



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ  
ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΟΥΠΕΟΛΗΣ ΣΕ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ  
ΦΥΜΑΤΙΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *LOTUS JAPONICUS*

ΣΟΦΙΑ Κ. ΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ 2008



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 6589/1  
Ημερ. Εισ.: 12-05-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2008  
ΓΕΩ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087299



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διπλωματική Εργασία**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ  
ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΟΥΠΕΟΛΗΣ ΣΕ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ  
ΦΥΜΑΤΙΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *LOTUS JAPONICUS***

**ΣΟΦΙΑ Κ. ΓΕΩΡΓΙΟΥ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2008**

## **Υπεύθυνος Καθηγητής**

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας  
Φυτών

## **Τριμελής Επιτροπή**

- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας  
Φυτών
- Καρπούζας Δημήτριος, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας  
αποικοδομητικών μικροοργανισμών
- Δελής Κωνσταντίνος, Διδάσκων ΠΔ 407

## **Ευχαριστίες**

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια μου, κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την επιστημονική καθοδήγηση σε όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και της συγγραφής της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ακόμη, την ευχαριστώ για το γεγονός ότι πίστεψε σε εμένα, για την υπομονή της, για το χρόνο που διέθεσε στις συζητήσεις μας για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που προέκυπταν κατά καιρούς στην ερευνητική διαδικασία και που με την βοήθεια της καταφέραμε να αντιμετωπιστούν. Την ευχαριστώ για το γεγονός ότι με εμπιστεύτηκε ένα τόσο φιλόδοξο project και μέσω αυτού έμαθα να δουλεύω στο εργαστήριο με υπομονή και επιμονή και που ποτέ δεν αρνήθηκε να ακούσει την άποψη μου και να συζητήσουμε για την ορθότητα της ή όχι. Τέλος, της είμαι ευγνώμων για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη, που μου προσέφερε και τις πολύτιμες συμβουλές της σε προσωπικό επίπεδο, τις οποίες δεν πρόκειται να ξεχάσω ποτέ.

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τον Κώστα Δελή, βοηθό της κ. Παπαδοπούλου και επιβλέποντα της πτυχιακής μου για το ό,τι με δίδαξε πώς να δουλεύω στο εργαστήριο, για το γεγονός ότι ήταν πάντα παρών σε ό,τι και να χρειαζόμουνα και πάντα αισθανόμουνα ότι ό,τι και να χρειαστώ δεν θα διστάσω να του ζητήσω βοήθεια. Τον ευχαριστώ, ακόμη, ως άνθρωπο για την πολύτιμη ψυχολογική υποστήριξη, που μου προσέφερε, όταν χρειάστηκε αλλά για το χιούμορ του και τα αστεία του που πάντα με έκαναν να αισθάνομαι καλά.

Θα ήθελα, να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Καρπούζα, που σε συνεργασία με την κ. Παπαδοπούλου κατόρθωσαν να μας προσφέρουν ένα άρτια εξοπλισμένο εργαστήριο και πραγματικά να μην μου λείψει ποτέ τίποτα για την διεκπεραίωση της πτυχιακής μου.

Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την συμβίωση μας, και κυρίως την Αφροδίτη και την Δήμητρα για την πρακτική βοήθεια που μου προσέφεραν και την φιλία τους. Τέλος ευχαριστώ την Ματίνα, την Κωνσταντίνα και τον Φώτη για τις εύστοχες επιστημονικές τους επισημάνσεις αλλά κυρίως για τα αστεία και το ωραίο κλίμα μας.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου και την φίλη μου Γιώτα για τις συμβουλές τους, για το ό,τι με στήριξαν και με βοήθησαν όλο αυτό το διάστημα σε καλές αλλά και στις κακές στιγμές.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. <i>Lotus japonicus</i> .....	7
2. α. Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	8
2. β. Τερπένια.....	9
3. OSCs.....	12
4. Συνθάση της λουπεόλης.....	15
5. α. Μηχανισμός της RNA παρεμβολής(RNAi).....	22
β. Εφαρμογές του RNAi στην βιοτεχνολογία.....	26
6. α. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	28
β. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	30
γ. <i>Agrobacterium</i> & Γενετική Μηχανική.....	32
7. Ριζόβια & σχηματισμός φυματίων.....	35
8. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας.....	36

### 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Μεθοδολογίες για τον χειρισμό πλασμιδίων.....	38
1.α. Πλασμιδιακοί φορείς και χαρακτηριστικά αυτών.....	38
1.β. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> .....	41
1.γ. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> .....	41
1.δ. Απομόνωση πλασμιδίου από υγρή καλλιέργεια <i>E.coli</i> με την μέθοδο του βρασμού(Boiling prep).....	43
1.ε. Απομόνωση πλασμιδίου από υγρή καλλιέργεια <i>E.coli</i> με kit.....	44
1.στ. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων <i>A.rhizogenes</i> .....	46
1.ζ. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>A.rhizogenes</i> .....	47
1.η. Διατήρηση κλώνων που φέρουν τα επιθυμητά πλασμίδια.....	47
2. Αντιβιοτικά.....	48
3. Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά υλικά.....	48
4. Ανάλυση νουκλεϊκων οξέων.....	50
4.α. Καθαρισμός νουκλεϊκων οξέων με το πρωτόκολλο της φαινόλης-χλωροφορμίου.....	50
4.β. Πέψη τμημάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	51
4.γ. Ανάλυση τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	53
4.δ. Επανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	54

4.ε. Ενίσχυση ακολουθιών DNA με την χρήση της PCR.....	54
4. στ. PCR colony.....	56
4. ζ. Αντίδραση σύνδεσης (Ligation) .....	57
4.η. Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικά κύτταρα.....	57
<b>5. Απολύμανση σπόρων <i>Lotus japonicus</i>.....</b>	<b>60</b>
<b>6. Θρεπτικά υποστρώματα για την ανάπτυξη φυτών.....</b>	<b>61</b>
6.α. NLN μέσο.....	61
6.β. MS (Murashige & Skoog) μέσο.....	62
6.γ. Jensen μέσο.....	63
<b>7. Holand.....</b>	<b>64</b>
<b>8. Μόλυνση των φυτών με <i>A.rhizogenes</i> για επαγωγή του σχηματισμού «hairy roots».....</b>	<b>65</b>
<b>9. Επαγωγή φυματίων στις διαγονιδιακές ρίζες <i>Lotus japonicus</i>.....</b>	<b>66</b>
<b>10. Ιστοχημική ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου <i>gus</i>.....</b>	<b>66</b>

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

<b>1. Κατασκευή του φορέα-φουρκέτα.....</b>	<b>69</b>
1.α. Σχεδιασμός των εκκινητών.....	69
1.β. PCR με τους εκκινητές OSC3(3).....	70
1.γ. Κλωνοποίηση του Αντι-νοσηματικού ενθέματος.....	72
1.δ. Κλωνοποίηση του νοσηματικού ενθέματος.....	75
<b>2. Κλωνοποίηση του φορέα-φουρκέτα στον τελικό φορέα.....</b>	<b>78</b>
2.α. Κλωνοποίηση της κασέτας στον ενδιάμεσο φορέα pBluescript.....	78
2.β. Κλωνοποίηση της κασέτας από το pBluescript στον τελικό φορέα pCambia 1300.....	80
<b>3. Αλληλούχηση των ενθεμάτων.....</b>	<b>82</b>
<b>4. Δημιουργία της δεύτερης κατασκευής.....</b>	<b>84</b>
<b>5. Μετασχηματισμός <i>A.rhizogenes</i> με τον pCambia1300 που φέρει την κασέτα αποσιώπησης.....</b>	<b>87</b>
<b>6.Μόλυνση φυτών <i>Lotus japonicus</i> με το <i>A.rhizogenes</i> που φέρει την κασέτα αποσιώπησης και καλλιέργεια των φυτών για παραγωγή των «hairy roots».....</b>	<b>89</b>
6.α. Προετοιμασία του <i>A.rhizogenes</i> για την μόλυνση των φυτών.....	90
6.β. Μόλυνση των φυτών με το <i>A.rhizogenes</i> και επαγωγή των «hairy roots».....	91
<b>7. Μόλυνση των «hairy roots» με <i>Mesorhizobium loti</i> για την επαγωγή της δημιουργίας φυματίων.....</b>	<b>96</b>
<b>8. Χρώση <i>gus</i> φυτών αναφοράς.....</b>	<b>97</b>
<b>9. Εύρεση φυτών με ενσωματωμένη την κασέτα αποσιώπησης.....</b>	<b>101</b>
<b>10. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....</b>	<b>103</b>
<b>11. Μελλοντική εργασία.....</b>	<b>104</b>
<b>12. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>108</b>

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## 1. *Lotus japonicus*

Στον πλανήτη μας υπάρχουν 18.000 είδη ψυχανθών, πολλά από τα οποία έχουν αγρονομική σημασία, όπως η σόγια (*Glycine max*) και το κοινό φασόλι (*Phaseolus sp.*). Τα δύο φυτά μοντέλα ψυχανθών που χρησιμοποιούνται από την ερευνητική κοινότητα είναι το *Lotus japonicus* (εικ.1.1) και το *Medicago truncatula*. Το *Lotus japonicus* είναι φυτό των εύκρατων περιοχών με βέλτιστη θερμοκρασίας ανάπτυξης τους 20°C, χρησιμοποιείται ως τροφή για φυτοφάγα ζώα και παρουσιάζει ομοιότητες με το τριφύλλι (*Lotus corniculatus*). Τα χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδανικό ως φυτό μοντέλο είναι ο μικρός κύκλος ζωής (2-3 μήνες), το ότι είναι αυτογονιμοποιούμενο, διπλοειδές (n=6) και έχει μικρό γονιδίωμα (472,1 Mb), περίπου τρεις φορές μεγαλύτερο από το γένωμα του πιο γνωστού φυτικού μοντέλου *Arabidopsis thaliana*. Το *Lotus* σε αντίθεση με το *Medicago truncatula* σχηματίζει καθορισμένα φυμάτια, όπως ακριβώς η σόγια και το φασόλι. Η αλληλούχηση του γονιδιώματος του, η χρήση μοριακών δεικτών, τα ESTs, τα microarrays, η δημιουργία knock-out μεταλλαγμάτων μέσω του TILLING και της γονιδιακής αποσιώπησης δίνουν την δυνατότητα να εξακριβωθεί η λειτουργία συγκεκριμένων γονιδίων. Τα συμπεράσματα για τα γονίδια αυτά μπορούν να επεκταθούν μέσω ομολογίας και συνταινιακότητας για φυτά ψυχανθή, με απώτερο σκοπό την βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας τους αλλά και της τροποποίησης των αγρονομικών χαρακτηριστικών τους με την χρήση της βιοτεχνολογίας[1].



Εικόνα 1.1: *Lotus japonicus*, ποικιλίας Miyakojima MG-20

## 2α. Δευτερογενείς Μεταβολίτες-Γενικά

Η λουπεόλη, το μόριο που παράγεται από την δράση της συνθάσης της λουπεόλης, του ενζύμου που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, ανήκει στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Ως δευτερογενείς μεταβολίτες ορίζονται ενώσεις μικρού μοριακού βάρους με περιορισμένη κατανομή στο φυτικό βασίλειο και που δεν παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην αύξηση και ανάπτυξη του φυτού. Μέχρι πρόσφατα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες θεωρούνταν μόνο συνδεδεμένοι με οικολογικούς ρόλους[2,3]. Έτσι, λοιπόν, πίστευαν ότι η μεγάλη πλειοψηφία αυτών εμπλέκονται στις ανταγωνιστικές και συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και των παθογόνων τους, των φυτοφάγων ζώων, των επικονιαστών εντόμων κ.τ.λ. Για παράδειγμα, τα τερπένια, ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών όπως θα δούμε παρακάτω, είναι τοξίνες και αποτρεπτικά στη βοσκή σε ένα μεγάλο αριθμό εντόμων και θηλαστικών. Τα πυρεθροειδή, που απαντώνται στα φύλλα και στα άνθη των ειδών του γένους *Chrysanthemum* και έχουν εντυπωσιακή εντομοκτόνο δράση είναι μονοτερπένια. Ακόμη, τα αιθέρια έλαια γνωστά για τις εντομοαπωθητικές τους ιδιότητες είναι μίγματα μονοτερπενίων και σесκιτερπενίων, όπως το η μενθόλη, το λιμονένιο, το α-πινένιο[3].

Ωστόσο, με βάση τα νέα δεδομένα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες βρέθηκε ότι εμπλέκονται και σε πρωτογενείς διαδικασίες αύξησης, ανάπτυξης και αντίστασης σε αβιοτικό στρες(Εικ.1.2). Ορισμένα λοιπόν τερπένια, έχουν έναν καλά χαρακτηρισμένο ρόλο στη φυτική αύξηση και ανάπτυξη. Παραδείγματος χάρη, οι γιββερελλίνες, μία ομάδα φυτικών ορμονών, είναι διτερπένια. Τα καροτενοειδή είναι τετρατερπένια και λειτουργούν ως βοηθητικές χρωστικές στην φωτοσύνθεση[3].

Με βάση τις πρόδρομες ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την βιοσύνθεσή τους, οι δευτερογενείς μεταβολίτες ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες[2]:

1. Ενώσεις που περιέχουν άζωτο
2. Φαινυλοπροπανοειδή (phenylpropanoids)
3. Βενζενοειδή (Benzenoids)
4. Φλαβονοειδή (Flavonoids)
5. Τερπένια (Terpenes)

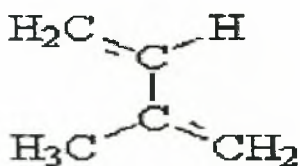
Major classes of secondary metabolites found in <i>A. thaliana</i> .		
Class	Approximate number of structures <sup>a</sup>	Suggested functions
Indole and indole-sulfur compounds	10	Defense against pathogens
Glucosinolates	35	Defense against pathogens and herbivores
Phenylpropanoids	20	UV protection. Defense against pathogens?
Benzenoids	25	Pollinator attractants? Defense against pathogens?
Flavonoids	15	UV protection. Auxin transport. Seed dormancy. Defense against pathogens?
Terpenes	50	Herbivore feeding deterrents? Resistance to oxidative stress? Defense against pathogens?
Fatty acid derivatives	15	Defense against pathogens? Volatile signals?

Εικόνα 1.2: Κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών, δευτερογενείς αλλά και πρωταρχικές λειτουργίες του φυτού με τις οποίες εμπλέκονται (Auria et al, 2005)

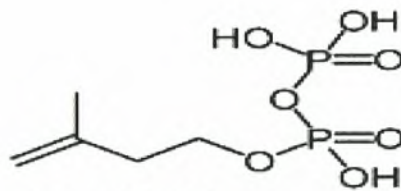
## 2β. Τερπένια

Τα τερπένια είναι η πιο πολυάριθμη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, αριθμώντας πάνω από 20.000 μέλη[2]. Αποτελούν πολυμερή του ισοπρενίου (C5) και ανάλογα με τις μονάδες ισοπρενίου από τις οποίες αποτελούνται κατατάσσονται σε μονοτερπένια (C10), σεσκιτερπένια (C15) και τριτερπένια (C30). Αντιπρόσωποι των δύο πρώτων κατηγοριών, όπως το λιμονένιο έχουν ανιχνευθεί ως πτητικά αέρια που εκλύουν τα φυτά μπροστά στο κίνδυνο βοράς από φυτοφάγα ζώα[2]. Γνωστά τριτερπενοειδή αποτελούν οι α και β αμυρίνη (α, β-amyrin) και η λουπεόλη (lupenol). Από φυτά ελαττωματικά στην παραγωγή της β-αμυρίνης, βρέθηκε ότι οι σαπωνίνες, μεταβολίτες της αμυρίνης ενέχονται στην άμυνα των φυτών έναντι μυκήτων[4,5]. Ο φυσιολογικός ρόλος της λουπεόλης παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστος.

Όσον αφορά την βιοσύνθεση τους, τα τερπένια είναι όπως είπαμε πολυμερή του ισοπρενίου (σχήμα 1.3). Δημιουργούνται με την σύντηξη μονάδων πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου (σχήμα 1.4) (IPP), της ενεργοποιημένης μορφής του ισοπρενίου[6].



Εικόνα 1.3: ισοπρένιο



Εικόνα 1.4 : IPP

Προκειμένου να φτάσουμε σε σκελετό με τριάντα άτομα άνθρακα ακολουθείται η εξής σειρά:



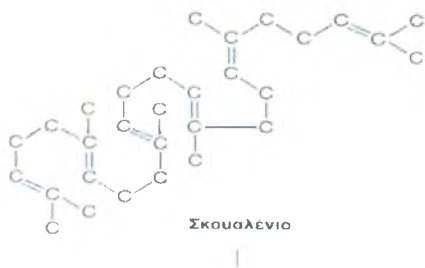
Το IPP και η ισομερής μορφή του πυροφωσφορικό διμέθυλλαλλύλιο (DMAPP) συμπυκνώνονται προς σχηματισμό πυροφωσφορικού γερανυλίου(C10)(Σχήμα 1.5). Το τελευταίο συμπυκνώνεται με το IPP προς σχηματισμό πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου(FPP-C15)(Σχήμα 1.6). Το τελευταίο βήμα είναι η συμπύκνωση δύο FPP προκειμένου να σχηματιστεί το σκουαλένιο(C30)(σχήμα 1.7) με την βοήθεια της συνθάσης του σκουαλενίου (SQS). Τέλος, με την βοήθεια της εποξειδάσης του σκουαλενίου, η οποία είναι μία μονοξυγονάση μετατρέπεται το σκουαλένιο σε 2,3-Οξειδοσκουαλένιο(σχήμα 1.8), μόριο που αποτελεί το κομβικό σημείο για την παραγωγή είτε στερολών και στεροειδών ορμονών είτε τριτερπενοειδών αλκοολών. Η συνολική βιοσυνθετική πορεία παρουσιάζεται στο σχήμα 1.9.



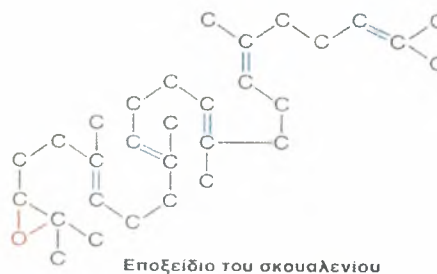
Εικόνα 1.5 : GPP



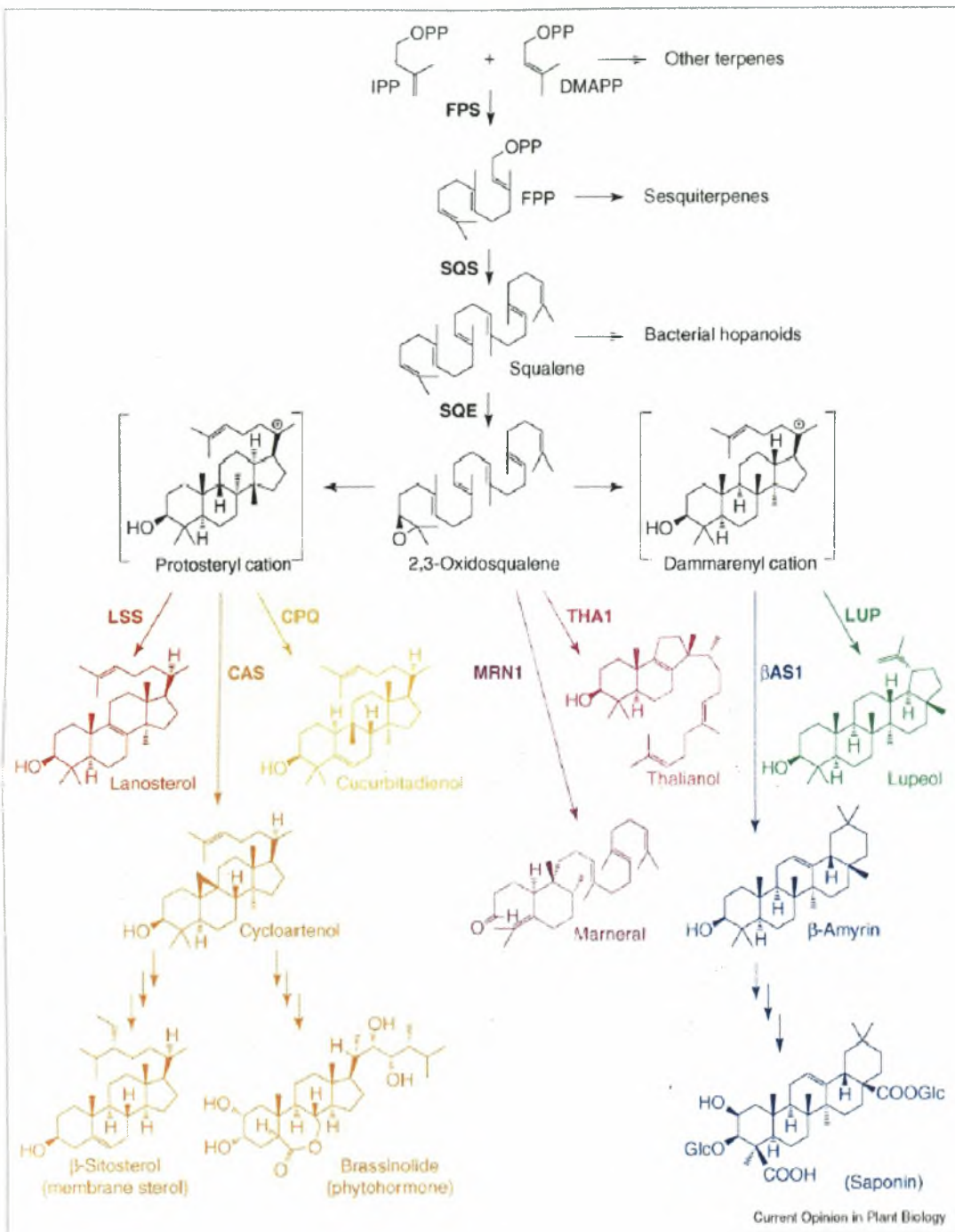
Εικόνα 1.6: FPP



Εικόνα 1.7



Εικόνα 1.8



Εικόνα 1.9: Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών(Phillips et all, 2006)

Βέβαια, οι δύο εναλλακτικές επιλογές υπάρχουν μόνο στα φυτά, αφού στα ζώα ο μοναδικός δρόμος του 2,3-οξειδοσκουαλενίου είναι να μετατραπεί σε λανοστερόνη μέσω της συνθάσης της λανοστερόνης(lanosterol synthase, LSS). Κατόπιν η λανοστερόνη μετατρέπεται σε χοληστερόλη, η οποία μπορεί να παραμείνει αυτούσια ή να μετατραπεί σε στεροειδείς ορμόνες.

### 3. OSCs

Τα ένζυμα που παραλαμβάνουν το 2,3-οξειδοσκουαλένιο και το μετατρέπουν σε κυκλικές τριτερπενοειδείς αλκοόλες με τουλάχιστον έξι δακτυλίους ονομάζονται **κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου(oxidosqualene cyclases( OSCs)**. Το γένωμα του *Arabidopsis thaliana* κωδικοποιεί για 13 OSCs, του *Oryza sativa* για 9 και του *Lotus japonicus* για 8(OSC1-OSC8)[7].Οι OSCs διακρίνονται σε δύο κατηγορίες με βάση το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται: σε αυτές που σχηματίζουν με διαμόρφωση ανάκλιντρου-λουτήρα-ανάκλιντρου το κατιόν του προτεστερυλίου(*protosteryl cation*) και σε αυτές που σχηματίζουν το κατιόν του νταμαρενυλίου(*dammarenyl cation*) με διαμόρφωση ανάκλιντρου-ανάκλιντρου-ανάκλιντρου[8]. Στην πρώτη κατηγορία ανήκει η LSS που αναφέραμε και η *συνθάση της κυκλοαρτενόλης (cycloartenol synthase, CAS)*, η οποία είναι η κύρια φυτική κυκλάση για την παραγωγή των στερολών και των στεροειδών φυτοορμονών (π.χ. μπρασσινοστεροειδή). Βέβαια σε αρκετά γένη φυτών έχει βρεθεί και LSS.

Οι κυκλάσες που σχηματίζουν ενδιάμεσα το κατιόν του νταμαρενυλίου απαντώνται αποκλειστικά στα φυτά και μάλιστα σε αυτά με αγγειακό αγωγό σύστημα (τραχεόφυτα) και είναι υπεύθυνες για την παραγωγή των τριτερπενοειδών αλκοολών. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν η *συνθάση της β-αμυρίνης*, η *συνθάση της λουπεόλης*, καθώς και πολυλειτουργικές κυκλάσες που παράγουν μίγμα προϊόντων.

Όσον αφορά την εξελικτική πορεία των OSCs, η *συνθάση της κυκλοαρτενόλης* μεταξύ διαφορετικών ειδών παρουσιάζει μεγάλη ομολογία, γεγονός που επιβεβαιώνει το γεγονός ότι έχει σημαντικό ρόλο για την ομοίωση του φυτικού κυττάρου. Σε αντίθεση, οι κυκλάσες που χρησιμοποιούν ως ενδιάμεσο το κατιόν του νταμαρενυλίου εμφανίζουν μικρή ομοιότητα μεταξύ τους. Αυτό σημαίνει ότι μετά το διαχωρισμό των ειδών, είχαν την δυνατότητα να συσσωρεύσουν μεταλλάξεις, ευνοϊκές ,βέβαια αφού επικράτησαν, για την επιβίωση των ειδών στο εκάστοτε περιβάλλον. Συνεπώς, αυτό έρχεται σε συμφωνία με το ότι οι περισσότερες από αυτές παράγουν προϊόντα που ευνοούν την προσαρμογή και επιβίωση του φυτού στο περιβάλλον, π.χ. σαπωνίνες και άμυνα έναντι μυκήτων[4].

Πολλά τερπενοειδή προκειμένου να δράσουν χρειάζονται επιπλέον τροποποιήσεις, όπως υδροξυλίωση από P450-εξαρτώμενες μονοοξυγονάσες, μεθυλίωση, γλυκοσυλίωση όπως στην περίπτωση των σαπωνίνων που είναι γλυκοσυλιωμένα παράγωγα β-αμυρίνης[4].

