

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

«Ανάλυση μεταλλάξεων του γονιδίου κινάσης *LjLSK1* στο φυτό *Lotus japonicus* και φαινοτυπική ανάλυση της φυματιογένεσης στα μεταλλάγματα φυτών»

«Mutation analysis of the *LjLSK1* kinase gene in *Lotus japonicus* and phenotypic analysis of nodulation in plant mutants»

Παντελίδης Ιωάννης, του Κυριάκου

Λάρισα, 2023

### **Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:**

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (επιβλέπουσα)

Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας–Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την ευκαιρία να εκπονήσω τη πτυχιακή μου εργασία στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος καθώς και για τις συμβουλές και την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κουκάρα Τζένη, για τη πολύτιμη βοήθεια της, για την εμπιστοσύνη της, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε, για τις συμβουλές της και για την υπομονή της.

Επιπλέον, να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την συνεργασία μας και τη βοήθεια τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τους φίλους, για τη στήριξη και τη συμπαράστασή τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα:

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	5
1. Εισαγωγή.....	6
1.1 <i>Lotus japonicus</i> .....	6
1.2 Συμβίωση ψυχανθών με βακτήρια του γένους <i>Rhizobium</i> .....	7
1.2.1 Σηματοδότηση στη φυματογένεση.....	7
1.2.2 Σχηματισμός φυματίων.....	9
1.2.3 Ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών.....	9
1.2.4 Αυτορρύθμιση της φυματογένεσης.....	10
1.2.5 <i>Lotus japonicus</i> SHAGGY-like kinase 1.....	11
1.3 CRISPR-Cas9 στα βακτήρια.....	13
1.3.1 CRISPR-Cas σύστημα II.....	13
1.3.2 Γενετική τροποποίηση με το σύστημα CRISPR-Cas9.....	14
1.4 Μεταφορά και Ενσωμάτωση T-DNA.....	15
1.5 Ανίχνευση μεταλλάξεων.....	17
Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας.....	18
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	19
2.1 Μετασχηματισμός <i>A. rhizogenes</i> με ηλεκτροδιάτρηση.....	19
2.2 Μετασχηματισμός ρίζας με χρήση <i>A. rhizogenes</i> .....	19
2.3 Μεταφορά σε γλάστρες και εμβολιασμός με <i>M. loti</i> .....	20
2.4 Δειγματοληψία ριζών από μετασχηματισμένα φυτά.....	21
2.5 Απομόνωση DNA.....	21
2.6 Ανάλυση της δραστηριότητας των gRNAs.....	22
2.7 Έλεγχος μη ειδικής στόχευσης των gRNAs.....	23
2.8 Αλληλούχηση μεταλλάξεων.....	23
2.9 Απομόνωση RNA.....	25
2.10 Δοκιμασία DNase.....	25
2.11 Ποσοτική PCR.....	26
2.12 Στατιστική ανάλυση του αριθμού των φυματίων.....	27
3. Αποτελέσματα	
3.1 Ηλεκτροδιάτρηση σε <i>A. rhizogenes</i> 1334.....	27
3.2 Ανάλυση δραστηριότητας των gRNAs.....	28
3.3 Έλεγχος μη ειδικής στόχευσης των gRNAs.....	31
3.4 Επιβεβαίωση μεταλλάξεων με αλληλούχηση κατά Sanger.....	33
3.5 Αποτελέσματα qPCR.....	34
3.6 Στατιστική ανάλυση του αριθμού των φυματίων.....	34
4. Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	35
5. Βιβλιογραφία.....	38

## Περίληψη

Το *Lotus japonicus* ανήκει στην οικογένεια των ψυχανθών (*Fabaceae*), φυτών με μεγάλο γεωργικό και βιολογικό ενδιαφέρον. Θεωρείται φυτό-μοντέλο λόγω του μικρού διπλοειδούς γονιδιώματος, του μικρού χρόνου γενιάς και της δεκτικότητας του στο μετασχηματισμό. Μία ιδιότητα που ξεχωρίζει τα ψυχανθή από τις υπόλοιπες οικογένειες φυτών είναι η σύμπραξη συμβιωτικών σχέσεων με ριζόβια, τα οποία μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία που είναι πιο εύκολο για το φυτό να την απορροφήσει. Το γονίδιο *LjLSK1* κωδικοποιεί για μία SHAGGY-like κινάση και έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τον αριθμό των φυματίων που σχηματίζονται στη ρίζα. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας στόχος είναι η ανάλυση των μεταλλάξεων του *LjLSK1* γονιδίου που προκαλούνται από το σύστημα CRISPR/Cas9 με τη χρήση της δοκιμασίας T7E1 και η σύγκριση του φαινοτύπου της φυματογένεσης σε μετασχηματισμένες από *Agrobacterium rhizogenes* ρίζες και μη.

## Abstract

*Lotus japonicus* belongs to the family of legumes (*Fabaceae*), plants of great agricultural and biological interest. It is considered a model plant because of its small diploid genome, short generation time and its ability to be easily genetically transformed. A property that distinguishes legumes from other plant families is their ability to form symbiotic relationships with *Rhizobia* during which atmospheric nitrogen is converted to ammonia making it easier for the plant to absorb it. The *LjLSK1* gene encoding for a SHAGGY-like kinase has been shown to affect the number of nodules formed in the roots. In this study, we aim to analyze mutations of the *LjLSK1* gene caused by the CRISPR/Cas9 system, using the T7 endonuclease assay and compare the nodulation phenotype *Agrobacterium rhizogenes*-produced transgenic and non-transgenic hairy roots.

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 *Lotus japonicus*:

Το φυτό *Lotus japonicus* ανήκει στο γένος των ψυχανθών, φυτών με μεγάλο γεωργικό και βιολογικό ενδιαφέρον. Εντοπίζεται στην Ιαπωνία όπου για πολλούς αιώνες χρησιμοποιούνταν από τους ντόπιους ως γιατροσόφι. Ο καθηγητής William F. Grant του Πανεπιστημίου McGill (Μόντρεαλ) το μελέτησε για πρώτη φορά τη δεκαετία του '50. Τα φυτά που σύλλεξε προήλθαν από τις ακτές ενός ποταμού στη περιοχή Gifu, από την οποία ο συγκεκριμένος οικότυπος έλαβε και το όνομά του. Ακόμα ένας οικότυπος ο οποίος είναι εξίσου καλά μελετημένος είναι ο Miyakojima ή MG-20. Το 1992 οι καθηγητές Kurt Handberg και Jens Stougaard του Πανεπιστημίου του Άαρχους κατέστησαν το φυτό αυτό μοντέλο για την έρευνα των ψυχανθών λόγω της πληθώρας επιθυμητών χαρακτηριστικών που διαθέτει. Τέτοια είναι το μικρό διπλοειδές γονιδίωμα (470Mb), ο μικρός χρόνος γενιάς (2-3 μήνες), η παραγωγή μεγάλου αριθμού σπόρων, η ικανότητα του να αυτογονιμοποιείται και το γεγονός ότι είναι δεκτικό σε μετασχηματισμό από αγροβακτήρια (Sato et al, 2006).

Στα ψυχανθή ανήκουν επίσης: το φασόλι, το ρεβίθι, η σόγια και ο αρακάς. Τα φυτά αυτά αποτελούν σημαντική πηγή τροφής τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα στη κτηνοτροφία (κυρίως η σόγια)(Graham et al, 2003; Wang et al, 2003). Επιπλέον παράγουν δευτερογενείς ουσίες όπως ισοφλαβόνες οι οποίες διατίθενται στην αγορά με τη μορφή συμπληρωμάτων διατροφής και έχουν αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές δράσεις (Dixon et al, 2003). Τα αποτελέσματα των ερευνητικών δραστηριοτήτων στο *Lotus japonicus* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την βελτίωση της παραγωγής των συγγενικών αυτών φυτών που περιορίζεται από ποικίλους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες όπως η ξηρασία, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών από το έδαφος και η αλατότητα/οξύτητα αυτού (Graham et al, 2003).

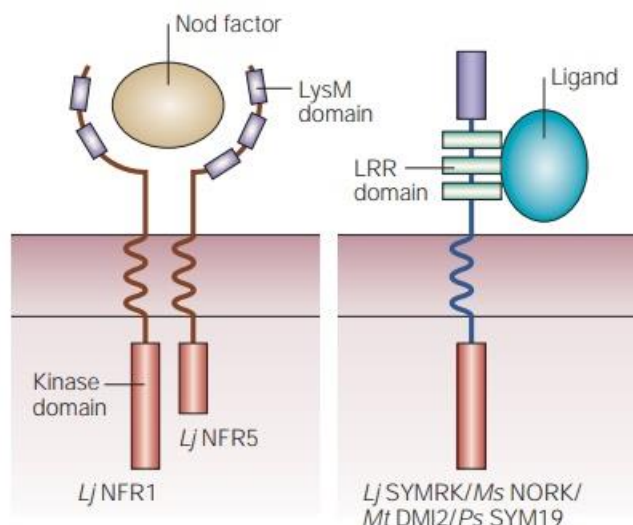
Μία ιδιότητα που ξεχωρίζει τα ψυχανθή από τη πλειοψηφία των καλλιεργούμενων φυτών είναι η ικανότητα τους να αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια όπως αυτά του γένους *Rhizobium* όταν αναπτύσσονται σε εδάφη στα οποία παρατηρείται έλλειψη πηγών αζώτου (Roy et al, 2019). Ένα από τα είδη που έχει αναγνωριστεί ως συμβιώτης των ψυχανθών είναι το *Mesorhizobium loti*. Ανήκει στη οικογένεια των ριζοβίων, είναι Gram- βακτήριο και απομονώθηκε για πρώτη φορά από το *Lotus corniculatus*, ένα άλλο μέλος της οικογένειας των ψυχανθών (Jarvis et al, 1982). Στο τομέα της γεωργίας τα ριζόβια μπορούν να αντικαταστήσουν τα συμβατικά αζωτούχα λιπάσματα, τα οποία έχουν υψηλό κόστος παραγωγής και επιβαρύνουν σημαντικά το περιβάλλον (Sutton et al, 2011).

## 1.2 Συμβίωση ψυχανθών με βακτήρια του γένους *Rhizobium*:

### 1.2.1 Σηματοδότηση στη φυματιογένεση

Η έναρξη της συμβίωσης ψυχανθούς-ριζοβίου γίνεται μέσω έκκρισης χημικών ουσιών στη ριζόσφαιρα αρχής γενομένης από το φυτό. Σε εδάφη με χαμηλή περιεκτικότητα σε άζωτο, το φυτό εκκρίνει φλαβονοειδή και ισοφλαβονοειδή, που επάγουν την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *nodD* στο ριζόβιο, ο οποίος με τη σειρά του συνδέεται στη ρυθμιστική περιοχή *nod box* και επάγει την έκφραση των γονιδίων *nod* (D.Wang et al, 2012). Τα προϊόντα αυτών, οι παράγοντες *nod*, είναι λιποχιτοολιγосακχαρίτες που συνήθως αποτελούνται από 4 ή 5 κατάλοιπα N-ακέτυλογλυκοζαμίνης συνδεδεμένα με β-1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς. Η σύσταση των παραγόντων *nod* φέρει μικρές διαφορές ανάμεσα στα διάφορα στελέχη ριζοβίων. Οι διαφορές αυτές επιτρέπουν στο φυτό να ξεχωρίζει τα διαφορετικά στελέχη ριζοβίων και να σχηματίζει συμβιωτικές σχέσεις με ορισμένα από αυτά (D.Wang et al, 2012; Oldroyd et al, 2013).

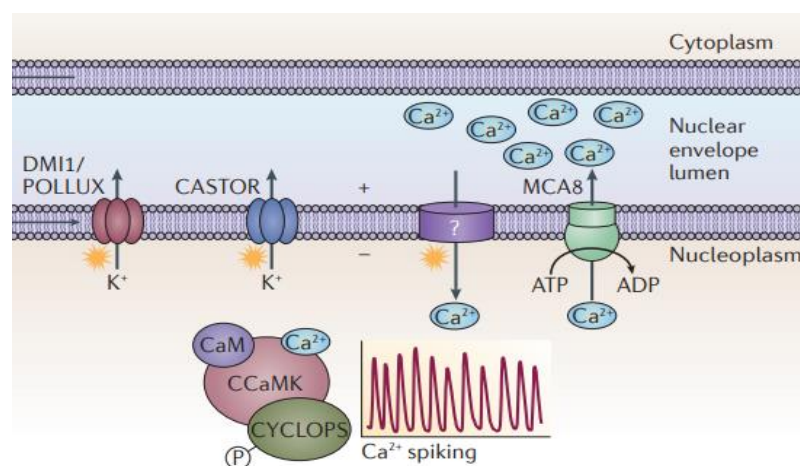
Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς στους οποίους προσδένονται οι παράγοντες *nod* διαθέτουν περιοχές LysM στο εξωκυττάριο τμήμα τους με τις οποίες αυτοί αλληλεπιδρούν. Στο *Lotus japonicus* έχουν βρεθεί δύο υποδοχείς, ο NFR1 και ο NFR5 (εικόνα 1) οι οποίοι εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση και αλληλεπιδρούν ακόμα και με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις παραγόντων *nod*. Μελέτες αποκάλυψαν ότι οι δύο αυτοί υποδοχείς συνεργάζονται, καθώς η περιοχή κίνησης του NFR1 έχει την ικανότητα, εκτός από το να αυτοφωσφορυλιώνεται, να φωσφορυλιώνει και τον υποδοχέα NFR5 (Oldroyd et al, 2013). Ένας ακόμα διαμεμβρανικός υποδοχέας που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ανάπτυξη σχέσεων συμβίωσης είναι ο SYMRK (εικόνα 1), οποίος έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με τον NFR5. Ο SYMRK διαθέτει στο εξωκυττάριο τμήμα του περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (leucine-rich repeats, LRRs) που είναι πιθανό να αλληλεπιδρούν με σήματα που παράγονται στα αρχικά στάδια της φυματιογένεσης (Oldroyd et al, 2013; Stracke et al, 2002).



**Εικόνα 1:** Οι υποδοχείς NFR1, NFR5 και SYMRK αλληλεπιδρούν στα αρχικά στάδια της φυματιογένεσης.

Η πρόσδεση των παραγόντων nod στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς και η ενεργοποίηση του SYMRK προκαλούν διακυμάνσεις στη συγκέντρωση των ιόντων  $Ca^{2+}$  στον πυρήνα. Μία πιθανή εξήγηση του πώς συμβαίνει αυτό εμπλέκει την παραγωγή μεβαλονικού. Έχει βρεθεί ότι ο SYMRK αλληλεπιδρά με την 3-υδροξυ-3-μεθυλ-γλουταρυλ-CoA αναγωγάση (HMGR), ένα ένζυμο το οποίο διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη παραγωγή του μεβαλονικού. Μελέτες σε κύτταρα ρίζας του φυτού *M. truncatula* έχουν δείξει ότι το μεβαλονικό μπορεί από μόνο του να προκαλέσει διακυμάνσεις στη συγκέντρωση του ασβεστίου. Προϋπόθεση για τις διακυμάνσεις αυτές είναι η παρουσία καναλιών ιόντων ασβεστίου που εισάγουν  $Ca^{2+}$  από το ενδοπλασματικό δίκτυο στον πυρηνικό φάκελο, αντλίες που απομακρύνουν τα  $Ca^{2+}$  πίσω στο κυτταρόπλασμα και τέλος κανάλια ιόντων που εξισορροπούν το φορτίο το οποίο μεταβάλλεται λόγω της μετακίνησης των  $Ca^{2+}$  όπως τα POLLUX, CASTOR (Oldroyd et al, 2013)

Οι αυξομειώσεις της συγκέντρωσης  $Ca^{2+}$  οδηγούν στην ενεργοποίηση του ενζύμου-αποκωδικοποιητή CCaMK (Calcium and Calmodulin-dependent kinase). Η ενεργοποίηση αυτή γίνεται είτε με σύνδεση ιόντων  $Ca^{2+}$  σε περιοχές με μοτίβο έλικα-βρόγχος-έλικα (EF hand motifs) που βρίσκονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο είτε μέσω αλληλεπίδρασης  $Ca^{2+}$  με καλμοδουλίνη σε περιοχές αλληλεπίδρασης με τη καλμοδουλίνη (CaM binding domains). Η κίνηση αυτή φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη πρωτεΐνη CYCLOPS η οποία με τη σειρά της επιστρατεύει μεταγραφικούς παράγοντες (NSP1, NSP2) απαραίτητους για τη συμβίωση και τη φυματιογένεση (Oldroyd et al, 2013; Diédhiou et al, 2018).

