράση του AON, είναι η «παρακολούθηση» του αριθμού των φυματίων μέσω δύο σημάτων μεγάλης απόστασης. Το ένα προέρχεται από τη ρίζα και το άλλο από το βλαστό. Στο *L. japonicus* υπάρχουν δύο μικρά πεπτιδία, το CLE ROOT SIGNAL 1 (CLE-RS1) και το CLE ROOT SIGNAL 2 (CLE-RS2), τα οποία αποτελούν τα σήματα από την ρίζα και τα οποία αναγνωρίζονται από τον πρωτεϊνικό υποδοχέα του βλαστού HYPERNODULATION ABERRANT ROOT FORMATION1 (HAR1), ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ομοίωση του μεριστώματος. Αυτός ο υποδοχέας παρουσιάζει 75% ομοιότητα με τον υποδοχέα κινάσης με περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (Leucine Rich Repeats, LRRs) CLV1 (CLAVATA) του *A. thaliana* (Searle *et al.*, 2003), και εκφράζεται αποκλειστικά στο φλοιώμα του βλαστού και στα φυμάτια (Nontachaiyaroom *et al.*, 2007). Ο υποδοχέας CLAVATA 1 στο *A. thaliana* ελέγχει την ισορροπία μεταξύ διαφοροποιημένων και αδιαφοροποίητων κυττάρων στο Ακραίο Μεριστόμα του Βλαστού (Schoof *et al.*, 2000), μέσω της πρόσδεσης του πεπτιδίου CLV3. Συλλογικά αυτοί οι υποδοχείς ονομάζονται NARK. Αυτή η αλληλεπίδραση πεπτιδίου-υποδοχέα είναι απαραίτητη για τη συστηματική καταστολή της δημιουργίας υπέρογκου αριθμού φυματίων. Ο τρόπος μεταγωγής του σήματος της αναστολής της φυματιογένεσης μέσω του μηχανισμού AON στη ρίζα δεν είναι ακόμα γνωστός (Ryu *et al.*, 2012), αν και πρόσφατα έχει προταθεί ότι εμπλέκονται οι κυτοκίνινες (Gamas *et al.*, 2017).

Ο υποδοχέας CLAVATA1 ανήκει στην ίδια οικογένεια υποδοχέων (LRR-RLKs) με τον BRI1 που ενεργοποιούνται από τα μπρασσινοστεροειδή και αναστέλλουν τη δράση της BIN2/AtSK21. Όπως είδαμε και παραπάνω, ο πιο καλά μελετημένος ρόλος μέχρι σήμερα των φυτικών SKs είναι η συμμετοχή τους ως αρνητικοί ρυθμιστές στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω των μπρασσινοστεροειδών (brassinosteroid, BR). Επιπλέον οι ορμόνες αυξίνη, γιασμονικό οξύ (JA) και μπρασσινοστεροειδή (BR) φαίνεται να παίζουν ρόλο ως μεταγωγοί σήματος στο μονοπάτι του AON (Nakagawa & Kawaguchi, 2006; Oka-Kira & Kawaguchi, 2006; Terakado *et al.*, 2006). Εξωγενής παροχή μπρασσινοστεροειδών σε μεταλλαγμένα φυτά που σχηματίζουν υπερβολικά πολλά φυμάτια (hypernodulating) στις ρίζες τους έδειξε να μειώνει τον αριθμό τους αλλά δεν παρατηρήθηκε το ίδιο και σε φυτά αγρίου τύπου (Terakado *et al.*, 2006). Από την άλλη, αποτελέσματα από άλλα πειράματα δείχνουν διαφορετική επίδραση των μπρασσινοστεροειδών μεταξύ της αρνητικής επίδρασης τους στον αριθμό των φυματίων όταν παρέχονται εξωγενώς και της αδυναμίας να σχηματίσουν λειτουργικά φυμάτια φυτά με μετάλλαξη στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των μπρασσινοστεροειδών ή μεταλλαγμένα φυτά με μειωμένη ευαισθησία στα BRs (Symons & Reid, 2004, Ferguson *et al.*, 2005). Ενδέχεται αυτές οι αντιφάσεις να προέρχονται από τις μεθόδους ή τα είδη που χρησιμοποιούνται, καθώς και από τον τύπο και τη συγκέντρωση του BR που εφαρμόζεται. Παρόλα αυτά, δεδομένου του κύριου ρόλου της BIN2/AtSK21 και της AtSK32/θ του *Arabidopsis* στη μεταγωγή σήματος των μπρασσινοστεροειδών, η LSK1 μπορεί να παίζει έναν ανάλογο ρόλο στη μεταγωγή σήματος στα κύτταρα του φυματίου, μετά την πρόσδεση του μηνύματος από τον βλαστό. Αν και δεν είναι γνωστό σε ποιο ακριβώς στάδιο της φυματιογένεσης ξεκινά να δρα ο μηχανισμός, πειράματα έχουν δείξει ότι ξεκινάει πριν τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις. Το παραπάνω μοντέλο συμφωνεί και με την ταχεία αύξηση των επιπέδων της LSK1 που ανιχνεύεται μια ώρα μετά τον εμβολιασμό των φυτών με το ριζόβιο (Psarrakou, MSc Thesis, 2014).