Οι συνθάσες των τερπενίων ανήκουν σε μια οικογένεια ενζύμων που καταλύουν πολύπλοκες αντιδράσεις πολλών βημάτων και παράγουν προϊόντα ποικίλης δομής με βιολογική και εμπορική σημασία. Η τρισδιάστατη δομή των ενζύμων αυτών είναι καλά διατηρημένη από τους μύκητες μέχρι τα φυτά και περιλαμβάνει την «αναδίπλωση τερπενίων». Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, για την δραστικότητα των ενζύμων αυτών δεν παίζουν ρόλο μόνο κάποια συγκεκριμένα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, αλλά και το σύνολο των αμινοξέων που το περιβάλλουν. Με τον τρόπο αυτό του προσδίδουν την κατάλληλη στερεοδιάταξη και γεωμετρία για την κατάλυση των πολύπλοκων αντιδράσεων[9]. Από μελέτες στην ευκαρυωτική συνθάση της λανοστερόνης (LSS), βρέθηκε ότι περιέχει κοντά στο ενεργό κέντρο και ένα λιποφιλικό κανάλι, καθώς και ένα στενό πέρασμα μεταξύ τους, το οποίο σχηματίζει μία εύκαμπτη θηλιά ώστε να επιτρέπει την διόδο του υποστρώματος. Αποδείχτηκε ότι η υψηλή εξειδίκευση των κυκλασών οφείλεται στις περιοχές αυτές[10].

Από μελέτες αρχικά σε ευκαρυωτική OSC και κατόπιν και σε κυκλάσες από φυτά, μύκητες βρέθηκε το DCTAEA μοτίβο. Το μοτίβο DCTAEA(Asp-Asp-Thr-Ala-Glu-Ala) είναι ιδιαίτερα συντηρημένο, ίσως σε μια πιο ευρεία μορφή( DDXXD μοτίβο-Asp-Asp-Xaa-Xaa-Asp) σε όλες τις κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου.(εικ.1.10). Αποτελεί τμήμα της θέσης πρόσδεσης του υποστρώματος[5,10,11]. Ο μηχανισμός της αντίδρασης γίνεται μέσω νουκλεόφιλης προσβολής από το καρβοξύλιο του ασπαρτικού στο 2,3- οξειδοσκουαλένιο(Εικ.1.11)[11]. Επίσης, το ενεργό κέντρο αυτών περιέχει περιοχή πλούσια σε αρωματικά αμινοξέα, που χρησιμεύουν στην σταθεροποίηση των ενδιάμεσων καρβοκατιόντων που σχηματίζονται, μέσω αλληλεπίδρασης καρβοκατιόντος-π δεσμού[11,12].

(A) Sterol and Triterpene Cyclases

Rat OSC CNBr-6 kDa<sup>\*\*\*</sup> (This work)  
*C. albicans* OSC (Refs. 16,17)  
*A. acidocaldarius* SC (Ref. 24)



(B) Sesquiterpene Cyclases

5-*epi*-Aristolochene Synthase (Plant, Ref. 25)  
 Pentalenene Synthase<sup>4</sup> (Fungi)  
 Tnchodiene Synthase (Fungi, Ref. 27)  
 Aristolochene Synthase (Fungi, Ref. 28)

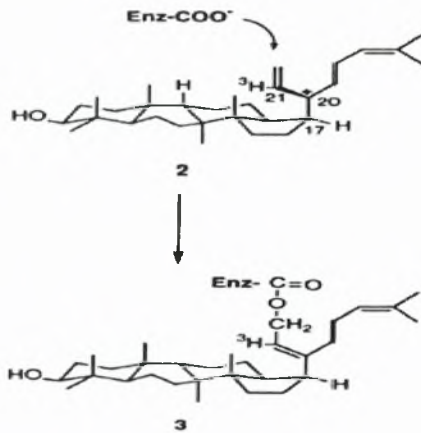


(C) Prenyl Transferases

FPP Synthase (Human, Ref. 29)  
 HPP Synthase (Yeast, Ref. 30)  
 GGPP Synthase (Bacteria, Ref. 31)



Εικόνα 1.10: Πολλαπλή ομοπαράθεση διαφόρων OSCs και η συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος DCTAEA(Abe et all, 1993)



Εικόνα 1.11: Μηχανισμός πρόσδεσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο των OSCs(Abe et all, 1993)

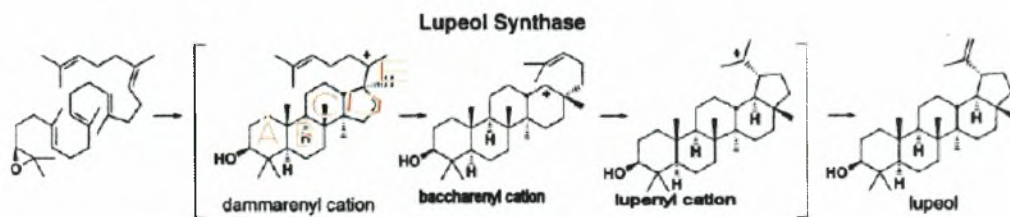


#### 4. Συνθάση της λουπεόλης

Η συνθάση της λουπεόλης είναι όπως είπαμε μία OSC που καταλύει την μετατροπή του 2,3-οξειδοσκαλενίου στο τριτερπενοειδές λουπεόλη. Το EC (Enzyme Commission) της συνθάσης της λουπεόλης είναι 5.4.99.-

Αυτό σημαίνει ότι είναι μία ισομεράση(5.) και συγκεκριμένα μία ενδομοριακή τρανσφεράση (5.4)(μουτάση) και μεταφέρει ομάδες διαφορετικές από αμινομάδες, φωσφορικές ομάδες και ακυλομάδες(5.4.99) σε τμήματα του ίδιου του μορίου. Τα ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις ισομερίωσης προξενούν ανακατατάξεις ομάδων, δεσμών κ.τ.λ. μέσα στα υποστρώματα τους[13].

Η συνθάση της λουπεόλης καταλύει διαδοχικές μετατοπίσεις ηλεκτρονίων και ανακατατάξεις δεσμών[14]. Συγκεκριμένα, στο μόριο του 2,3 οξειδοσκαλενίου, διασπά τους δεσμούς του οξυγόνου με τον πρώτο δακτύλιο, προκειμένου να σχηματίσει τον A δακτύλιο(Εικ.1.12). Επίσης, κυκλοποιεί τους τρεις δακτυλίους(B,C,D) για να σχηματίσει το κατιόν του νταμαρενυλλίου. Το τελευταίο υφίσταται επέκταση στο τέλος της αλυσίδας με σκοπό τον σχηματισμό του E δακτυλίου. Σχηματίζεται έτσι το baccherrenyl cation, το οποίο υφίσταται κυκλοποίηση του δακτυλίου με παραγωγή του lupenyl cation. Αυτό με αποπρωτονίωση μετατρέπεται στην λουπεόλη. Συνεπώς, η λουπεόλη, χημικά, είναι μία πεντακυκλική αλκοόλη[12,14].



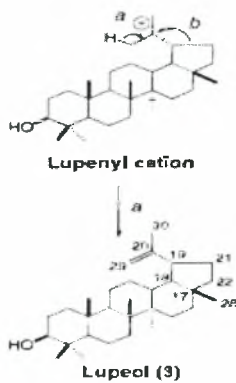
Εικόνα 1.12: Μηχανισμός σχηματισμού της λουπεόλης(Herrera et al,1998)

Από μελέτες μεταλλαξιγένεσης, βρέθηκε η περιοχή του ενεργού κέντρου της συνθάσης της λουπεόλης που είναι υπεύθυνη για την εξειδικευμένη παραγωγή της λουπεόλης[14]. Πρόκειται για το εξαπεπτίδιο MLCYCR(Εικ1.13) και συγκεκριμένα η αλειφατική πλευρική ομάδα της λεύκινης(L) σταθεροποιεί tolupenyl cation για να γίνει η αποπρωτονίωση με παρεμβολή H<sub>2</sub>O μη ειδικά από την μία από τις δύο μεθυλομάδες[15,16]. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι συνθάση της λουπεόλης από

το Lotus ανήκει σε έναν άλλο κλάδο διαφορετικό από την συνθάση της λουπεόλης του Arabidopsis. Με βάση αυτό η αποπρωτονίωση γίνεται εξειδικευμένα από την μία μεθλομάδα(Εικ.1.14)[16,17].

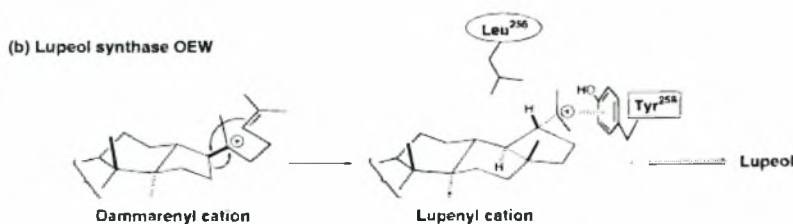
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	223	S	L	P	M	H	P	C	R	W	V	H	T	R	G	V	I	F	V	S	Y	L	S	L	V	K	F	S	C	252		
<i>P. ginseng</i> PNY	250	F	L	P	M	H	P	A	K	M	W	C	Y	C	R	M	V	M	P	M	S	Y	L	Y	G	K	R	F	V	G	279	
<i>P. ginseng</i> PNY2	248	F	L	P	M	H	P	A	K	M	W	C	Y	C	R	M	V	M	P	M	S	Y	L	Y	G	K	R	F	V	G	277	
<i>P. sativum</i> PSY	248	F	L	P	M	H	P	A	K	M	W	C	Y	C	R	L	A	V	M	P	M	S	Y	L	Y	G	K	R	F	V	G	277
<i>G. glabra</i> GbAS1	248	F	L	P	M	H	P	A	K	M	W	C	Y	C	R	M	V	M	P	M	S	Y	L	Y	G	K	R	F	V	G	277	
<i>O. europaea</i> OEW	247	F	S	P	I	H	P	C	K	M	L	C	Y	R	L	A	V	M	P	M	S	Y	L	Y	G	K	R	F	V	G	276	
<i>T. officinale</i> TRW	249	F	P	F	I	H	P	C	K	M	L	C	Y	R	L	A	V	M	P	M	S	Y	L	Y	G	K	R	F	V	G	278	
<i>A. thaliana</i> LUPI	246	F	L	P	I	H	P	C	K	I	L	C	Y	S	R	M	V	S	I	P	S	Y	L	Y	G	K	R	F	V	G	275	

Εικόνα 1.13: Περιοχή MLCYCR: για εξειδίκευση του προϊόντος στις συνθάσες της λουπεόλης(Kushiro et all,1999)



Εικόνα 1.14: Αποπρωτονίωση του lupenyl cation για παραγωγή της λουπεόλης(Kushiro et all,1999)

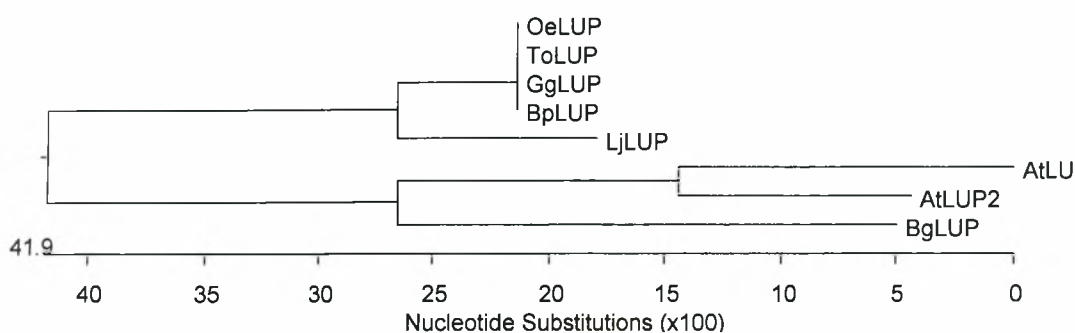
Η Tyr (Y) θεωρείται ότι σταθεροποιεί τον τελευταίο δακτύλιο(E ring ) μόλις σχηματιστεί και είναι υπεύθυνη για την παραγωγή πεντακυκλικού και όχι τετρακυκλικού προϊόντος. Συνολικά η συμβολή των αμινοξέων στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου φαίνεται στην Εικ.1.15



Εικόνα 1.15: Συμβολή της λευκίνης και της τυροσίνης του ενεργού κέντρου της συνθάσης της λουπεόλης στον σχηματισμό του τελικού προϊόντος(Kushiro et all,1999)

Εξελικτικά, υπάρχουν δύο κλάδοι συνθασών της λουπεόλης (Εικ. 1.16)[17]:

1. συνθάσες της λουπεόλης που παράγουν και άλλα προϊόντα πέρα από την λουπεόλη, όπως η LUP 1( συνθάση της λουπεόλης του *Arabidopsis thaliana*) και
2. οι «αυθεντικές» συνθάσες της λουπεόλης που παράγουν μόνο λουπεόλη, όπως η OSC3(συνθάση της λουπεόλης του *Lotus japonicus*) και OEW και TRW οι αντίστοιχες της *Olea europaea* και του *Taraxacum officinale*[16,17]



Εικόνα 1.16: φυλογενετικό δένδρο συνθασών της λουπεόλης από διαφορετικά είδη φυτών. Παρατηρείται ο διαχωρισμός των συνθασών της λουπεόλης σε δύο κλάσεις με την συνθάση της λουπεόλης του *Lotus japonicus* να ανήκει στις «αυθεντικές». Το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα ClustalW και οι αμινοξικές αλληλουχίες των συνθασών παρατίθενται στο παράρτημα I.

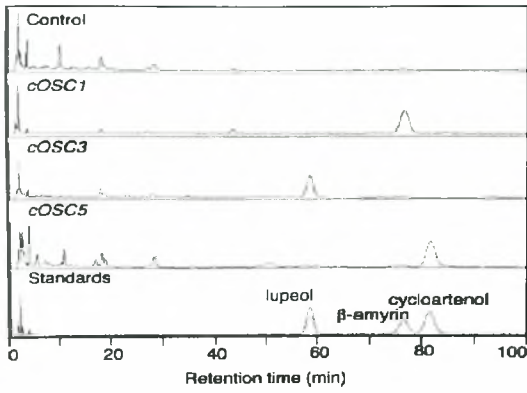
Η συνθάση της λουπεόλης του *Lotus japonicus*(OSC3) έχει cDNA μήκους 2465bp με ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης μεγέθους 2268bp και κωδικοποιεί για πρωτεΐνη 755 αμινοξέων(πλαίσιο 1). Την μεγαλύτερη ομολογία την έχει με την συνθάση της λουπεόλης από την *Glycyrrhiza glabra*(86%) και ακολουθούν οι αντίστοιχες της *Betula platyphylla*(80%) και *Olea europaea*(77%). Με την συνθάση της β-αμυρίνης από το *Lotus* έχει μόνο 60% ομοιότητα( BLASTp έναντι non-redundant database)

>OSC3

MWKLKVAEGGKGLVSVSNFIGRQHWVFDPNAGTPQEHEEIERMRQEFKTNRFSIKQS  
ADLLMRMQLRKENPCGPIPPAVKLRDVEKVTAEALITTIIRRSITFYSSIQAHDGHW  
AESAGPLFFVQPLVMALYITGSLDDVLGPQHKEIIRYLYNHQNEGGWGFHIEGHS  
TMFGSALSYYIALRVLGQSLEDGEDMAVARGRKWILDHGGLVAIPSWGKFWVTVLGVY  
EWSGCNPLPPEFWLLPKIFPIHPGK**MLCYCR**LVYMPMSYLYGKKFVGPI TALVRSR  
KELYNEPYDRVDWNKARNTVAKEDLYYPHPLIQDMLWGFLHHVGERVLNTWPF SMLR  
QKAIEVAINHVRYEDETTRYLCIGSVEKVLVLIARWVEDPNSEAYKLHLARIPDYFW  
LAEDGLKIQSFGCQMWDAAFAIQAILSGNVSEEGPTLKKAHHFVKASQVRENPSGD  
FKAMYRHI SKGAWTFSMHDHWQVSDCTAEGGLKVALLLSEMSDDL VGAKMETEQFYD  
AVNVILSLQSSNGGFPAWEPQRAYQWLEKFNPT EFFEETLIEREYVECTGSAMQALA  
LFRKLYPKHRRKEIDRCISKAIRYIENTQNPDGSWYGCWGICYTYGTWFAVEGLTAC  
GKNFQNSVTLRRACKFLLSKQLPNGGWGESYLSQDKVYTNI EGKRANLVQSSWALL  
SLMRAGQAEIDPTPIHRGIRLLINSQMDDGDFPQQEITGVFMRNCTLNYSYRNIFP  
IWALGEYRRRVLCA

Πλαίσιο 1: Αμινοξική ακολουθία της OSC3(Expasy, Translation), όπου φαίνεται με έντονα γράμματα η περιοχή MLCYCR, καθώς και το μοτίβο DDX(X)D με υπογραμμισμένα γράμματα.

Το cDNA της OCS3 κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης και μετασχημάτισαν με αυτό στέλεχος μύκητα, ελαττωματικό στην παραγωγή της λανοστερόνης[8]. Έτσι, το μονοπάτι μπορούσε να κινηθεί μόνο προς την παραγωγή τριτερπενοειδών αλκοολών. Μετά από εκχύλιση του πρωτεϊνικού περιεχομένου, καθαρισμό με TLC, τα δείγματα αναλύθηκαν με HPLC και συγκρίθηκαν με πρότυπα. Βρέθηκε ότι το cDNA της OCS3 κωδικοποιεί για ένζυμο που έχει ως στόχο την παραγωγή λουπεόλης(Εικ. 1.17). Με ετερόλογη έκφραση προσπάθησαν να χαρακτηρίσουν λειτουργικά και τα υπόλοιπα γονίδια που κωδικοποιούν OSC στο *Lotus japonicus* (εικ.1.18).



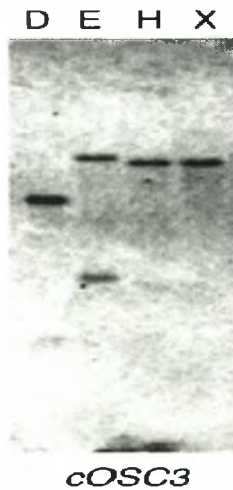
Εικ.1.17: Χαρακτηρισμός της OSC3 ως συνθάσης της λουπεόλης (Sawai et al,2006)

Gene Triterpene alcohols produced by the recombinant yeast GIL77

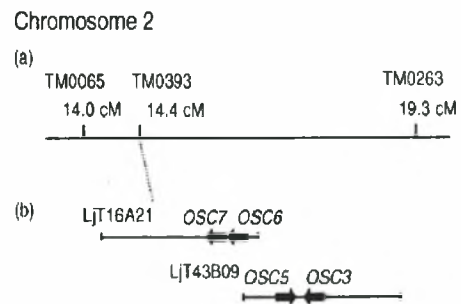
Gene	Triterpene alcohols produced by the recombinant yeast GIL77
OSC1	-
OSC2	-
OSC3	β-Amyrin
OSC4	-
OSC5	Lupeol
OSC6	-
OSC7	-
OSC8	β-Amyrin, lupeol [19]

Εικ.1.18: Χαρακτηρισμός των OSC του Lotus (Sawai et al,2006)

Το γονίδιο της OSC3 εντοπίστηκε στο δεύτερο χρωμόσωμα του *Lotus japonicus*(n=6)[8]. Το αποτέλεσμα αυτό προέκυψε με την δημιουργία για το γένωμα του Lotus BACs(bacterial artificial chromosomes), εντοπισμός κλώνου που περιέχει την OCS3 με PCR με τους εκκινητές της και αλληλούχηση των προϊόντων και βέβαια εντοπισμός του χρωμοσώματος με την χρήση μοριακών δεικτών(εικ.1.20). Με την χρήση Southern ανάλυσης αποδείχτηκε ότι στο γονιδίωμα του *Lotus japonicus* υπάρχει ένα αντίγραφο για την συνθάση της λουπεόλης(εικ.1.19).

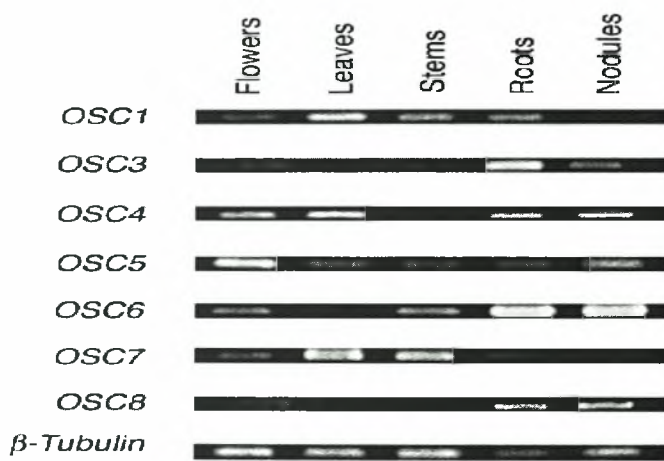


Εικ. 1.19: Southern ανάλυση με αντιχενυτή cDNA κλώνο της OSC3 και γνωρίζοντας ότι το γονίδιο της OSC 3 περιέχει μία θέση κοπής για το ένζυμο περιορισμού EcoRI και καμία για τα: DraI, HindIII, XbaI (Sawai et al,2006)

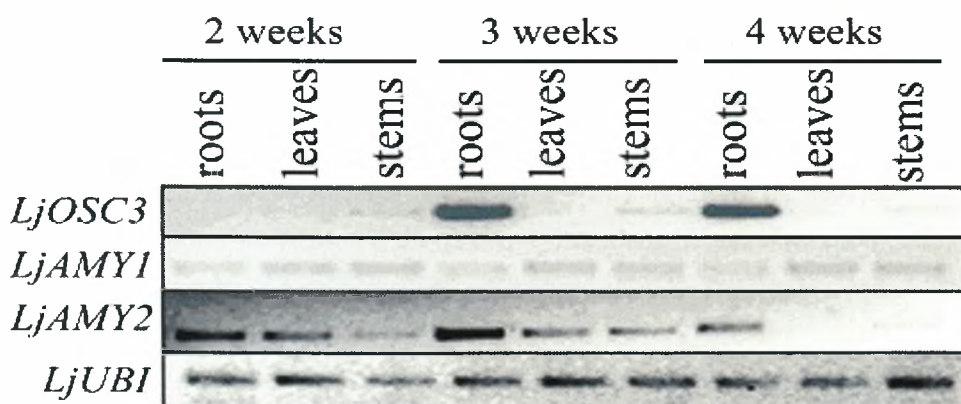


Εικ.1.20: Εντοπισμός του γονιδίου της OSC3 στο δεύτερο χρωμόσωμα του Lotus(Sawai et al,2006)

Χρησιμοποιώντας mRNA από διαφορετικούς ιστούς και εκκινητές ειδικούς για κάθε γονίδιο βρέθηκε ότι η συνθάση της λουπεόλης συσσωρεύεται σε μεγάλες ποσότητες στις ρίζες και στα φυμάτια και σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα φύλλα. Έχουμε, δηλαδή, οργανο-ειδικές απαιτήσεις γενικότερα για τα τριτερπενοειδή και ειδικότερα για την λουπεόλη(Εικ.1.21 & Εικ. 1.22). Πιθανώς, η λουπεόλη εμπλέκεται σε κάποιον φυσιολογικό ρόλο στις ρίζες και στα φυμάτια που δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί.

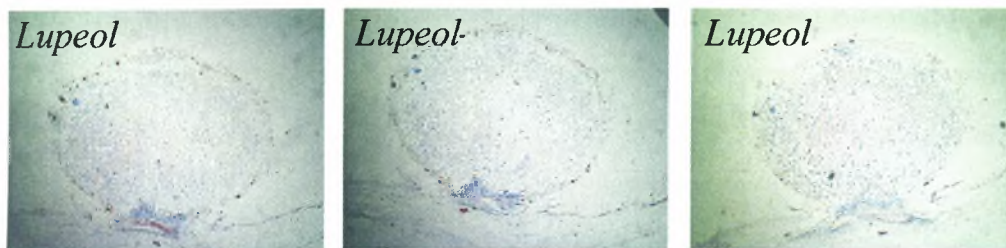


Εικ.1.21: RT-PCR (Sawai et al,2006)



Εικ. 1.22: RT-PCR (Delis et all, unpublished results)

Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η έκφραση της συνθάσης της λουπεόλης σχετίζεται με την ανάπτυξη φυματίων σε διάφορα φυτά[5,7,17]. Με βάση in situ(Εικ. 1.23) ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για εντοπισμό του μεταγραφήματος της συνθάσης της λουπεόλης σε φυμάτια του *Lotus japonicus*, παρατηρήθηκε ότι το mRNA του OSC3 συσσωρεύεται κυρίως στο σημείο επαφής φυματίου και ρίζας[Delis et all, Unpublished Results).



Εικ. 1.23: RNA-RNA In situ υβριδισμός μεταγραφήματος της OSC3 σε ώριμα φυμάτια *Lotus japonicus* 28 ημερών (Delis et all, unpublished results).

Στα φυμάτια των ριζών της γλυκόριζας (*Glycyrrhiza glabra*) βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα του mRNA της συνθάσης της λουπεόλης. Στους ίδιους ιστούς, εντοπίστηκε ποσότητα μπετουλίνης (betulinic acid), το οποίο αποτελεί μεταβολίτη της λουπεόλης[18]. Η ίδια ουσία συσσωρεύεται στο εξωτερικό τοίχωμα των φυματίων του φασολιού(*Vicia faba*)[19].

Επιπλέον, σε προηγούμενη μελέτη ένα γονίδιο που τελικώς αποδείχθηκε ότι έχει ομολογία με την συνθάση της λουπεόλης από το *Arabidopsis thaliana* βρέθηκε να εκφράζεται στα φυμάτια του *Medicago truncatula*[20]. Μάλιστα, το χαρακτήρισαν ως πρώιμη νοντουλίνη, γεγονός που σημαίνει ότι εμπλέκεται είτε στη μόλυνση από το ριζόβιο είτε σε οργανογενετικές διαδικασίες στα φυμάτια. Απέδειξαν, όμως, ότι είναι Nar παράγοντας( Nodulation in the absence of Rhizobium). Συνεπώς, εμπλέκεται στην δημιουργία των φυματίων.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω και το γεγονός ότι και στο *Lotus* εκφράζεται έντονα στα φυμάτια, αξίζει να μελετήσουμε τον ρόλο που παίζει αυτό το τριτερπενοειδές στην δημιουργία των φυματίων.

### 5.α. Μηχανισμός της RNA παρεμβολής(RNAi)

Ο μηχανισμός της *RNA παρεμβολής (RNA interference, RNAi)* ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στο φυτό *Petunia hybrida* σε μία προσπάθεια τροποποίησης του χρωματισμού των ανθέων. Συγκεκριμένα, εισήγαγαν επιπλέον του ενδογενούς γονιδίου της συνθάσης της χαλκόνης( καταλύει το πρώτο βήμα για την βιοσύνθεση ανθοκυανινών) ένα ακόμη αντίγραφο. Όμως, αντί να πετύχουν ενίσχυση του χρώματος πήραν άνθη άχρωμα, φαινόμενο που ονόμασαν συν-καταστολή(co-suppression), καθώς το διαγονίδιο καταστέλλει την δράση και του ενδογενούς γονιδίου. Με το επιπρόσθετο γονίδιο, το οποίο πιθανώς είχε εισέλθει σε πολλαπλά αντίγραφα τα οποία μεταγραφόταν σε αντίθετη φορά , ενεργοποίησαν τον RNAi μηχανισμό[21].