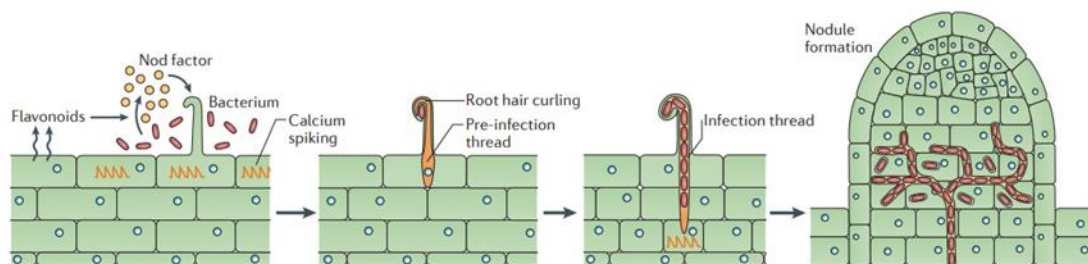


**Εικόνα 2:** Διακυμάνσεις της  $[Ca^{2+}]$  στον πυρήνα οδηγούν στην ενεργοποίηση της CCaMK και στη συνέχεια της πρωτεΐνης CYCLOPS η οποία επιστρατεύει μεταγραφικούς παράγοντες και επάγει τη φυματιογένεση (Oldroyd et al, 2013).



### 1.2.2 Σχηματισμός φυματίων

Η πρόσδεση παραγόντων nod στους υποδοχείς του φυτού έχει ως αποτέλεσμα κύρτωση των ριζικών τριχιδίων της επιδερμίδας παγιδεύοντας βακτήρια ανάμεσα στα κυτταρικά τοιχώματα. Δημιουργείται ένας θύλακας μόλυνσης (infection rocket) μέσα στον οποίο πολλαπλασιάζονται τα βακτήρια σχηματίζοντας μία μικρο-αποικία (microcolony). Ακολουθεί διάσπαση των τοιχωμάτων από ένζυμα φυτικής και βακτηριακής προέλευσης και εγκόλπωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Έτσι ξεκινάει ο σχηματισμός, μίας σωληνώδους δομής, του νηματίου μόλυνσης (Infection Thread, IT), το οποίο επεκτείνεται μεταφέροντας τα ριζόβια στο φλοιό της ρίζας (εικόνα 3). Παράλληλα πραγματοποιείται διαίρεση κυττάρων του φλοιού και του περικύκλιου που οδηγούν στο σχηματισμό ενός πρόωρου φυματίου (nodule primordium). Όταν το νηματίο μόλυνσης φτάσει στο άκρο του ριζικού τριχιδίου, παρατηρούνται αλλαγές στη διάταξη του κυτταροσκελετού και πιο συγκεκριμένα των μικροσωληνίσκων στο κύτταρο του φλοιού με το οποίο έρχεται σε επαφή. Οι αλλαγές αυτές οδηγούν το νηματίο μόλυνσης από συγκεκριμένο μονοπάτι στο πρόωρο φυμάτιο που έχει αρχίσει να σχηματίζεται. Σε αυτό εισάγονται τα ριζόβια και τελικά σχηματίζεται το ώριμο φυμάτιο μέσα στο οποίο τα βακτήρια μετατρέπονται στην αζωτοδεσμευτική τους μορφή, τα βακτηριοειδή (Oldroyd et al, 2011). Μία μεμβράνη φυτικής προέλευσης, η περιβακτηριακή μεμβράνη καλύπτει τα βακτηριοειδή σχηματίζοντας το συμβιώσωμα (Pal and Hong et al, 1996).



**Εικόνα 3:** Κύρτωση ριζικών τριχιδίων εγκλωβίζει τα ριζόβια ανάμεσα σε κύτταρα της ρίζας και είναι το πρώτο βήμα για το σχηματισμό του νηματίου μόλυνσης, δομής που μεταφέρει τα ριζόβια το φυμάτιο (Oldroyd et al, 2013).

### 1.2.3 Ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών

Η συνεργασία ψυχανθών-ριζοβίων αποφέρει οφέλη και για τις δύο πλευρές. Τα βακτηριοειδή μέσα στο συμβιώσωμα με τη βοήθεια του ενζύμου νιτρογενάση μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο ( $N_2$ ) σε αμμωνία ( $NH_3$ ), μία ένωση την οποία το φυτό μπορεί να προσλάβει εύκολα. Ένα χαρακτηριστικό του ενζύμου αυτού είναι ότι δεν λειτουργεί παρουσία οξυγόνου. Οι συνθήκες που εξασφαλίζονται μέσα στο συμβιώσωμα ελέγχουν τα επίπεδα  $O_2$  και άρα επιτρέπουν στη νιτρογενάση να ενεργοποιηθεί και να δράσει. Έτσι τα αμμωνιακά ιόντα που παράγονται μεταφέρονται μέσω του ξυλώματος σε όλα τα μέρη του φυτού. Με τη σειρά του το φυτό μέσω του φλοιώματος προμηθεύει τα βακτήρια με πηγές άνθρακα (σάκχαρα,

αμινοξέα) που προκύπτουν από την φωτοσύνθεση και είναι απαραίτητες για την επιβίωση αυτών (Udvardi and Poole, 2013).

#### 1.2.4 Αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης

Ο σχηματισμός υπερβολικά μεγάλου αριθμού φυματίων μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του φυτού. Προκειμένου αυτό να αποφευχθεί το φυτό διαθέτει ένα ενδογενή μηχανισμό που του επιτρέπει να ελέγχει τον αριθμό των φυματίων που σχηματίζονται και να τον μεταβάλλει ανάλογα με τις ανάγκες του σε άζωτο. Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης (Autoregulation of Nodulation, AON).

Η αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης φαίνεται να επηρεάζεται από την έκφραση των γονιδίων *CLE*. Οι πρωτεΐνες *CLE* είναι μικρές σε μέγεθος (~100 αμινοξέα) και διαθέτουν μία συντηρημένη περιοχή 14 αμινοξέων στο καρβοξυ-τελικό άκρο που ονομάζεται περιοχή *CLE* (*CLE domain*). Στο *Lotus japonicus* έχει βρεθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων περιέχει την συντηρημένη αυτή περιοχή. Μετά από ανάλυση των επιπέδων έκφρασης βρέθηκε ότι τα γονίδια *LjCLE-RS1*, *LjCLE-RS2*, *LjCLE-RS3*, *LjCLE40* εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης μετά τον εμβολιασμό με ριζόβιο. Περαιτέρω έρευνες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι μόνο τα γονίδια *LjCLE-RS1*, *LjCLE-RS2*, *LjCLE-RS3*, *LjCLE40* συμμετέχουν στον έλεγχο του αριθμού των φυματίων. Υπερέκφραση αυτών οδηγεί σε μειωμένο αριθμό φυματίων σε σχέση με τα φυτά ελέγχου. Τα *CLE-RS* πεπτίδια παράγονται στη ρίζα και μέσω του ξυλώματος μεταφέρονται στο βλαστό όπου αλληλεπιδρούν με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα *HAR1* (Hypernodulation Aberrant Root Formation 1). Ο υποδοχέας αυτός διαθέτει περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (Leucine-rich repeats) και δράση κινάσης. Η ενεργοποίηση του οδηγεί στην επαγωγή μονοπατιού που αναστέλλει τη φυματιογένεση. Επιπλέον μελέτες πάνω στα πεπτίδια *CLE* φανέρωσαν ότι η έκφραση των γονιδίων *LjCLE-RS2*, *LjCLE-RS3*, *LjCLE40* επάγεται και από την παρουσία αζώτου στο έδαφος (Okamoto et al, 2008; Okamoto et al, 2013; Nishida et al, 2016; Valmas et al; 2023).

Εκτός από τα πεπτίδια *CLE* και αρκετά *miRNAs* συμμετέχουν στις ρυθμιστικές διαδικασίες της φυματιογένεσης. Τα *miRNAs* είναι μη κωδικοποιητικά μόρια RNA με μικρό μέγεθος (21-24 νουκλεοτίδια). Η RNA pol II μεταγράφει την αλληλουχία του *miRNA* συνθέτοντας το *pri-miRNA* που διαθέτει 5' κάλυμμα και 3' πολύ-A ουρά. Το *pri-miRNA* υφίσταται τροποποίηση από το ένζυμο *DCL1* για προκύψει το *pre-miRNA*, που έχει δομή φουρκέτας και στη συνέχεια το ίδιο ένζυμο επιδρά στο *pre-miRNA* για να προκύψει δίκλωνο μόριο *miRNA*\*/*miRNA* που διαθέτει δύο ελεύθερα νουκλεοτίδια σε κάθε 3' άκρο. Αμέσως μετά η πρωτεΐνη *HEN1* (μεθυλοτρανσφεράση) μεθυλιώνει τα ελεύθερα 3' άκρα προκειμένου να εμποδίσει την αποικοδόμηση του μορίου από ένζυμα με δράση εξωνουκλεάσης. Το σύμπλοκο εξάγεται στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της πρωτεΐνης *HASTY* και μία ελικάση ξετυλίγει το δίκλωνο *miRNA* σε μονόκλωνο. Το ώριμο πλέον μονόκλωνο *miRNA* συνδέεται με το πρωτεϊνικό σύμπλοκο *RISC* (RNA-induced

silencing complex) και αλληλεπιδρά με το mRNA-στόχο. Αν η συμπληρωματικότητα είναι απόλυτη τότε η πρωτεΐνη AGO κόβει το συμπληρωματικό mRNA οδηγώντας σε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης (Hoang et al, 2020).

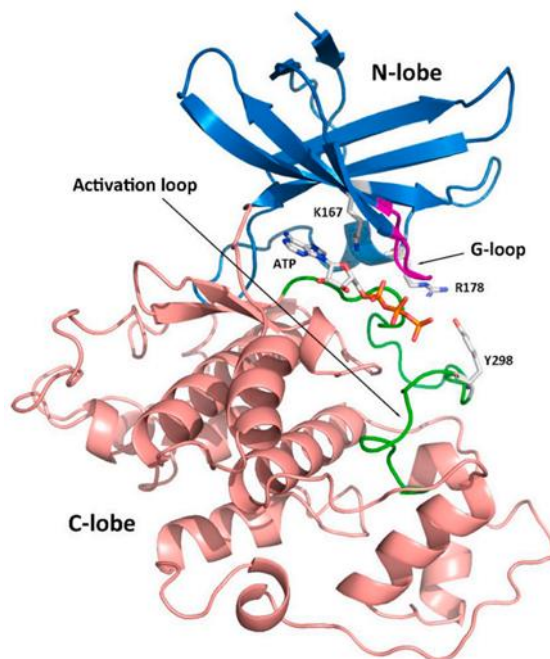
Όσον αφορά το *Lotus japonicus* δύο από τα miRNAs που έχει ανακαλυφθεί ότι επηρεάζουν το σχηματισμό φυματίων είναι το miR2111 και το miR171c. Το miR2111 παράγεται στα φύλλα και μεταφέρεται στη ρίζα όπου στοχεύει και αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου *TML*, ενός αρνητικού ρυθμιστή της φυματογένεσης. Χαμηλά επίπεδα N επάγουν τη παραγωγή του miR2111, το οποίο μέσω αναστολής της έκφρασης του *TML* οδηγεί σε φαινότυπο με αυξημένο αριθμό φυματίων. Αντίθετα υπερέκφραση του miR171c στα φυμάτια οδηγεί σε μείωση των επιπέδων φυματογένεσης στα φυτά. Το miRNA αυτό στοχεύει το μεταγραφικό παράγοντα NSP2, μία πρωτεΐνη με πολύ σημαντικό ρόλο κατά τα αρχικά στάδια της φυματογένεσης (Tsikou et al, 2018; Ana De Luis et al, 2012; Valmas et al, 2023).

#### 1.2.5 *Lotus japonicus* SHAGGY-like kinase 1 (LSK1)

Το γονίδιο *LjLSK1* κωδικοποιεί για μία κινάση σερίνης/θρεονίνης που ανήκει στην οικογένεια των SHAGGY-like κινασών. Ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά σε θηλαστικά, όπου και συμμετέχουν στο μεταβολισμό του γλυκογόνου, φωσφορυλιώνοντας και αναστέλλοντας την συνθάση του γλυκογόνου. Σήμερα γνωρίζουμε ότι ομόλογες κινάσες της οικογένειας αυτής εντοπίζονται τόσο σε θηλαστικά όσο και σε φυτά. Στα φυτά και συγκεκριμένα στο *Lotus japonicus* οι κινάσες αυτές συμμετέχουν σε διαδικασίες ανάπτυξης και αύξησης καθώς και σε μηχανισμούς που αντιμετωπίζουν βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (T.G.A. Solonou et al, 2021). Τέτοιου είδους χαρακτηριστικά τις καθιστούν στόχους προκειμένου να βελτιωθούν οι συνθήκες της γεωργικής παραγωγής των ψυχανθών.

Οι κινάσες αυτές διαθέτουν ένα αμινο-τελικό λοβό (N-lobe) που αποτελείται από β-πτυχωτά και έναν καρβοξυ-τελικό λοβό (C-lobe) που αποτελείται από α-έλικες, βρόγχους (εικόνα 4) και περιέχει περιοχές αναγνώρισης υποστρωμάτων (T.G.A Solonou et al, 2021). Σε όλες τις κινάσες υπάρχει η ρυθμιστική τριάδα που αποτελείται από ένα κατάλοιπο Lys (N-lobe), μία Asp και μία Glu (C-lobe) οι οποίες παίζουν καθοριστικό ρόλο στη καταλυτική ικανότητα της κινάσης. Στο χώρο εντοπίζονται κοντά στις φωσφορικές ομάδες του ATP (Taylor et al, 2019). Βρέθηκε ότι στη LSK1 η λυσίνη αντιστοιχεί στο κατάλοιπο Lys167, καθώς μετατροπή αυτού σε αλανίνη οδήγησε σε πλήρη απουσία της ενζυμικής δραστηριότητας (T.G.A Solonou et al, 2021). Ένα τμήμα του αμινο-τελικού λοβού ονομάζεται θηλιά G (G-loop), περιέχει συντηρημένα κατάλοιπα γλυκίνης και ενώνει το β1-πτυχωτό του C-λοβού με το β2-πτυχωτό. Ο ρόλος του είναι να σταθεροποιεί το μόριο ATP με προσανατολισμό ιδανικό για τη κατάλυσή του, τα αμύδια του σκελετού της θηλιάς G συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της α και β φωσφορικής ομάδας του ATP (Taylor et al, 2019). Μετάλλαξη σε κάποια από τις γλυκίνες έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τη πρόσδεση του ATP και άρα τη δραστηριότητα της κινάσης. Ο δακτύλιος της αδενίνης του ATP αλληλεπιδρά με κατάλοιπα Glu214 και Val216. Στη σχισμή (cleft) που σχηματίζεται

ενδιάμεσα των λοβών βρίσκεται ο βρόγχος ενεργοποίησης. Η φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου Thr (Thr197 στη PKA) οδηγεί σε αλλαγή θέσης στο χώρο του βρόγχου επιτρέποντας τη πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου από 2 έως 50 φορές (Dajani et al, 2001). Στην LSK1 έχει βρεθεί ότι σημειακή μετάλλαξη στο κατάλοιπο Tyr298 (Y298A) του βρόγχου ενεργοποίησης μειώνει τη καταλυτική ικανότητα του ενζύμου. Η σταθερά  $K_m$  αυξάνεται κάτι που σημαίνει ότι μειώνεται η συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος (T.G.A Solonou et al, 2021). Στη σχισμή βρίσκεται και το ενεργό κέντρο του ενζύμου όπου συνδέεται το ATP μέσω της  $\gamma$  φωσφορικής του ομάδας καθώς και η περιοχή στην οποία συνδέεται το υπόστρωμα μέσω φωσφορικών ομάδων που εντοπίζονται σε αμινοξέα 4 κατάλοιπα μακριά από τη θέση φωσφορυλίωσης (Dajani et al, 2001). Σημειακή μετάλλαξη στο κατάλοιπο Arg178 (R178A) που εντοπίζεται στη περιοχή πρόσδεσης υποστρώματος μειώνει εκ νέου τη καταλυτική ικανότητα του ενζύμου ( $K_m$  αυξάνεται). Η LSK1 διαθέτει 89 κατάλοιπα στο αμινο-τελικό της άκρο τα οποία δεν εντοπίζονται στην αντίστοιχη κινάση στον άνθρωπο τη GSK3 $\beta$ . Μετάλλαγμα το οποίο δε φέρει τα κατάλοιπα αυτά παρουσιάζει αυξημένη καταλυτική ικανότητα σε σχέση με τη πρωτεΐνη αγρίου τύπου (T.G.A Solonou et al, 2021). Η μειωμένη έκφραση του γονιδίου έχει συσχετιστεί με μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης NIN καθώς και των πεπτιδίων CLE-RS1/CLE-RS2 σημαντικών ρυθμιστών της φυματογένεσης. Αντίθετα υπερέκφραση του LjLSK1 μειώνει ελάχιστα τον αριθμό των σχηματιζόμενων φυματίων (Garagkounis et al, 2019). Ο ρόλος του συγκεκριμένου γονιδίου δεν έχει ακόμα πλήρως διαλευκανθεί. Ένα σημαντικό βήμα προς τη κατεύθυνση αυτή είναι η δημιουργία σταθερών μεταλλαγμάτων.