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να εξετάσει τον πιθανό ρόλο της υπερέκφρασης της κινάσης σερίνης/θρεονίνης SHAGGY-like, LSK1 στη διαδικασία της δημιουργίας των πολύ εξειδικευμένων συμβιωτικών

δομών, των φυματίων. Η αρχική υπόθεση, ότι δηλαδή η υπερέκφραση του γονιδίου της *LSK1* μειώνει τον αριθμό των φυματίων επιβεβαιώθηκε, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της *LSK1* στον έλεγχο του τελικού αριθμού των φυματίων που θα σχηματιστούν, ωστόσο ο μηχανισμός μέσω του οποίου γίνεται απομένει να διαλευκανθεί.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12:8711–8721.
2. Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Becard G, Rosenberg C, Barker DG (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* 14:695–700
3. Caetano-Anolles G., Gresshoff P. (1991) Plant genetic control of nodulation. *Annual Review of Microbiology* 45: 345–382
4. Charrier, B., Champion, A., Henry, Y., and Kreis, M. (2002). Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiol.* 130:577–590
5. Chilton MD, Tepfer D, Petit A, David C, Casse Delbart FT(1982) *Agrobacterium rhizogenes* insert T-DNA into the genome of the host plant root cells. *Nature.* 1982; 295:432-4
6. Clouse, S.D. (2011). Brassinosteroids. *Arabidopsis Book* 9:e0151.
7. Dajani, R. *et al*(2001) Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* **105**, 721–732
8. Dal Santo, S., Stampfl, H., Krasensky, J., Kempa, S., Gibon, Y., Petutschnig, E., Rozhon, W., Heuck, A., Clausen, T., and Jonak, C. (2012). Stress-induced GSK3 regulates the redox stress response by phosphorylating glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24:3380–3392.
9. Desbrosses G. & Stougaard J. (2011) Root Nodulation: A Paradigm for How Plant-Microbe Symbiosis Influences Host Developmental Pathways. *Cell Host & Microbe* 10, 348-358
10. Ding, Y., and Oldroyd, G.E. (2009). Positioning the nodule, the hormone dictum. *Plant Signal. Behav.* 4, 89–93.
11. Doble, B.W., and Woodgett, J.R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* 116:1175–1186.
12. Frame, S., and Cohen, P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* 359:1–16.
13. Pascal Gamas, Mathias Brault, Marie-Françoise Jardinaud and Florian Frugier,(2017) Cytokinins in Symbiotic Nodulation: When, Where, What For?
14. Harris JM, Wais R, and Long SR. (2003) Rhizobium-induced calcium spiking in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 335-341.
15. He, J.X., Gendron, J.M., Yang, Y., Li, J., and Wang, Z.Y. (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:10185–10190.
16. Heckmann AB, Lombardo F, Miwa H, Perry JA, Bunnewell S, et al. 2006. *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiol.* 142:1739–50
17. Hirsch, S., Kim, J., Mun, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A., Oldroyd, G.E. (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 21, 545–557
18. Høgslund N, Radutoiu S, Krusell L, Voroshilova V, Hannah MA, et al. (2009) Dissection of Symbiosis and Organ Development by Integrated Transcriptome Analysis of *Lotus japonicus* Mutant and Wild-Type Plants. *PLoS ONE* 4(8): e6556.
19. Hughes, K. et al. (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 12, 803–808
20. Hur, E.M., and Zhou, F.Q. (2010). GSK3 signalling in neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* 11:539–551
21. Jia, J. et al. (2002) Shaggy/GSK antagonizes hedgehog signaling by regulating cubitus interruptus. *Nature* 416, 548–552