Εικόνα 1.24: *Petunia hybrida*

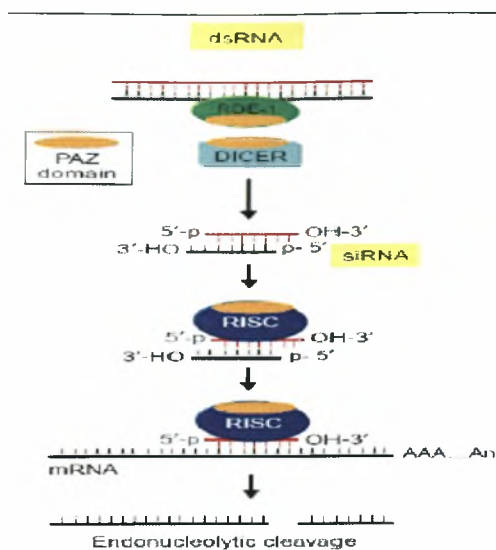
Παρόμοια φαινόμενα με τον RNAi μηχανισμό είναι το φαινόμενο την συν-καταστολής(co-suppression), της μετα-μεταγραφικής γονιδιακής αποσιώπησης(PTGS-Post-Transcriptional-Gene-Silencing), της γονιδιακής αποσιώπησης επαγόμενη από ιούς(VIGS-Virus-Induced-Gene-Silencing).Πρόκειται για έναν καλά συντηρημένο μηχανισμό, καθώς απαντιέται στο *Arabidopsis* και σε πολλά άλλα φυτά, *C.elegans*, *Hydra*, *zebrafish*, στο ποντίκι και στα ανθρώπινα κύτταρα[22].

Ο μηχανισμός του RNA interference είναι ο εξής(Εικ.1.25):

- a. Το ένζυμο DICER διασπά το δίκλωνο RNA (ds RNA) σε μικρά τμήματα, γνωστά ως μικρά RNA παρεμβολής(si RNAs-short-interfering RNAs). Αυτά τα δίκλιωνα ολιγοριβονουκλεοτίδια έχουν μήκος 21-22 nt και χαρακτηριστικό τους είναι μία προεξοχή δύο νουκλεοτιδίων σε κάθε 3 άκρο τους.



- b. Τα siRNAs ενώνονται με ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το RISC (RNA INDUCED SILENCING COMPLEX). Το siRNA θεωρείται ότι



λειτουργεί ως οδηγός για να συναντήσει το σύμπλοκο το mRNA με την συμπληρωματική αλληλουχία. Κατόπιν, πραγματοποιείται ενδονουκλεοτιδική διάσπαση του mRNA με αποτέλεσμα να μην μπορεί να παραχθεί η συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

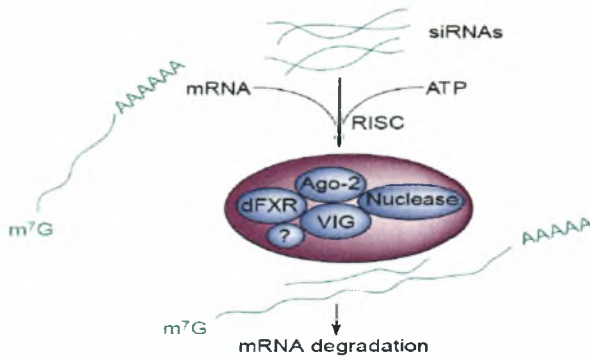
[22,23].

Εικόνα 1.25: Μηχανισμός της RNA παρεμβολής(Thackray,2004)

Το πρώτο βήμα του RNAi μηχανισμού(διάσπαση του dsRNA στα siRNAs) μπορεί να συμβεί είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα, όμως το δεύτερο βήμα(κατακερματισμός του ομόλογου mRNA) συμβαίνει αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα, καθώς το ώριμο mRNA είναι αυτό που διασπάται[24,25].

Το τελικό, λοιπόν, αποτέλεσμα αυτού του μηχανισμού που πυροδοτείται από την παρουσία δίκλωνου RNA στο κύτταρο είναι η διάσπαση ομόλογου mRNA με τα siRNAs, τερματίζοντας έτσι την έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου. Η διάσπαση του mRNA γίνεται στην μέση περίπου του τμήματος που βρίσκει ομολογία το siRNA με το mRNA. Όσο πιο μεγάλο είναι το dsRNA τόσο πιο αποτελεσματική είναι η αποσιώπηση του γονιδίου. Ο αριθμός των siRNAs που προκύπτουν από την διάσπαση του δίκλωνου RNA είναι:dsRNA/ 21. Τα siRNAs είναι όπως είπαμε δίκλιωνα τμήματα RNA μήκους 21-22 nt και έχουν ένα 5'-φωσφορικό άκρο και στο 3'υδροξυλικό-άκρο έχουν μία προεξοχή δύο νουκλεοτιδίων[26]. Το RISC ή αλλιώς siRNP(small interfering ribonucleoprotein particle) αποτελείται από πολλές πρωτεΐνες, οι περισσότερες από τις οποίες δεν είναι γνωστές(Εικόνα 1.26), προσδένει ένα siRNA την

φορά και προκαλεί διάσπαση του ομόλογου mRNA. Πολλοί πιστεύουν ότι είναι η ίδια η DICER που προκαλεί την διάσπαση των mRNAs.



Εικόνα 1.26: RISC(Thackray,2004)

Ο RNAi μηχανισμός ως ενδογενής μηχανισμός εξελίχθηκε για να υπηρετεί κάποιους σκοπούς. Αυτοί είναι[22]:

1. αντιμετώπιση ιϊκής εισβολής(εξωγενής απειλή)[22,27,28]
- 2.περιορισμός της κινητικότητας των τρoνσποζονίων (ενδογενή απειλή)[22,29,30]
3. ρύθμιση της έκφρασης ενδογενών γονιδίων κατά την ανάπτυξη του οργανισμού[22,29,31].

### 1. αντιμετώπιση ιϊκής εισβολής(εξωγενής απειλή)

Στο 90% των περιπτώσεων οι φυτικοί ιοί έχουν ssRNA και αντιγράφονται μέσω της RNA-εξαρτώμενης-RNA-πολυμεράσης, με ενδιάμεσο δηλαδή dsRNA. Ο RNAi μηχανισμός είναι μία μορφή ανοσοποιητικού συστήματος για τα φυτά που δρα σε επίπεδο DNA. Το αμυντικό αυτό σύστημα έχει το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό ότι δυνητικά προσαρμόζεται σε οποιοδήποτε ιό, επειδή η εξειδίκευση του μηχανισμού αυτού δεν οφείλεται στο γενετικό υλικό του ξενιστή, αλλά του εισβολέα. Παρουσιάζει ιδιότητες ενός άριστου ανοσοποιητικού συστήματος:εξειδίκευση, προσαρμοστικότητα, μεταφορά εντός οργανισμού. Στα ζώα, αν και έχει αποδειχθεί ότι ο μηχανισμός αυτός παίζει ουσιαστικό ρόλο έναντι μεταθετών στοιχείων, δεν έχει αποδειχθεί να αντιμετωπίζει ιούς[28]. Θεωρείται ότι τα RISC σύμπλοκα ελέγχουν τα mRNAs που περνούν από τους πυρηνικούς πόρους και από τα δεσμοσώματα, προσπαθώντας να βρουν ιϊκά τμήματα με ομολογία με τα siRNAs τους και να τα

διασπάσουν. Ο RNAi μηχανισμός βρέθηκε ότι μεταφέρεται διασυστηματικά στο φυτό, προσπαθώντας έτσι να προετοιμάσει μη προσβεβλημένους ιστούς. Η διάδοση του σήματος γίνεται μέσω μεταφοράς των siRNAs ή του dsRNA μεταξύ κυττάρων από τα πλασμοδέσματα και για μεγάλες αποστάσεις με το φλοιώμα. Μετακινούνται μόνο προς μία κατεύθυνση: από το σημείο παραγωγής προς το σημείο υποδοχής και έχει δειχθεί ότι μπορούν να φτάσουν σε απόσταση 30cm[27].

## 2. περιορισμός της κινητικότητας των τρoνσποζονίων (ενδογενή απειλή)

Μεταλλάγματα *C. elegans* με απενεργοποιημένο τον RNAi μηχανισμό εμφάνιζαν μεγαλύτερη κινητικότητα των μεταθετών στοιχείων του γενώματος τους, υποδηλώνοντας φυσιολογικό ρόλο για το RNAi στην σταθεροποίηση των μεταθετών στοιχείων[29]. Ο μηχανισμός του RNAi αναγνωρίζει τα μεταγραφήματα των τρoνσποζονίων από τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που περιέχουν και είναι κοινές μόνο μεταξύ των μεταθετών στοιχείων. Προστατεύει έτσι τη βλαστική σειρά κυττάρων[30].

## 3. ρύθμιση της έκφρασης ενδογενών γονιδίων κατά την ανάπτυξη του οργανισμού.

Ομόλογα του *dce* γονιδίου(εμπλέκεται στα πρώτα στάδια του μηχανισμού, βλ. εικ.23) σχετίζονται με ρύθμιση της ανάπτυξης στα φυτά(*swille, argonaute*) και διατήρηση της βλαστικής σειράς στο *C. elegans* προτείνοντας ρόλο για τον RNAi μηχανισμό στην ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων[29]. Η παραγωγή δίκλωνου RNA από την μεταγραφή ενδογενών γονιδίων μπορεί να οφείλεται σε εκκινητές στην αντίστροφη φορά του γονιδίου, σε πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου με αντίθετες φορές. Μία τρίτη πιθανότητα είναι να περιέχει το ίδιο το mRNA επαναλαμβανόμενα τμήματα και να σχηματίζει θηλιές. Στην κατηγορία αυτή εμπίπτει η συνθάση της χαλκόνης, ρυθμίζοντας έτσι το φυτό την ποσότητα χρωστικής που περιέχει στα άνθη του[31].

## **β. Εφαρμογές του RNAi στην βιοτεχνολογία**

### 1. Εφαρμογή του RNAi μηχανισμού για βελτίωση καλλιεργειών

Η επιλεκτική αποσιώπηση γονιδίων που εμπλέκονται σε πολύπλοκα μεταβολικά μονοπάτια είναι δυνητικά χρήσιμο εργαλείο για την βελτίωση των αγρονομικών χαρακτηριστικών καλλιεργούμενων φυτών. Για παράδειγμα, αποσιώπηση γονιδίων αποκορεσμάσων (desaturases) έδωσε την δυνατότητα αλλαγής της περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα στο λάδι του βαμβακόσπορου[31].

### 2. Εφαρμογή του RNAi μηχανισμού για μελέτες αντίστροφης γενετικής, προκειμένου να μελετηθεί η λειτουργική σημασία γονιδίων.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι δημιουργίας knock-out φαινοτύπων, όπως η απώλεια της έκφρασης γονιδίων εξαιτίας της ένθεσης T-DNA ή τρανσποζονίων, ή η χημική μεταλλαξιγένεση παρουσιάζουν μία σειρά από περιορισμούς, που κάποιος από αυτούς μπορούν να ξεπεραστούν με την μέθοδο της αποσιώπησης γονιδίων μέσω ενεργοποίησης έναντι αυτών του ενδογενούς RNAi μηχανισμού. Οι περιορισμοί αφορούν κυρίως δυσκολία στο να έχουν πρόσβαση τα μεταλλαξιγόνα σε όλο το γονιδίωμα, απαίτηση μεγάλου χρόνου για την διεκπεραίωση τους, δυσκολία στο να συσχετιστούν συγκεκριμένοι φαινότυποι με τα αντίστοιχα γονίδια. Επίσης, απενεργοποιώντας γονίδια που η έκφραση τους είναι απαραίτητη για την ζωή, οδηγούμαστε σε θνησιγόνο φαινότυπο, μη επιτρέποντας έτσι την πιο λεπτομερή μελέτη του γονιδίου αυτού. Με τον RNAi μηχανισμό, το πρόβλημα αυτό ξεπερνιέται, καθώς σχεδόν ποτέ δεν πετυχαίνεται 100% αποσιώπηση του γονιδίου. Εναλλακτική λύση, αποτελεί το να είναι η γονιδιακή αποσιώπηση επαγόμενη, με την χρήση επαγόμενων προαγωγέων[31]. Η διαδικασία της δημιουργίας της κατασκευής προκειμένου να επαχθεί η γονιδιακή αποσιώπηση μπορεί να απλοποιηθεί περισσότερο αντικαθιστώντας τις κλωνοποιήσεις με την χρήση ενζύμων περιορισμού με κλωνοποίηση με την βοήθεια ρεκομπινασών. Παράδειγμα αποτελεί ο pHELLSGATE φορέας, που δίνει την δυνατότητα να κατασκευαστεί σε ένα βήμα η κασέτα από την οποία θα προκύψει το hpRNA(hairpin-RNA, δίκλωνο RNA) με ανασυνδυασμό[32].

Υπάρχουν μέχρι σήμερα αρκετά παραδείγματα ενεργοποίησης του RNAi μηχανισμού έναντι ενδογενών γονιδίων, προκειμένου να αποσαφηνιστεί η

λειτουργική σημασία αυτών των γονιδίων. Με την αποσιώπηση ενός γονιδίου δεν αναλύεται βιοχημικά το προϊόν του γονιδίου(που μπορεί να γίνει με άλλες μεθόδους), αλλά παρατηρώντας τον φαινότυπο που προκύπτει καταλαβαίνουμε την σημασία του γονιδίου αυτού για το φυτό. Στα πλαίσια αυτού του σκοπού, έχει πραγματοποιηθεί γονιδιακή αποσιώπηση με την βοήθεια του *A.rhizogenes* μεταφορέα φωσφόρου σε συμβιωτική αλληλεπίδραση μύκητα-φυτού(arbuscular-mycorrhizza)[33]. Επίσης γονιδίων που καθορίζουν την ανάπτυξη του βλαστού και του άνθους, AG, CLV3,FLC1[34]. Επιπλέον, προκειμένου να αποδειχθεί ότι η συνθάση νταμαρενεντιολίου (dammarenediol synthase),που είναι μία OSC, είναι υπεύθυνη για την παραγωγή τριτερπενοειδών με μεγάλη φαρμακολογική σημασία στο *Panax ginseng* αποσιωπήθηκε η δράση της με RNAi και με την χρήση του *A.tumefaciens*[35]. Γενικότερα, ο μηχανισμός της γονιδιακής αποσιώπησης γονιδίων με σκοπό την μελέτη της φυσιολογικής σημασίας αυτών για τον οργανισμό αποτελεί ένα ολοένα και πιο χρησιμοποιούμενο εργαλείο για την ερευνητική κοινότητα.

Ωστόσο, δεν αποτελεί την εύκολη λύση που θα δώσει την δυνατότητα να μελετηθούν λειτουργικά όλα τα γονίδια. Υπάρχουν συσχετίσεις με ενεργοποίηση της απόπτωσης, σε κύτταρα θηλαστικών. Επίσης, εάν υπάρχουν 15 συνεχόμενα ταυτόσημα νουκλεοτίδια μεταξύ siRNA και mRNA γονιδίου διαφορετικού από αυτό που στοχεύουμε τότε συμβαίνει αποσιώπηση[22]. Για αυτό πρέπει η ερμηνεία του φαινοτύπου να γίνεται με προσοχή και πρέπει να τον επιβεβαιώνεται ότι οφείλεται σε αποσιώπηση του γονιδίου στόχου.

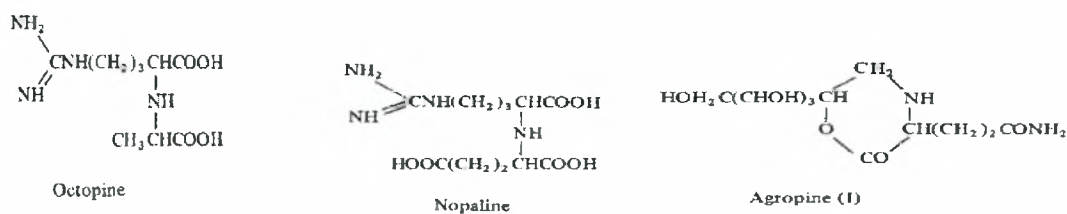
3. Η μεγάλη εξειδίκευση που παρουσιάζει το κάνει ιδανικό εργαλείο για μελέτη για γονιδιακή θεραπεία έναντι ογκογονιδίων[22].

## 6. α. *A.tumefaciens*

Τα βακτήρια του γένους *Agrobacterium* (*A.tumefaciens* & *A.rhizogenes* κ.α.) είναι Gram αρνητικά, ραβδόμορφα βακτήρια εδάφους και ανήκουν στην οικογένεια *Rhizobiaceae* [36]. Οι αλληλεπιδράσεις του *Agrobacterium* με το φυτικό κύτταρο οδηγούν σε οριζόντια γονιδιακή μεταφορά (HGT, Horizontal Gene Transfer) από το βακτήριο στο φυτό [37]. Το αξιοσημείωτο είναι ότι σε αντίθεση με την μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ οργανισμών του ίδιου βασιλείου π.χ σύζευξη βακτηρίων, η μεταφορά DNA μέσω των βακτηρίων *Agrobacterium* είναι η μόνη γνωστή περίπτωση μεταφοράς γενετικού υλικού μεταξύ δύο βασιλείων (μονήρων και φυτών).

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι υπεύθυνο για την πρόκληση της ασθένειας του κορονωτού κάλλου, ο οποίος είναι μία συμπαγή μάζα αδιαφοροποίητων κυττάρων. Η δημιουργία του όγκου οφείλεται σε εξωχρωμοσωμικό παράγοντα στο *Agrobacterium*, που ονομάστηκε ογκο-επαγωγικό πλασμίδιο (Ti-Tumor-inducing). Το φαινόμενο του *Rhizobium*, που επάγει την δημιουργία φυματίων σε ψυχανθή φυτά, θεωρείται ότι είναι παραπλήσιο [36].

Τα κύτταρα του κορονωτού κάλλου παράγουν αυτόνομα αυξίνη και γιββεrellίνη με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται υπέρμετρα. Επίσης, παράγουν οπίνες, που συντίθενται από συμπύκνωση σακχάρων και αμινοξέων και αποτελούν τροφή για το *Agrobacterium*. Τις δύο αυτές ιδιότητες τις αποκτούν τα κύτταρα του κάλλου εξαιτίας ένθεσης τμήματος του Ti πλασμιδίου, του T-DNA (Transferred DNA, Μεταφερόμενο DNA). Έχουν βρεθεί τρία είδη Ti πλασμιδίων: της οκτοπίνης, της νοπαλίνης, της αγροπίνης (Εικ.1.27), ανάλογα με την οπίνη που «αναγκάζουν» το φυτό να παράγει. Επιπλέον, στο Ti πλασμίδιο υπάρχουν και γονίδια για ένζυμα καταβολισμού των οπινών. Το ειδικό αυτό φαινόμενο ονομάζεται γενετικός αποικισμός, μιας και το *Agrobacterium* κατορθώνει να δημιουργήσει μία οικολογική φωλιά στα κύτταρα του κάλλου [38].

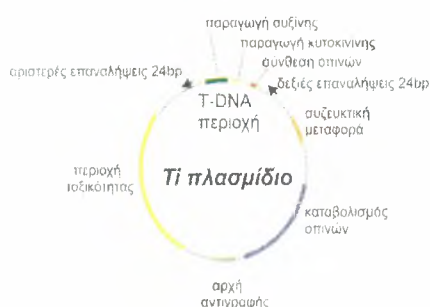


Εικόνα 1.27: Χημική δομή των πιο γνωστών οπινών: οκτοπίνη, νοπαλίνη, αγροπίνη

## ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΤΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ

Η περιοχή του ΤΙ πλασμιδίου που εισέρχεται στο φυτικό γένωμα είναι το T-DNA και περιέχει, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.28, τα γονίδια για την παραγωγή αυξίνης, γιββερελλινών και οπινών. Το τμήμα αυτό ενσωματώνεται στο φυτικό γένωμα, αντιγράφεται και μεταγράφεται όπως αυτό. Το T-DNA περιστοιχίζεται και από τις δύο πλευρές από μία ευθεία συντηρημένη επανάληψη 24bp. Οι αλληλουχίες αυτές ονομάζονται επαναλαμβανόμενα συνοριακά(**RB-Right Border & LB-Left Border**). Οι περιοχές αυτές οριοθετούν το T-DNA και αποτελούν σιγνάλα για την αναγνώριση και μεταφορά του. Η θέση ενσωμάτωσης του στο φυτικό γένωμα είναι τυχαία, αλλά ευνοούνται οι μεταγραφικά ενεργές περιοχές, καθώς είναι πιο εύκολα προσβάσιμες.

Τα γονίδια τοξικότητας(virulence genes) κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες για την μεταφορά του T-DNA από το *Agrobacterium* στο φυτό. Βρίσκονται στο ΤΙ πλασμίδιο(vir γονίδια) και στο χρωμόσωμα του βακτηρίου(chv γονίδια) και δεν ενσωματώνονται στο φυτικό γένωμα.



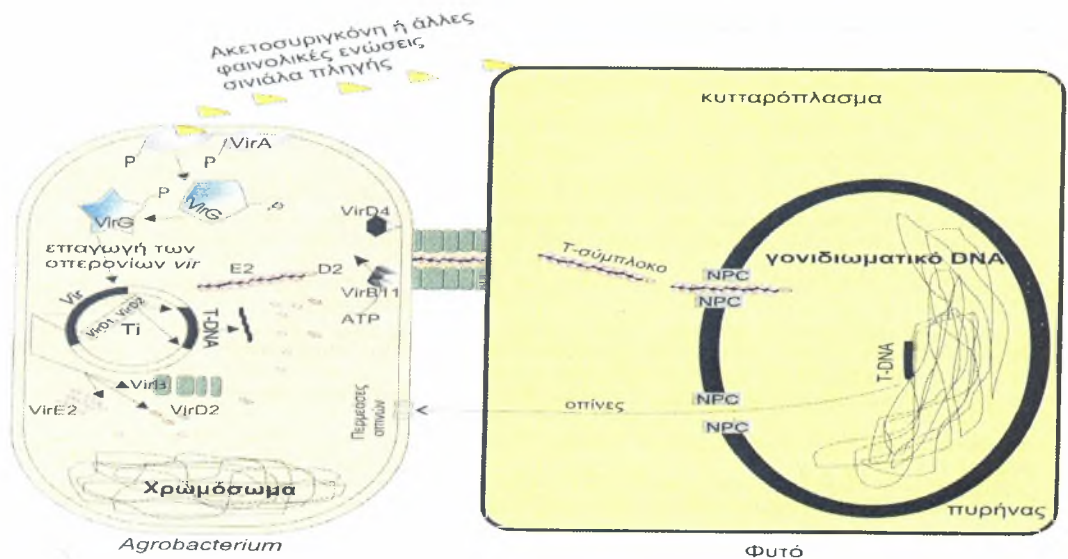
Εικόνα 1.28:Δομή ΤΙ πλασμιδίου(Χατζόπουλος

2001)

## ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥ T-DNA ΑΠΟ ΤΟ *Agrobacterium* ΣΤΟ ΦΥΤΟ

Το *Agrobacterium* μπορεί να μολύνει μόνο πληγωμένους ιστούς, καθώς τα παραγόμενα φαινολικά, όπως η ακετοσυριγγόνη δρουν ως χημειοτακτικές ουσίες. Οι τελευταίες συνδέονται με τις VirA και VirG οι οποίες επάγουν την έκφραση των οπερονίων των υπολοίπων γονιδίων τοξικότητας. Με την βοήθεια των VirD1 και VirD2, οι οποίες τέμνουν το T-DNA εξειδικευμένα στο RB και στο LB, παράγεται ss T-DNA. Η ενδιάμεση αλληλουχία του T-DNA μπορεί να αντικατασταθεί, όμως τα συνοριακά είναι απαραίτητα για την μεταφορά αλληλουχίας από το *Agrobacterium*

στο φυτό. Η πρωτεΐνη VirD2 συνδέεται με το 5' άκρο του μονόκλωνου T-DNA και δρα ως οδηγός για την μεταφορά του στο φυτικό κύτταρο. Επιπλέον, η VirE2 περικλείει την αλυσίδα του T-DNA και το προστατεύει από νουκλεάσες. Τα προϊόντα του οπερονίου VirB σχηματίζουν το κανάλι στην επιφάνεια βακτηρίου-φυτού για να διέλθει το DNA. Το νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο με ενεργή μεταφορά διέρχεται τους πυρηνικούς πόρους και ενσωματώνεται στο φυτικό γένωμα. Τα συνολικά βήματα της αλληλεπίδρασης φυτού-*Agrobacterium* φαίνεται στην εικόνα 1.29.



Εικόνα 1.29: Συνολική εικόνα της αλληλεπίδρασης *Agrobacterium*-φυτού(Χατζόπουλος 2001)

Τέλος, η ενσωμάτωση του T-DNA στο φυτικό γονιδίωμα γίνεται με ανορθόδοξο ανασυνδυασμό, γεγονός που σημαίνει ότι πραγματοποιείται μεταξύ περιοχών που έχουν ελάχιστη ή καμία ομοιότητα.

## 6 β. *Agrobacterium rhizogenes*

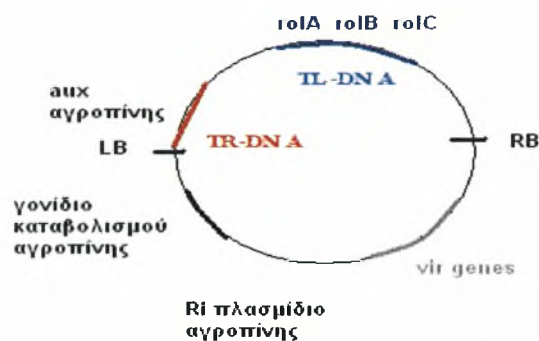
Το *Agrobacterium rhizogenes* είναι ένα βακτήριο του εδάφους, που είναι υπεύθυνο για την ασθένεια «hairy root» που παρουσιάζεται σε πολλά δικότυλα[39]. Ο μετασχηματισμός με το *A.tumefaciens* και με το *A.rhizogenes* διαφέρουν, καθώς ο πρώτος οδηγεί στην δημιουργία μίας ανοργάνωτης και αδιαφοροποίητης μάζας, του κάλλου, ενώ ο δεύτερος στον σχηματισμό έντονα διακλαδωμένων ριζών(hairy roots).Η διαφορά αυτή έγκειται στο γεγονός ότι το T-DNA του Ti πλασμιδίου του *A.tumefaciens* περιέχει γονίδια για παραγωγή αυξίνης, κυτοκίνης αλλά και οπινών,



προκαλώντας έτσι την αποδιοργάνωση. Σε αντίθεση, το T-DNA του Ri πλασμιδίου δεν κωδικοποιεί για ένζυμα παραγωγής ορμονών(με εξαίρεση το πλασμίδιο της αγροπίνης). Συνεπώς άλλα γονίδια είναι υπεύθυνα για την δημιουργία του «hairy root» φαινομένου[40]. Υπάρχουν τέσσερις τύποι Ri πλασμιδίων ανάλογα με την οπίνη που ωθούν το φυτό να παράγει: 1.αγροπίνης,2. μαννοπίνης,3. cucumoprine και 4. mikimoprine[38].