**Εικόνα 4.** Δομή της LSK1, βασισμένη στην ομόλογη πρωτεΐνη GSK3 $\beta$  στον άνθρωπο (T.G.A Solonou et al, 2021)

## 1.3 CRISPR-Cas9 στα βακτήρια

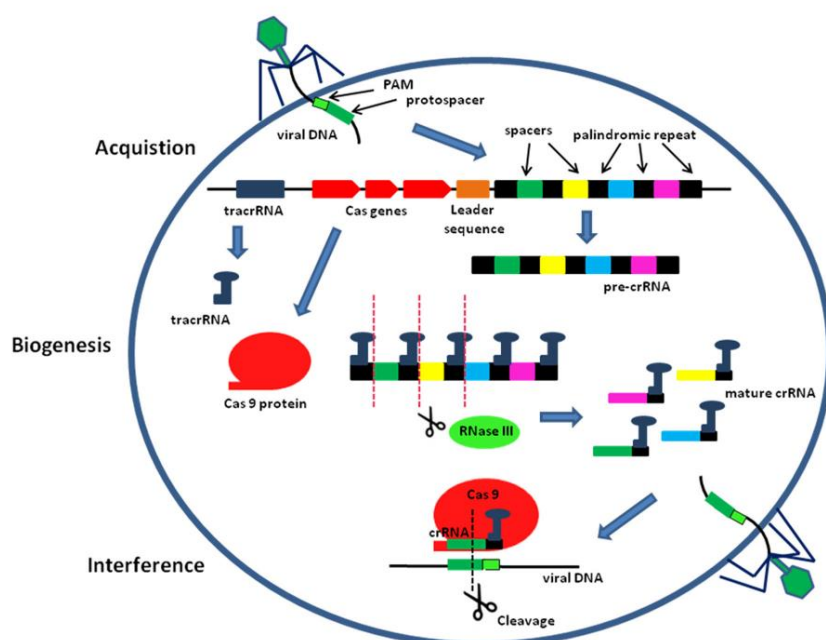
### 1.3.1 CRISPR-Cas σύστημα II

Ένας αμυντικός μηχανισμός που συναντάται τόσο στα βακτήρια όσο και στα αρχαία αξιοποιεί τις αλληλουχίες CRISPRs (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) και την πρωτεΐνη Cas που σχετίζεται με τις επαναλήψεις αυτές. Τα συστήματα CRISPR/Cas κατηγοριοποιούνται σε τρεις τύπους (I, II, III) ανάλογα με τις διαφορές που παρατηρούνται στην αλληλουχία και στη τριτοταγή μορφή των Cas πρωτεϊνών. Από αυτά το σύστημα CRISPR/Cas τύπου II έχει μελετηθεί εκτενώς και προτιμάται από τους επιστήμονες για τη γενετική τροποποίηση κυττάρων και οργανισμών καθώς είναι απλούστερο συγκριτικά με τα I και III (Rath et al, 2015; Gupta et al, 2019).

Το φυσικό σύστημα λειτουργεί ως εξής. Αρχικά το γενετικό υλικό ενός ιού (πχ. βακτηριοφάγου) εισάγεται στο εσωτερικό του βακτηρίου. Οι συντηρημένες πρωτεΐνες Cas1 και Cas2 σχηματίζουν σύμπλοκο το οποίο συνεργάζεται με πρωτεΐνες όπως η Cas9, Cas4, Csn2 προκειμένου να κόψουν και να ενσωματώσουν ένα τμήμα του ιικού γενετικού υλικού που ονομάζεται αλληλουχία protospacer (30-50bp) στο αρχικό άκρο (leader end) της περιοχής CRISPR, ενός γονιδιακού τόπου (CRISPR locus) στο γονιδίωμα του βακτηρίου. Καθοδικά από την αλληλουχία protospacer βρίσκεται μία περιοχή που ονομάζεται PAM (Protospacer Adjacent Motif). Η περιοχή αυτή αποτελείται από 2-6 νουκλεοτίδιο, υπάρχει μόνο στο γονιδίωμα του ιού, δηλαδή δε συμπεριλαμβάνεται στην αλληλουχία protospacer. Η απουσία της αλληλουχίας PAM εμποδίζει τη Cas9 από το να κόψει το βακτηριακό DNA (Nunez et al ,2014; Chylinski et al, 2014; Rath et al, 2015; Gupta et al, 2019).

Ο γονιδιακός τόπος CRISPR αποτελείται από σύντομες παλινδρομικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (20-40bp) ενδιάμεσα από τις οποίες υπάρχουν μικρά τμήματα του γενετικού υλικού των ιών που ονομάζονται spacers. Η συγκεκριμένη περιοχή λειτουργεί ως μνήμη, όπως το ανοσοποιητικό σύστημα στον άνθρωπο, προκειμένου το βακτήριο να μπορέσει να απωθήσει επιθέσεις από παρόμοιους ιούς στο μέλλον. Αφού ενσωματωθεί η αλληλουχία spacer ακολουθεί μεταγραφή του γονιδιακού τόπου CRISPR και προκύπτει το πρόδρομο CRISPR RNA (pre-crRNA). Πάνω σε κάθε μία από τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες συνδέεται ένα tracrRNA και στη συνέχεια η RNase III κόβει το pre-crRNA με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να προκύψει το ώριμο crRNA που περιλαμβάνει μία αλληλουχία spacer, ένα tracrRNA και μία παλίνδρομη επανάληψη. Το σύμπλοκο αυτό συνδέεται μέσω των θηλιών του tracrRNA με την πρωτεΐνη Cas9 η οποία ψάχνει στο γονιδίωμα του ιού για αλληλουχίες PAM ελέγχοντας στη συνέχεια αν η αλληλουχία του crRNA ταιριάζει με αυτή που βρίσκεται ανοδικά της PAM. Η αλληλουχία PAM όντας μόνο στο ιικό γονιδίωμα επιτρέπει στην Cas9 να κόβει μόνο αυτό αφήνοντας ανέπαφο το βακτηριακό. Αν οι δύο αλληλουχίες δε συμπίπτουν η Cas9 αποσυνδέεται και συνεχίζει την αναζήτηση. Αν υπάρχει απόλυτη ταύτιση τότε προκαλεί δίκλωνη ρήξη στο γενετικό υλικό του ιού 3-4bp ανοδικά της PAM μέσω δύο περιοχών με δράση

νουκλεάσης: της HNH και της RuvC που κόβουν την συμπληρωματική και την μη συμπληρωματική αλυσίδα αντίστοιχα καθιστώντας το ιικό DNA άχρηστο (Chylinski et al, 2014; Rath et al, 2015; Gupta et al, 2019).



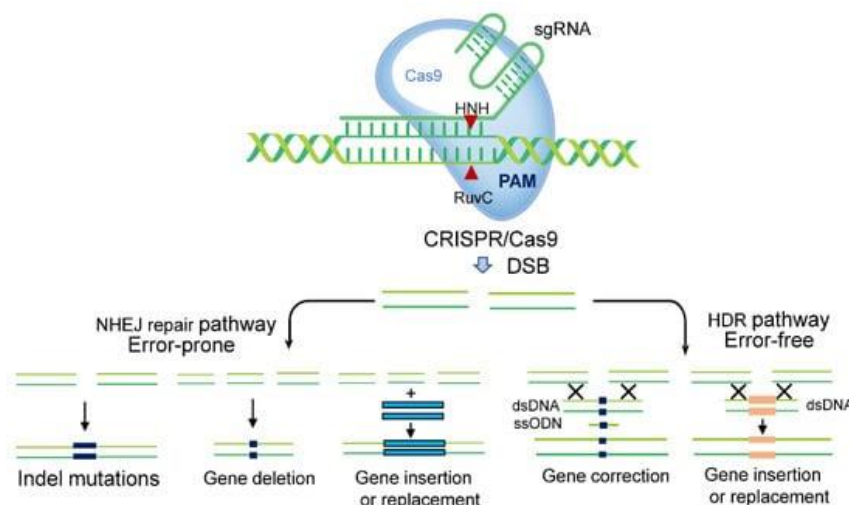
**Εικόνα 5:** Το σύστημα CRISPR/Cas9 λειτουργεί ως μηχανισμός άμυνας των βακτηρίων απέναντι στη μόλυνση από ιούς (Hryhorowicz et al, 2017).

### 1.3.2 Γενετική τροποποίηση με το σύστημα CRISPR-Cas9

Οι επιστήμονες έχουν στη διάθεση τους αρκετές τεχνικές για να επιτύχουν γενετική τροποποίηση ενός οργανισμού εκ των οποίων οι TALENs (Transcription Activator-like Effector Nucleases), ZFNs (Zinc-Finger Nucleases) και το σύστημα CRISPR/Cas9. Το τελευταίο προερχόμενο από το φυσικό προκαρυωτικό σύστημα CRISPR/Cas9 είναι πιο αποτελεσματικό, πιο γρήγορο, πιο φθινό και πιο εύκολο από τα άλλα δύο. Σε αυτό το σύστημα το RNA-οδηγός (single guide RNA ή sgRNA) αναλαμβάνει να καθοδηγήσει τη πρωτεΐνη Cas9 στο DNA-στόχο. Το sgRNA έχει μήκος περίπου 100 νουκλεοτίδια και αποτελείται από το gRNA scaffold που έχει μήκος περίπου 80 νουκλεοτίδια και συνδέεται με τη πρωτεΐνη Cas9 και το crRNA που έχει μήκος 20-21 νουκλεοτίδια και συνδέεται μέσω συμπληρωματικότητας με το DNA-στόχο. Στη συνέχεια η Cas9 μέσω των περιοχών με δράση ενδονουκλεάσης (RuvC, HNH) προκαλεί δίκλωνη ρήξη σε αυτό. Το κύτταρο θα επιδιώξει να επιδιορθώσει το πρόβλημα είτε με μη ομόλογη συνένωση άκρων (NHEJ) είτε με ομόλογο ανασυνδυασμό (HDR). Η μη ομόλογη σύνδεση άκρων (NHEJ) είναι επιρρεπής σε λάθη με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ελλείμματα ή προσθήκες που μπορεί να επηρεάσουν την αλληλουχία, άρα τη δομή και τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός προϋποθέτει την παρουσία ομόλογης περιοχής DNA και δίνει την δυνατότητα για εισαγωγή εξωγενών τμημάτων DNA



αλλά και τη γενετική τροποποίηση με υψηλή ακρίβεια ως προς τη θέση που αυτή θα γίνει (Hryhorowicz et al, 2017; Wan et al, 2021).



**Εικόνα 6:** Το σύστημα CRISPR/Cas9 χρησιμοποιείται για γενετική τροποποίηση κυττάρων και μπορεί να προκαλέσει ενθέματα, ελλείμματα βάσεων καθώς και ολόκληρων γονιδίων (Wan et al, 2021).

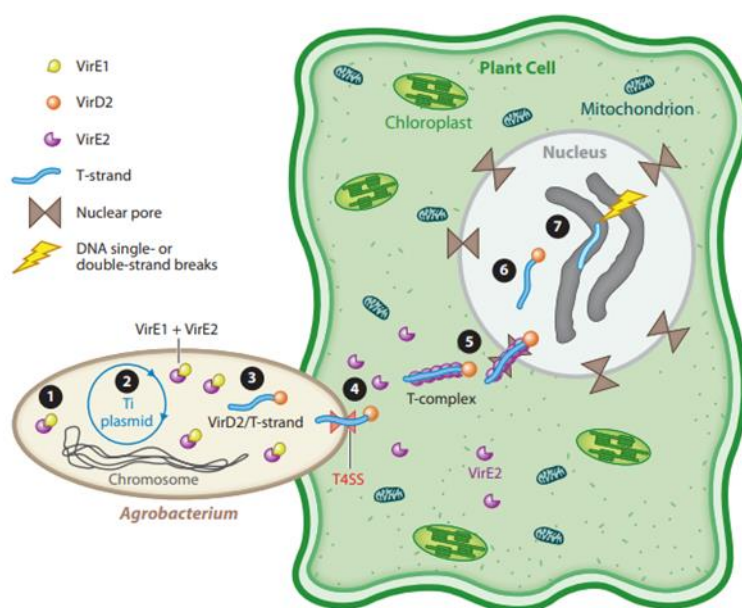
Ένα πρόβλημα που μπορεί να προκύψει κατά τη εφαρμογή του συστήματος CRISPR-Cas9 είναι η πλήρης σύνδεση του gRNA σε περιοχές του γονιδιώματος εκτός του DNA-στόχου. Αν συμβεί αυτό τότε το RNA-οδηγός κρίνεται ακατάλληλο καθώς οποιαδήποτε άλλη στόχευση πέραν της επιθυμητής μπορεί να δημιουργήσει πληθώρα προβλημάτων στο κύτταρο και κατ' επέκταση στον οργανισμό.

#### 1.4 Μεταφορά και Ενσωμάτωση T-DNA

Το *Agrobacterium rhizogenes* αποτελεί το βασικό μεταφορέα ενθεμάτων στο γονιδίωμα των φυτών σε πειράματα γενετικής τροποποίησης ριζών. Οι ερευνητές εκμεταλλεύονται την φυσιολογική ικανότητα του βακτηρίου να εισάγει, με οριζόντια μεταφορά και να ενσωματώνει στο φυτικό γονιδίωμα ένα τμήμα του πλασμιδίου Ri (Root inducing), το οποίο ονομάζεται T-DNA. Αυτό οριοθετείται από δύο αλληλουχίες, μήκους 25 ζεύγη βάσεων, το δεξί (Right border, RB) και το αριστερό συνοριακό άκρο (Left border, LB). Τραυματισμός του φυτού έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή και απελευθέρωση στον εξωκυττάριο χώρο φαινολικών ενώσεων όπως η ακετοσυριγγόνη. Οι ενώσεις αυτές αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη virA, η οποία βρίσκεται στη μεμβράνη. Αυτή με τη σειρά της αυτοφωσφορυλιώνεται, ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει τη πρωτεΐνη virG η οποία προσδέεται στη περιοχή vir box που βρίσκεται στον υποκινητή των γονιδίων vir εκκινώντας τη μεταγραφή τους. Μεταξύ των πρωτεϊνών που παράγονται είναι η virD1 που έχει δράση ελικάσης και ξετυλίγει το DNA και η virD2 που έχει δράση νουκλεάσης και κόβει το DNA στη τρίτη ή τέταρτη βάση της αλληλουχίας του δεξιού και του αριστερού συνοριακού άκρου. Με αυτό το τρόπο προκύπτει μονόκλωνο T-DNA στο 5' άκρο του οποίου είναι συνδεδεμένη μία πρωτεΐνη virD2, το C-τελικό άκρο της

οποίας λειτουργεί ως σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) οδηγώντας το T-DNA στο εσωτερικό του πυρήνα. Αρχικά το σύμπλοκο T-DNA/virD2 όπως και άλλα μόρια βακτηριακής προέλευσης περνάνε μέσω ενός συστήματος έκκρισης τύπου 4 (T4SS) που αποτελείται από τις πρωτεΐνες virB1-virB11 και virD4 στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου (Gelvin et al, 2015; Hogdes et al, 2004). Εκεί το σύμπλοκο συνδέεται με τη πρωτεΐνη GALLS (που αντικαθιστά την virE2 του *A. tumefaciens*) και το βοηθάει εισαχθεί μέσω του πυρηνικού πόρου στον πυρήνα (Ream, 2009) . Μέσα στον πυρήνα το T-DNA ενσωματώνεται τυχαία μία ή περισσότερες φορές στο γενετικό υλικό του ριζικού κυττάρου και τα γονίδια που περιέχονται σε αυτό αρχίζουν να εκφράζονται (Gelvin, 2015 et al; Hogdes et al, 2004).