22. Kanamori N, Madsen LH, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EM, (2006) A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(2): 359–364.
23. Katzen Federico (2007) Gateway® recombinational cloning: a biological operating system
24. Khan, M., Rozhon, W., Bigeard, J., Pflieger, D., Husar, S., Pitzschke, A., Teige, M., Jonak, C., Hirt, H., and Poppenberger, B. (2013). Brassinosteroid-regulated GSK3/Shaggy-like kinases phosphorylate mitogen-activated protein (MAP) kinase kinases, which control stomata development in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 288:7519–7527.
25. Kim, L. & Kimmel, A. R. GSK3 at the edge: regulation of developmental specification and cell polarization. *Curr Drug Targets* 7, 1411–1419 (2006)
26. Kim, L., and Kimmel, A.R. (2006). GSK3 at the edge: regulation of developmental specification and cell polarization. *Curr. Drug Targets* 7:1411–1419.
27. Kim, T.W., and Wang, Z.Y. (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:681–704.
28. Kim, T.W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J.X., Sun, Y., Burlingame, A.L., and Wang, Z.Y. (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat. Cell Biol.* 11:1254–1260.
29. Kim, T.W., Michniewicz, M., Bergmann, D.C., and Wang, Z.Y. (2012). Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature* 482:419–422
30. Kouchi H, Shimomura K, Hata S, Hirota A, Wu GJ, Kumagai H, Tajima S, Suganuma N, Suzuki A, Aoki T, Hayashi M, Yokoyama T, Ohyama T, Asamizu E, Kuwata C, Shibata D, Tabata S. (2004) Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research* 4, 263-274.
31. Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S., Ronson, C.W., James, E.K., and Stougaard, J. (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* 1, 10.
32. Maekawa T., Kusakabe M., Shimoda Y., Sato S., Tabata S., Murooka Y., Hayashi M. (2008) Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact.* Apr;21(4):375-82
33. Mylona P., Pawlowski K., Bisseling T. (1995) Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, Vol. 7, 869-885
34. Nakamura, A., Goda, H., Shimada, Y., and Yoshida, S. (2004). Brassinosteroid selectively regulates PIN gene expression in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 952-954.
35. Newcomb, W. (1981). Nodule morphogenesis and differentiation. In *Biology of the Rhizobiaceae*, K.L. Giles and A.G. Atherly, eds (New York: Academic Press), pp. 247-297.
36. Oka-Kira, E., and Kawaguchi, M. (2006). Long-distance signaling to control root nodule number. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 496-502.
37. Oldroyd G. E.D., Murray J. D., Poole P. S., Downie J. A. (2011) The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 2011. 45:119–44
38. Oldroyd GED, Downie JA. 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:566–76
39. Pap, M. and Cooper, G.M. (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 19929–19932
40. Phillip A. Sharp P.A. (2001) RNA interference—2001. *Genes Dev.* 2001 15: 485-490
41. Popp C. & Ott T. (2011) Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14:458–467

42. Rao, S.R.; Ravishankar, G. (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 20:101–153
43. Reid DE, Ferguson BJ, Hayashi S, Lin Y-H, Gresshoff PM. (2011). Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Annals of Botany* 108: 789–95.
44. Rodutoiu, S, Madsen, LH, Madsen, EB, Felle, HH, Umehara, Y, Gronlund, M, Sato, S, Nakamura, Y, Tabata, S, Sandal, N, and Stougaard, J. (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425, 585-592.
45. Rohrig, H., Schmidt, J., Miklashevichs, E., Schell, J., and John, M. (2002). Soybean ENOD40 encodes two peptides that bind to sucrose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1915–1920.
46. Rozhon, W., Mayerhofer, J., Petutschnig, E., Fujioka, S., and Jonak, C. (2010). ASKtheta, a group-III Arabidopsis GSK3, functions in the brassinosteroid signalling pathway. *Plant J.* 62:215–223
47. Ruel, L., Bourouis, M., Heitzler, P., Pantesco, V., Simpson, P. (1993). Drosophila shaggy kinase and rat glycogen synthase kinase-3 have conserved activities and act downstream of Notch. *Nature* 362:557–560.
48. Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, et al. (2007) NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 19(2): 610–624.
49. Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001) edn. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
50. Sinkar V.P., White F.F., Gordon M.P. (1987) Molecular biology of Ri-plasmid—A review. *J. Biosci.*, Vol. 11, Numbers 1–4, 47–57.
51. Small I. (2007) RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Current Opinion in Biotechnology*, 18:148–153
52. Stacey, G., McAlvin, C.B., Kim, S.Y., Olivares, J., and Soto, M.J. (2006). Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 141, 1473-1481.
53. Stiller J, Martirani L, Tuppale S, Chian RJ, Chiurazzi M, and Gresshoff PM. (1997) High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany* 48, 1357-1365.
54. Stougaard J. (2000) Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development. *Plant Physiol.* Vol. 124, 531-540.
55. Szczyglowski K, Shaw S.R, Wopereis J, Hamburger D, Copeland S, Dazzo F.B, and de Bruijn FJ. (1998) Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 684-697.
56. Tepfer, D. (1984) Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37:959–967
57. van Kammen, A. (1984) Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2: 43–45.
58. Wang K, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Zambryski P (1984) Right 25 bp terminus sequences of the nopaline T-DNA is essentially for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38:455-462
59. Wang, Z.Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T., et al. (2002). Nuclearlocalized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev. Cell* 2:505–513.
60. Woodgett, J. R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9, 2431-2438.
61. Woodgett, J.R., & Cohen, P. (1984). Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochim. Biophys. Acta* 788:339–347