Συμπτώματα της «hairy root» ασθένειας περιλαμβάνουν : σχηματισμός τυχαίων ριζών, αυξημένος ρυθμός ανάπτυξης της ρίζας, ανάπτυξη πλάγιων ριζών με αλλαγμένο γεωτροπισμό, μειωμένη παραγωγή γύρης και σπόρων, μείωση της επάκριας κυριαρχίας του βλαστού αλλά και της ρίζας[41]. Γενικότερα, μόλυνση με το *A.rhizogenes* οδηγεί στην δημιουργία ρίζας στο σημείο κοπής[42]. Τα «hairy roots» διαφέρουν από τις φυσιολογικές ρίζες, καθώς έχουν διαφορετική γεωτροπική συμπεριφορά και περισσότερες διακλαδώσεις[39].

#### ΔΟΜΗ ΤΟΥ Ri ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ



Εικ. 1.30: Ri πλασμίδιο της αγροπίνης

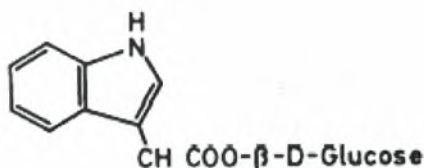
Το **Ri**(Root inducing) πλασμίδιο, όπως και το **Ti**, περιέχει εκτός των συνοριακών τα *vir* γονίδια και τα γονίδια καταβολισμού των οπινών. Ωστόσο το T-DNA του αποτελείται από δύο μη-συνεχόμενα τμήματα:1. T<sub>L</sub>-DNA, 2. T<sub>R</sub>-DNA [42,43].

Το T<sub>R</sub>-DNA περιέχει τα γονίδια για την παραγωγή των οπινών και μόνο στην περίπτωση του Ri πλασμιδίου της αγροπίνης και δύο γονίδια για παραγωγή αυξίνης[46].

Το T<sub>L</sub>-DNA περιέχει τέσσερις γενετικούς τόπους *rol* (*root loci*) A, B, C, D. Η δομή του Ri πλασμιδίου της αγροπίνης παρουσιάζεται στην εικόνα 1.30. Οι διαφορετικές περιοχές του T-DNA ίσως να υποδηλώνουν προσαρμογή σε διαφορετικούς ξενιστές[45].

Η «hairly root» ασθένεια είναι αποτέλεσμα αυξημένης ευαισθησίας στην αυξίνη, η οποία προκαλείται από τροποποίηση του συστήματος αντίληψης-μεταγωγής του σήματος της αυξίνης. Η τροποποίηση αυτή προκαλείται από τα γονίδια *rol* και συγκεκριμένα το *rolB* προκαλεί ευαισθησία στην αυξίνη, οδηγώντας σε ριζογένεση. Η επίδραση αυτή είναι τοπική, καθώς δεν επηρεάζεται η μεταφορά της αυξίνης σε ολόκληρο το φυτό. Το *rolC* γονίδιο δρα ανταγωνιστικά με το *rolB*[41,42].

Το *rolB* γονίδιο κωδικοποιεί για μία β-γλυκοσιδάση, με την δράση της οποίας απελευθερώνεται η αυξίνη(IAA) από την συζευγμένη της μορφή με γλυκοσίδιο(Εικ.1.31).Οι συζευγμένες μορφές των φυτοορμονών δρουν ως αποθήκες για το φυτό. Συνεπώς, αυξάνοντας την απελευθέρωση, αυξάνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της αυξίνης, με αποτέλεσμα να επάγεται η ριζογένεση.



Εικ.1.31: IAA β-γλυκοζίτης

Το *rolC* κωδικοποιεί για το αντίστοιχο ένζυμο που αποδεσμεύει την κυτοκίνη από την γλυκοζυλιωμένη μορφή της. Πιθανώς, επέρχεται ισορροπία μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων με αποτέλεσμα την ριζοβολία[45].

### γ. *Agrobacterium* & Γενετική Μηχανική

Η ξεχωριστή ιδιότητα των βακτηρίων του γένους *Agrobacterium* να ενσωματώνουν τμήμα του γενώματος τους στο φυτικό γονιδίωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή παροδικά μετασηματισμένων φυτών για την έκφραση ή την καταστολή της έκφρασης γονιδίων. Αναφερόμαστε σε παροδικό μετασηματισμό, καθώς η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού δεν συμβαίνει στην βλαστική σειρά με αποτέλεσμα να μην μπορεί να περάσει το ένθεμα στην επόμενη γενιά. Σε αντιδιαστολή, ως σταθερός μετασηματισμός ορίζεται η εισαγωγή

γενετικού υλικού στο φυτικό κύτταρο, οδηγώντας σε πυρηνική ή οργανιδιακή ένθεση και σε σταθερή κληρονομικότητα του υλικού αυτού μετά από μείωση[36].

Προκειμένου να γίνεται η μεταφορά και η ενσωμάτωση του T-DNA στο φυτικό γονιδίωμα, πρέπει να υπάρχουν:

1. Το RB & LB στα άκρα της περιοχής που θέλουμε να εισάγουμε.
2. Τα πλασμιδιακά γονίδια *vir*
3. Τα χρωμοσωμικά γονίδια *chv*

Η περιοχή του T-DNA μπορεί να αντικατασταθεί από οποιαδήποτε αλληλουχία θέλουμε. Τα γονίδια *vir* και *chv* είναι απαραίτητα για την μεταφορά του τμήματος και δρουν ως *trans* παράγοντες, δηλαδή η αλληλουχία που τα κωδικοποιεί δεν χρειάζεται να είναι φυσικά συνδεδεμένη με την αλληλουχία του T-DNA.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα έχουν κατασκευαστεί δύο ειδών φορείς για την μεταφορά τμημάτων στο φυτό με την χρήση βακτηρίων του γένους *Agrobacterium*:

1. Σύστημα cis ή συνεισεργόμενοι φορείς, όπου στο T<sub>i</sub> πλασμίδιο(με τα *vir* γονίδια) γίνεται αντικατάσταση του T-DNA με τμήμα της επιλογής μας.
2. Διαδικό σύστημα ή σύστημα trans, όπου χρησιμοποιούνται δύο ανεξάρτητα πλασμίδια, το T<sub>i</sub> με αποπλισμένο το T-DNA και ένας δεύτερος φορέας που φέρει την αλληλουχία που θέλουμε να μεταφέρουμε ανάμεσα βέβαια σε συνοριακά. Παραδείγματα δυαδικών φορέων που χρησιμοποιούνται για την κλωνοποίηση της επιθυμητής αλληλουχίας αποτελούν ο pBin, pArt, pCambia.



Εικόνα 1.32: Δυαδικοί φορείς: pBin, pArt, pCambia

Και στις δύο περιπτώσεις το αγρίο τύπου T-DNA που περιέχει τα ογκογενετικά γονίδια είναι αποπλισμένο. Συνεπώς οι ιστοί που προκύπτουν από τον

μετασχηματισμό συμπεριφέρονται φυσιολογικά και όχι όπως τα καρκινικά κύτταρα στην ιστοκαλλιέργεια και στην επαγωγή του κάλλου για αναγέννηση φυτού.

Στα δυαδικά συστήματα χρησιμοποιούν στελέχη *Agrobacterium* που έχουν το Tι πλασμίδιο με διατηρημένα τα vir γονίδια αλλά με αποπλισμένο το T-DNA, δηλαδή με «διαγραμμένα» τα ογκογονίδια και τα γονίδια παραγωγής οπινών. Στην περίπτωση του *A.rhizogenes*, τα παραπάνω γονίδια της περιοχής T<sub>R</sub>-DNA είναι διαγραμμένα όμως τα γονίδια rol(T<sub>L</sub>-DNA) είναι διατηρημένα. Το πλασμίδιο αυτό ονομάζεται «vir helper». Συνεπώς στην περίπτωση του *A.rhizogenes* έχουμε διπλή ενσωμάτωση: αφενός του γονιδίου που ενδιαφέρει ή του ξένου γονιδίου(Gene of Interest, GOI) που βρίσκεται στον δυαδικό φορέα και που περικλείεται από το δεξί και αριστερό συνοριακό και αφετέρου των rol γονιδίων που βρίσκονται στο «vir helper» πλασμίδιο[47]. Το *A.rhizogenes*, όπως είπαμε(Spena et all), οδηγεί στην δημιουργία ρίζας στο σημείο μόλυνσης, συνεπώς δίνει την δυνατότητα να σχηματιστούν «**σύνθετα φυτά**», καθώς προκύπτουν μεταμορφωμένες ρίζες(με ενσωματωμένο το GOI) σε ένα μη μεταμορφωμένο φυτό[48]. Για αυτό ακριβώς τον λόγο, ο μετασχηματισμός με το *Agrobacterium rhizogenes* είναι παροδικός μετασχηματισμός, καθώς δεν γίνεται μεταφορά του GOI σε επόμενες γενιές. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι έχει επιτευχθεί αναγέννηση φυτού από τις μεταμορφωμένες ρίζες(Crane et all).

## 7. Ριζόβια & σχηματισμός φυματίων

Τα βακτήρια του εδάφους που ανήκουν στην οικογένεια *Rhizobiaceae* είναι Gram αρνητικά και υποχρεωτικά αερόβια και καλούνται συνολικά ριζόβια. Τα ριζόβια, αναπτύσσουν μία στενή, ειδική και ωφελιμιστική σχέση με ψυχανθή φυτά όπως το *Lotus japonicus*. Η συνεργασία αυτή έχει ως τελικό αποτέλεσμα την δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου σε οργανική μορφή, διαθέσιμη πλέον για τα φυτά[49].

Το άζωτο αποτελεί θρεπτικό συστατικό που απαιτείται σε μεγάλες ποσότητες για την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών. Υπάρχουν δύο οδοί με τους οποίους τα φυτά αποκτούν το άζωτο που χρειάζονται, είτε από τα εδαφικά διαλύματα με την μορφή νιτρικών ιόντων, είτε με την βοήθεια αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, στην περίπτωση των ψυχανθών φυτών.

Κατά την συμβίωση του βακτηρίου με το φυτό, το ριζόβιο επάγει την δημιουργία στις ρίζες του φυτού ενός νέου οργάνου που καλείται φυμάτιο(nodule). Ο σχηματισμός αυτού είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο φυτό και στο βακτήριο, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν επαγωγή της έκφρασης γονιδίων και στις δύο πλευρές. Συγκεκριμένα, από την πλευρά του ριζοβίου εκφράζονται οι παράγοντες nod, οι οποίοι αποτελούν τα μοριακά σινιάλα για τη επικοινωνία βακτηρίου- φυτού. Επίσης, εκφράζονται τα γονίδια *nif* και *fix* τα οποία κωδικοποιούν για υπομονάδες της νιτρογενάσης.

Η νιτρογενάση αποτελεί ένα πολυλειτουργικό σύμπλοκο στο οποίο πραγματοποιείται η καθήλωση του ατμοσφαιρικού αζώτου σε αμμωνία. Η τελευταία διαχέεται με την μορφή αμμωνιακών ιόντων στα φυτικά κύτταρα, όπου ενσωματώνεται στο αμινοξύ γλουταμίνη.

Από την πλευρά του φυτού, κατά την διάρκεια αυτής της συμβιωτικής αλληλεπίδρασης επάγεται η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, γνωστά ως νοντουλίνες(nodulins genes). Οι νοντουλίνες διακρίνονται σε πρώιμες και όψιμες. Ως γονίδια πρώιμων νοντουλινών χαρακτηρίζονται εκείνα τα γονίδια του φυτού τα οποία εκφράζονται κατά την διάρκεια σχηματισμού του φυματίου. Έτσι, πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο είτε στην εισβολή του βακτηρίου στο φυτό είτε στην οργανογένεση του φυματίου. Η έκφραση των γονιδίων αυτών είτε επάγεται αποκλειστικά κατά την συμβίωση, είτε ενισχύεται σημαντικά από την παρουσία των ριζοβίων. Οι όψιμες

νοντουλίνες εκφράζονται λίγο πριν ή μετά την έναρξη της αζωτοδέσμευσης. Πρόκειται για ένζυμα που παίζουν ρόλο στην αφομοίωση της αμμωνίας, στον μεταβολισμό του άνθρακα, κ.α.

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι στην συμβίωση αυτή, τα βακτήρια παραμένουν εντός του φυματίου. Συγκεκριμένα, τα κυτταρικά οργανίδια συγκεντρώνονται στην περιφέρεια του κυττάρου, ενώ τον ενδιάμεσο χώρο καταλαμβάνουν τα ριζόβια στην συμβιωτική τους μορφή, που ονομάζονται βακτηριοειδή.

Τέλος, βάση πειραμάτων κλασσικής γενετικής, έχουνε βρεθεί εξής κατηγορίες μεταλλαγμάτων στον σχηματισμό των φυματίων:

- (α) μη-μόλυνση
- (β) μη αποτελεσματική μόλυνση, σχηματισμός παραμορφωμένων φυματίων
- (γ) μη αποτελεσματική μόλυνση, πρόωρη γήρανση φυματίων
- (δ) υπερμόλυνση
- (ε) εμφάνιση φυματίων απουσία ριζοβίου

## **8. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας**

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να διερευνηθεί ο φυσιολογικός ρόλος της συνθάσης της λουπεόλης σε ρίζες και φυμάτια του φυτού *Lotus japonicus*. Ο τρόπος με τον οποίο έγινε η προσέγγιση αυτού του θέματος στην παρούσα μελέτη είναι μέσω της αποσιώπησης της έκφρασης του γονιδίου αυτού, ενεργοποιώντας τον RNAi μηχανισμό έναντι αυτού. Με τον τρόπο αυτό, ο προκύπτων φαινότυπος από την αποσιώπηση ή την μείωση της έκφρασης του γονιδίου μπορεί να συσχετιστεί με την σημασία αυτού για το φυτό.

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

## 1. Μεθοδολογίες για τον χειρισμό πλασμιδίων

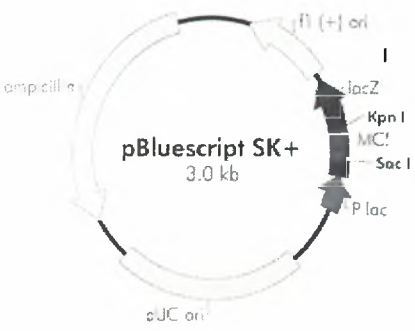
### α. Πλασμιδιακοί φορείς και τα χαρακτηριστικά αυτών

Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς με σκοπό:

(α) Να υποκλωνοποιηθούν τμήματα DNA έτσι ώστε να χειριστούν ευκολότερα και να αλληλουχηθούν (pGem, pBluescript)

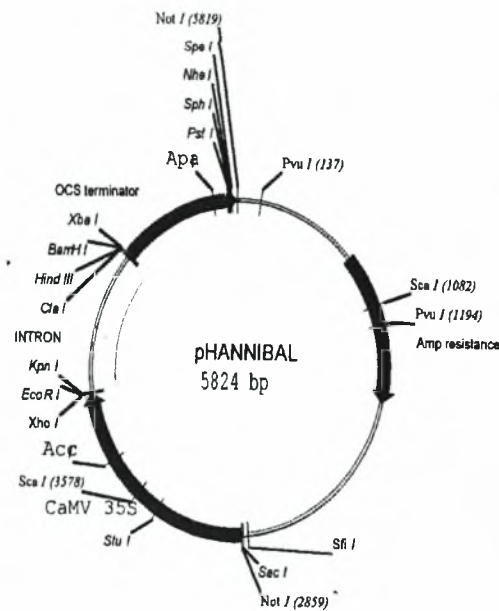
(β) Να δημιουργηθεί ο φορέας φουρκέτα για να χρησιμοποιηθεί για την αποσιώπηση του γονιδίου(pHannibal)

(γ) Να κλωνοποιηθεί η κατασκευή αποσιώπησης στον τελικό φορέα για την μεταφορά του στο φυτό μέσω του *Agrobacterium rhizogenes*(pCambia1300,pCambia1303)

Πλασμιδιακός φορέας	Κυριότερα χαρακτηριστικά
<p>pBluescript SK+</p> 	<p>Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση τμημάτων. Έχει μέγεθος 3,0kb και φέρει γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Δίνει την δυνατότητα κλωνοποίησης τμημάτων στην MCS(Multiple Cloning Site), η οποία βρίσκεται εντός του τμήματος α του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης. Το τελευταίο εκφράζεται κάτω από την επίδραση του προαγωγέα του ,Plac, και μπορεί να ανακτήσει την λειτουργικότητα της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από το γένωμα του <i>E.coli</i>. Συνεπώς, αν ενσωματωθεί αλληλουχία στο MCS, διακόπτεται το lacZ, με συνέπεια να μην μπορεί να μεταβολιστεί το χημικό ανάλογο της λακτόζης, X-Gal. Παρατηρούμε, έτσι, άσπρες αποικίες, σε αντίθεση με τις μπλε όπου το X-Gal μεταβολίζεται. Περιέχει, επιπλέον, αρχή έναρξης της αντιγραφής(pUC origin) για το <i>E.coli</i> για την διατήρηση του εντός των κυττάρων. Τέλος, διαθέτει εκατέρωθεν της MCS T3 &amp; T7 εκκινητές για την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης.</p>



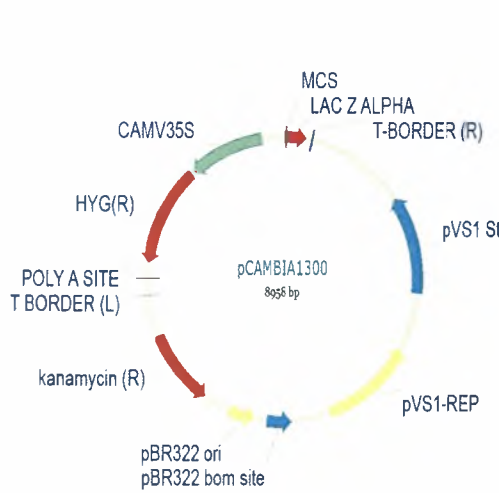
### pHannibal



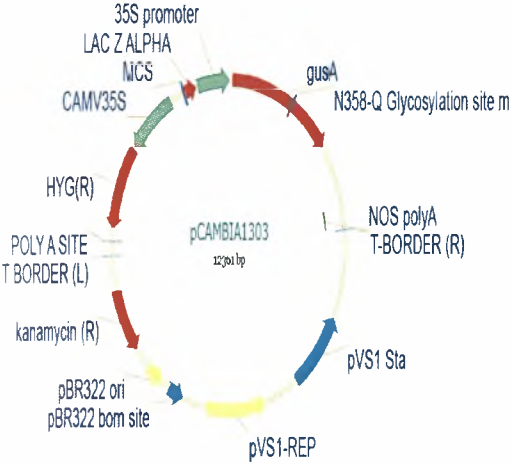
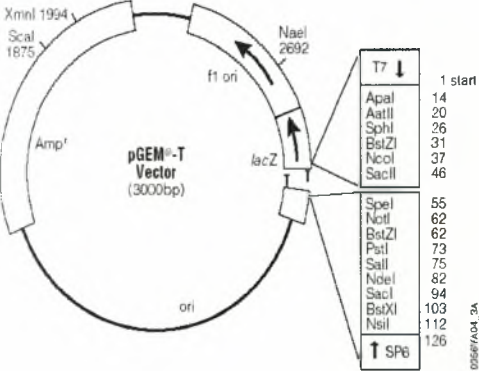
Αποτελεί έναν από τους κύριους φορείς που χρησιμοποιούνται για την γονιδιακή αποσιώπηση, καθώς δίνει την δυνατότητα δημιουργίας της φουρκέτας. Περιέχει ιντρόνιο από την κινάση της αποκαρβοξυλάσης του πυροσταφυλικού(Pdk), μεγέθους 880bp, εκατέρωθεν του οποίου υπάρχουν θέσεις περιορισμού που δίνουν την δυνατότητα ενσωμάτωσης της ίδιας αλληλουχίας δύο φορές με αντίθετη φορά. Προηγείται ο ισχυρός φυτικός προαγωγέας CaMV 35S (του ιού του μωσαικού του καπνού) και στο τέλος της δεύτερης θέσης κλωνοποίησης υπάρχει αλληλουχία για τον τερματισμό της μεταγραφής(OCS terminator). Επιπλέον, διαθέτει θέσεις περιορισμού δεξιά και αριστερά αυτής της κατασκευής, προκειμένου να μπορεί να αφαιρεθεί και να μπορεί να ενσωματωθεί σε τελικό φορέα. Προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και έχει μέγεθος 5.824bp.

(Kumagai et al,2003)

### pCambia 1300



Αποτελεί δυαδικό φορέα για την μεταφορά και ενσωμάτωση τμημάτων στο φυτικό γένωμα με την βοήθεια βακτηρίων του γένους *Agrobacterium*. Έχει μέγεθος 8.958 bp και προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη για την επιλογή τόσο στα *E.coli*, όσο και στα *Agrobacterium*. Περιέχει αρχές έναρξης της αντιγραφής για την διατήρηση και αντιγραφή του πλασμιδίου και στις δύο οικογένειες βακτηρίων. Επιπλέον, έχει δεξιά και αριστερό συνοριακό άκρο( RB & LB ), προκειμένου να γίνει η τομή και η ενσωμάτωση του ενδιάμεσου τμήματος από ένζυμα του *A.rhizogenes* στο φυτικό γένωμα. Στο ενδιάμεσο, λοιπόν, τμήμα υπάρχει γονίδιο που κωδικοποιεί για ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη, προκειμένου να γίνεται η επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών. Το γονίδιο της υγρομυκίνης βρίσκεται κάτω από την επίδραση του CaMV, ενώ στο τέλος υπάρχει σήμα για πολύ-αδενυλίωση, προκειμένου να εκφραστεί η πρωτεΐνη στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το MCS για την ένθεση της κατασκευής περιέχεται

	<p>εντός της α- υπομονάδας του γονιδίου lacZ, η χρησιμότητα του οποίου περιγράφηκε προηγουμένως. Αποτελεί έναν βελτιωμένο δυαδικό φορέα, καθώς έχει την θέση ένθεσης του goi κοντά στο 5'' άκρο(RB) και το γονίδιο επιλογής στο 3'' άκρο(LB). (Lee et all,2008)</p>
<p>pCambia 1303</p> 	<p>Αποτελεί και αυτός δυαδικό φορέα για την ενσωμάτωση τμήματος στο φυτικό γονιδίωμα με την βοήθεια των βακτηρίων του γένους <i>Agrobacterium</i>. Έχει μέγεθος 12.361bp και παρουσιάζει όλα τα χαρακτηριστικά που παρουσιάστηκαν για τον pCambia 1300. Επιπλέον, περιέχει το γονίδιο gusA για την παραγωγή της β-γλουκουρονιδάσης, η οποία μετατρέπει το χημικό ανάλογο X-Gluc από άχρωμο σε μπλε. Το γονίδιο αυτό βρίσκεται κάτω από την επίδραση του CaMV και περιέχει μετάλλαξη που απαιτεί να γλυκοζυλιωθεί το παραγόμενο ένζυμο, προκειμένου να δράσει. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται ότι η παρατηρούμενη έκφραση προέρχεται από το φυτό. (Lee et all,2008)</p>
<p>pGem</p> 	<p>Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση τμημάτων. Προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και έχει μέγεθος 3,0 kb Δίνει την δυνατότητα άμεσης κλωνοποίησης τμημάτων μέσω TA cloning, εντός lacZ γονιδίου. Περιέχει θέση έναρξης της αντιγραφής για το <i>E. coli</i>.</p>

Πίνακας 2.1: Σύνοψη των κυριότερων χαρακτηριστικών των φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

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

### Αρχή της μεθόδου:

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να εισαχθούν σε εργαστηριακά στελέχη τα επιθυμητά πλασμίδια, έτσι ώστε πολλαπλασιαζόμενα τα βακτηριακά κύτταρα να παράγουν σε μεγάλη ποσότητα και το πλασμίδιο μας. Στηρίζεται στην φυσική διεργασία του μετασχηματισμού που συμβαίνει στην φύση και σε αυτήν οφείλεται μεγάλο μέρος της ποικιλότητας των βακτηρίων. Μόνο συγκεκριμένα γένη βακτηρίων(π.χ.*Streptococcus*, *Haemophilus*) τα οποία εκφράζουν γονίδια ετοιμότητας είναι σε θέση να προσλάβουν εξωγενές, «γυμνό» DNA και να το εκφράζουν στην συνέχεια. Άλλα βακτήρια μπορούν να επαχθούν τεχνητά σε κατάσταση ετοιμότητας με την έκθεση τους σε υψηλές συγκεντρώσεις δισθενών κατιόντων.

### Πρωτόκολλο:

- 1) Ενοφθάλμιση σε 200 ml LB 2 ml καλλιέργειας βακτηρίων *E.coli DH5a*
  - 2) Ανάπτυξη της καλλιέργειας στους 37<sup>0</sup>C μέχρι OD600=0,2-0,3
  - 3) Στον πάγο και μετά φυγοκέντρηση στους 6.000 rpm για 10 min(4<sup>0</sup>C)
  - 4) Επαναδιάλυση του ιζήματος με 10 ml CaCl<sub>2</sub> 25 mM (στον πάγο)
  - 5) Φυγοκέντρηση για 10 min στους 6.000 rpm(+4<sup>0</sup> C) στον πάγο
  - 6) Επαναδιάλυση σε 5 ml CaCl<sub>2</sub> 75 mM (στον πάγο)
  - 7) Τοποθέτηση στον πάγο για 20 min
  - 8) Φυγοκέντρηση για 10 min στους 6.000 rpm(+4<sup>0</sup> C)
  - 9) Επαναδιάλυση με 9,6 ml CaCl<sub>2</sub> 0,1 M ,ανάδευση και μετά προσθήκη 2,4 ml γλυκερόλης
- Τα δεκτικά κύτταρα διατηρούνται για μελλοντική χρήση στους -80<sup>0</sup>C

## 1.γ. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* για εισαγωγή πλασμιδιακού DNA

### Αρχή της μεθόδου:

Τα δεκτικά κύτταρα που βρίσκονται σε υποτονικό διάλυμα  $\text{CaCl}_2$ , είναι σε μορφή σφαιροπλαστών, καθώς νερό διέρχεται από το εξωκυττάριο χώρο προς αυτά. Με την προσθήκη DNA, σχηματίζεται ένα σύμπλοκο φωσφορικού υδροξυλίου του ασβεστίου που είναι ανθεκτικό στην δράση DNAσών. Το σύμπλοκο αυτό προσκολλάται στην επιφάνεια των σφαιροπλαστών. Με σύντομη έκθεση των κυττάρων στους  $42^\circ\text{C}$ , τα βακτηριακά τοιχώματα γίνονται παροδικά διαπερατά και προσλαμβάνουν το σύμπλοκο. Μετά από επώαση των κυττάρων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα επανακάμπτουν και αναπτύσσουν την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό που τους προσδίδει το νεοεισαχθέν πλασμίδιο.