Στα πειράματα γενετικής τροποποίησης εκτός από το T-DNA με τα επιθυμητά γονίδια, στα ριζικά κύτταρα εισάγεται και ένα T-DNA το οποίο περιέχει μεταξύ άλλων τα γονίδια σύνθεσης οπινών και τα γονίδια *rol* (A,B,C,D). Οι οπίνες καταβολίζονται μόνο από ένζυμα του αγροβακτηρίου τα οποία κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται επίσης στο πλασμίδιο Ri, εκτός της T-DNA περιοχής και αποτελούν βασική πηγή άνθρακα και αζώτου για το βακτήριο (Constantino et al, 1994). Τα γονίδια *rol* έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνα για το φαινότυπο που εμφανίζουν οι ρίζες δηλαδή, αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης, αυξημένο αριθμό διακλαδώσεων και πλαγιοτροπισμό (Constantino et al, 1994; Capone et al, 1989; Trovato et al, 2018).

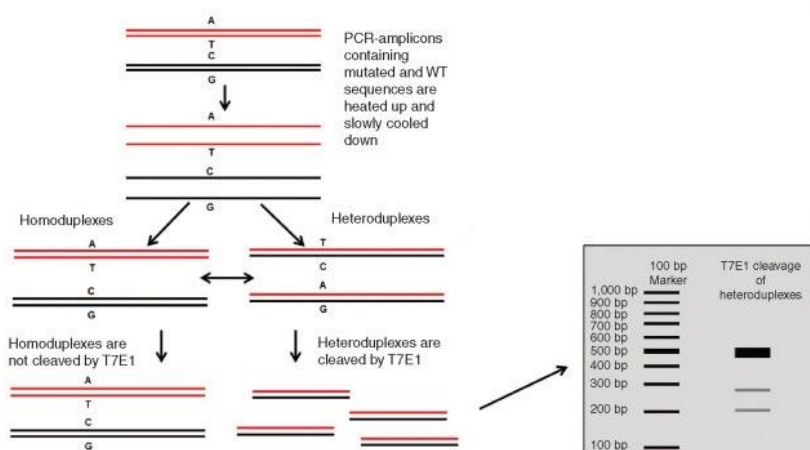


**Εικόνα 7:** Ο μηχανισμός μεταφοράς και ενσωμάτωσης T-DNA στο φυτικό γονιδίωμα του πλασμιδίου Ti είναι παρόμοιος με αυτόν του Ri. Μία διαφορά είναι η πρωτεΐνη GALLS που στη διαδικασία ενσωμάτωσης του πλασμιδίου Ri αντικαθιστά τη πρωτεΐνη virE2 (Gelvin, 2015 et al; Ream et al, 2009).



## 1.5 Ανίχνευση μεταλλάξεων

Ύστερα από την εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9 σε κύτταρα ή σε οργανισμούς θα πρέπει να γίνει έλεγχος ως προς την ύπαρξη μεταλλάξεων. Μία οικονομική, τεχνικά απλή μέθοδος είναι η δοκιμασία ενδονουκλεάσης T7 (T7E1). Στη συγκεκριμένη το DNA-στόχος ενισχύεται με PCR και στη συνέχεια με εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται. Με σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας τα μονόκλινα μόρια DNA με βάση την αρχή της συμπληρωματικότητας συνδέονται εκ νέου. Αν ο μηχανισμός επιδιόρθωσης NHEJ έχει προκαλέσει την εισαγωγή μεταλλάξεων στο DNA τότε κάποια από τα δίκλινα μόρια θα εμφανίζουν βρόγχους καθώς θα αποτελούνται από μία αλυσίδα αγρίου τύπου και μία αλυσίδα που έχει υποστεί μετάλλαξη (έλλειψη ή προσθήκη βάσεων). Η ενδονουκλεάση T7 αναγνωρίζει αυτούς τους βρόγχους και κόβει το γενετικό υλικό σε αυτά τα σημεία. Στη συνέχεια με πηκτή αγαρόζης γίνεται σύγκριση μεταξύ DNA που δεν έχει γίνει προσθήκη του ενζύμου και του DNA με το ένζυμο. Αν υπάρχει μετάλλαξη, τότε στη πηκτή αγαρόζης θα εμφανίζονται μπάντες σε διαφορετικά ύψη, ενώ στο δείγμα ελέγχου θα υπάρχει μόνο μία μπάντα (Vouillot et al, 2015; Mashal et al, 1995).



**Εικόνα 8:** Η δοκιμασία T7E1 χρησιμοποιείται ως μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων που προκλήθηκαν από το σύστημα CRISPR/Cas9 (Ehrke-Schulz et al, 2016).

## Σκοπός της παρούσας πτυχιακή εργασίας:

Η διαλεύκανση των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση της φυματιογένεσης είναι ένα σημαντικό βήμα για την καλύτερη κατανόηση της συμβίωσης μεταξύ ψυχανθών (*Fabaceae*) και ριζοβίων. Ένα από τα μονοπάτια ελέγχου στο *Lotus japonicus* περιλαμβάνει τη δράση μίας SHAGGY-like κινάσης, της LSK1. Ο τρόπος με τον οποίο η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει τη φυματιογένεση δεν είναι πλήρως κατανοητός. Προκειμένου να μελετήσουμε τις λειτουργίες της είναι απαραίτητη η δημιουργία σταθερών μεταλλάγματων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας ενός σχεδιασμένου συστήματος CRISPR/Cas9 που στοχεύει το γονίδιο *LjLSK1* μέσα από την ανίχνευση μεταλλάξεων σε ρίζες του *Lotus japonicus* αλλά και η παρατήρηση φαινοτυπικών διαφορών ανάμεσα στα μεταλλάγματα και σε φυτά ελέγχου έπειτα από εμβολιασμό με ριζόβιο.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Μετασχηματισμός *Agrobacterium rhizogenes* με ηλεκτροπόρωση

Σε κύτταρα *Agrobacterium rhizogenes* 1334 εισήχθησαν οι δυαδικοί φορείς **L2\_AtCas9\_LSK1\_gRNA1-gRNA3**, **L2\_AtCas9\_LSK1\_gRNA2-gRNA4** καθώς και φορέας που δεν περιείχε τις αλληλουχίες gRNA (**L2\_AtCas9\_only**). Οι φορείς αυτοί δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο σε προγενέστερο χρόνο. Αρχικά οι κυψελίδες τοποθετήθηκαν στον πάγο. Παράλληλα σε πάγο ξεπάγωναν σταδιακά ηλεκτροδοκτικά κύτταρα *Agrobacterium rhizogenes*. Στη συνέχεια έγινε εισαγωγή 1μl πλασμιδιακού γενετικού υλικού (10ng) στο σωλήνα που περιείχε τα βακτήρια και ακολούθησε ελαφριά ανακίνηση. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε κυψελίδα η οποία με τη σειρά της τοποθετήθηκε στο ειδικό μηχάνημα υπεύθυνο για την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος. Μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος προστέθηκε στην κυψελίδα 1ml θρεπτικού διαλύματος LB και ολόκληρο το μείγμα μεταφέρθηκε σε σωλήνα Eppendorf. Ακολούθησε επώαση στους 28°C για περίπου 2 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης έγινε φυγοκέντρηση 10.000g/30sec και δημιουργήθηκε ίζημα αγροβακτηρίων. Αφού απομακρύνθηκε το περισσότερο από το υπερκείμενο πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση του ιζήματος και επίστρωση του μείγματος σε τρυβλία Petri που περιείχαν LB και αντιβιοτικά kanamycin και rifampicin με συγκεντρώσεις 50 μg/ml και 25 μg/ml αντίστοιχα. Τέλος, ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 28°C για 2 ημέρες.

### 2.2 Μετασχηματισμός ρίζας με χρήση *Agrobacterium rhizogenes*

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν σπόροι *Lotus japonicus* GIFU. Την πρώτη μέρα οι σπόροι αυτοί χωρίστηκαν σε ομάδες των 80, τοποθετήθηκαν σε σωλήνες Eppendorf των 2ml και προστέθηκε πυκνό διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> μέχρι να γεμίσει το σωληνάκι. Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση για 20min σε θερμοκρασία δωματίου. Το πυκνό H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> αφαιρέθηκε και ακολούθησαν 5 πλύσεις με κρύο, αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O. Έπειτα για την αποστείρωση των σπόρων προστέθηκε διάλυμα που περιείχε 20% χλωρίνη και 0.1% tween 20. Ακολούθησε εκ νέου επώαση υπό ανάδευση για περίπου 20min, μέχρι να αποχρωματιστούν οι σπόροι. Το διάλυμα αφαιρέθηκε και πραγματοποιήθηκαν 8 πλύσεις με κρύο, αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O σε θάλαμο νηματικής ροής. Μετά την τελευταία πλύση ο σωλήνας Eppendorf γέμισε εξ' ολοκλήρου με αποστειρωμένο νερό, καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκε στους 4°C για 2 ημέρες.

Την τρίτη μέρα του πειράματος μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, οι σπόροι αφαιρέθηκαν από τους σωλήνες και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri (50 σπόροι ανά τρυβλίο) που περιείχαν αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί και νερό. Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν κάθετα στο σκοτάδι στους 22°C για τρεις ημέρες. Την πέμπτη μέρα του πειράματος τα πιάτα τοποθετήθηκαν στους 22°C σε συνθήκες 16h φως και 8h σκοτάδι.

Έπειτα προετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες που περιείχαν 5ml LB με αντιβιοτικά kanamycin 50 µg/ml και rifampicin 25 µg/ml προκειμένου να μην αναπτυχθούν άλλοι μικροοργανισμοί. Σε αυτές προστέθηκαν μεμονωμένες αποικίες από τα πιάτα με *A. rhizogenes* 1334 με τα επιθυμητά πλασμίδια. Ακολούθησε επώαση στους 28°C για 2 ημέρες. Την όγδοη μέρα του πειράματος 1ml από τις υγρές καλλιέργειες στρώθηκε σε τρυβλία Petri με LB που περιείχαν τα δύο αντιβιοτικά και ακολούθησε επώαση στους 28°C/160rpm για 2 ημέρες.

Την δέκατη μέρα έγινε ο μετασηματισμός των ριζών με τα μετασηματισμένα *Agrobacterium rhizogenes* 1334. Στα τρυβλία που περιείχαν τα βακτήρια προστέθηκαν 3ml αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O προκειμένου να δημιουργηθεί εναιώρημα. Στη συνέχεια τα φυτά μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο Petri που περιείχε διηθητικό χαρτί και με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού κόψαμε στο σημείο που τελειώνει το υποκοτύλιο και ξεκινάει να αναπτύσσεται η ρίζα. Ακολούθησε προσθήκη ποσότητας από το εναιώρημα, επώαση για περίπου 5 λεπτά και μεταφορά των φυτών σε τετράγωνα τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υλικό ½ MS. Τα τρυβλία καλύφθηκαν εξ' ολοκλήρου με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν κάθετα στο θάλαμο ανάπτυξης σε συνθήκες 22°C, 16h φως/8h σκοτάδι για 2 ημέρες. Μετά το πέρας των δύο ημερών το αλουμινόχαρτο αφαιρέθηκε και πέντε μέρες αργότερα έγινε η 1<sup>η</sup> μεταφορά σε τρυβλία ½ MS που περιείχαν και αντιβιοτικό ceftazidime 300µg/ml. Το αντιβιοτικό αυτό ανήκει στις κεφαλοσπορίνες (β-λακτάμες), ουσίες που εμποδίζουν την σύνθεση πεπτιδογλυκάνης από τα βακτήρια και άρα την κατασκευή βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Έπειτα έγιναν μεταφορές σε τρυβλία ½ MS που περιείχαν και αντιβιοτικό ceftazidime 300µg/ml ανά μία εβδομάδα ή όποτε ήταν απαραίτητο.

### 2.3 Μεταφορά σε γλάστρες και εμβολιασμός με *Mesorhizobium loti*

Τα φυτά ελέγχθηκαν 25 ημέρες μετά το μετασηματισμό με *Agrobacterium rhizogenes* 1334 ως προς τον φθορισμό τους. Το T-DNA που ενσωματώθηκε στο φυτικό γονιδίωμα περιείχε το γονίδιο tRFP. Τα φυτά των οποίων οι ρίζες φθόριζαν κατά τον έλεγχο με το στερεοσκόπιο θεωρήθηκαν ότι είχαν μετασηματιστεί και μεταφέρθηκαν σε γλάστρες με αποστειρωμένη παχιά άμμο, λεπτή άμμο και βερμικουλίτη (αναλογία 2:1:1). Τα φυτά συνέχισαν την ανάπτυξη τους στο θάλαμο ανάπτυξης σε συνθήκες 22°C, 16h φως/8h σκοτάδι.

Από stock αποθηκευμένο στους -80°C ποσότητα βακτηρίου *Mesorhizobium loti* μεταφέρθηκε σε πιάτο Petri που περιέχει θρεπτικό YMB και τοποθετήθηκε στους 28°C για 3 ημέρες. Στη συνέχεια μικρή ποσότητα από την καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένη φιάλη 50ml YMB η οποία τοποθετήθηκε στους 28°C για 3 ημέρες.

Μία εβδομάδα μετά τη μεταφορά σε γλάστρες, ποσότητα από την υγρή καλλιέργεια αραιώθηκε με προσθήκη ddH<sub>2</sub>O μέχρι η απορρόφηση να ισούται με OD<sub>600</sub>=0,02. Τέλος 1ml από την αραιωμένη καλλιέργεια προστέθηκε σε κάθε γλάστρα πάνω στη ρίζα του φυτού. Επειδή τα φυτά έλαβαν άζωτο με τη μορφή

Hoagland κατά λάθος δύο ημέρες μετά τον εμβολισμό, το οποίο μπορεί να αναστείλει την δημιουργία φυματίων, αποφασίστηκε να επαναληφθεί ο εμβολιασμός τους με *Mesorhizobium loti*, μια εβδομάδα αργότερα. Μέχρι και την ημέρα της δειγματοληψίας τα φυτά ποτίζονταν ανά δύο ημέρες εναλλάξ με νερό ή Hoagland 100% χωρίς άζωτο.

#### 2.4 Δειγματοληψία ριζών από μετασχηματισμένα φυτά

Στα πλαίσια του συγκεκριμένου πειράματος πραγματοποιήθηκαν δύο δειγματοληψίες. Η πρώτη έλαβε χώρα 3,5 εβδομάδες μετά το μετασχηματισμό των φυτών με *A. rhizogenes* λόγω επιμολύνσεων, ενώ η δεύτερη 3,5 εβδομάδες μετά τον δεύτερο εμβολιασμό με *Mesorhizobium loti*. Στη δεύτερη δειγματοληψία μετρήθηκε το μήκος της ρίζας, το μήκος του βλαστού καθώς και ο αριθμός των φυματίων. Τα δείγματα ρίζας φυλάχθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.5 Απομόνωση DNA

Προκειμένου να γίνει ανίχνευση και ανάλυση των μεταλλαγμάτων έπρεπε να απομονωθεί γενετικό υλικό από το ριζικό ιστό. Το πρωτόκολλο παρατίθεται παρακάτω:

1. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν θρυμματίζονται με τη χρήση γουδιού/εμβόλου και τοποθετούνται σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο.
2. Το διάλυμα CTAB τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους  $65^{\circ}\text{C}$  μέχρι να διαλυτοποιηθεί πλήρως.
3. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 300μl από το διάλυμα CTAB, γίνεται ανάμιξη με τη χρήση της συσκευής vortex και ακολουθεί επώαση στους  $65^{\circ}\text{C}$  για 20 λεπτά.
4. Μετά την επώαση, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στα 11.000g για 5 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιους σωλήνες Eppendorf χωρητικότητας 1,5ml.
5. Σε κάθε σωληνάκι προστίθενται 150μl διαλύματος που περιέχει χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1. Ακολουθεί ανάμιξη με vortex και φυγοκέντρηση στα 11.000g για 5 λεπτά.
6. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο, που αποτελείται από την υδατική φάση, μεταφέρεται σε καινούργιους σωλήνες Eppendorf χωρητικότητας 1,5ml.
7. Προσθήκη 0,7\*τον όγκο του διαλύματος ισοπροπανόλης, ελαφριά ανάμιξη και επώαση για 10 λεπτά στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
8. Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 15 λεπτά και απομακρύνση του υπερκειμένου.
9. Προσθήκη 500μl κρύας αιθανόλης 70%, φυγοκέντρηση στα 11.000g για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
10. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη.

11. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 15μl ddH<sub>2</sub>O + RNase A (αναλογία 50:1).
12. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας όλων των δειγμάτων με χρήση του μηχανήματος Nanodrop. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

## 2.6 Ανάλυση δραστηκότητας των gRNAs

Αρχικά οι επιθυμητές περιοχές του γονιδίου LSK1 ενισχύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε η Q5 πολυμεράση (High-Fidelity DNA polymerase, New England Biolabs). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: α) 98°C για 10sec, β) 98°C για 30sec γ) 59°C για τη περιοχή που περιέχει το gRNA2 και 61°C για τη περιοχή που περιέχει το gRNA4 δ) 72°C για 40sec ε) 72°C για 2min. Τα αντιδραστήρια για κάθε αντίδραση αναγράφονται στο πίνακα 1. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στο πίνακα 2.

**Πίνακας 1.** Αντιδραστήρια και ποσότητες αντίδρασης PCR.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Q5 Master mix 2X	7,5μl
Forward primer (10pmol/μl)	0,75μl
Reverse primer (10pmol/μl)	0,75μl
ddH <sub>2</sub> O	5μl
DNA (25ng/μl)	1μl

**Πίνακας 2.** Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')
LSK1_mut1_forward	GACCAATAAACTTGGTGTG
LSK1_mut1_reverse	ACCACAACAAATTTAAAATGTGA
LSK2_mut2_forward	GTGGAGTTGATCAGTTAGTG
LSK2_mut2_reverse	TTGAACAGAGGAGGTAGTG

Στην αντίδραση της T7 (Endonuclease I, New England Biolabs) κάθε ενισχυμένο δείγμα χωρίστηκε σε δύο σωληνάκια και τοποθετήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή όπου οι αλυσίδες DNA αποδιατάχθηκαν με αύξηση της θερμοκρασίας και υβριδίστηκαν εκ νέου με σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας. Οι συνθήκες της αντίδρασης αποδιάταξης-επαναυβριδοποίησης είναι: 95°C για 5 λεπτά, 95°C → 85°C ( με -2°C/sec ramp rate), 85°C → 25°C (με -1°C/sec ramp rate). Τα συστατικά της αντίδραση φαίνονται στο πίνακα 3. Στη συνέχεια 0,6μl της T7 (4U/μl) προστέθηκαν στο ένα από τα δύο σωληνάκια, ενώ το δεύτερο λειτούργησε ως δείγμα ελέγχου. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C για 30 λεπτά και ακολούθησε προσθήκη 1μl EDTA σε κάθε δείγμα, ρόλος του οποίου είναι να απενεργοποιήσει την ενδονουκλεάση. Τα αντιδραστήρια για κάθε αντίδραση και οι ποσότητες αναγράφονται στο πίνακα 3.

**Πίνακας 3.** Αντιδραστήρια αντίδρασης αποδιάταξης και επαναϋβριδοποίησης.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
T7 Buffer 2X	2μl
ddH <sub>2</sub> O	11μl
DNA (PCR reaction)	6μl

## 2.7 Έλεγχος μη ειδικής στόχευσης των gRNAs

Ο εντοπισμός πιθανών σημείων μη ειδικής στόχευσης των gRNAs στο γονιδίωμα γίνεται με τη βοήθεια βάσεων δεδομένων και αλγορίθμων. Στο συγκεκριμένο πείραμα βασιστήκαμε στον αλγόριθμο CRISPR-P (Liu et al, 2017). Παραθέσαμε τις αλληλουχίες των gRNAs και το πρόγραμμα εμφάνισε τις διάφορες αλληλουχίες του γονιδιώματος του φυτού τις οποίες μπορεί να στοχεύουν μη ειδικά τα gRNAs καθώς και τις συντεταγμένες αυτών. Για καθεμία από αυτές εμφανίζει έναν αριθμό που ονομάζεται off score, του οποίου η τιμή όσο πιο κοντά στο 1 είναι, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να προκύψει μη ειδική σύνδεση του gRNA με την αντίστοιχη γονιδιωματική αλληλουχία και άρα να δράσει η Cas9. Επιλέξαμε να ελέγξουμε τη περιοχή με το υψηλότερο off score για κάθε περίπτωση. Για τις δύο αυτές περιοχές έγινε σχεδιασμός εκκινητών με τη βοήθεια του εργαλείου Primer designing tool του NCBI. Ακολούθησε ενίσχυση της εκάστοτε περιοχής με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και δοκιμασία T7E1 για ανίχνευση μεταλλάξεων όπως περιγράφηκε παραπάνω. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στο πίνακα 4.

**Πίνακας 4.** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε τον έλεγχο της μη ειδικής σύνδεσης των gRNAs.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' → 3'
gRNA2_offtarget_0.532F	TCCGCAACCAAGGCTACTTAAT
gRNA2_offtarget_0.532R	ACAGAGAACCCAGCTAACACATC
gRNA4_offtarget_0.750F	GCTTTCTTACAGCAGAGCATCG
gRNA4_offtarget_0.750R	TTCTGGTGTTTCCCACGAGA

## 2.8 Αλληλούχηση μεταλλάξεων

Το πρώτο στάδιο της προετοιμασίας των επιλεγμένων δειγμάτων για αλληλούχηση είναι η ενίσχυση τους με PCR (Q5 High-Fidelity DNA polymerase, New England Biolabs). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50μl, οι συνθήκες της αντίδρασης είναι: α) 98°C για 10sec, β) 98°C για 30sec γ) 59°C για τη περιοχή που περιέχει το gRNA2 και 61°C για τη περιοχή που περιέχει το gRNA4 δ) 72°C για 40sec (30 κύκλοι) ε) 72°C για 2min. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι: i)

LSK1\_mut1\_forward, LSK1\_mut1\_reverse για τη περιοχή δράσης του gRNA2 και ii) LSK1\_mut2\_forward, LSK1\_mut2\_reverse για τη περιοχή δράσης του gRNA4.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης της συνολικής ποσότητας της αντίδρασης. Με τη βοήθεια του UV απομονώθηκε το κομμάτι από τη πηκτή που περιείχε το ενισχυμένο τμήμα DNA. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Macherey-Nagel πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από το τμήμα πηκτής αгарόζης. Στη συνέχεια ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης του γενετικού υλικού και της καθαρότητας στο μηχάνημα Nanodrop και εισαγωγή του τμήματος στο φορέα pJET 1.2 (ThermoFisher). Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στο πίνακα 5.

**Πίνακας 5.** Αντιδραστήρια και ποσότητες για κλωνοποίηση σε φορέα pJET.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες (<math>V_{TEA} = 10\mu\text{l}</math>)</b>
<b>Reaction Buffer 2X</b>	5μl
<b>T4 λιγάση</b>	0,5μl
<b>Φορέας pJET 1.2</b>	0,5μL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Μέχρι $V_{TEA} = 10\mu\text{l}$
<b>DNA</b>	25ng

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την εισαγωγή του φορέα σε χημειοδεκτικά κύτταρα *Escherichia coli DH5a* με τη διαδικασία του μετασχηματισμού με θερμικό σοκ. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε είναι το εξής:

1. Σταδιακή απόψυξη των χημειοδεκτικών βακτηρίων από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε πάγο.
2. Προσθήκη 5μl πλασμιδίου στο σωλήνα Eppendorf που περιέχει τα βακτήρια και ελαφριά ανάδευση.
3. Μεταφορά του σωλήνα Eppendorf σε πάγο και επώαση για 25 λεπτά.
4. Μεταφορά του σωλήνα Eppendorf στους  $42^{\circ}\text{C}$  για 1 λεπτό.
5. Μεταφορά του σωλήνα Eppendorf στο πάγο για 5 λεπτά.
6. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
7. Προσθήκη 400μl θρεπτικού LB και επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}/210$  rpm για 60 λεπτά.
8. Απόχυση της καλλιέργειας σε τριβλίο Petri που περιέχει LB και αντιβιοτικό carbenicillin.
9. Επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 16-18 ώρες.

Στη συνέχεια μεμονωμένες αποικίες από το τριβλίο μεταφέρθηκαν σε υγρές καλλιέργειες που περιέχουν LB και αντιβιοτικό carbenicillin και τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 16-18 ώρες. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδίου σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Macherey-Nagel και μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των δειγμάτων στο μηχάνημα Nanodrop. Το επόμενο βήμα ήταν η διαγνωστική πέψη με το ένζυμο BgIII για την επιβεβαίωση της



εισαγωγής του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες τους φαίνονται στο πίνακα 6.

**Πίνακας 6.** Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες τους για τη διαγνωστική πέψη.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες (<math>V_{TEA}=15\mu\text{l}</math>)</b>
<b>Buffer 3.1</b>	1 $\mu\text{l}$
<b>BgIII</b>	0,3 $\mu\text{l}$
<b>Δείγμα</b>	1,5 $\mu\text{l}$
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	7,2 $\mu\text{l}$

Τέλος τα δείγματα αραιώθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας που πραγματοποίησε την αλληλουχία (CeMIA SA), προστέθηκε ο pJET1.2 forward εκκινητής (διανέμεται μαζί με το φορέα pJET1.2) και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση κατά Sanger.

## 2.9 Απομόνωση RNA

1. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν θρυμματίζονται με τη χρήση γουδιού και εμβόλου και τοποθετούνται σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο.
2. Τα δείγματα αφαιρούνται από το υγρό άζωτο και επωάζουν σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 λεπτά.
3. Προσθήκη 1ml διαλύματος Trizol και ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση στο vortex για 1-2 λεπτά.
4. Επώαση για 5 λεπτά δε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στα 12.000g για 7 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούργιο σωλήνα Eppendorf.
5. Προσθήκη 200 $\mu\text{l}$  χλωροφορμίου, ανάδευση με το vortex και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Φυγοκέντρηση στα 12.000g για 15 λεπτά.
7. Μεταφορά της επάνω φάσης και προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση.
8. Επώαση στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά.
9. Φυγοκέντρηση στα 12.000g για 17 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου.
10. Προσθήκη 1ml αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση στα 12.000g για 5 λεπτά.
11. Απόρριψη της αιθανόλης και επαναδιαλυτοποίηση σε 30 $\mu\text{l}$  αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O.
12. Μέτρηση συγκέντρωση στο μηχάνημα Qubit.
13. Αποθήκευση δειγμάτων στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.10 Δοκιμασία DNase

Προκειμένου να βεβαιωθούμε ότι στα δείγματα μας δεν υπήρχε καθόλου DNA που θα ενισχυόταν με τη qPCR και θα επηρέαζε το αποτέλεσμα αυτής προσθέσαμε στα δείγματα μας DNase, ένα ένζυμο το οποίο καταστρέφει DNA αφήνοντας ανέπαφο το RNA. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αραιώση στα δείγματα έτσι ώστε ο τελικός όγκος να ισούται με 10 $\mu\text{l}$  και η τελική συγκέντρωση του RNA να

ισούται με 10ng/μl. Εκτός από τη DNase προστέθηκαν το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (Buffer 10X) και ένας αναστολέας του ενζύμου RNase (RNase out). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή στους 37°C για 40 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο πάγο και σε 2μl από το αραιωμένο δείγμα πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR για να ελέγξουμε αν υπήρχαν υπολείμματα DNA. Οι εκκινητές στόχευσαν περιοχή του γονιδίου *LjUb*. Μετά τη διαγνωστική ενίσχυση προστέθηκαν 0,5μl EDTA και ακολούθησε επώαση στους 65°C για 10 λεπτά. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στο πίνακα 5. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη PCR φαίνονται στο πίνακα 6.

**Πίνακας 7.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαγνωστική PCR.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' → 3'
Ub_Forward	ATGCAGATCTTTTGTGAAGAC
Ub_Reverse	ACCACCACGGAAGACGGAG

**Πίνακας 8.** Διαλύματα και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαγνωστική PCR.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Buffer A	2μl
ddH <sub>2</sub> O	13,96μl
Forward primer	0,8μl
Reverse primer	0,8μl
dNTPs	0,4μl
K-Taq polymerase	0,08μl
DNA	2μl

## 2.11 Ποσοτική PCR (qPCR)

Για τη κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το ιδιοσύστατο γονίδιο *LjUB*. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι: α) 55°C για 10min, β) 95°C για 1min, 95°C για 10sec, 60°C για 30sec (40 κύκλοι). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για το ιδιοσύστατο γονίδιο όσο και για την LSK1 φαίνονται στο πίνακα 7. Τα ονόματα των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες τους φαίνονται στο πίνακα 8.

**Πίνακας 9.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη qPCR.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' → 3'
UBQrt_F	TTCACCTTGTGCTCCGTCTTC
UBQrt_R	AACAACAGCACACAGCCAATCC
qRT_LSK1_2_F	CAAACGGGCAACCACTACCTC
qRT_LSK1_2_R	TCAAAGCGAAAATCAACTCAACTCC

**Πίνακας 10.** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη qPCR.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα</b>	5μl
<b>Μείγμα ενζύμων</b>	0,5μl
<b>Forward primer</b>	0,4μl
<b>Reverse primer</b>	0,4μl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	2,7μl
<b>Δείγμα</b>	1μl

## **2.12 Στατιστική ανάλυση του αριθμού των φυματίων**

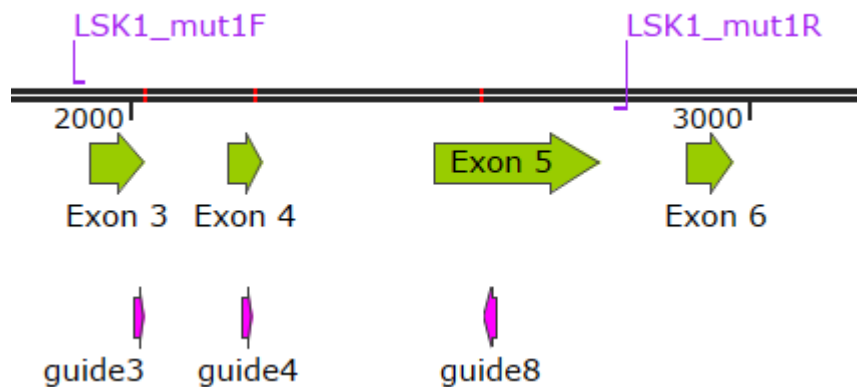
Έλεγχος που έγινε στον αριθμό των φυματίων από φυτά που μετασχηματίστηκαν τόσο με τα gRNA2/gRNA4 όσο και με τον άδειο φορέα (Cas9-only) ως προς τη κανονικότητα (normality) τους έδειξε ότι δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή. Προκειμένου λοιπόν να γίνει στατιστική ανάλυση θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ένα μη παραμετρικός έλεγχος. Αυτός που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη ανάλυση είναι το Mann-Whitney U test και πραγματοποιήθηκε στη γλώσσα προγραμματισμού R. Η ανάλυση συγκρίνει τον αριθμό των φυματίων και τον αριθμό φυματίων ανά εκατοστό ρίζας μεταξύ των δύο τύπων φυτών. Από την τελική ανάλυση αφαιρέθηκαν οι μηδενικές τιμές όσον αφορά τα φυτά Cas9 only καθώς θεωρήθηκαν ως ακραίες τιμές (λόγω προσθήκης αζώτου).