62. Wrzaczek, M., Rozhon, W., and Jonak, C. (2007). A proteasomeregulated glycogen synthase kinase-3 modulates disease response in plants. *J. Biol. Chem.* 282:5249–5255
63. Yano K, Shibata S, Chen WL, Sato S, Kaneko T, Jurkiewicz A, Sandal N, Banba M, Imaizumi-Anraku H, Kojima T et al.: CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant J*2009, 60:168-180.
64. Yano K, Yoshida S, Muller J, Singh S, Banba M, Vickers K, Markmann K, White C, Schuller B, Sato S et al.: CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:20540-20545.
65. Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., and Chory, J. (2005). A new class of transcription factors mediates brassinosteroid regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell* 120:249–259.
66. Yokota K, Fukai E, Madsen LH, Jurkiewicz A, Rueda P, Radutoiu S, Held M, Hossain MS, Szczyglowski K, Morieri G et al.: Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of Lotus japonicus roots by Mesorhizobium loti. *Plant Cell* 2009, 21:267-284.
67. Yoo, M.J., Albert, V.A., Soltis, P.S., and Soltis, D.E. (2006). Phylogenetic diversification of glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinase genes in plants. *BMC Plant Biol.* 6:3.
68. Youn J.-H. and Kim T.-W. (2015). Functional Insights of Plant GSK3-like Kinases: Multi-Taskers in Diverse Cellular, Signal Transduction Pathways. *Mol. Plant.* 8, 552–565.
69. Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A. and Sawada H. 2001. A revision of Rhizobium Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of Agrobacterium Conn 1942 and Allorhizobium undicola de Lajudie et al. 1998 as new combinations: Rhizobium radiobacter, R. rhizogenes, R. rubi, R. undicola and R. vitis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:89-103
70. Zhao, J., Peng, P., Schmitz, R.J., Decker, A.D., Tax, F.E., and Li, J. (2002). Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. *Plant Physiol.* 130:1221–1229

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Θρεπτικό υλικό βακτηριακής ανάπτυξης.

LB με τελικό όγκο 200ml: 10g/l NaCl

10g/L Bacteriological Peptone

5g/L Yeast extract

15g/L Agar

Θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης φυτών.

1/2 x MS : 1/2 x MS-salts

2% w/v Sucrose

0.05% w/v MES pH 5.5

0.8% Agar

Θρεπτικό διάλυμα ποτίσματος Hoagland χωρίς άζωτο (-N)

ΔΙΑΛΥΜΑ	C ΑΡΧΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ	ml/l ΤΕΛΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ 1L
MgSO ₄	1M	2
KH ₂ PO ₄	1M	1
Fe – EDTA	1/10 M	1
Microelements*		1
CaCl ₂	0,5M	10
KCl	1M	5

Microelements stock solution

Micro element	gr/lt
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ 4H ₂ O	1,81
ZnCl ₂	0,11
CuCl ₂ H ₂ O	0,05
H ₂ MoO ₄	0,02

Φορέας υπερέκφρασης

35S terminator Hygromycin 35S promoter nos terminator attR2 LSK1 attR1 Ubi intron Ubi promoter