#### Υλικά:

- Διάλυμα 100 mM IPTG: 0,238g IPTG(isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) διαλύονται σε 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Το διάλυμα αποστειρώθηκε με φιλτράρισμα( $0,22\ \mu\text{m}$ , Whatman) και φυλάσσεται στους  $+4^\circ\text{C}$
- Διάλυμα 2% X-Gal: 0,02g X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosidase) προστέθηκαν σε 1 ml διμεθυλ-φορμαμίδιου. Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $-20^\circ\text{C}$

#### Πρωτόκολλο:

- 1) Ξεπάγωμα δεκτικών κυττάρων στον πάγο
- 2) Προσθήκη σε 60  $\mu\text{l}$  δεκτικών κυττάρων 2  $\mu\text{l}$  πλασμιδίου. Τοποθέτηση στον πάγο για 30 min
- 3) Θέρμανση στους  $42^\circ\text{C}$  για 50sec . Τοποθέτηση στον πάγο για 2 min.
- 4) Στον πάγο τα επηρεάζονται και προσθήκη 200  $\mu\text{l}$  LB.
- 5) Επώαση στους  $37^\circ\text{C}$  για 1 h.
- 6) Στρώσιμο 50  $\mu\text{l}$  X-Gal, 10  $\mu\text{l}$  IPTG σε τρυβλίο LB με ανάλογο αντιβιοτικό(που έχει ένα τέταρτο ζεσταθεί στη θερμοκρασία δωματίου)  
(Το βήμα αυτό εφαρμόζεται μόνο για φορείς που περιέχουν το MCS εντός lacZ γονιδίου).
- 7) Στρώσιμο των κυττάρων στο τρυβλίο
- 8) Ανάπτυξη των βακτηρίων στους  $37^\circ\text{C}$  overnight.

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

#### Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιούνταν κατά κόρον από τους ερευνητές πριν την αυτοματοποιημένη απομόνωση πλασμιδίου από βακτήρια με kit. Οδηγεί στην απομόνωση του πλασμιδίου που όμως περιέχει και ποσότητα RNA, καθώς διέρχεται και αυτό από τους πόρους που δημιουργεί η λυσοζύμη στο βακτηριακό τοίχωμα. Για τον λόγο αυτό απαιτείται η κατεργασία του απομονωμένου πλασμιδίου με Rnase. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση πλασμιδίου από μεγάλο αριθμών διαφορετικών κλώνων από τον μετασχηματισμό, έτσι ώστε μετά από πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού να βρεθεί ο επιθυμητός κλώνος. Στηρίζεται στην ικανότητα της λυσοζύμης να διασπά τον β-1,4 γλυκοσιδικό δεσμό του βακτηριακού τοιχώματος και να δημιουργεί μικρούς πόρους από τους οποίους διέρχεται το πλασμίδιο όχι όμως το χρωμοσωμικό DNA.

#### Υλικά:

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

8% sucrose

0,5% Triton X-100

50 mM EDTA

10 mM Tris

lysozyme 50 mg/ml

Χρήση βακτηριακής καλλιέργειας (η οποία έχει προκύψει από εμβολιασμό σε 5ml LB μίας μοναδικής αποικίας από τον μετασχηματισμό, προσθήκη ανάλογης ποσότητας κατάλληλου αντιβιοτικού και ανάπτυξη στους 37<sup>0</sup>C στους 200rpm overnight)

#### Πρωτόκολλο:

- 1) Φυγοκέντρηση 2 ml της υγρής καλλιέργειας στα 6.000 rpm για 4 min
- 2) Απόρριψη υπερκευμένου
- 3) Προσθήκη 150 μl STET Buffer

- 4) Προσθήκη 1 μl λυσοζύμη
- 5) Ανακίνηση με σύρσιμο στο στατώ
- 6) Τοποθέτηση των δειγμάτων για 1 min σε νερό που βράζει (για αδρανοποίηση της λυσοζύμης, προκειμένου να μην δράσει περαιτέρω)
- 7) Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 20 min
- 8) Απομάκρυνση του ιζήματος με οδοντογλυφίδα
- 9) Προσθήκη 180 μl ισοπροπανόλης(καθιζάνει το πλασμίδιο, ως αδιάλυτο)
- 10) Ανακίνηση με αναποδογύρισμα των erpendorffs
- 11) Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 7 min
- 12) Απόρριψη υπερκειμένου
- 13) Προσθήκη 300 μl EtOH 70%
- 14) Ανακίνηση με σύρσιμο στο στατώ
- 15) Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 5 min
- 16) Απόρριψη υπερκειμένου
- 17) Τα erperdorffs αφήνονται ανοιχτά για 15 min προκειμένου να εξατμιστούν τα τελευταία ίχνη αιθανόλης
- 18) Επαναδιάλυση σε 20 μl ddH<sub>2</sub>O
- 19) Αποθήκευση του DNA στους -20<sup>0</sup> C

#### **1.ε. Απομόνωση πλασμιδίου από υγρή καλλιέργεια *E.coli* με χρήση kit (Nucleo spin plasmid, Macherey Nagel)**

##### Αρχή της μεθόδου:

Με την χρήση αυτού του kit πετυχαίνεται απομόνωση του πλασμιδίου με μεγάλη καθαρότητα, απαλλαγμένο από RNA και πρωτεΐνες. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του επιθυμητού πλασμιδίου από κλώνο που είχε ελεγχθεί ότι είναι ο κατάλληλος με την μέθοδο του βρασμού και διαγνωστική πέψη. Το kit αυτό στηρίζεται στην *αλκαλική μέθοδο*, όπου παρουσία NaOH και SDS πραγματοποιείται αποδιάταξη του χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών που το συνοδεύουν και όταν γίνει εξουδετέρωση με οξικό κάλιο δημιουργείται αδιάλυτο ίζημα. Η πλειονότητα του πλασμιδιακού DNA και του βακτηριακού RNA παραμένει διαλυτή. Με καθίζηση του DNA σε αιθανόλη και επαναδιάλυση σε υδατικό διάλυμα παραλαμβάνεται DNA με αυξημένη καθαρότητα.

Υλικά του kit:

A1 Buffer: περιέχει Rnase (διατήρηση στους +4<sup>0</sup>C)

A2 Buffer: περιέχει NaOH και SDS

A3 Buffer: περιέχει οξικό κάλιο, υδροχλωρική γουανιδίνη (χαοτροπικός παράγοντας)

AW Buffer: περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη

A4 Buffer: είναι αλκοολικό διάλυμα

AE Buffer: 5 mM Tris/Hcl, pH 8.5

Πρωτόκολλο:

1) Φυγοκέντρηση 3 ml βακτηριακής υγρής καλλιέργειας στους 13.000 rpm για 30 sec. Απόρριψη υπερκειμένου.

2) Λύση κυττάρων

-Προσθήκη 250 μl Buffer A<sub>1</sub>, μηχανική ανάδευση έτσι ώστε να μην υπάρχουν συσσωματώματα

-Προσθήκη 250 μl Buffer A<sub>2</sub>, αναμονή για 5 min

-Προσθήκη 300 μl Buffer A<sub>3</sub>. Ανάδευση inverted 6-8 φορές

3) Φυγοκέντρηση στους 13.000 rpm για 10 min

4)Πρόσδεση του DNA.

Τοποθέτηση υπερκειμένου σε στήλη (Nucleo spin plasmid). Φυγοκέντρηση στους 13.000 rpm για 1 min

5) Προσθήκη 500 μl AW( που είχε προθερμανθεί στους 50<sup>0</sup> C). Φυγοκέντρηση για 1 min στους 13.000 rpm

6) Προσθήκη 600 μl A<sub>4</sub>. Φυγοκέντρηση για 1 min στους 13.000 rpm

7) Απόρριψη του υγρού. Φυγοκέντρηση για 2 min στους 13.000 rpm

8) Προσθήκη 50 μl Buffer AE. Αναμονή για 1 min. Φυγοκέντρηση για 1 min στους 13.000 rpm

## 1.στ. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *A.rhizogenes* ικανών για μετασχηματισμό με πλασμιδιακό DNA (competent cells)

### Αρχή της μεθόδου:

Ο στόχος μας ήταν η παρασκευή δεκτικών κυττάρων *A.rhizogenes* στα οποία να μπορούμε εισάγουμε τον φορέα που φέρει την κατασκευή μας. Τα βακτήρια του γένους *Agrobacterium* είναι και αυτά Gram(-) βακτήρια όπως τα *E.coli*. Συνεπώς η δημιουργία δεκτικών *Agrobacterium* διέπεται από τις ίδιες αρχές με αυτές του *E.coli*. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η «freeze-thaw» μέθοδος.

### Πρωτόκολλο:

1. *Agrobacterium rhizogenes* στέλεχος *LBA 1334* καλλιεργείται σε 5 ml YEB μέσο που περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά overnight στους 28<sup>0</sup>C με ανάδευση.
2. 2 ml της προηγούμενης καλλιέργειας προστίθενται σε 50 ml θρεπτικού YEB και αναπτύσσονται στους 28<sup>0</sup>C με ανάδευση μέχρι να φτάσουν οπτική πυκνότητα OD<sub>600</sub>=0,5-1,0
3. Οι χειρισμοί από εδώ και πέρα γίνονται στον πάγο. Φυγοκέντρηση στα 3.000g για 5 min στους 4<sup>0</sup>C.
4. Απόρριψη υπερκειμένου και επαδιάλυση ου ιζήματος σε 1 ml CaCl<sub>2</sub> 20 mM.

Το διάλυμα μοιράστηκε σε aliquots των 0,1 ml σε epperdoffs που είχαν προψυχθεί. Τα δεκτικά κύτταρα *A.rhizogenes* διατηρούνται στους -80<sup>0</sup>C για μελλοντική χρήση.

### Σημείωση:

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



## **1.ζ. Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *A.rhizogenes* για εισαγωγή πλασμιδιακού DNA**

Πρωτόκολλο:

1. Προσθήκη στα δεκτικά κύτταρα *A.rhizogenes* ανάλογης ποσότητας πλασμιδίου έτσι ώστε να προστεθεί 1 μg ( οι χειρισμοί γίνονται στον πάγο)
2. Επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 5 min (σε υγρό μπάνιο)
3. Προσθήκη 1 ml YEB σε κάθε erperdorff και ακολουθεί ανάπτυξη για 4h στους 28<sup>0</sup> C με ήπια ανάδευση. Στο στάδιο αυτό τα βακτήρια εκφράζουν την αντίσταση στα αντιβιοτικά.
4. Φυγοκέντρηση των erperdorffs στους 13.000 rpm για 30 sec. Απόρριψη του υπερκειμένου. Προσθήκη 100 μl YEB μέσο.
5. Στρώσιμο των κυττάρων σε YEP μέσο που περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά Επώαση στους 28<sup>0</sup> C για 2-3 days

Σημείωση: Από την πρώτη κιόλας ημέρα επώασης οι αποικίες αρχίζουν να εμφανίζονται

## **1.η. Διατήρηση κλώνων που φέρουν τα επιθυμητά πλασμίδια**

### **α) Μέθοδος των παραλλήλων γραμμών(stricking)**

Πυρακτωμένος βιολογικός κρίκος εμβαπτίζεται σε υγρή καλλιέργεια και ακολουθούν διαδοχικά περάσματα σε τρυβλίο με κατάλληλα αντιβιοτικά και πυρακτώσεις, έτσι ώστε να καταλήξουμε σε μοναδιαίες αποικίες. Τα τρυβλία μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων, διατηρούνται στους 4<sup>0</sup>C για χρονικό διάστημα 15-20 ημερών μετά το οποίο οι καλλιέργειες πρέπει να ανανεώνονται.

### **(β) Δημιουργία stock γλυκερόλης**

Η γλυκερόλη έχει την ιδιότητα να μπορεί να βοηθά τα κύτταρα να διατηρήσουν την ακεραιότητα των μεμβρανών τους κάτω από συνθήκες εξαιρετικά χαμηλής θερμοκρασίας. Σε 900 μl βακτηριακής «φρέσκιας» καλλιέργειας προστίθενται 180 μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 100%. Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση και τα stock

γλυκερόλης διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για διάστημα 6 μηνών, μετά το οποίο πρέπει να ανανεώνονται.

## 2. Αντιβιοτικά

Αντιβιοτικό	Stock διαλύματα			Συγκέντρωση στο θρεπτικό υλικό**
	Συγκέντρωση*	διαλύτης	Θερμοκρασία φύλαξης	
Αμπικιλίνη(Amp)	100mg/ml	ddH <sub>2</sub> O	$-20^{\circ}\text{C}$	100μg/ml
Καναμυκίνη(Kan)	50mg/ml	ddH <sub>2</sub> O	$-20^{\circ}\text{C}$	50μg/ml
Ριφαμικίνη(Rif)	25mg/ml	μεθανόλη	$-20^{\circ}\text{C}$	50μg/ml
Σπεκτινομυκίνη(Spe)	50mg/ml	ddH <sub>2</sub> O	$-20^{\circ}\text{C}$	250μg/ml
Σεφοταξάμη(Cef)	200mg/ml	ddH <sub>2</sub> O	$-20^{\circ}\text{C}$	200μg/ml

Πίνακας 2.2 : Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για την επιλογή πλασμιδίων με βάση την ανθεκτικότητα σε αυτά

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

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

\*\*\* Τα διαλύματα των αντιβιοτικών αποστειρώθηκαν με φιλτράρισμα από φίλτρο 0,22 μm (Whatman).

## 3.Βακτηριακά Στελέχη & Θρεπτικά Υλικά

Ονομασία στελέχους	Χαρακτηριστικά	Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης θερμοκρασία
DH5a	Στέλεχος <i>E.coli</i> που χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό με πλασμίδια κατά την διαδικασία	LB $37^{\circ}\text{C}$

	κατασκευής τους. Έχει υποστεί ένα έλλειμμα στο οπερόνιο lac	
<i>LBA 1334</i>	Στέλεχος <i>A.rhizogenes</i> το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά και ενσωμάτωση της κατασκευής στο φυτικό γένωμα με συνέπεια την παραγωγή μετασχηματισμένων hairy roots. Έχει ενδογενή ανθεκτικότητα στην ριφαμπικίνη(χρωμοσωμικός τύπος) και στην σπεκτινομυκίνη, εξαιτίας του Ri πλασμιδίου της αγροπίνης, το οποίο έχει διατηρημένα τα <i>vir</i> και τα <i>rol</i> γονίδια αλλά απενεργοποιημένα τα γονίδια παραγωγής οπινών.	YEB/YEP 28 <sup>0</sup> C
<i>RfA</i>	Στέλεχος <i>Mesorhizobium loti</i> της οικογένειας <i>Rhizobiaceae</i> . Χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή φυματίων στις μετασχηματισμένες ρίζες του <i>Lotus japonicus</i>	YMB/TYR 30 <sup>0</sup> C

Πίνακας 2.3: Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και περιγραφή των κυριότερων χαρακτηριστικών τους

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

Mannitol Broth)	0,05%(w/v) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,02%(w/v) MgSO <sub>4</sub> 0,01%(w/v) NaCl 0,05%(w/v) yeast extract
-----------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Πίνακας 2.4: Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης και συντήρησης βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

#### 4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

##### 4.α. Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με το πρωτόκολλο της φαινόλης-χλωροφορμίου

###### Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή έχει ως στόχο να παραληφθεί καθαρό DNA σε υδατικό διάλυμα. Στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA λόγω της χημικής του δομής (σακχαροφωσφορικός σκελετός) είναι διαλυτό στο νερό και αδιάλυτο σε οργανικούς διαλύτες. Συνεπώς, παρουσία φαινόλης, χλωροφορμίου, αιθανόλης οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται και μετά από φυγοκέντρηση, πραγματοποιείται διαχωρισμό των δύο φάσεων (υδατικής & οργανικής) και παραλαβή του DNA από την υδατική φάση (εκχύλιση DNA). Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των φορέων και των ενθεμάτων μετά από πέψη, από τα περιοριστικά ένζυμα και τα ρυθμιστικά διαλύματα τους, προκειμένου να προχωρήσουμε σε αντίδραση σύνδεσης (ligation) ή σε επόμενη πέψη.

###### Πρωτόκολλο:

Στο DNA προς καθαρισμό προστίθεται τριπλάσια ποσότητα ddH<sub>2</sub>O(υδατική φάση). Σε αυτό προστίθεται ίση ποσότητα φαινόλης(PH=8,0) με την υδατική. Ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5 min στους 13.000 rpm.

Από τις 2 φάσεις που προκύπτουν γίνεται μεταφορά της πάνω φάση σε νέο epperdoff. Η πάνω φάση είναι η υδατική και περιέχει το DNA. Σε αυτό γίνεται προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης-χλωροφορμίου. Ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5min στους 13.000 rpm

Από τις 2 φάσεις που προκύπτουν γίνεται μεταφορά της πάνω φάση σε νεο epperdoff. Σε αυτό γίνεται προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου. Ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5min στους 13.000 rpm

Από τις 2 φάσεις που προκύπτουν γίνεται μεταφορά της πάνω φάση σε νεο epperdoff και ακολουθεί προσθήκη αιθανόλης 100%. Ακολουθεί προσθήκη 1/20 όγκου οξικού νατρίου 3 M (PH=5,2). Ανάδευση με αναποδογύρισμα των epperdoff. Τα epperdoff τοποθετούνται είτε στους  $-20^{\circ}$  C overnight είτε στους  $-80$  για 45 min

Φυγοκέντρηση στους  $4^{\circ}$  C για 20 min στα 13.000 rpm

Απομάκρυνση του υπερκειμένου προσεκτικά με πιπέτα ώστε να μείνει το ίζημα

Γρήγορη φυγοκέντρηση για να απομακρυνθούν τα τελευταία ίχνη αιθανόλης(προαιρετικό)

Προσθήκη 70% αιθανόλης. Ο χειρισμός αυτός γίνεται στον πάγο. Ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 20 min στους 13.000 rpm στους  $4^{\circ}$  C

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

Τα epperdoff μένουν ανοιχτά για 5-10 min στο περιβάλλον για να εξατμιστεί και η τελευταία ποσότητα αιθανόλης.

Επαναδιάλυση του ιζήματος σε ανάλογη ποσότητα ddH<sub>2</sub>O.

#### **4.β. Πέψη τμημάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού**

Στην παρούσα εργασία, οι πέψεις με ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιήθηκαν:

(α) για την δημιουργία συνεκτικών άκρων μεταξύ ενθέματος και φορέα,

(β) για διαγνωστικό σκοπό, προκειμένου να βρεθεί ο επιθυμητός κλώνος. Στην τελευταία περίπτωση, πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες πέψεις από πλασμίδιο που απομονώθηκε με την μέθοδο του βρασμού.

(α) Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε μεγάλη ποσότητα DNA(3-8 μl), σε μεγάλο τελικό όγκο αντίδρασης(60μl), 2 μl περιοριστικού ενζύμου και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για το κάθε ένζυμο.

Δείγμα DNA	3-8μl
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 10X	6 μl
Περιοριστικό ένζυμο	2 μl
BSA 100x*	0,6 μl
ddH <sub>2</sub> O	(48,6-43,4 μl)

Πίνακας 2. 5: Ενδεικτική αντίδραση πέψης

\*Το BSA προστέθηκε όταν ότι το ένζυμο περιορισμού που χρησιμοποιήθηκε απαιτούσε την παρουσία του για να αποκτήσει 100% δραστηριότητα

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

Μετά από πολύ καλή ανάδευση, οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν στους 37<sup>0</sup>C για 4 ώρες.

(β) Στην δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα DNA (3μl) , σε μικρό τελικό όγκο αντίδρασης(30μl), 0,5-1 μl περιοριστικού ενζύμου και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για το αντίστοιχο ένζυμο. Η αντίδραση πέψης αφέθηκε να γίνει για 2-3 ώρες στους 37<sup>0</sup>C. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστέθηκε 0,5 μl Rnase για να διασπαστεί το υπάρχον RNA.

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

Πίνακας 3. 6: Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και αλληλουχίες που αναγνωρίζουν. Με τις καθέτους φαίνεται η θέση περιορισμού.

#### 4.γ.. Ανάλυση τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης

##### Αρχή της μεθόδου:

Η ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης, δίνει την δυνατότητα να διαχωριστούν βάσει του μεγέθους τους, με τα μικρότερα σε μέγεθος τμήματα να ταξιδεύουν πιο χαμηλά. Στην περίπτωση που τα τμήματα είναι γραμμικά, η κινητικότητα τους είναι ευθέως ανάλογη του μεγέθους τους. Δεν ισχύει, όμως, το ίδιο για κυκλικά μόρια. Γενικότερα, όσο πιο μεγάλα τμήματα θέλουμε να διαχωριστούν τόσο πιο αραιή πρέπει να είναι η πηκτή και το αντίστροφο. Το DNA γίνεται ορατό με την βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και το σύμπλοκο που δημιουργείται φθορίζει στο υπεριώδες.

##### Υλικά:

- 50X TAE: 24,2%(w/v) Tris, 57,1 ml/lit οξικό οξύ, 100 ml/lit 0.5 M EDTA.
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου: Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάστηκε ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH<sub>2</sub>O και φυλάσσεται στους 4<sup>0</sup> C
- Διάλυμα 10X Loading Buffer: 0,25% Μπλέ της βρωμοφαινόλης 0,25 % κυανό του ξυλενίου και 35% γλυκερόλη.

- 1) Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστέθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το σημείο βρασμού.
- 2) Στην συνέχεια στην λιωμένη αγαρόζη αφού αφέθηκε να κρυώσει περίπου στους 50<sup>0</sup> C, προστέθηκε 0,007% v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου.
- 3) Η πηκτή τοποθετήθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στην πηκτή βυθίζεται ειδική «χτένα» που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων.
- 4) Στα δείγματα DNA που πρόκειται να αναλυθούν, προστέθηκε 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής 10X LB
- 5) Μόλις στερεοποιήθηκε η πηκτή, απομακρύνθηκε η «χτένα» και τοποθετήθηκε στο δοχείο ηλεκτροφόρησης το οποίο συμπληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE.
- 6) Τα δείγματα αναλύθηκαν σε ηλεκτρικό πεδίο τάσεως μέχρι 100 V

#### **4. δ. Επανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης**

##### Αρχή της μεθόδου:

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

Από την πηκτή της αγαρόζης αφαιρέθηκε με νυστέρι το τμήμα της αγαρόζης που περιείχε το επιθυμητό DNA.

Το κομμάτι της αγαρόζης ζυγίστηκε σε ένα σωλήνα eppendorf και προστέθηκε ο τριπλάσιος όγκος διαλύματος αποδιάταξης της αγαρόζης(QG Buffer)

Το μίγμα επώαστηκε στους 50<sup>0</sup>C για 10 min, ενώ ανακινήθηκε κατά τακτά χρονικά διαστήματα σε μηχανικό αναδευτήρα. (μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη)

Προσθήκη ισοπροπανόλης (1:1) ( vortex)

Χρήση στήλης και προσθήκη σε αυτή του διαλύματος (μέγιστος όγκος για στήλη :800μl). Φυγοκέντρωση στα 13.000rpm για 1 min.

Το υγρό που διήλθε από την στήλη απορρίφθηκε και προστέθηκε στην τελευταία 0,5 ml Buffer QC και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 1 min

Προσθήκη 0,75 ml Buffer PE(που περιείχε αιθανόλη, προκειμένου το DNA να παραμείνει στην στήλη), αναμονή 2-5 min και φυγοκέντρωση για 1 min

Απόρριψη του υγρού και φυγοκεντρείται για 1 min άδειο, προκειμένου να αφαιρεθούν όλα τα υπολείμματα αιθανόλης

Τοποθέτηση της στήλης σε ένα καθαρό eppendorf του 1,5 ml

Για παραλαβή του DNA γίνεται προσθήκη 30μl elution buffer στο κέντρο της στήλης. Αναμονή για 1 min και φυγοκέντρωση για 1 min.

#### **4.ε. Ενίσχυση ακολουθιών DNA με την χρήση της PCR**

##### Αρχή της μεθόδου:

Στην παρούσα μελέτη η τεχνική της PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμημάτων DNA από cDNA ,καθώς και ακολουθιών εντός πλασμιδίων.