## **3. Αποτελέσματα**

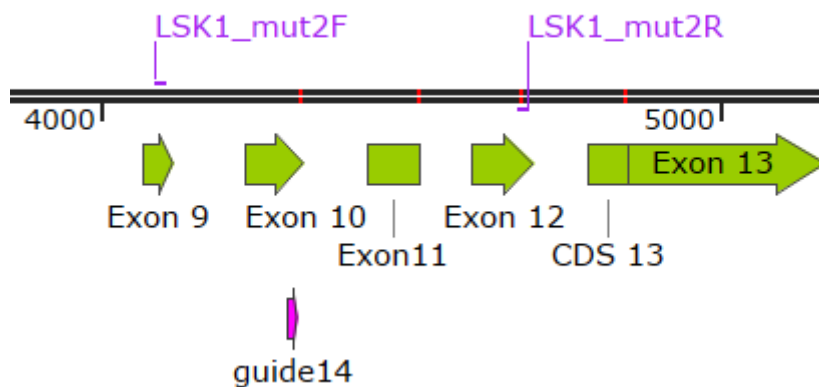
### **3.1 Ηλεκτροδιάτρηση σε *Agrobacterium rhizogenes* 1334**

Με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης έγινε εισαγωγή τριών πλασμιδιακών φορέων στο στέλεχος *Agrobacterium rhizogenes* 1334. Οι φορείς περιέχουν γονίδιο ανθεκτικότητας στη kanamycin προκειμένου με βάση την ανθεκτικότητα σε αυτή να επιλεγθούν τα βακτήρια που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο. Επίσης διαθέτουν το γονίδιο *tRFP* που παράγει μία φθορίζουσα κόκκινη πρωτεΐνη και βοηθάει στην ανίχνευση των μετασχηματισμένων φυτών, καθώς οι ρίζες φθορίζουν κόκκινο όταν τις παρατηρούμε στο στερεοσκόπιο. Επιπλέον διαθέτουν το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη AtCas9. Οι δύο από τους φορείς αυτούς (εικόνα 9) διαθέτουν από δύο gRNAs ο καθένας που στοχεύουν το γονίδιο *LjLSK1*. Ο τρίτος φορέας έχει το ρόλο φορέα ελέγχου, είναι ίδιος ως προς το περιεχόμενο με τους άλλους δύο αλλά δε περιέχει τις αλληλουχίες των gRNAs.



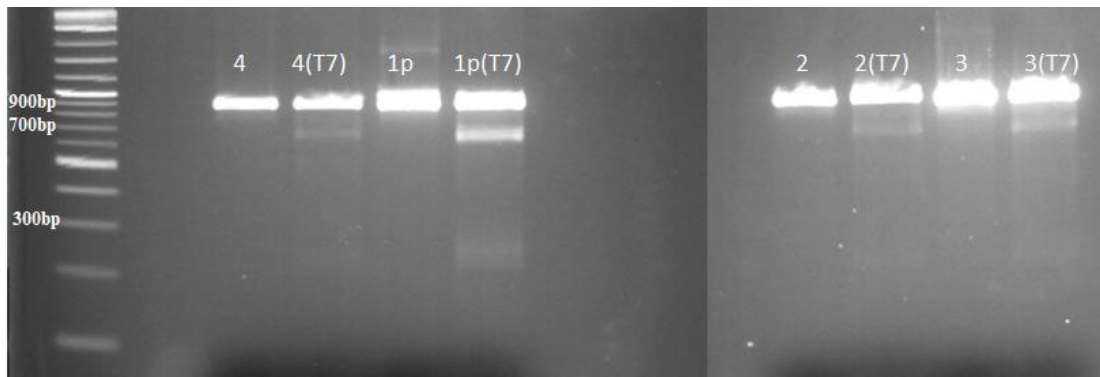


**Εικόνα 10.** Η περιοχή στο γονίδιο *LjLSK1* που στοχεύουν τα gRNA1 (g3), gRNA2 (g4), gRNA3 (g8) καθώς και το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με PCR.

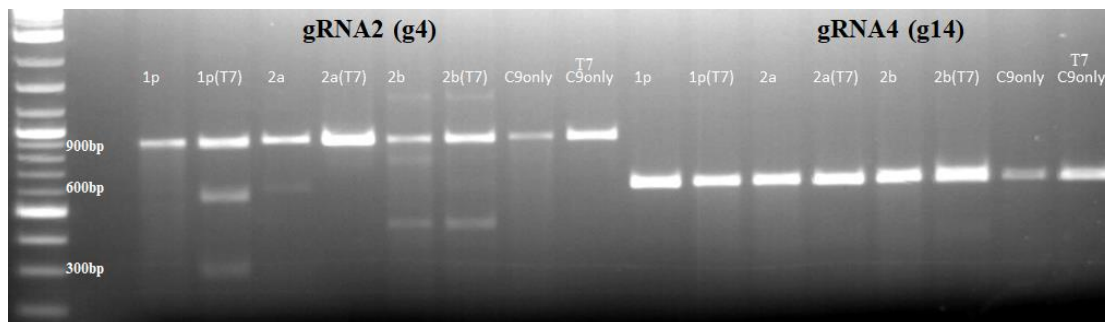


**Εικόνα 11.** Η περιοχή του γονιδίου *LjLSK1* στην οποία δρα το gRNA4 (g14), καθώς και το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με PCR.

Στη πρώτη δειγματοληψία [3,5 εβδομάδες μετά το μετασχηματισμών των ριζών (Hairy root transformation)] συλλέξαμε ρίζες από 4 φυτά που είχαν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο LSK1:gRNA1-gRNA3 (g3-g8) και δύο φυτά που είχαν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο LSK1:gRNA2-gRNA4 (g4-g14). Τα φυτά αυτά εμφάνισαν φθορισμό στη ρίζα όταν παρατηρήθηκαν στο στερεοσκόπιο. Αρχικά έγινε απομόνωση DNA, για να ακολουθήσει ενίσχυση των δύο περιοχών που στοχεύουν τα gRNAs με Q5 High-Fidelity PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές LSK\_mut1F, LSK\_mut1R και LSK\_mut2F, LSK\_mut2R. Ο έλεγχος για την επιτυχία της ενίσχυσης έγινε σε πηκτική αгарόζης 1%. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία T7E1 για να ανιχνεύσουμε υπάρχουσες μεταλλάξεις. Κάθε ενισχυμένο δείγμα χωρίστηκε ώστε να πραγματοποιηθούν δύο αντιδράσεις αποδιάταξης-επανασύνδεσης των κλώνων. Στη μία από αυτές προστέθηκε το ένζυμο T7E1, ενώ στην άλλη όχι και θα λειτούργησε ως αρνητικός μάρτυρας. Μετά και τη προσθήκη EDTA που απενεργοποίησε το ένζυμο, τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε πηκτική αгарόζης 2% (εικόνες 12, 13).



**Εικόνα 12:** Αποτέλεσμα της δοκιμασίας T7E1 σε δείγματα από φυτά που μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο LSK1:gRNA1-gRNA3 (g3-g8). Το δείγμα 1p, 2 και 3 δεν αποτελούνται από μία ρίζα, αλλά από ένα σύνολο ριζών που μπορεί να φέρουν διαφορετικές μεταλλάξεις μεταξύ τους.



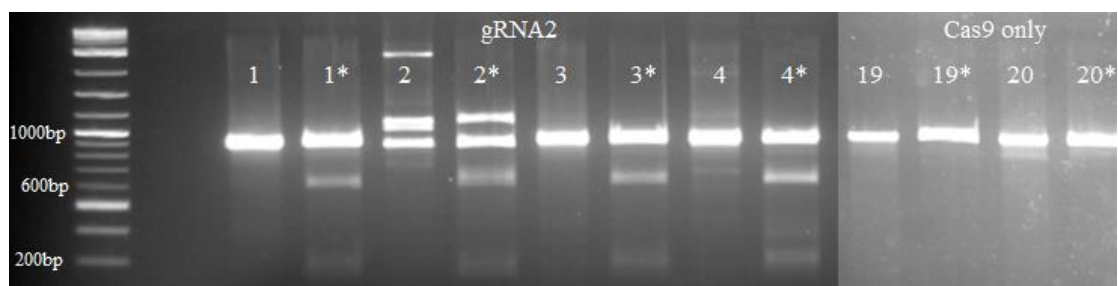
**Εικόνα 13:** Αποτέλεσμα της δοκιμασίας T7E1 σε δείγματα από φυτά που μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο LSK1:gRNA2-gRNA4 (g4-g14). Τα δείγματα 2a και 2b περιέχουν μεμονωμένες ρίζες από το φυτό 2 όπου καθεμία ρίζα φέρει διαφορετικές μεταλλάξεις. Στο δείγμα 2a (gRNA2) παρατηρείτε μία μπάντα η οποία πιθανώς αποκωδομήθηκε μη ειδικά από τη T7.

Σε όλα τα φυτά της πρώτης δειγματοληψίας, που μετασχηματίστηκαν με τα gRNA1 και gRNA3, εντοπίστηκαν μεταλλάξεις όπως φαίνεται και στην εικόνα 11. Όμως το μοτίβο που παρατηρείται στη πηκτή αгарόζης αντιστοιχεί σε δράση του gRNA3, που σημαίνει το gRNA1 δεν είναι λειτουργικό. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου. Επιπλέον από τα δύο φυτά που μετασχηματίστηκαν με τα gRNA2 και gRNA4, μόνο στο ένα ανιχνεύεται μετάλλαξη από τη δράση του gRNA2 (δείγμα 1p, εικόνα 12). Το αποτέλεσμα αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα ότι το gRNA4 είναι μη λειτουργικό. Είναι πιθανό το ποσοστό των κυττάρων που έφεραν αλληλόμορφα με μεταλλάξεις ένθεσης ή ελλείμματος (INDELS) στην αλληλουχία-στόχο του gRNA4 να ήταν χαμηλό. Με τη πάροδο του χρόνου το ποσοστό των κυττάρων που φέρουν μεταλλαγμένα αλληλόμορφα αυξάνεται, οπότε ήταν πιθανό να επιβεβαιωθεί η δραστηριότητα του gRNA4 στη 2<sup>η</sup> δειγματοληψία που ακολουθεί.

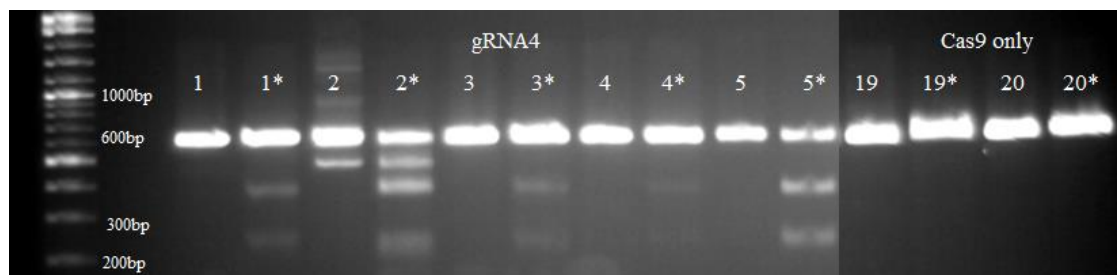
Η διαδικασία της δεύτερης δειγματοληψίας, που πραγματοποιήθηκε 3,5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με ριζόβιο (3,5 εβδομάδες μετά το μετασχηματισμό



με αγροβακτήριο), ήταν παρόμοια με αυτή της πρώτης. Συλλέχθηκαν δείγματα ρίζας από 11 φυτά που μετασχηματίστηκαν με το φορέα LSK1:gRNA2-gRNA4 (g4-g14) καθώς και από 7 φυτά που μετασχηματίστηκαν με το φορέα που δεν έφερε τις αλληλουχίες gRNA. Η δοκιμασία T7E1 φανέρωσε ότι από τα 11 φυτά που μετασχηματίστηκαν με το φορέα LSK1:gRNA2-gRNA4 (g4-g14) τα 8 φέρουν μεταλλάξεις και στις δύο θέσεις στόχευσης των gRNAs, 1 φέρει μετάλλαξη μόνο στη θέση στόχευσης του gRNA2, 1 φυτό φέρει μετάλλαξη στη θέση στόχευσης του gRNA4, ενώ 1 φυτό δε φέρει καμία απολύτως μετάλλαξη (εικόνα 14, 15). Λόγω επιμολύνσεων δεν συλλέξαμε δείγματα από φυτά που μετασχηματίστηκαν με το φορέα LSK1:gRNA1-gRNA3 (g3-g8).



**Εικόνα 14.** Δείγματα μετά τη διαδικασία T7E1 που εμφανίζουν μεταλλάξεις οι οποίες οφείλονται στο gRNA2. Τα δείγματα 1-4 έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο LSK1:gRNA2-gRNA4 (g4-g14), ενώ τα δείγματα 19 και 20 με το φορέα Cas9 only. Όπου \* έχει προστεθεί ένζυμο το T7E1.



**Εικόνα 15.** Δείγματα μετά τη διαδικασία T7E1 που εμφανίζουν μεταλλάξεις οι οποίες οφείλονται στο gRNA4. Τα δείγματα 1-5 έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο LSK1:gRNA2-gRNA4 (g4-g14), ενώ τα δείγματα 19 και 20 με το φορέα Cas9 only. Όπου \* έχει προστεθεί ένζυμο το T7E1.

### 3.3 Έλεγχος μη ειδικής στόχευσης των gRNAs

Στα δείγματα της δεύτερης δειγματοληψίας που εμφάνισαν μεταλλάξεις τουλάχιστον σε μία από τις δύο περιοχές ενίσχυσης ακολούθησε έλεγχος μη ειδικής στόχευσης για τα gRNAs (off-target effects). Ο προσδιορισμός των πιθανών θέσεων μη ειδικής στόχευσης έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος CRISPR-P (εικόνες 16, 17). Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας T7E1 έδειξαν ότι το gRNA4 δεν αλληλεπιδρά με καμία άλλη περιοχή (εικόνα 19). Αντίθετα όταν έγινε έλεγχος για το gRNA2 παρατηρήθηκε μοτίβο το οποίο όμως δε ταιριάζει με το αναμενόμενο σε περίπτωση που υπήρχε μετάλλαξη στη περιοχή ενίσχυσης (εικόνα 20). Αλληλούχηση κατά

Sanger της συγκεκριμένης περιοχής θα μας βοηθήσει να ερμηνεύσουμε το αποτέλεσμα αυτό.

Sequence	Off-score ②	MMS <sup>②</sup>	Locus	Gene	Region
GTAATAGGGACTGGAACCTTGG	0.532	4MMS	chr2:+17161970	Lj2g3v1068650	CDS
ATGGTTGGGCTCTGGGTCITTAGG	0.332	4MMS	chr0:-127689595	Lj0g3v0246419	exon
ATGGTTGGGCTCTGGGTCITTAGG	0.332	4MMS	chr2:-36175655	Lj2g3v2691260	exon
ATGGTTGGGCTCTGGGTCITTAGG	0.332	4MMS	chr0:+180561289		Intergenic
GTGTAGGGACTAGACCCTTGG	0.267	4MMS	chr1:-57238803	Lj1g3v4764120 Lj1g3v4764130	CDS
GTGTGTAGACTAGATCATTGGG	0.249	4MMS	chr0:-191753624		Intergenic
GTGTGTGGCACTGGATCTTTGG	0.173	3MMS	chr3:+19174922	Lj3g3v1507310	CDS
GTGTGTGGAAATGGGTCCTTGG	0.157	4MMS	chr1:+58488654	Lj1g3v4831730	CDS
TTGGTTGTGACATGATCCTTAGG	0.150	4MMS	chr1:-22872513	Lj1g3v1929140	intron
GTGTGTGGCACTGGATCATTGG	0.145	3MMS	chr0:-27592177	Lj0g3v0073509	CDS
GTGTTTGTACTAGATCCTTGGG	0.102	4MMS	chr0:+54055763	Lj0g3v0121249	exon
GTGTGGGAAGCTGGATCATTGG	0.099	4MMS	chr6:-23017574	Lj6g3v1984530	CDS
GTATTGGGGTTGGATCCTTGG	0.077	4MMS	chr3:+26370431		Intergenic
GTGGTTTGGATTGGATTTTGG	0.053	4MMS	chr4:-812316		Intergenic
GCGGCTGGGACTGGATCCTCGG	0.045	4MMS	chr2:+28958578	Lj2g3v1984120	CDS
TTGGAATGGGACTGGGTCGTTGG	0.043	4MMS	chr0:+142960354	Lj0g3v0275609	intron
ATGGTTAGACTAGTTCCTTAG	0.043	4MMS	chr2:-7827516	Lj2g3v0571730	intron
GTGGTTGGGTGTGGATCCCAAGG	0.034	4MMS	chr0:+17838570		Intergenic
GTGGTTGGGTGTGGATCCCAAGG	0.034	4MMS	chr5:+21117882		Intergenic
GTGTGTGGTACTTGATCCATAGG	0.023	4MMS	chr4:-31873649		Intergenic

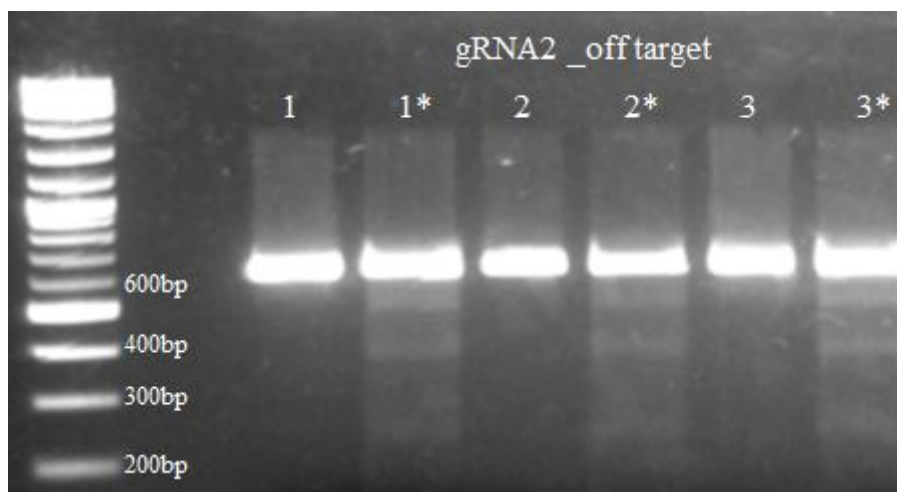
Εικόνα 16. Πιθανές περιοχές μη ειδικής σύνδεσης του gRNA2.