Η ποσότητα του DNA που προστέθηκε ως μήτρα για την αντίδραση εξαρτήθηκε από το είδος αυτού. Στην περίπτωση του cDNA, χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ίση με 20ng (1-2  $\mu$ l), ενώ του πλασμιδιακού αρκούν 10-100ng(1  $\mu$ l από 1/100 αραιώση πλασμιδίου από Mini prep). Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτήθηκε κάθε φορά από την θερμοκρασία τήξεώς τους. Γενικότερα, όσο πιο υψηλή είναι η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών, τόσο πιο αυστηρές είναι οι συνθήκες της αντίδρασης, δηλαδή τόσο πιο ειδικά προϊόντα παίρνουμε.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Μήτρα DNA	1-2 $\mu$ l
Primer F 10 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l
Primer R 10 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l
5X Ρυθμιστικό διάλυμα*	10 $\mu$ l
Μίγμα dNTPs( 10mM το καθένα)	1 $\mu$ l
Taq DNA πολυμεράση(1U/ $\mu$ l)	0,5-1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	<u>Μέχρι τα 50 <math>\mu</math>l</u>
Τελικός όγκος	50 $\mu$ l

Πίνακας 2.7: Τυπική αντίδραση PCR

\* Εάν το ρυθμιστικό διάλυμα δεν περιέχει MgCl<sub>2</sub>, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα, καθώς η DNA πολυμεράση απαιτεί την παρουσία δισθενών κατιόντων για να δράσει

Διαδικασία	θερμοκρασία	χρόνος
Έναρξη αντίδρασης	94 <sup>0</sup> C	3min
Αποδιάταξη ddDNA	94 <sup>0</sup> C	1min
Υβριδισμός εκκινητών	55-60 <sup>0</sup> C	1min
Επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C	1min
Τελική επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C	10min

Επανάληψη για 25-35 κύκλους

Πίνακας 2.8: Τυπικές συνθήκες αντίδρασης PCR

Σύμβολο εκκινητή	Νουκλεοτιδική αλληλουχία εκκινητή	Μήτρα DNA
OSC3(3) REVERSE	5'-AGGTACCAAGCTTAGAACTCTGGTGGAA	cDNA ρίζας

	GGG-3'	
OSC3(3), FORWARD	5'- GACTCGAGTCTAGATAGGACCTCAACACAA GAAG-3'	cDNA ρίζας
OSC3(4), REVERSE	5'-TAAATTCCAAGCTTACGCATAAGTGACAAC AAAGC-3'	cDNA ρίζας
OSC3(4), FORWARD	5'-GCCTCGAGGGATCCCGAAGCATAGGCGA AAGG-3'	cDNA ρίζας
pHanA	5'-TTAGTCGAACATGAATAACAAGG-3'	Φορέας pHannibal
pHanS	5'-TCAAACCAGCTAGAATTACTATTATG-3'	Φορέας pHannibal

Πίνακας 2.9: Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία με τα σύμβολα τους

#### 4.στ. PCR Colony

##### Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή αποτελεί παραλλαγή της PCR, όπου ως μήτρα για την αντίδραση προστίθεται αποικία βακτηριακών κυττάρων E.coli. Στηρίζεται στη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος PCR Colony το οποίο περιέχει KCl και Triton, προκειμένου στις συνθήκες αυτές (αυξημένη συγκέντρωση ιόντων και απορρυπαντικό) σε συνδυασμό με το πρώτο βήμα της αντίδρασης όπου εφαρμόζεται αυξημένη θερμοκρασία, να πραγματοποιηθεί λύση των βακτηριακών κυττάρων. Παράλληλα, το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα διατηρεί ευνοϊκές συνθήκες για της δράση της DNA πολυμεράσης. Στην παρούσα μελέτη, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε διαγνωστικά, ώστε να βρεθούν οι αποικίες που περιείχαν το επιθυμητό πλασμίδιο.

##### Υλικά:

##### **10X Buffer PCR Colony:**

500mM KCl

100mM Tris-HCl (pH=9,0)

1,0% Triton X 100

Στο μίγμα της PCR ,που παρατίθεται παρακάτω, προστίθεται μικρή ποσότητα κυττάρων και ακολουθεί μηχανική ανάδευση για να ξεκινήσει η ρήξη των μεμβρανών. Το υπόλοιπο της αποικίας μεταφέρεται σε υγρό θρεπτικό υλικό, προκειμένου να μην χαθεί ο κλώνος.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητα</b>
Primer F 10μM	0,4 μl
Primer R 10μM	0,4 μl
10X Ρυθμιστικό διάλυμα	1 μl
Μίγμα dNTPs( 10mM το καθένα)	0,2μl
Taq DNA πολυμεράση(1U/ μl)	0,2 μl
MgCl <sub>2</sub>	0,6 μl
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>7,2 μl</u>
Τελικός όγκος	10 μl

Πίνακας 2. 10: Αντίδραση PCR Colony

Διαδικασία	θερμοκρασία	χρόνος
Ρήξη των μεμβρανών	95 <sup>0</sup> C	5min
Αποδιάταξη ddDNA	95 <sup>0</sup> C	1min
Υβριδισμός εκκινητών	55-60 <sup>0</sup> C	1,5min
Επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C	1min
Τελική επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C	5min

Επανάληψη για 30-40 κύκλους

Πίνακας 2. 11: Συνθήκες αντίδρασης PCR Colony

#### 4.ζ. Αντίδραση σύνδεσης-Λιγοποίηση (Ligation)

Αρχή της μεθόδου:

Στηρίζεται στην ικανότητα της λιγάσης να καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού, με κατανάλωση ενέργειας. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η T4-λιγάση(Promega) που έχει απομονωθεί από ανασυδρασμένο *E.coli* και βέλτιστη θερμοκρασία τους 4<sup>0</sup>C. Η αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των κατασκευών μας στα επιθυμητά πλασμίδια, μέσω της σύνδεσης πλασμιδίου και ενθέματος που είχαν συνεκτικά άκρα.

#### Υλικά:

#### **2X Ligation Buffer (Promega, pGem kit)**

#### Πρωτόκολλο:

Για να υπολογιστεί η ποσότητα του ενθέματος που προστέθηκε για να γίνει η εισχώρηση ενός ενθέματος στο πλασμίδιο, χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος, έχοντας πάντα ως γνώμονα ότι η βέλτιστη αναλογία ενθέματος / φορέα είναι 3/1

<b>ng of insert</b>	$\frac{\text{ng of vector} \cdot \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times 1/3$
---------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητα*</b>
2X Ligation Buffer	5 μl
T4-λιγάση	1 μl
Ένθεμα	3,5 μl
<u>Φορέας</u>	<u>0.4</u>
Τελικός Όγκος	10 μl

Πίνακας 2.12: Ενδεικτική αντίδρασης λιγοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία

\* Είναι φανερό ότι ανάλογα με το πόσο αραιό ή πυκνό ήταν το ένθεμα και ο φορέας κάθε φορά, προσαρμόστηκε η ποσότητα που προστέθηκε στην αντίδραση, διατηρώντας όμως πάντα την αναλογία 3/1

#### **4.η. Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικά κύτταρα**

##### Αρχή Μεθόδου

Η απομόνωση γενωμικού DNA με το πρωτόκολλο που παρατίθεται παρακάτω στηρίζεται στο σπάσιμο των συνδέσεων των ιστών και των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων με λειοτριβήση ιστών, που βρίσκονται υπό μορφή κρυστάλλων. Η χρήση του διαλύματος CTAB και της μερκαπτοαιθανόλης βοηθούν στην περαιτέρω διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με συνέπεια την απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου. Στην συνέχεια ακολουθεί καθαρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση γενωμικού DNA από τμήματα μετασχηματισμένων με την κασέτα αποσιώπησης ριζών.

##### Υλικά

###### **CTAB**

50 mM Tris (pH=8,0)

50 mM Tris (pH=6,0)

6,4 LiCl

1% CTAB(Cetyltimethyl ammonium bromide)

0,5% Tween 20

1,1 M NaCl

##### Πρωτόκολλο

- 1) Τοποθέτηση των eppendorffs με τους ιστούς σε στατώ με υγρό άζωτο. Ακολουθεί λειοτριβήση του κάθε ιστού μέχρι ο ιστός να γίνει σκόνη. Σημαντικό στοιχείο της διαδικασίας είναι οι ιστοί να μην ξεπαγώσουν έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η λειοτριβήση τους.
- 2) Προσθήκη σε κάθε δείγμα 100 μl προθερμασμένου στους 65<sup>0</sup> C CTAB στο οποίο έγινε προσθήκη μερκαπτοαιθανόλης 1% v/v.
- 3) Τα δείγματα επιάζονται για 15 min στους 65<sup>0</sup> C.
- 4) Προσθήκη 150 μl χλωροφορμίου + 1/25 όγκου χλωροφορμίου ισομυλίκη αλκοόλη . Ακολουθεί καλή ανάδευση.

- 5) Φυγοκέντρηση για 5 min στα 13.000 rpm
- 6) Μεταφορά της πάνω φάσης σε νέο erpendorff και προσθήκη 0,8 του όγκου της υδατικής φάσης(της πάνω φάσης) ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ανάδευση με αναστροφή των erpendorff.
- 7) Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min
- 8) Φυγοκέντρηση για 15 min στα 13.000 rpm. Το ίζημα στο οποίο βρίσκεται το γενωμικό DNA είναι ορατό. Απόρριψη υπερκειμένου.
- 9) Προσθήκη 500 μl 70% Et-OH κρύας. Από εδώ και κάτω οι χειρισμοί γίνονται στον πάγκο προκειμένου να μην επαναδιαλύεται το ίζημα.
- 10) Φυγοκέντρηση για 5 min στα 13.000 rpm. Απόρριψη υπερκειμένου.
- 11) Φυγοκέντρηση για άλλα 5 min στα 13.000 rpm ώστε να απομακρυνθεί και η τελευταία ποσότητα αιθανόλης.
- 12) Αφού απομακρυνθούν με εξάτμιση και τα τελευταία ίχνη αιθανόλης , το DNA επαναδιαλύεται σε 20 μl ddH<sub>2</sub>O.

### **5. Απολύμανση σπόρων *Lotus japonicus***

#### Υλικά:

Buffer I: 4 ml υποχλωριώδες οξύ, 6ml dH<sub>2</sub>O, 2 ml Tween 20

- 1) Προσθήκη σε 0,1g σπόρων(50 σπόροι) σε erperdoff 500μl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Μηχανική ανάδευση για να διαχυθεί παντού το H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Αναμονή για 5 min
- 2) Αφαίρεση H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και στην συνέχεια γίνονται ξεπλύματα με αποστειρωμένο νερό.
- 3) Προσθήκη 500 μl Buffer1,μηχανική ανάδευση. Αναμονή για 20 min
- 4) Αφαίρεση Buffer1 , και στην συνέχεια γίνονται ξεπλύματα με αποστειρωμένο νερό.
- 5) Το τελευταίο H<sub>2</sub>O αφέθηκε για 10 min για να ενυδατωθούν οι σπόροι.

## 6. Θρεπτικά Υποστρώματα για την ανάπτυξη των φυτών

### α. NLN μέσο

Χρησιμοποιήθηκε προ-παρασκευασμένο μίγμα NLN Vitamin Mixture(Duchefa Biochemie), προσθέτιντας 1038,55 mg/l. Στον παρακάτω πίνακα, παρατίθεται η σύσταση του NLN μέσο.

<b>Micro Elements</b>		
CuSO <sub>2</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025 mg/l	0.10 μM
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.11 μM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10.00	0.16 mM
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	18.95	0.11 mM
NaFeEDTA	36.70	0.10 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	1.03 μM
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10.00	34.78 μM
<b>Macro Elements</b>		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	125.00 mg/l	0.92 mM
KNO <sub>3</sub>	125.00	1.24 mM
MgSO <sub>4</sub>	61.00	0.51 mM
	386.95 mg/l	
<b>Vitamins</b>		
D(+)-Biotin	0.05 mg/l	0.21 μM
Folic acid	0.50	1.13 μM
L-Glutamine	800.00	5.47 mM
Gluthation (reduced)	30.00	0.10 mM
Glycine	2.00	26.64 μM
Myo-Inositol	100.00	0.56 mM
Nicotinic acid	5.00	40.62 μM
Pyridoxin HCl	0.50	2.43 μM

L-Serine	100.00	0.95 mM
Thiamine HCl	0.50	1.48 μM
	1038.55 mg/l	

Πίνακας 2.13: Σύσταση του NLN

Στο παραπάνω μίγμα, προστέθηκε 1%(w/v) σουκρόζη και 1%(w/v) άγαρ για την παρασκευή των τρυβλίων NLN+vitamins+1% σουκρόζη

### β. MS(Murashige & Skoog Medium) μέσο

Χρησιμοποιήθηκε προ-παρασκευασμένο μίγμα MS Vitamin Mixture(Duchefa Biochemie), προσθέτιντας 4405.19 mg/l. Στον παρακάτω πίνακα, παρατίθεται η σύσταση του MS μέσο.

<b>Micro Elements</b>		
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025 mg/l	0.11 μM
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.10 μM
FeNaEDTA	36.70	0.10 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	0.10 mM
KI	0.83	5.00 μM
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.90	0.10 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	1.03 μM
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.60	29.91 μM
<b>Macro Elements</b>		
CaCl <sub>2</sub>	332.02 mg/l	2.99 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00	1.25 mM
KNO <sub>3</sub>	1900.00	18.79 mM
MgSO <sub>4</sub>	180.54	1.50 mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00	20.61 mM
	4302.09 mg/l	
<b>Vitamins</b>		
Glycine	2.00 mg/l	26.64 μM



myo-Inositol	100.00	0.56 mM
Nicotinic Acid	0.50	4.06 $\mu$ M
Pyridoxine HCl	0.50	2.43 $\mu$ M
Thiamine HCl	0.10	0.30 $\mu$ M
	4405.19 mg/l	

Πίνακας 2.14: Σύσταση του MS

Στο παραπάνω μίγμα, προστέθηκε 1%(w/v) σουκρόζη και 1%(w/v) άγαρ για την παρασκευή των τρυβλίων MS+vitamins+1% σουκρόζη

### γ.Jensen Μέσο

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

Πίνακας 2.15: Σύσταση Jensen

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

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

Πίνακας 2.16: Σύσταση Mixed διαλύματος του Jensen

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

## 7. Holand

Αποτελεί ένα πλήρες θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για το πότισμα των φυτών. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε Holand χωρίς άζωτο, διότι ο στόχος ήταν η επαγωγή των φυματίων για να μελετήσουμε το γονίδιο της συνθάσης της λουπεόλης. Με την παροχή όμως πηγή αζώτου, τα φυμάτια είτε δεν θα αναπτύσσονταν καθόλου είτε θα ατροφούσαν, καθώς δεν θα υπήρχε ανάγκη να αναπτυχθεί η συμβιωτική σχέση με το βακτήριο.

Συστατικό	C Stock	ml/lt
MgSO <sub>4</sub>	1M	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1M	1
FeEDTA	0,5M	200 μl
Microelement		1
CaCl <sub>2</sub>	0,1M	50
KCl	1M	5

Πίνακας 2.17: Σύσταση Holand

STOCK ΔΙΑΛΥΜΑ ΜΙΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΩΝ	
ΜΙΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	gr/lt stock solution
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1,81
ZnCl <sub>2</sub>	0,11
CuCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0,05
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,02

Πίνακας 2.18: Σύσταση διαλύματος μικροστοιχείων Holand

## 8. Μόλυνση των φυτών με το *A.rhizogenes*

### Αρχή της μεθόδου:

Χρησιμοποιήσαμε *A.rhizogenes* που φέρει την κατασκευή για την αποσιώπηση της συνθάσης της λουπεόλης, στηριζόμενοι στην ικανότητα του να μεταφέρει τμήμα του πλασμιδίου του στο φυτικό γένωμα και να παράγει διαγονιδιακές ρίζες (βλέπε Εισαγωγή ββ,βγ).

Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά, μολύνθηκαν με το *A.rhizogenes* με δύο τρόπους:

(α) Πραγματοποιήθηκε κοπή της ρίζας στο ύψος του υποκοτυλίου με αποστειρωμένο νυστέρι. Το φυτό (από το υποκοτύλιο και άνω) μεταφέρθηκε σε υγρή καλλιέργεια *A.rhizogenes* που είχε αναπτυχθεί για 2 ημέρες σε YEB (28<sup>0</sup>C) με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Τα φυτά «κρεμάστηκαν» από τις κοτυληδόνες τους στο τρυβλίο, έτσι ώστε μόνο το πληγωμένο σημείο να έρχεται σε επαφή με την βακτηριακή καλλιέργεια. Παρέμειναν για 5 min και μεταφέρθηκαν σε καινούργιο υλικό για να παραχθούν τα «hairy roots».

(β) Κατά τον δεύτερο τρόπο μόλυνσης, η κοπή της ρίζας στο ύψος του υποκοτυλίου πραγματοποιήθηκε εντός της καλλιέργειας του *A.rhizogenes*. Συγκεκριμένα, πρόκειται για εναιώρημα βακτηριακής καλλιέργειας :

500ml *A.rhizogenes* αναπτύχθηκαν για 2 ημέρες σε τρυβλίο με YEP (28<sup>0</sup>C) που περιείχε τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Τα βακτήρια μεταφέρθηκαν σε 2 ml αποστειρωμένου νερού με την βοήθεια «τριγώνου». Το εναιώρημα αυτό μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί και εκεί έγινε η κοπή των φυτών. Στην συνέχεια, τα φυτά μεταφέρθηκαν σε καινούργιο υλικό για να παραχθούν τα «hairy roots».

## 9. Επαγωγή φυματίων στις διαγονιδιακές ρίζες *Lotus japonicus*

Υλικά:

### 1x PBS(Phosphate Buffer Saline)

1)4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2)137 mM NaCl

3)2,7 KCl

4)1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Ρύθμιση του pH στο 7,4 με προσθήκη HCl

*Mesorhizobium loti* αναπτύχθηκε για 2 ημέρες στους 30<sup>0</sup>C με ανάδευση σε YMB ή σε TYR μέσο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στους 4<sup>0</sup>C στα 4500rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκε για κάθε 100 ml βακτηριακής καλλιέργειας 10 ml 1x PBS και το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναδιαλύθηκε. Με το εναιώρημα αυτό έγινε μόλυνση των μετασχηματισμένων ριζών. Συγκεκριμένα, κάθε ρίζα διαβρέχτηκε σε όλο της το μήκος με 500 ή με 750 μl του εναιωρήματος του ριζοβίου. Η μόλυνση έγινε μόλις τα φυτά τοποθετήθηκαν στο μίγμα του περλίτη-βερμικουλίτη και αμέσως μετά φυτεύτηκαν. Τα φυτά παρέμειναν σε αυτό για 3 εβδομάδες προκειμένου να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός των φυματίων.

## 10. Ιστοχημική ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου GUS

Αρχή της μεθόδου:

Το γονίδιο της β-γλουκουρονιδάσης (*gus*) είναι το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο γονίδιο αναφοράς στους φορείς γενετικής τροποποίησης των φυτών. Μπορεί να γίνει τόσο ποιοτική εκτίμηση της δράσης του ενζύμου (υπόστρωμα X-Gluc), όσο και ποσοτική (υπόστρωμα 4 MUG). Το χημικό ανάλογο X-Gluc (5-bromo-4chloro-3indonyl Bd-glycoronnide) είναι άχρωμο και μετατρέπεται με την δράση του ενζύμου σε μπλε προϊόν. Στην παρούσα μελέτη, η χρώση GUS χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί ότι το πρωτόκολλο μεταφοράς του T-DNA με την βοήθεια του *A.rhizogenes* έγινε με επιτυχία. Συγκεκριμένα, βάφτηκαν οι μεταμορφωμένες ρίζες με τον pCambia 1303(βλέπε Πιν.2.1)

Υλικά:

Ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμής AB Buffer

-50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(PH=7,0)

-10mM EDTA (PH=8,0)

-0,1%(w/v) N-lauroyl-sarcosyl(\*)

- 1%(v/v) Triton 100%

-0,07%(w/v) μερκαπτοαιθανόλη(\*)

(\*)Είναι θερμοευαίσθητα, για αυτό η προσθήκη γίνεται μετά την αποστείρωση.

Ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμής GUS

Όπως το AB Buffer με προσθήκη 2 mM X-Gluc

Οι ρίζες με νυστέρι κόπηκαν από το φυτό και εμβαπτίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμής GUS. Τοποθετήθηκαν σε συμπιεστή υπό κενό για 1 h και κατόπιν στους 37<sup>0</sup>C για 4 ημέρες, καθώς οι ρίζες του *Lotus japonicus* είναι πιο ογκώδεις από τις αντίστοιχες του *Arabidopsis thaliana* και χρειάζονται περισσότερο χρόνο να βαφτούν.. Καθώς, το X-Gluc είναι φωτοευαίσθητο, τα εpperdoffs πρέπει να είναι καλυμμένα με αλουμινόχαρτο.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

&

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή (Ενότητα 5α, 5β), η ενεργοποίηση του ενδογενούς RNAi μηχανισμού πυροδοτείται από την παρουσία δίκλωνου RNA. Στην παρούσα μελέτη, σχεδιάστηκαν κατασκευές που έδιναν την δυνατότητα να παραχθεί εντός των φυτικών κυττάρων δίκλωνο RNA που να έχει ομολογία με τμήμα του mRNA της συνθάσης της λουπεόλης. Ο στόχος ήταν με αυτό τον τρόπο στο να μειωθούν τα επίπεδα του mRNA του υπό μελέτη γονιδίου. Προκειμένου να είναι σίγουρο ότι ο προκύπτων φαινότυπος οφείλεται σε αποσιώπηση του γονιδίου της συνθάσης της λουπεόλης και όχι σε αποσιώπηση οποιοδήποτε άλλου γονιδίου, λόγω ομολογίας(Ενότητα 5.β.3), σχεδιάστηκαν δύο κατασκευές που να στοχεύουν σε δύο διαφορετικά τμήματα του mRNA αυτού του γονιδίου. Για την πρώτη κατασκευή(συμβολίζεται με [OSC3(3)], σχεδιάστηκαν εκκινητές που να ενισχύουν μία περιοχή 300bp του cDNA της συνθάσης της λουπεόλης, που εντοπίζεται 400 νουκλεοτίδια εσωτερικά του 5' άκρου. Για την δεύτερη κατασκευή( συμβολίζεται με [OSC3(4)], σχεδιάστηκαν εκκινητές που να ενισχύουν μία περιοχή 330bp η οποία εντοπίζεται 200 νουκλεοτίδια πριν το 3' άκρο(Παράρτημα II)

## **1. Κατασκευή του φορέα-φουρκέτα**

### (α) Σχεδιασμός των εκκινητών

Μέσω πολλαπλής ομοπαράθεσης των cDNA των OSCs[7], βρέθηκαν περιοχές οι οποίες δεν είναι συντηρημένες στις υπόλοιπες κυκλάσες του 2,3-οξειδοσουλενίου(OSC1-8,Εισαγ.Εικ.18). Με χρήση προγράμματος σχεδιασμού εκκινητών (Peacon Designer 7) σχεδιάστηκαν εκκινητές με ομολογία σε τμήμα του cDNA της συνθάσης της λουπεόλης. Ταυτόχρονα, στον σχεδιασμό των εκκινητών προνοήθηκε η εισαγωγή στα 5' άκρα των εκκινητών θέσεων αναγνώρισης από ένζυμα περιορισμού, προκειμένου όπως θα εξηγηθεί παρακάτω, να γίνει η κατασκευή του φορέα φουρκέτα. Οι αλληλουχίες αυτές είναι επιπρόσθετες και δεν έχουν ομολογία με το cDNA της συνθάσης της λουπεόλης. Επιπλέον, προστέθηκαν ένα με δύο νουκλεοτίδια πριν τις θέσεις αναγνώρισης, προκειμένου να προστατεύονται οι τελευταίες από την δράση νουκλεασών. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για την κατασκευή των βραχιόνων του φορέα φουρκέτα, παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.1 & 3.2.

OSC3(3) REVERSE: 5'-AGGTACCAAGCTTAGAACTCTGGTGGAAGGG-3'  
KpnI HindIII

OSC3(3) FORWARD: 5'-GACTCGAGTCTAGATAGGACCTCAACACAAGAAG-3'  
XhoI XbaI

Εικόνα 3.1 : Αλληλουχίες των εκκινητών της πρώτης κατασκευής [OSC3(3)]. Παρουσιάζονται και οι θέσεις αναγνώρισης από τα ένζυμα περιορισμού.

OSC3(4), REVERSE: 5'-TAAATTCCAAGCTTACGCATAAGTGACAACAAAGC-3'  
EcoRI HindIII

OSC3(4), FORWARD: 5'-GCCTCGAGGGATCCGAAGCATAGGCGAAAGG-3'  
XhoI BamHI

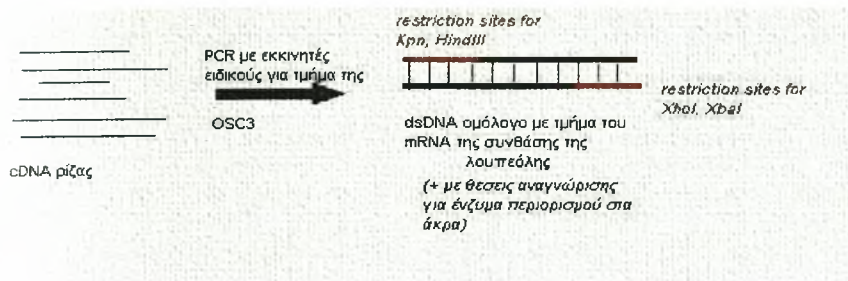
Εικόνα 3.2 : Αλληλουχίες των εκκινητών της δεύτερης κατασκευής [OSC3(4)]. Παρουσιάζονται και οι θέσεις αναγνώρισης από τα ένζυμα περιορισμού.

*\*Σημείωση: Για λόγους απλούστευσης, παρακάτω θα αναλυθεί ο σχεδιασμός της πρώτης κατασκευής, καθώς ακολουθήθηκαν ακριβώς τα ίδια βήματα για τις δύο κατασκευές.*

(β) PCR με τους εκκινητές OSC3(3): (Υλικά & Μέθοδοι 4. ε)

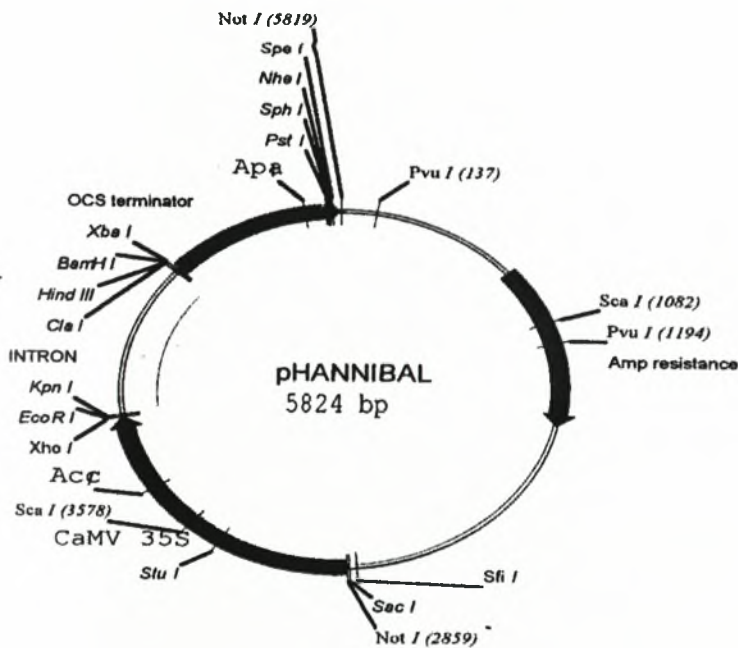
Ως μήτρα για την PCR χρησιμοποιήθηκε cDNA ρίζας, καθώς γνωρίζαμε ότι το μεταγράφημα της συνθάσης της λουπεόλης παράγεται σε μεγάλες ποσότητες στην ρίζα του *Lotus japonicus* (Εισαγωγή 4. εικ. 1.21). Το προϊόν της PCR που προέκυψε, περιλάμβανε στα άκρα του και θέσεις αναγνώρισης από ένζυμα περιορισμού (Εικόνα 3.3).