Sequence	Off-score ②	MMS <sup>②</sup>	Locus	Gene	Region
CTCAGATTAAAGCACACCCGTTGG	0.750	1MMS	chr1:-30158479	Lj1g3v2611330	CDS
CACAAATTAAAGCACACCCATGG	0.516	4MMS	chr6:-23015925	Lj6g3v1984530	CDS
ATAAAATTAAAGCGCACCCAGCGG	0.322	4MMS	chr0:-70060417		Intergenic
CACAGATTAAAGCACATCCATGG	0.278	4MMS	chr5:-22332799	Lj5g3v1531180	CDS
CTCAAATTAAAGCTCATCCATGG	0.101	4MMS	chr1:+58490669		Intergenic
CTCAGATTAAAGCTCATCCATGG	0.087	3MMS	chr3:+19176480	Lj3g3v1507310	CDS

Εικόνα 17. Πιθανές περιοχές μη ειδικής σύνδεσης του gRNA4.

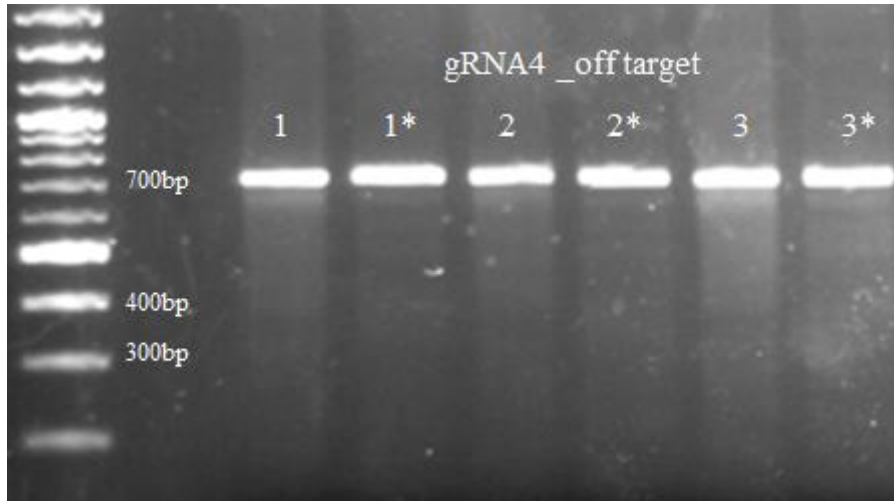
Πίνακας 12. Περιοχή ενίσχυσης και μοτίβο μετά από προσθήκη του ενζύμου T7E1.

Περιοχή που ενισχύθηκε	T7E1
gRNA2 off target → 624bp	500bp + 124bp
gRNA4 off target → 724bp	526bp + 198bp



Εικόνα 18. Έλεγχος μη ειδικής στόχευσης του gRNA2.

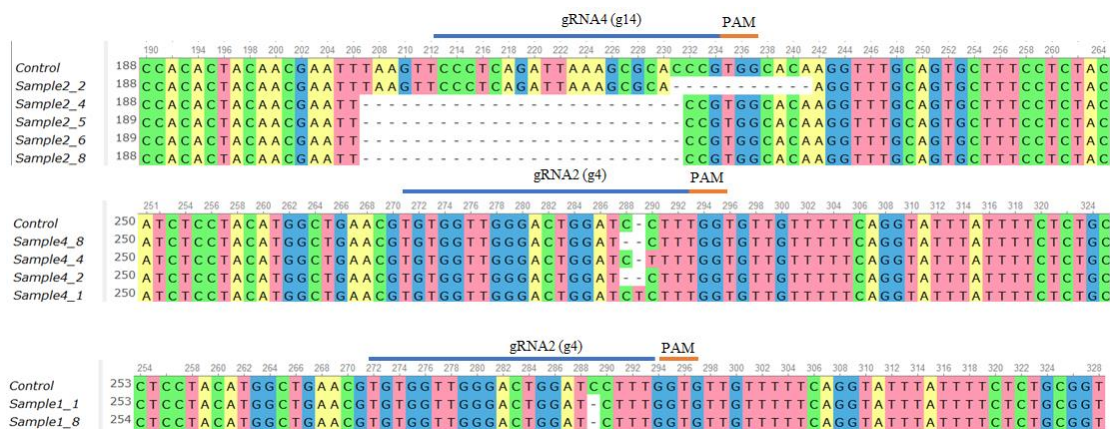




**Εικόνα 19.** Έλεγχος μη ειδικής στόχευσης του gRNA4.

### 3.4 Επιβεβαίωση μεταλλάξεων με αλληλούχηση κατά Sanger

Ορισμένα από τα δείγματα που βγήκαν θετικά στην διαδικασία T7E1 προετοιμάστηκαν και στάλθηκαν για αλληλούχηση κατά Sanger προκειμένου να διαπιστώσουμε τις αλλαγές που προέκυψαν από τη δράση του συστήματος CRISPR/Cas9. Επιπλέον στάλθηκε και ένα δείγμα Cas9 only η αλληλουχία του οποίου χρησιμοποιήθηκε κατά την πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών ως αλληλουχία αναφοράς. Στην εικόνα 20 φαίνονται οι περιοχές της LSK1 που φέρουν τις αλληλουχίες-στόχους των gRNA2 και gRNA4. Στην περιοχή-στόχο του gRNA4 του δείγματος 2 παρατηρούνται ελλείψεις 11 και 25 βάσεων. Στη περιοχή-στόχο του gRNA4 του δείγματος 4 υπάρχουν ελλείψεις, αντικαταστάσεις και προσθήκες βάσεων, ενώ στο δείγμα 1 παρατηρείται έλλειψη 1 βάσης. Όλες οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίστηκαν στις αλληλουχίες-στόχους των δύο gRNAs 3-4 βάσεις ανοδικά της PAM, άρα είναι σίγουρο ότι είναι αποτέλεσμα της δράσης τους. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι πιθανό να επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου άρα και τη ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης.

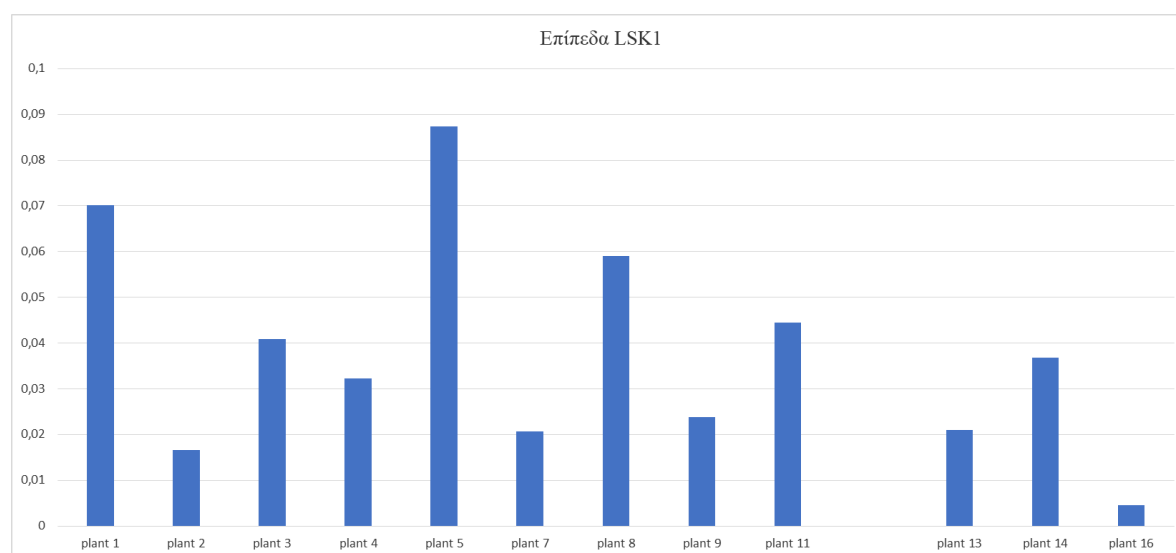


**Εικόνα 20.** Αποτελέσματα αλληλούχησης κατά Sanger. Η πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα MUSCLE μέσω του προγράμματος UniPro

UGENE. Κατά την προετοιμασία για την αλληλούχηση μεμονωμένες αποικίες από το τριβλίο μεταφέρθηκαν σε υγρές καλλιέργειες που περιέχουν LB, άρα το Δείγμα 2\_2 (Sample 2\_2) είναι η δεύτερη αποικία από το δείγμα δύο που μεταφέρθηκε σε υγρή καλλιέργεια.

### 3.5 Αποτελέσματα qPCR

Ακολούθησε αντίδραση qPCR προκειμένου να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου LSK1 στα δείγματα. Από τις τιμές που προέκυψαν δεν προκύπτει κάποια συσχέτιση μεταξύ των δύο συνθηκών όποτε δεν προβήκαμε σε περαιτέρω αναλύσεις (εικόνα 21). Αφού αλληλουχηθεί ολόκληρο το αλληλόμορφο θα επανεξετάσουμε τα αποτελέσματα της qPCR και αν χρειαστεί θα πραγματοποιηθεί εκ νέου αντίδραση qPCR με διαφορετικό ζεύγος εκκινητών προκειμένου να ελέγξουμε αν υπάρχει πιθανή συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου, της έκφραση της πρωτεΐνης και του φαινοτύπου.



**Εικόνα 21.** Επίπεδα έκφρασης της LSK1 σε φυτά που μετασηματίστηκαν με τα gRNA2/gRNA4 (Plant 1-11) και σε φυτά ελέγχου (Plant 13,14,16).

### 3.6 Στατιστική ανάλυση φυματίων

Κατά τη δειγματοληψία μετρήσαμε τον αριθμό των φυματίων καθώς και το μήκος της ρίζας (εικόνα 22). Με αυτό τον τρόπο υπολογίσαμε τον αριθμό φυματίων/μήκος ρίζας. Και στις δύο περιπτώσεις η εύρεση στατιστικών διαφορών έγινε με την χρήση του Mann-Whitney U test. Η στατική ανάλυση των φυματίων έδειξε ότι τα φυτά που υπέστησαν μετάλλαξη από τα gRNA2 και gRNA4 εμφανίζουν αρκετά μειωμένο αριθμό φυματίων σε σχέση με τα αντίστοιχα που περιείχαν το φορέα μόνο με το γονίδιο της Cas9. Εξαιρέση αποτελούν τα φυτά 4 και 5 με 14 και 19 φυμάτια αντίστοιχα. Προς το παρόν δεν γνωρίζουμε την ακριβή αλληλουχία των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων στα δείγματα με επιβεβαιωμένες μεταλλάξεις, καθώς αναλύσαμε τις μεταλλάξεις ανά αλληλουχία-στόχο. Αναμένεται η ενίσχυση της περιοχής που περιλαμβάνει και τις δύο αλληλουχίες-στόχους των gRNA2 και gRNA4

και η αλληλούχισή της. Τότε θα είναι δυνατή η συσχέτιση μεταξύ μεταλλαγμένων αλληλομόρφων και του φαινοτύπου καθώς θα γνωρίζουμε ολόκληρη την αλληλουχία του γονιδίου και άρα τη δομή της πρωτεΐνης.

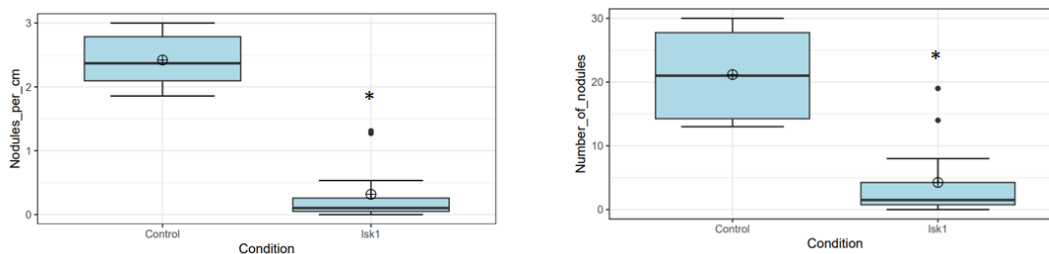
**Πίνακας 13.** Στο πίνακα καταγράφεται ο αριθμός των φυματίων καθώς και το μήκος της ρίζας κάθε φυτού. Επιπλέον καταγράφονται τα αποτελέσματα της δοκιμασίας T7E1 και για τις δύο περιοχές στόχευσης των gRNAs. Τέλος αναγράφεται και ποια δείγματα επιλέχθηκαν για αλληλούχηση κατά Sanger. Όπου X η απομόνωση DNA δεν ήταν επιτυχής.

**LSK1 gRNA2-gRNA4**

	Plant 1	Plant 2	Plant 3	Plant 4	Plant 5	Plant 6	Plant 7	Plant 8	Plant 9	Plant 10	Plant 11	Plant 12
Φυμάτια	1	1	3	14	19	8	1	2	2	0	0	0
Μήκος ρίζας	15cm	12,2cm	18cm	11cm	14,5cm	15cm	11cm	12cm	17,5cm	15cm	11cm	13,5cm
T7E1 gRNA2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	X	-	+
T7E1 gRNA4	+	+	+	+	+	-	+	-	+	X	+	+
Sanger	gRNA2	gRNA4		gRNA2			gRNA4					

**Cas9-only**

	Plant 13	Plant 14	Plant 15	Plant 16	Plant 17	Plant 18	Plant 19	Plant 20
Φυμάτια	29	0	0	13	13	30	18	24
Μήκος ρίζας	14cm	16cm	10,5cm	7cm	6cm	10,5cm	7cm	8cm
T7E1 gRNA2	-	-	-	X	-	-	-	-
T7E1 gRNA4	-	-	-	X	-	-	-	-
Sanger	gRNA2, gRNA4							



**Εικόνα 22.** Σύγκριση του αριθμού φυματίων (αριστερά,  $p = 0.04271$ ) και σύγκριση του αριθμού φυματίων/μήκος ρίζας (δεξιά,  $p = 0.0008$ ) ανάμεσα στα LSK1 φυτά και στα φυτά control.

#### **4. Συζήτηση-Συμπεράσματα**

Τα φυτά της οικογένειας των ψυχανθών (Fabaceae), ξεχωρίζουν λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του γένους *Rhizobium*. Τα βακτήρια σχηματίζουν δομές στη ρίζα, τα φυμάτια, όπου μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία, άρα προμηθεύουν το φυτό με εύκολα αφομοιώσιμες μορφές αζώτου. Είναι σημαντικό για το φυτό να ρυθμίζει τον αριθμό των φυματίων που σχηματίζονται. Αυξημένος αριθμός φυματίων σε σχέση με τις απαιτήσεις του φυτού σε άζωτο συνεπάγεται σπατάλη ενέργειας και πόρων χωρίς

το αντίστοιχο όφελος. Για το λόγο αυτό διαθέτει τον ενδογενή μηχανισμό αυτορρύθμισης της φυματογένεσης (AON) ο οποίος επιστρατεύει μικρά πεπτιδία (CLE) αλλά και μικρά RNA (miRNA) για να διατηρήσει τις ισορροπίες. Πρόσφατα βρέθηκε ότι το γονίδιο LjLSK1, που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη που ανήκει στην εκτεταμένη οικογένεια των SHAGGY-like κινασών, συμμετέχει στη ρύθμιση της φυματογένεσης (Tsikou et al, 2018; Ana De Luis et al, 2012; Valmas et al, 2023).