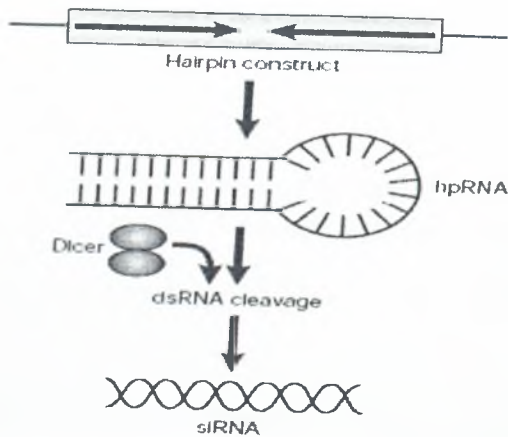
Εικόνα 3.3

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε (Υλικά & Μέθοδοι 4. γ) σε 1,2 % πηκτή αγαρόζης. Η μπάνα των 300 bp αφαιρέθηκε με νυστεράκι και ακολούθησε επανάκτηση του τμήματος αυτού. Το τμήμα αυτό, από εδώ και στο εξής θα ονομάζεται ένθεμα, και μάλιστα θα γίνει διάκριση μεταξύ νοηματικού (Sense) και αντι-νοηματικού (Anti-Sense) ενθέματος, ανάλογα με την φορά που θα εισέλθει στον πλασμιδιακό φορέα pHannibal. Η διάκριση αυτή μπορεί να γίνεται αυθαίρετα, όμως έχει πρακτική σημασία. Θεωρούμε, ότι το ένθεμα που εισέρχεται παραπλεύρως του προαγωγέα 35S του pHannibal είναι το Sense, ενώ αυτό που εισέρχεται παραπλεύρως της ληκτικής ακολουθίας OCS είναι το Antisense(Εικ. 3.4).



Εικ.3. 4: Ο ευρέως χρησιμοποιούμενος φορέας γονδιακής αποσιώπησης pHannibal

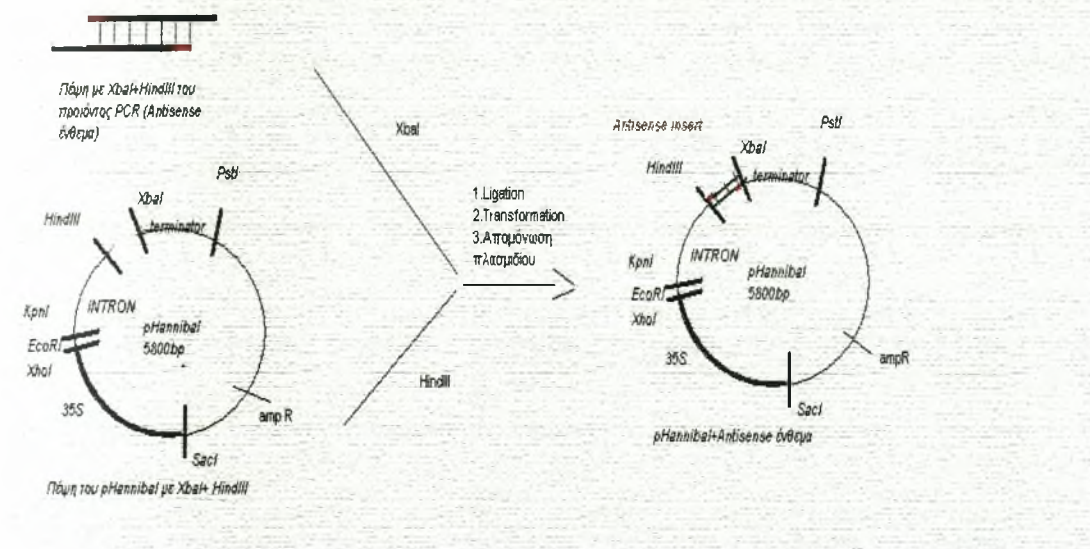
Ο πλασμιδιακός φορέας pHannibal (Υλικά και μέθοδοι, πίνακας 2.1) δίνει την δυνατότητα να κλωνοποιηθεί το ίδιο τμήμα δύο φορές με αντίθετη κατεύθυνση στα άκρα ενός ιντρονίου. Η κατασκευή αυτή, αφού μεταγραφεί, θα δώσει δίκλωνο RNA που θα είναι ικανό να ενεργοποιήσει τον RNAi μηχανισμό. Το ιντρόνιο που θα παρεμβάλλεται μεταξύ των συμπληρωματικών περιοχών RNA σχηματίζει την θηλιά μεταξύ τους (Εικ. 3.5).



Εικόνα 3.5: Η σχηματιζόμενη φουρκέτα, εξαιτίας της μεταγραφής τμήματος του pHannibal

### (γ) Κλωνοποίηση του Αντι-νοσηματικού ενθέματος

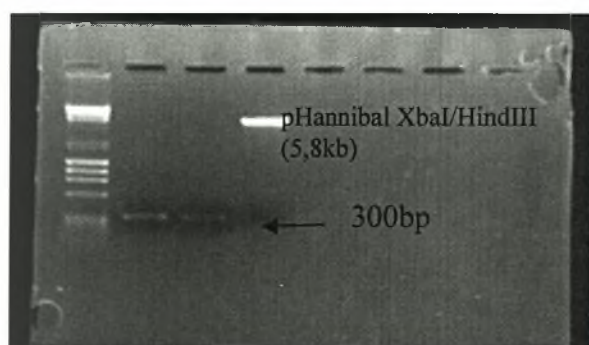
Παρατηρώντας τον ορθόδρομο και οπισθόδρομο εκκινητή της πρώτης κατασκευής (Εικ 3.1), καθώς και το προϊόν της PCR που προκύπτει (Εικ. 3.3), γίνεται αντιληπτό ότι στο τελικό προϊόν υπάρχουν θέσεις αναγνώρισης από δύο ένζυμα περιορισμού σε κάθε άκρο. Με βάση τις θέσεις για ένθεση που προσφέρει ο pHannibal στα δύο άκρα του ιντρονίου και τις θέσεις που έχουν ενσωματωθεί στο ένθεμα ( KpnI, HindIII στο ένα άκρο και XbaI, XhoI στο άλλο άκρο), προκύπτει ότι υπάρχει συγκεκριμένος συνδυασμός πέψεων. Συνεπώς, πέψη με KpnI & XhoI δίνει την δυνατότητα να ενσωματωθεί το νοσηματικό ένθεμα, ενώ πέψη με HindIII & XbaI δίνει την δυνατότητα να ενσωματωθεί το αντι-νοσηματικό. Εξαιτίας, όμως, των διπλών θέσεων αναγνώρισης σε κάθε άκρο προσφέρεται η δυνατότητα οι δύο κλωνοποιήσεις να γίνουν με αντίθετη φορά. Το άκρο, λοιπόν, που περιέχει τις θέσεις περιορισμού για KpnI και HindIII, όταν κοπεί με το κάθε ένζυμο χωριστά και εισέλθει στον pHannibal, λόγω δομής του τελευταίου, θα εισέλθει με αντίθετη κατεύθυνση.



Εικόνα 3.6: Κλωνοποίηση αντι-νοηματικού ενθέματος

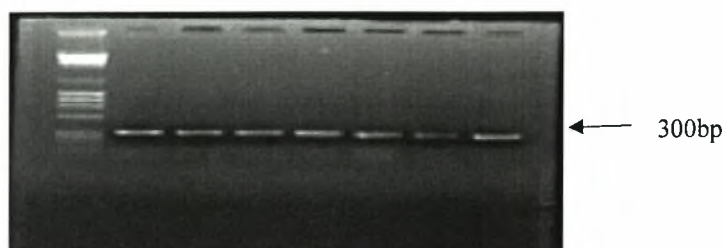
Ένα επακόλουθο του σχεδιασμού των εκκινητών, είναι το γεγονός ότι οι δύο ενθέσεις του νοηματικού και του αντι-νοηματικού πρέπει να γίνουν με χρονική σειρά, καθώς μετά την πέψη και κλωνοποίηση του αντι-νοηματικού ενθέματος, οι θέσεις του νοηματικού ενθέματος(εξωτερικές) έχουν χαθεί. Συγκεκριμένα, πρέπει να προηγηθεί η κλωνοποίηση του αντι-νοηματικού ενθέματος. Και αυτό γιατί οι θέσεις ένθεσης αυτού(XbaI,HindIII) είναι εσωτερικές των θέσεων για εισχώρηση του νοηματικού(KpnI,XhoI) στο τελικό προϊόν.

Έτσι, για την κλωνοποίηση του αντι-νοηματικού ενθέματος έγινε πέψη με XbaI&HindIII του προϊόντος PCR (OSC3-3). Με τα ίδια ένζυμα προετοιμάστηκε και ο πλασμιδιακός φορέας pHannibal (Εικ. 3.6).



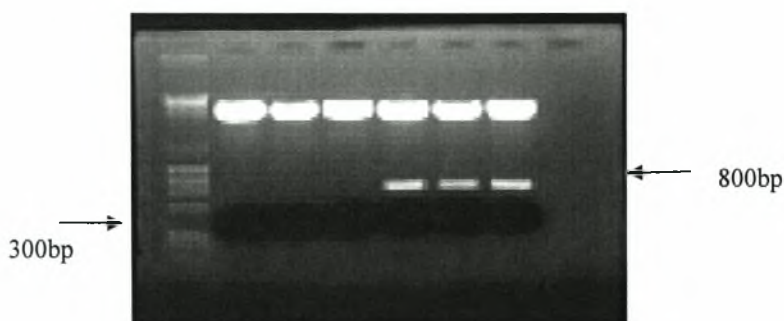
Εικ.3.7: Ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτή αγαρόζης μετά από καθαρισμό με φαινόλη-χλωροφόρμιο

Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης(Υλικά & Μέθοδοι 4.ζ) και η εισαγωγή του κατασκευασμένου πλασμιδίου pHA(OSC3-3)σε δεκτικά κύτταρα E.coli(Υλικά & Μέθοδοι 1.γ). Για την σάρωση των μετασχηματισμένων κυττάρων εφαρμόστηκε colony PCR(Υλικά & Μέθοδοι 4.στ), χρησιμοποιώντας τους αρχικούς εκκινητές ενίσχυσης του ενθέματος από το cDNA( Εικ. 3.8).



Εικ 3.8:Ηλεκτροφόρηση σε 1,2 % πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR Colony για τον pHA(OSC3-3)

Το pHA(OSC3-3) απομονώθηκε και ακολούθησε Πέψη με XbaI/HindIII και με HindIII/KpnI [εντοπίζουν από μία θέση περιορισμού στα άκρα του ιντρονίου(Εικ.3.4)] για να επιβεβαιωθεί ότι το πλασμίδιο pHA(OSC3-3) έχει ακέραιες θέσεις (Εικ. 3.9).

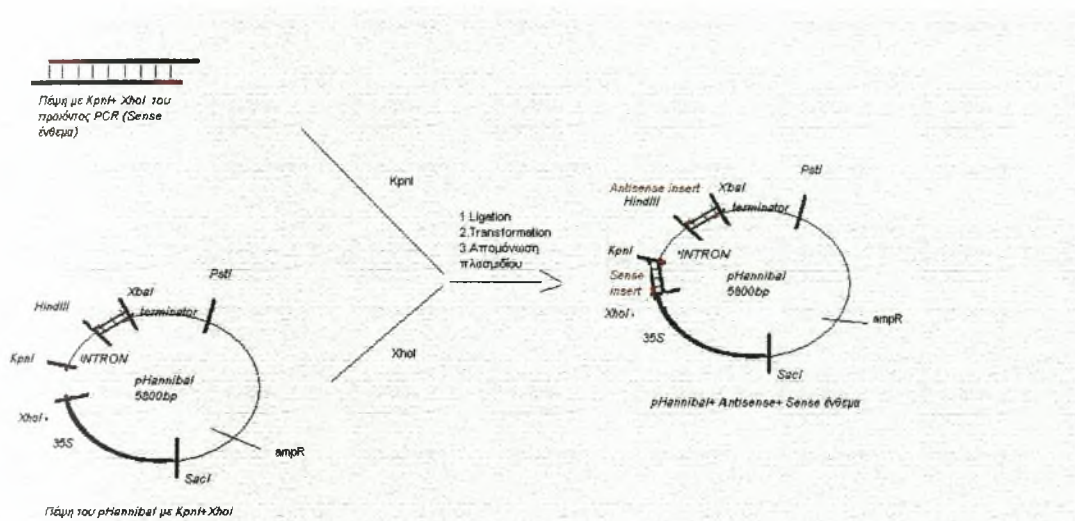


Εικ.3.9: Ηλεκτροφόρηση σε 1,0% πηκτή αγαρόζης διαγνωστική πέψης τριών διαφορετικών κλώνων που περιέχουν το αντί-νοηματικό ένθεμα με XbaI/HindIII(3πρώτες θέσεις) και με KpnI/HindIII

(δ) Κλωνοποίηση του νοηματικού ενθέματος

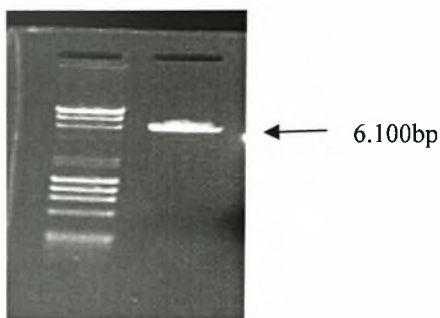
Προκειμένου να ολοκληρωθεί ο φορέας-φουρκέτα, ο *pHA(OSC3-3)* (μεγέθους πλέον  $5.800+300=6.100\text{bp}$ ) χρησιμοποιήθηκε ως αφετηρία για την κλωνοποίηση του ενθέματος στην άλλη πλευρά του ιντρονίου.

Η συνολική διαδικασία κλωνοποίησης του νοηματικού ενθέματος παρουσιάζεται στην εικόνα 3.10.



Εικ3..10: Κλωνοποίηση του νοηματικού ενθέματος στον *pHannibal* που ήδη περιέχει το αντι-νοηματικό ένθεμα

Στην εικόνα 3.11, φαίνεται ο *pHA(OSC3-3)* φορέας μετά από την πέψη με *XhoI* και *KpnI*.



Εικ3..11: *pHA(OSC3-3)* κομμένο με *XhoI*+*KpnI*, επεξεργασμένο με φαινόλη-χλωροφόρμιο

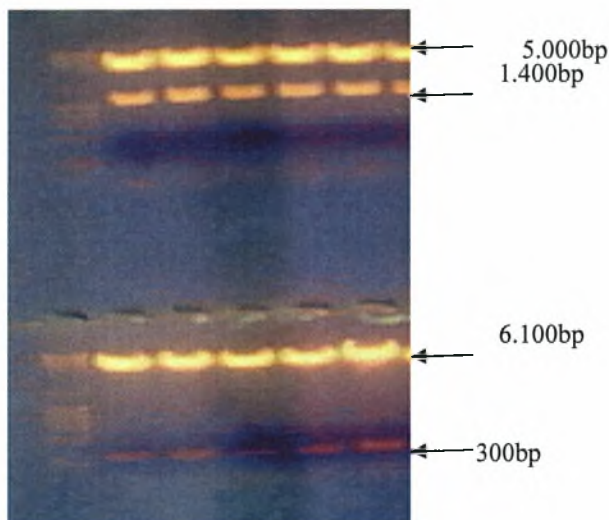
Ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης με το νοηματικό ένθεμα OSC3-3 κομμένο με XhoI&KpnI και ανάκτηση μετασηματισμένων κλώνων E.coli.

Για να επιβεβαιωθεί η ακεραιότητα της κατασκευής πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις με:

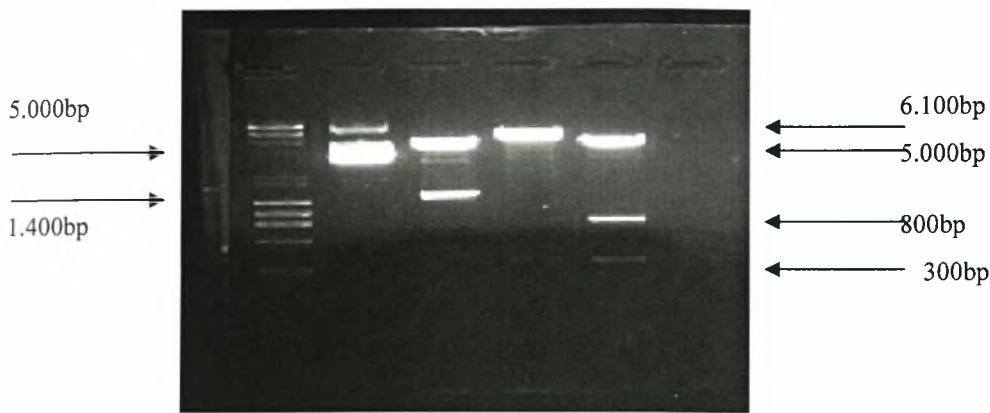
-XhoI +XbaI: προκύπτει τμήμα του pHannibal(5,0kb) & τα δύο ενθέματα μαζί με το ιντρόνιο(300+300+800=1.400bp)

-XhoI+KpnI: προκύπτει το νοηματικό ένθεμα(300bp) και ο υπόλοιπος φορέας(6,100bp)

-XbaI/HindIII: 5.000+800+2\*300bp



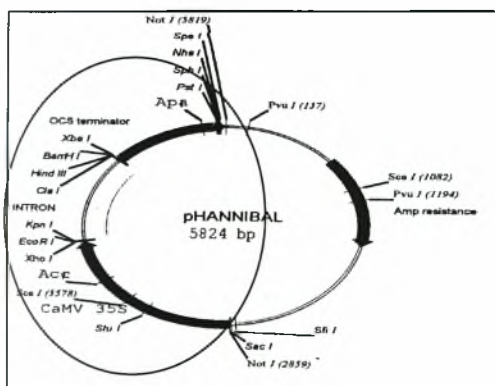
Εικ.3.12: Ηλεκτροφόρηση σε 1,0 % πηκτή αγαρόζης των διαγνωστικών πέψεων για εύρεση κλώνου που να περιέχει και τα δύο ενθέματα. Στο πάνω τμήμα της εικόνας ηλεκτροφορήθηκαν οι πέψεις 5 πλασμιδίων με XhoI/XbaI. Στο κάτω μέρος, οι πέψεις των ίδιων κλώνων με XhoI/KpnI



Εικ.3.13: Ηλεκτροφόρηση σε 1,0% πηκτή αгарόζης των προϊόντων των διαγνωστικών πέψεων του κλώνου που είχε εντοπιστεί ότι περιέχει και τα δύο ενθέματα. Στην δεύτερη θέση μετά τον μάρτυρα μοριακού βάρους ηλεκτροφορήθηκε η πέψη με *XhoI/XbaI*. Στην τρίτη θέση, ηλεκτροφορήθηκε πέψη με *XhoI/KpnI*. Τέλος, στην τέταρτη θέση, ηλεκτροφορήθηκε πέψη με *XbaI/HindIII*

Στην πέψη με *XbaI/HindIII* τέμνεται ο κατασκευασμένος φορέας φουρκέτα στα άκρα και των δύο ενθεμάτων, διότι όπως είπαμε οι θέσεις για ένθεση του αντινοσηματικού είναι εσωτερικές και επομένως διατηρούνται και στο νοσηματικό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να εξέρχεται και το ενδιάμεσο ιντρόνιο(Εικ.3.12 & 3.13).

Με τον τρόπο αυτό ολοκληρώθηκε η δημιουργία της επιθυμητής κατασκευής, δηλαδή να είναι το ένθεμα δύο φορές κλωνοποιημένο με αντίθετη φορά στα άκρα του ιντρονίου του φορέα *pHannibal*. Η κατασκευή αυτή ονομάστηκε *pHAS(OSC3-3)*. Ο επόμενος στόχος ήταν να κλωνοποιηθεί το τμήμα του *pHannibal* που απαιτείται για την αποσιώπηση στον τελικό φορέα, *pCambia 1300*. Το τμήμα του *pHannibal* περιλαμβάνει εκτός από τα ενθέματα και το ιντρόνιο, τον ισχυρό εκκινητή, καθώς και την αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής *OCS* (Υλικά & Μέθοδοι, Πίνακας 1). Το τμήμα αυτό του *pHannibal* απεικονίζεται στην Εικ.3.14 και για χάρην ευκολίας θα αναφερόμαστε σε αυτό ως *η κασέτα του pHAS(OSC3-3)*.



Εικ.3.14: Τμήμα του *pHannibal* που απαιτείται για την γονιδιακή αποσιώπηση

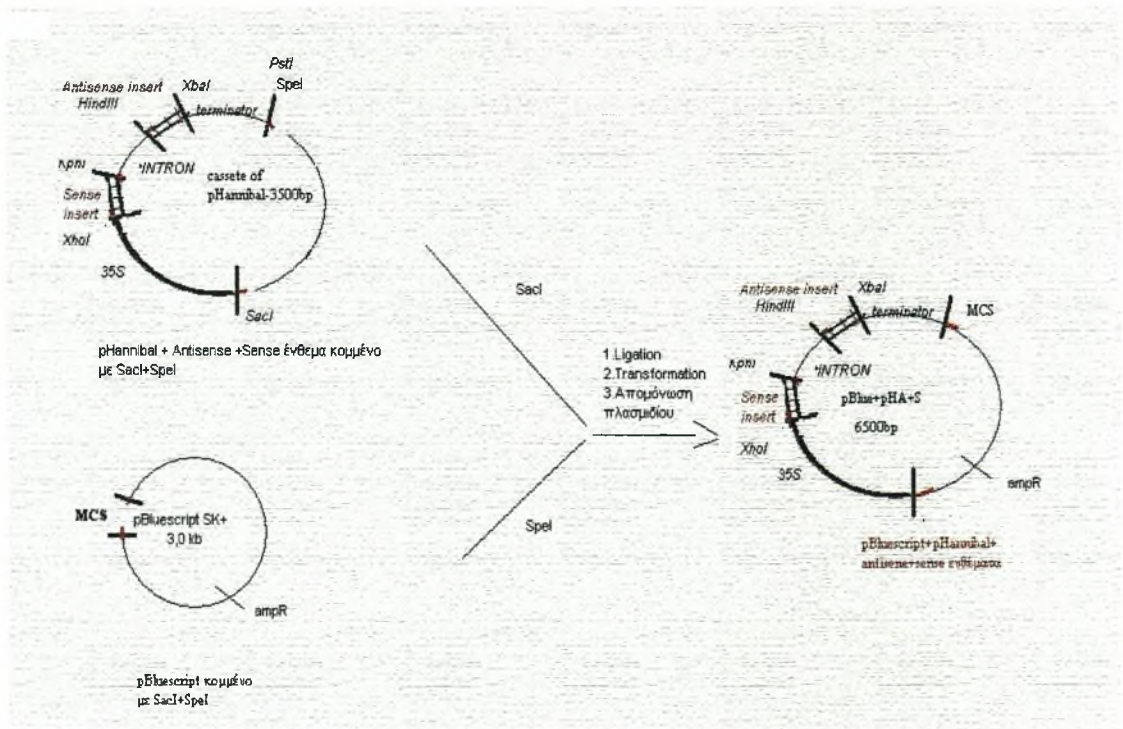
Ο λόγος για τον οποίο πρέπει να χρησιμοποιηθεί άλλος φορέας για να γίνει η ενσωμάτωση της κασέτας στο φυτικό γένωμα, είναι ότι το *A.rhizogenes* αναγνωρίζει, τέμνει και μεταφέρει μία αλληλουχία μέσα στο φυτικό γένωμα μόνον όταν περιβάλλεται από το δεξί και αριστερό συνοριακό άκρο(RB&LB) (Εισαγωγή 6,β). Οι φορείς pCambia προσφέρουν αυτήν την δυνατότητα(Υλικά & Μέθοδοι, Πίνακας 2.1).

## 2. Κλωνοποίηση του φορέα-φουρκέτα στον τελικό φορέα

Η άμεση κλωνοποίηση της κασέτας από τον pHannibal στον pCambia 1300 δεν ήταν δυνατή. Προηγήθηκε κλωνοποίηση της κασέτας πρώτα σε έναν ενδιάμεσο φορέα, τον pBluescript SK+(Υλικά & Μέθοδοι, Πίνακας 1), ο οποίος έχει περισσότερες θέσεις αναγνώρισης από ένζυμα περιορισμού και διευκολύνεται η κλωνοποίηση.

### (α) Κλωνοποίηση της κασέτας στον ενδιάμεσο φορέα pBluescript

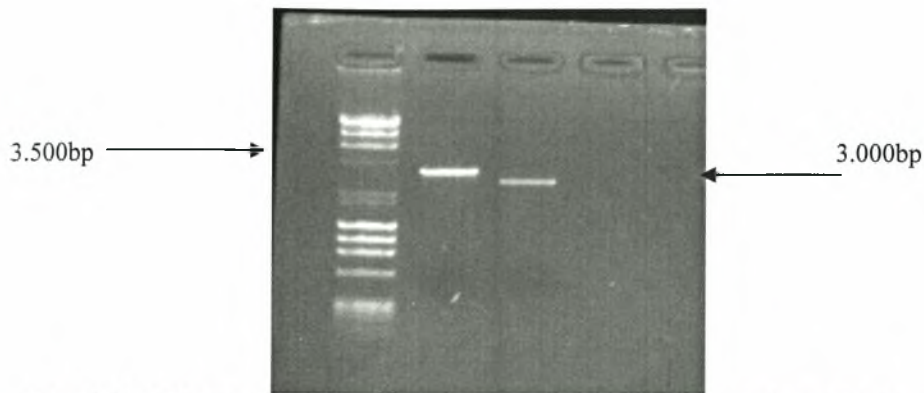
Η συνολική διαδικασία της κλωνοποίησης από τον pHannibal στον pBluescript παρουσιάζεται στην Εικ.3.15



Εικ.3.15: Κλωνοποίηση της κασέτας από τον pHannibal στον pBluescript.



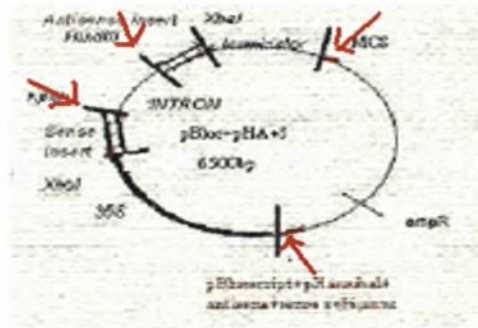
Αρχικά έγινε πέψη με SacI & SpeI του pBluescript αλλά και του φορέα pHAS(OSC3-3). Η ζώνη 3.500bp, η οποία αντιστοιχεί στην κασέτα pHAS(OSC3-3) ανακτήθηκε από την πηκτική αγαρόζης και συνδέθηκε με τον pBluescript κομμένο με τα ίδια ένζυμα περιορισμού. Η κατασκευή αυτή ονομάστηκε **pBlue OSC3**.