Η κινάση αυτή ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης ενός καταλοίπου θρεονίνης του βρόγχου ενεργοποίησης. Η φωσφορυλίωση αυτή επιτρέπει στο υπόστρωμα να αλληλεπιδράσει με το ενεργό κέντρο του ενζύμου Στο ενεργό κέντρο της LSK1 προσδένεται ATP μέσω της γ φωσφορικής ομάδας καθώς και το υπόστρωμα μέσω των ήδη φωσφορυλιωμένων καταλοίπων του (Dajani et al, 2001). Μεταλλάξεις στο βρόγχο ενεργοποίησης καθώς και στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος μειώνουν τη καταλυτική ικανότητα του ενζύμου. Το μόριο ATP σταθεροποιείται με τη βοήθεια της θηλιάς G (G-loop), καθώς και μέσω σύνδεσης της αδενίνης με τα κατάλοιπα Glu214 και Val216 (Taylor et al, 2019). Τέλος διαθέτει και τρία κατάλοιπα (ρυθμιστική τριάδα): τη Lys167, Arg και Glu που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της δράσης κινάσης. Μετάλλαξη σε ένα από τα τρία αμινοξέα αυτά οδηγεί σε πλήρη απώλεια της δραστηριότητας του ενζύμου (Taylor et al, 2019; T.G.A Solonou et al 2021).

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ικανότητας των gRNAs να προκαλέσουν μεταλλάξεις στο γονίδιο LjLSK1 καθώς και ανάλυση του φαινοτύπου μετά τον εμβολιασμό των φυτών με ριζόβιο. Η δοκιμασία T7E1 έδειξε ότι τα gRNA2, gRNA3 και gRNA4 έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν μεταλλάξεις κάτι το οποίο δεν ισχύει για το gRNA1 τουλάχιστον για την χρονική στιγμή της δειγματοληψίας (3,5 εβδομάδες μετά το μετασχηματισμό). Η αλληλούχηση κατά Sanger που ακολούθησε επιβεβαίωσε την ύπαρξη μεταλλάξεων. Η πολλαπλή στοίχιση με την αλληλουχία αγρίου τύπου που ακολούθησε αποκάλυψε σημειακές μεταλλάξεις έλλειψης, αντικατάστασης, προσθήκης καθώς και ελλείψεις μεγάλων τμημάτων (11 και 25 βάσεων) στις περιοχές δράσης των gRNAs.

Ο αριθμός των φυματίων στα φυτά ελέγχου του πειράματος μας είναι παρόμοιος με αυτόν από προηγούμενα πειράματα (T.G.A Solonou et al, 2021; Garagounis et al, 2019). Εκεί που παρατηρείται μεγάλη απόκλιση είναι στον αριθμό φυματίων στα φυτά που υπέστησαν μεταλλάξεις με το σύστημα CRISPR/Cas9. Στη δική μας περίπτωση, τα φυτά που υπέστησαν μετάλλαξη από τα gRNA2 και gRNA4 εμφανίζουν αρκετά μειωμένο αριθμό φυματίων σε σχέση με τα αντίστοιχα που περιείχαν το φορέα μόνο με το γονίδιο της Cas9.

Από τις προηγούμενες μελέτες έχειδειχθεί ότι η μειωμένη έκφραση της LSK1 λόγω στόχευσης και αποικοδόμησης του mRNA από το μηχανισμό παρεμβολής RNA (RNA interference) ή παραγωγή μιας μικρότερης πρωτεΐνης της οποίας απουσιάζει το καρβοξυτελικό άκρο -λόγω ένθεσης ενός τραπεζονίου στο 3' άκρο- συνοδεύεται από αυξημένο αριθμό φυματίων. Μετατροπή του κατάλοιπου Arg167, της

ρυθμιστικής τριάδας, σε αλανίνη είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη απουσία της δράσης του ενζύμου. Η υπερέκφραση αυτής της πρωτεΐνης μαζί με την αγρίου τύπου δεν επηρέασε τον αριθμό των φυματίων, πολύ πιθανώς γιατί τα επίπεδα της ενδογενούς πρωτεΐνης αρκούν για την φωσφορυλίωση των στόχων (T.G.A Solonou et al, 2021; Garagounis et al, 2019).

Στο πείραμά μας, το gRNA2 στοχεύει στη περιοχή που αποτελεί το G-loop (κατάλοιπα 140-150). Σε περίπτωση μετάλλαξης στην αλληλουχία-στόχο του gRNA2 μία από τις περιπτώσεις είναι η προσθήκη/αφαίρεση μικρού αριθμού νουκλεοτιδίων άρα και αμινοξέων στο σημείο της δίκλωνης ρήξης. Η μετάλλαξη αυτή πολύ πιθανό να διαταράξει την ικανότητα του G-loop να συνδέεται με ATP και αρά να επηρεάσει αρνητικά ή θετικά την καταλυτική ικανότητας της LSK1. Ένα δεύτερο σενάριο είναι η πλήρης αλλαγή του αναγνωστικού πλαισίου η οποία οδηγεί σε πλήρη αναδιαμόρφωση της δομής της πρωτεΐνης και πολύ πιθανό στην απενεργοποίηση ή στην αλλαγή της λειτουργίας αυτής. Τέλος, είναι πιθανή και η δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης η οποία θα έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας μικρότερης πρωτεΐνης πιθανώς μη λειτουργικής.

Όσο αφορά τη περιοχή στόχευσης του gRNA4 δε φαίνεται να περιέχει κάποιο κατάλοιπο που συμμετέχει στη κατάλυση, επομένως οποιαδήποτε από τις περιπτώσεις μετάλλαξης που αναφέρθηκαν προηγουμένως στο σημείο αυτό θα επηρεάσει λιγότερο τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Ωστόσο, εάν το καρβοξυτελικό άκρο έχει κάποιο ρυθμιστικό ρόλο, η απουσία του ή ακόμη και η επιμήκυνση του, λόγω μετατόπισης του κωδικονίου λήξης, μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία της LSK1.

Επιπρόσθετα μπορεί να πραγματοποιηθεί μετάλλαξη και στις δύο περιοχές στόχευσης των gRNAs στο ίδιο αλληλόμορφο. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω έτσι και σε αυτή τη περίπτωση μπορεί να προκληθεί προσθήκη ή απομάκρυνση μικρού αριθμού αμινοξέων, μετατόπιση του αναγνωστικού καθώς και σχηματισμός πρόωρου κωδικονίου λήξης. Υπάρχει όμως και ένα ακόμα σενάριο που περιλαμβάνει την απομάκρυνση της ενδιάμεσης αλληλουχίας. Η πρωτεΐνη που θα προκύψει θα είναι σαφώς μικρότερη από του αγρίου τύπου και είναι πιθανό είτε να είναι μη λειτουργική είτε να εμφανίζει αρκετά διαφορετική λειτουργία.

Σε κάθε περίπτωση, η παραγόμενη πρωτεΐνη οδηγεί στον περιορισμό της φυματιογένεσης, καθώς όλα τα φυτά -με εξαίρεση τα φυτά 4 και 5- είχαν μειωμένο αριθμό φυματίων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ο αριθμός φυματίων στα φυτά 4 και 5 ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια. Προκειμένου να είμαστε σίγουροι για το ποιο/ποια από τα σενάρια αυτά ισχύουν αλλά και πώς η αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης επηρεάζει τη φυματιογένεση πρέπει να γίνει αλληλούχηση ολόκληρου του αλληλομόρφου.

## **Βιβλιογραφία**

Ana De Luis, et al. *Two MicroRNAs Linked to Nodule Infection and Nitrogen-Fixing Ability in the Legume Lotus Japonicus* . Vol. 160, no. 4, 1 Dec. 2012, pp. 2137–2154

Capone, Imerio, et al. “Induction and Growth Properties of Carrot Roots with Different Complements of Agrobacterium Rhizogenes T-DNA.” *Plant Molecular Biology*, vol. 13, no. 1, 1 July 1989, pp. 43–52

Chylinski, Krzysztof, et al. “Classification and Evolution of Type II CRISPR-Cas Systems.” *Nucleic Acids Research*, vol. 42, no. 10, 11 Apr. 2014, pp. 6091–6105

Costantino, Paolo, et al. “Bacterial Plant Oncogenes: Therol Genes’ Saga.” *Genetica*, vol. 94, no. 2-3, 1 Jan. 1994, pp. 203–211

Dajani, Rana, et al. “Crystal Structure of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ : Structural Basis for Phosphate-Primed Substrate Specificity and Autoinhibition.” *Cell*, vol. 105, no. 6, 15 June 2001, pp. 721–732

Diédhiou, Issa, and Diaga Diouf. “Transcription Factors Network in Root Endosymbiosis Establishment and Development.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 34, no. 3, 15 Feb. 2018

Dixon, Richard A., and Lloyd W. Sumner. “Legume Natural Products: Understanding and Manipulating Complex Pathways for Human and Animal Health: Fig. 1.” *Plant Physiology*, vol. 131, no. 3, 1 Mar. 2003, pp. 878–885

Ehrke-Schulz, Eric, et al. “Quantification of Designer Nuclease Induced Mutation Rates: A Direct Comparison of Different Methods.” *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, vol. 3, 2016, p. 16047

Garagounis, Constantine, et al. “Lotus SHAGGY-like Kinase 1 Is Required to Suppress Nodulation in Lotus Japonicus.” *The Plant Journal*, vol. 98, no. 2, 12 Feb. 2019, pp. 228–242

Gelvin, Stanton B. “Integration of Agrobacterium T-DNA into the Plant Genome.” *Annual Review of Genetics*, vol. 51, 27 Nov. 2017, pp. 195–217

Graham, Peter H., and Carroll P. Vance. “Legumes: Importance and Constraints to Greater Use.” *Plant Physiology*, vol. 131, no. 3, 1 Mar. 2003, pp. 872–877

Gupta, Darshana, et al. “CRISPR-Cas9 System: A New-Fangled Dawn in Gene Editing.” *Life Sciences*, vol. 232, Sept. 2019, p. 116636

Hoang, Nhung T, et al. “The Role of MicroRNAs in the Legume–Rhizobium Nitrogen-Fixing Symbiosis.” *Journal of Experimental Botany*, vol. 71, no. 5, 12 Mar. 2020, pp. 1668–1680

- Hodges, L. D., et al. “Agrobacterium Rhizogenes GALLS Protein Substitutes for Agrobacterium Tumefaciens Single-Stranded DNA-Binding Protein VirE2.” *Journal of Bacteriology*, vol. 186, no. 10, 28 Apr. 2004, pp. 3065–3077
- Hryhorowicz, Magdalena, et al. “CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering.” *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 65, no. 3, 2017, pp. 233–240
- JARVIS, B. D. W., et al. “Rhizobium Loti, a New Species of Legume Root Nodule Bacteria.” *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 32, no. 3, 1 July 1982, pp. 378–380
- Lei, Yang, et al. “CRISPR-P: A Web Tool for Synthetic Single-Guide RNA Design of CRISPR-System in Plants.” *Molecular Plant*, vol. 7, no. 9, Sept. 2014, pp. 1494–1496
- Liu, Hao, et al. “CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants.” *Molecular Plant*, vol. 10, no. 3, Mar. 2017, pp. 530–532
- Mashal, Robert D., et al. “Detection of Mutations by Cleavage of DNA Heteroduplexes with Bacteriophage Resolvases.” *Nature Genetics*, vol. 9, no. 2, Feb. 1995, pp. 177–183
- Nishida, Hanna, et al. “Expression of the CLE-RS3 Gene Suppresses Root Nodulation in Lotus Japonicus.” *Journal of Plant Research*, vol. 129, no. 5, 13 June 2016, pp. 909–919
- Nuñez, James K, et al. “Cas1–Cas2 Complex Formation Mediates Spacer Acquisition during CRISPR–Cas Adaptive Immunity.” *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 21, no. 6, 4 May 2014, pp. 528–534
- Okamoto, Satoru, et al. “Nod Factor/Nitrate-Induced CLE Genes That Drive HAR1-Mediated Systemic Regulation of Nodulation.” *Plant and Cell Physiology*, vol. 50, no. 1, 11 Dec. 2008, pp. 67–77
- . “Root-Derived CLE Glycopeptides Control Nodulation by Direct Binding to HAR1 Receptor Kinase.” *Nature Communications*, vol. 4, no. 1, 12 Aug. 2013
- Oldroyd, Giles E. D. “Speak, Friend, and Enter: Signalling Systems That Promote Beneficial Symbiotic Associations in Plants.” *Nature Reviews. Microbiology*, vol. 11, no. 4, 1 Apr. 2013, pp. 252–263
- Pal, Desh, and Zonglie Hong. “Biogenesis of the Peribacteroid Membrane in Root Nodules.” *Trends in Microbiology*, vol. 4, no. 9, 1 Sept. 1996, pp. 364–368,
- Popp, Maximilian W., and Lynne E. Maquat. “Leveraging Rules of Nonsense-Mediated mRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine.” *Cell*, vol. 165, no. 6, June 2016, pp.

- Rath, Devashish, et al. "The CRISPR-Cas Immune System: Biology, Mechanisms and Applications." *Biochimie*, vol. 117, Oct. 2015, pp. 119–128,
- Ream, Walt. "Agrobacterium Tumefaciens and A. Rhizogenes Use Different Proteins to Transport Bacterial DNA into the Plant Cell Nucleus." *Microbial Biotechnology*, vol. 2, no. 4, 6 Apr. 2009, pp. 416–427
- Roy, Sonali, et al. "Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation." *The Plant Cell*, vol. 32, no. 1, 24 Oct. 2019, pp. 15–41
- Sato, Shusei, and Satoshi Tabata. "Lotus Japonicus as a Platform for Legume Research." *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 9, no. 2, 1 Apr. 2006, pp. 128–132,
- Stracke, Silke, et al. "A Plant Receptor-like Kinase Required for Both Bacterial and Fungal Symbiosis." *Nature*, vol. 417, no. 6892, 27 June 2002, pp. 959–962,
- Sutton, Mark A., et al. "Too Much of a Good Thing." *Nature*, vol. 472, no. 7342, Apr. 2011, pp. 159–161
- T.G.A. Solovou, et al. "Mutagenesis of a Lotus Japonicus GSK3 $\beta$ /Shaggy-like Kinase Reveals Functionally Conserved Regulatory Residues." *Phytochemistry*, vol. 186, 1 June 2021, pp. 112707–112707
- Taylor, Susan S, et al. "Evolution of a Dynamic Molecular Switch." *Iubmb Life*, vol. 71, no. 6, 1 June 2019, pp. 672–684
- Trovato, Maurizio, et al. "From A. Rhizogenes RolD to Plant P5CS: Exploiting Proline to Control Plant Development." *Plants*, vol. 7, no. 4, 6 Dec. 2018, p. 108,
- Tsikou, Daniela, et al. "Systemic Control of Legume Susceptibility to Rhizobial Infection by a Mobile MicroRNA." *Science*, vol. 362, no. 6411, 12 Oct. 2018, pp. 233–236,
- Udvardi, Michael, and Philip S. Poole. "Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses." *Annual Review of Plant Biology*, vol. 64, no. 1, 29 Apr. 2013, pp. 781–805
- Vouillot, Léna, et al. "Comparison of T7E1 and Surveyor Mismatch Cleavage Assays to Detect Mutations Triggered by Engineered Nucleases." *G3: Genes, Genomes, Genetics*, vol. 5, no. 3, 1 Mar. 2015, pp. 407–415,
- Wan, Lili, et al. "CRISPR-Cas9 Gene Editing for Fruit and Vegetable Crops: Strategies and Prospects." *Horticulturae*, vol. 7, no. 7, 1 July 2021, p. 193,
- Wang, Dong, et al. "Symbiosis Specificity in the Legume - Rhizobial Mutualism." *Cellular Microbiology*, vol. 14, no. 3, 3 Feb. 2012, pp. 334–342,



Wang, Trevor L., et al. "Can We Improve the Nutritional Quality of Legume Seeds?"  
*Plant Physiology*, vol. 131, no. 3, 1 Mar. 2003, pp. 886–891