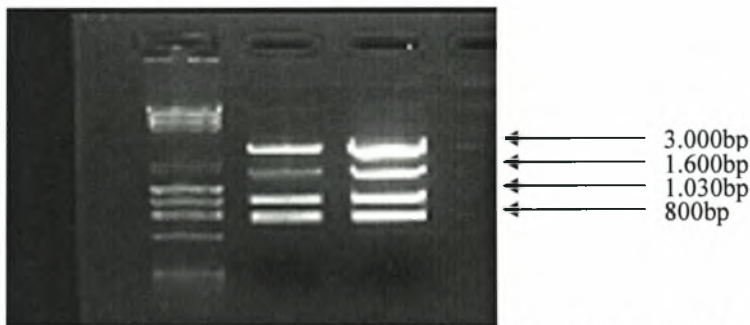
Εικ 3.16: Ηλεκτροφόρηση σε 1,0 % πηκτική αγαρόζης της κασέτας από το pHannibal καθαρισμένο με Gel extraction και του pBluescript καθαρισμένο με φαινόλη χλωροφόρμιο

Οι μετασηματισμένοι κλώνοι ελέγχθησαν με διαγνωστικές πέψεις με SacI/HindIII. Με την διπλή αυτή πέψη, αναμένεται από πλασμίδιο pBlue OSC3-3 στο οποίο να έχει κλωνοποιηθεί η κασέτα να προκύψουν τα εξής τμήματα:

- ❖ 3.000bp(προκύπτει δηλαδή ο pBluescript, καθώς εξάγεται όλη η κασέτα)
- ❖ 1600bp( περιοχή μεταξύ θέση κλωνοποίησης Sac και νοηματικού ενθέματος, συμπεριλαμβανομένου και αυτού, καθώς διατηρείται η θέση αναγνώρισης HindIII)
- ❖ 1030bp (περιοχή μεταξύ αντί-νοηματικού ενθέματος, συμπεριλαμβανόμενου και αυτού και MCS)
- ❖ 800bp( προκύπτει το ιντρόνιο)



Εικ. 3.16: pBluescript με την κασέτα μας, όπου με τα βέλη φαίνονται οι θέσεις κοπής από τα SacI & HindIII

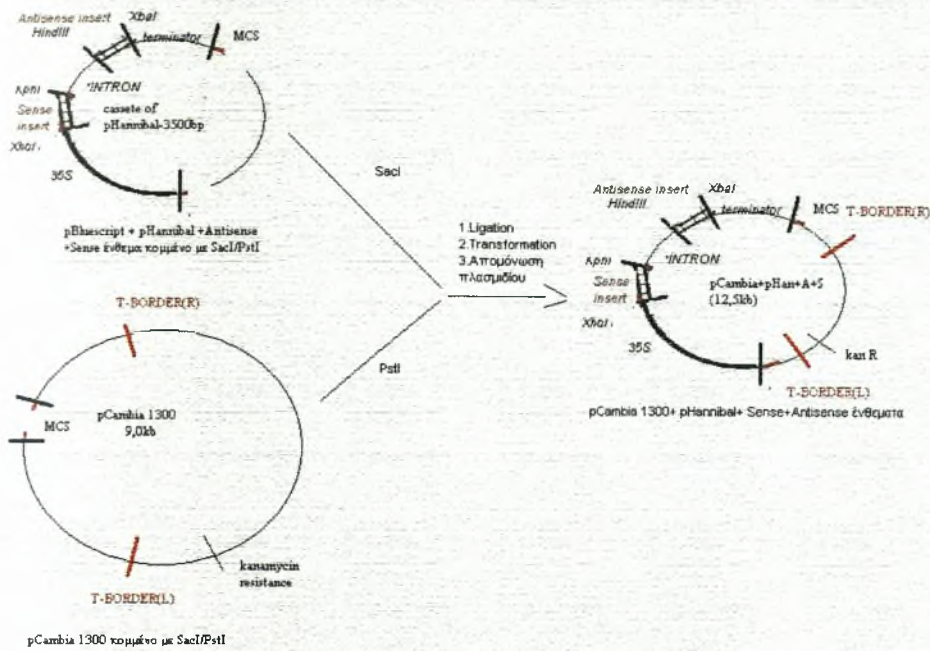


Εικ.3.17: Ηλεκτροφόρηση σε 1,0% πηκτή αгарόζης των προϊόντων της διαγνωστικής πέψης με SacI/HindIII δύο κλώνων που περιέχουν την κασέτα PHAS(OSC3-3)

Να επισημανθεί, εδώ, ότι τα ένζυμα περιορισμού, τα οποία επιλέχθηκαν για την πραγματοποίηση των διαγνωστικών πέψεων, ελέχθησαν αρχικά, για ενδεχόμενες θέσεις περιορισμού εντός του ενθέματος ή των φορέων με την χρήση του προγράμματος DNA Star 7.

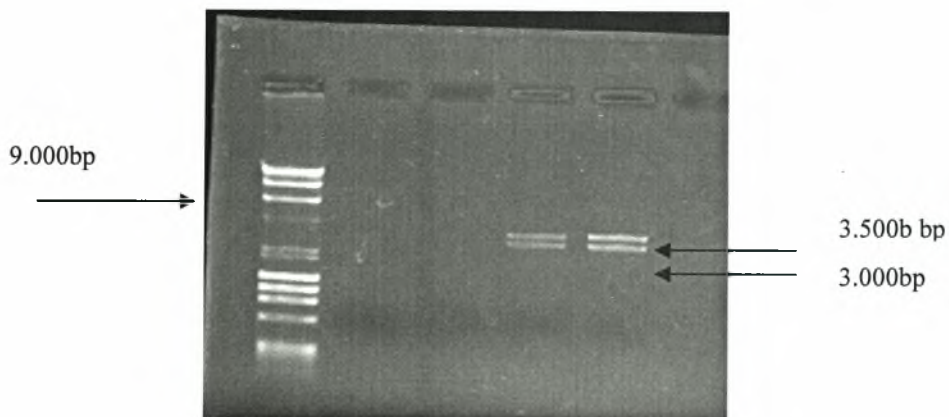
(β) Κλωνοποίηση της κασέτας από το pBluescript στον τελικό φορέα pCambia 1300

Η συνολική διαδικασία της κλωνοποίησης από τον pHannibal στον pBluescript παρουσιάζεται στην Εικ.3.18



Εικ.3.18: Κλωνοποίηση της κασέτας pBlueAS(OSC3-3) στον pCambia 1300

Η κασέτα του pHAS(OSC3-3) ανακτήθηκε από τον pBlueAS(OSC3-3) και συνδέθηκε στον pCambia 1300 στις θέσεις SacI/PstI.

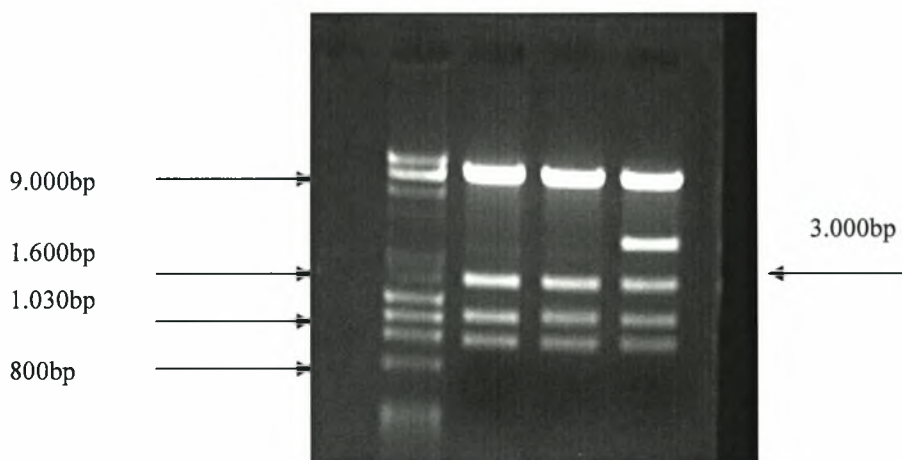


Εικ. 3.20: Ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτή αгарόζης του pCambia 1300 (9.000bp) κομμένου με SacI & PstI και επεξεργασμένο με φαινόλη χλωροφόρμιο ( δύο πηγαδάκια μετά το ladder) και του pBluescript που περιέχει την κασέτα (6.500bp) κομμένο με SacI & PstI και επεξεργασμένο με φαινόλη χλωροφόρμιο ( δύο τελευταία πηγαδάκια).

Στην περίπτωση αυτή για την αντίδραση σύνδεσης με τον pCambia προστέθηκαν και τα δύο τμήματα(κασέτα & pBluescript).

Ακολούθησαν διαγνωστικές πέψεις με SacI/HindIII. Με την διπλή αυτή πέψη, αναμένεται από πλασμίδιο pCambia στο οποίο να έχει κλωνοποιηθεί η κασέτα να προκύψουν τα εξής τμήματα (Εικ. 3.21):

- ❖ 9.000bp (προκύπτει δηλαδή ο pCambia )
- ❖ 1600bp( περιοχή μεταξύ θέση κλωνοποίησης Sac και νοηματικού ενθέματος, συμπεριλαμβανομένου και αυτού, καθώς διατηρείται η θέση αναγνώρισης HindIII)
- ❖ 1030bp (περιοχή μεταξύ αντί-νοηματικού ενθέματος, συμπεριλαμβανόμενου και αυτού και MCS)
- ❖ 800bp( προκύπτει το ιντρόνιο)



Εικ.3.21: Ηλεκτροφόρηση σε 1,0% πηκτή αραρόζης των προϊόντων πέψης SacI/HindIII τριών κλώνων για εύρεση κλώνου που να περιέχει τον pCambia με ενσωματωμένη την κασέτα μας. Οι δύο πρώτοι κλώνοι έχουν το επιθυμητό πλασμίδιο, ενώ ο τρίτος περιέχει επιπλέον και τον pBluescript.

Η επιθυμητή κατασκευή της κασέτας- φουρκέτας στον pCambia 1300 (συνολικού μεγέθους 12.500bp) ονομάστηκε *pCOSC3*.

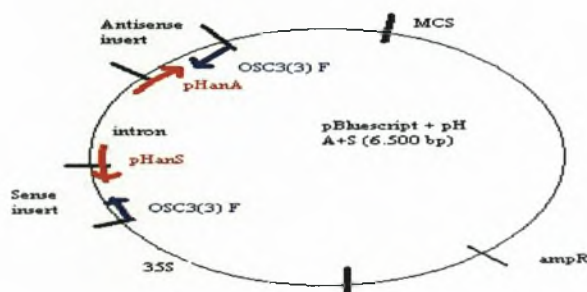
### (3) Αλληλούχιση των ενθεμάτων

Η αλληλούχιση στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε προκειμένου να γνωρίζουμε ότι οι κλωνοποιημένες αλληλουχίες είναι ανέπαφες. Εισαγωγή μεταλλάξεων θα μπορούσε να είχε συμβεί ως αποτέλεσμα της έκθεσης στο υπεριώδες φως σε συνδυασμό με την δράση του βρωμιούχου αιθιδίου. Κάτι τέτοιο θα είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία βρόγχων (εξαιτίας αταίριαστων βάσεων) στο

σχηματιζόμενο δίκλωνο RNA με πιθανή ίσως συνέπεια να μην αναγνωρίζεται από την Dicer ή ακόμα τα σχηματιζόμενα siRNAs να μην έχουν απόλυτη ομολογία με το mRNA της συνθάσης της λουπεόλης.

Προκειμένου, λοιπόν, να ενισχυθούν τα δύο ενθέματα (στα άκρα του ιντρονίου του pHannibal), έγινε χρήση ειδικών εκκινητών, pHanA και pHanS, οι οποίοι έχουν ομολογία με τμήματα του ιντρονίου του pHannibal, (Πίνακας 2.9, Υλικά & Μέθοδοι). Συγκεκριμένα, ο pHanA υβριδίζεται με περιοχή 710 bp εσωτερικά του ιντρονίου στην πλευρά που εφάπτεται με το κλωνοποιημένο αντί-νοηματικό ένθεμα. Αντίστοιχα, ο pHanS έχει ομολογία με την περιοχή του ιντρονίου που βρίσκεται κοντά στο νοηματικό ένθεμα και συγκεκριμένα 514bp εσωτερικά του ιντρονίου (Εικ.3.22).

Με την χρήση των παραπάνω εκκινητών σε συνδυασμό με τον ορθόδρομο εκκινητή(OSC3.3 F) είναι δυνατόν να ενισχυθούν με PCR τα ενθέματα . Γίνεται χρήση μόνο του ορθόδρομου εκκινητή για την ενίσχυση και των δύο ενθεμάτων, εξαιτίας της κατεύθυνσης με την οποία έχουμε κλωνοποιήσει τα ενθέματα. Συγκεκριμένα, το άκρο του ενθέματος στο οποίο έχει ενσωματωθεί ο ορθόδρομος εκκινητής βρίσκεται και στις δύο κλωνοποιήσεις στην πλευρά που δεν εφάπτεται με το άκρο του ιντρονίου. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού, χρησιμοποιώντας ανά ζεύγη τον pHanA & OSC3.3 F, καθώς και pHanS & OSC3.3 F ενισχύονται με PCR τα ενθέματα αντί-νοηματικό και νοηματικό αντίστοιχα. Εξαιτίας, όμως, του γεγονότος ότι οι εκκινητές που βρίσκουν ομολογία με περιοχή του ιντρονίου ενισχύουν και ένα τμήμα του, 119bp και 314bp προσθέτοντας τις βάσεις αυτές στο τελικό προϊόν.



Εικ.3.22: Σχεδιάγραμμα, όπου φαίνονται οι θέσεις που υβριδίζουν οι εκκινητές: pHanA , pHanS

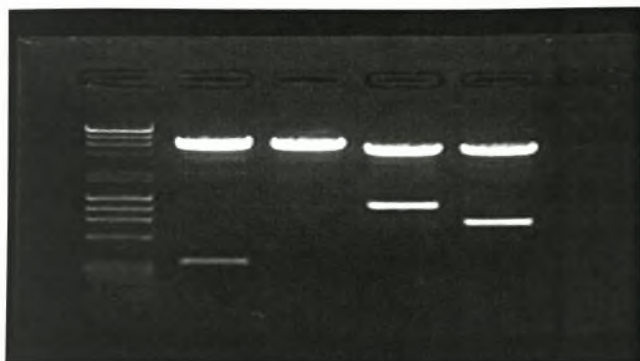


Εικ.3.23: Ηλεκτροφόρηση σε 1,2% πηκτή αραρόζης του προϊόντος της PCR με εκκινητές OSC3 F & pHanS( δεξιά εικόνα), όπου φαίνεται το προϊόν ενίσχυσης του νοηματικού ενθέματος και τμήματος του ιντρονίου (συνολικού μεγέθους 614bp), καθώς και του προϊόντος της PCR με εκκινητές OSC3F & pHanA(αριστερή εικόνα), όπου φαίνεται το προϊόν ενίσχυσης του αντί-νοηματικού ενθέματος και τμήματος του ιντρονίου (συνολικού μεγέθους 319bp).

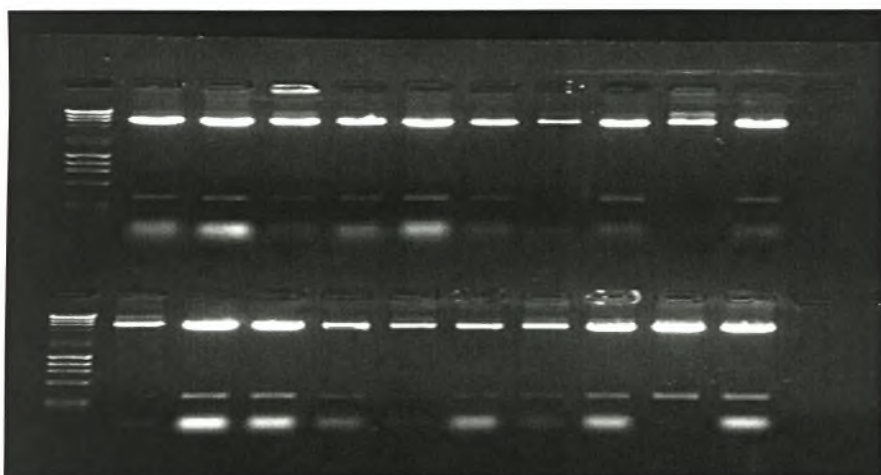
Η κασέτα στάλθηκε για αλληλούχιση κλωνοποιημένη στον ενδιάμεσο φορέα pBluescript με χρήση των προαναφερθέντων εκκινητών. Με τον τρόπο αυτό, αλληλουχίστηκε ολόκληρο το ένθεμα (300bp) με την χρήση του ορθόδρομου εκκινητή. Με αλληλούχιση του τμήματος που προκύπτει από τον εκκινητή που βρίσκει ομολογία με το ιντρόνιο, επιβεβαιώθηκε η ενσωμάτωση των ενθεμάτων στα άκρα του ιντρονίου.

#### (4) Δημιουργία της δεύτερης κατασκευής

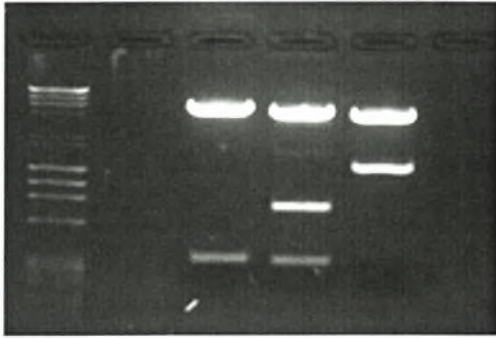
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο φαινότυπος της αποσιώπησης ενός γονιδίου, απαιτείται να προκύπτει ο ίδιος φαινότυπος όταν ενεργοποιείται ο RNAi μηχανισμός έναντι του γονιδίου με την χρήση δίκλωνων RNA που έχουν ομολογία με δύο διαφορετικά τμήματα του mRNA του γονιδίου αυτού. Η δεύτερη, λοιπόν, κατασκευή (OSC3.4) στοχεύει σε περιοχή του mRNA της συνθάσης της λουπεόλης κοντά στο 3' άκρο (Παράρτημα II). Η διαδικασία κατασκευής της που ακολουθήθηκε είναι ακριβώς η ίδια με την πρώτη κατασκευή, που αναλύθηκε παραπάνω. Στην περίπτωση αυτή, το ένθεμα έχει διαφορετικές θέσεις αναγνώρισης από ένζυμα περιορισμού προκειμένου να κλωνοποιηθεί στα άκρα του ιντρονίου του pHannibal και επίσης είχε μέγεθος λίγο μεγαλύτερο(330bp). Η διαδικασία αυτή έχει ολοκληρωθεί μέχρι την κλωνοποίηση της κασέτας στον ενδιάμεσο φορέα pBluescript. Παρακάτω, παρατίθενται οι φωτογραφίες από τις ηλεκτροφορήσεις των διαγνωστικών πέσεων κατά την προσπάθεια της κατασκευής αυτής της κασέτας.



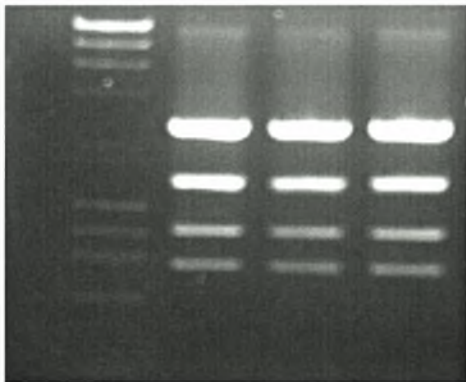
Εικ.3.24: Ηλεκτροφόρηση σε 1,0% πηκτή αγαρόζης διαγνωστική πέψης δύο διαφορετικών κλώνων ο ένας εκ των οποίων περιέχει το αντινοσηματικό ένθεμα (ο πρώτος). Στις πρώτες δύο θέσεις ηλεκτροφορήθηκε πέψη των πλασμιδίων με XbaI/HindIII και παρατηρούμε ότι ο πρώτος κλώνος περιέχει το ένθεμα. Στις δύο επόμενες θέσεις, ηλεκτροφορήθηκε πέψη των δύο αυτών κλώνων με XhoI/XbaI, στα άκρα δηλαδή των δύο ενθεμάτων, και παρατηρείται ότι στο πρώτο κλώνο έχουμε μπάντα 1130bp, όσο δηλαδή τα δύο ενθέματα και το ιντρόνιο μαζί.



Εικ.3.25: Ηλεκτροφόρηση σε 1,0% πηκτή αγαρόζης διαγνωστική πέψης ,πλασμιδίων που είχαν απομονωθεί με την μέθοδο του βρασμού, με XhoI/EcoRI προκειμένου να εντοπιστεί κλώνος που να περιέχει το νοσηματικό ένθεμα. Οι περισσότεροι κλώνοι περιέχουν την επιθυμητή αλληλουχία.



Εικ.3.26: Ηλεκτροφόρηση σε 1,0% πηκτή αραρόζης διαγνωστική πέψη- επιβεβαίωσης πλασμιδίου ενός από τους παραπάνω κλώνους που απομονώθηκε με Kit. Στην πρώτη θέση ηλεκτροφορήθηκε πέψη με XhoI/EcoRI και προκύπτει το νοηματικό ένθεμα(330bp). Στην δεύτερη θέση ηλεκτροφορήθηκε πέψη με XbaI/HindIII και παρατηρείται η ανάλυση των δύο ενθεμάτων(είναι εμφανές το μικρότερο μέγεθος, λόγω εσωτερικών θέσεων περιορισμού), καθώς και το ιντρόνιο(800bp). Στην τρίτη θέση ηλεκτροφορήθηκε πέψη με XhoI/XbaI και παρατήρηση της αναμενόμενης μπάντας των 1460bp.

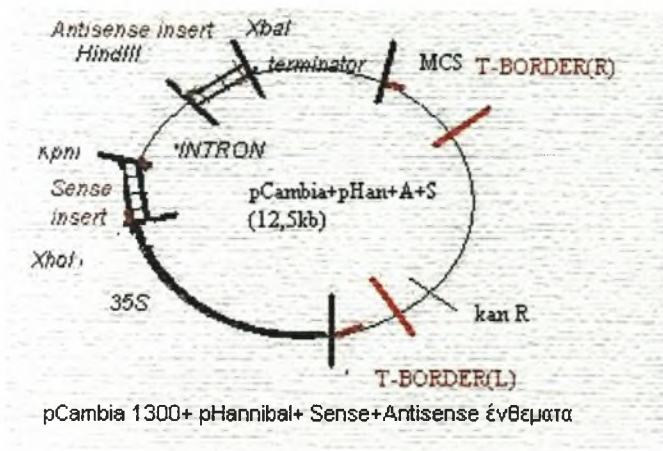


Εικ.3.27: Ηλεκτροφόρηση σε 1,0% πηκτή αραρόζης διαγνωστική πέψη τριών διαφορετικών πλασμιδίων με SacI/HindIII, όπου φαίνεται όπως και στην περίπτωση της πρώτης κατασκευής η διάσπαση της κασέτας που έχει ενσωματωθεί στον pBluescript σε τέσσερα τμήματα.



### (5) Μετασχηματισμός *A.rhizogenes* με τον pCambia1300 που φέρει την κασέτα αποσιώπησης

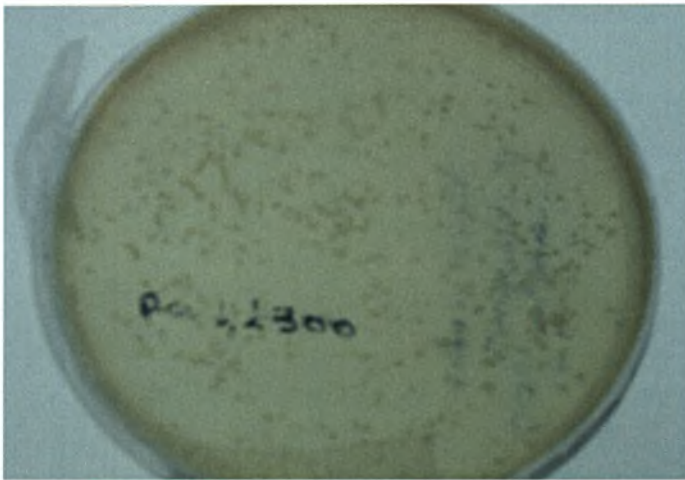
Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή (τμήμα 4), τα βακτήρια του γένους *Agrobacterium* έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν, να τέμνουν και να ενσωματώνουν τμήμα DNA που περιβάλλεται από δεξί και αριστερό συνοριακό άκρο. Συνεπώς, ο επόμενος στόχος ήταν να μετασχηματιστεί κατάλληλο στέλεχος *A.rhizogenes* με τον pCOSC3-3, τον πλασμιδιακό φορέα που φέρει την κατασκευή για την αποσιώπηση του γονιδίου της συνθάσης της λουπεόλης (Εικ.3.28).



Εικ.3.28: Σχέδιο του pCambia 1300 που φέρει την κασέτα αποσιώπησης της συνθάσης της λουπεόλης

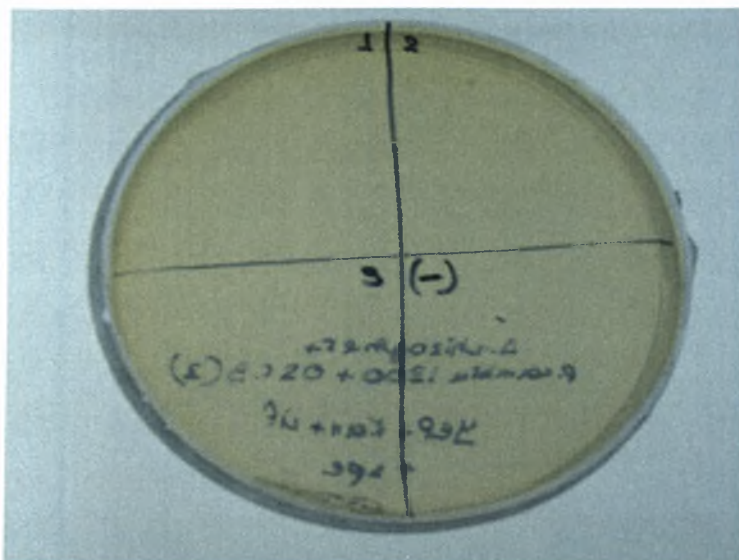
Για τον λόγο αυτό δεκτικά κύτταρα *A.rhizogenes* LBA1334, τα οποία φέρουν το πλασμίδιο Ri της αγροπίνης και φέρουν τα γονίδια rol για την παραγωγή των «hairy root», αλλά και τα vir γονίδια μετασχηματίστηκαν με την μέθοδο «Freeze-Thaw» (Υλικά & Μέθοδοι 1.ζ) με τον pCOSC3-3. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός του *A.rhizogenes* LBA1334 με κενό pCambia 1300, προκειμένου τα φυτά που θα μολυνθούν με αυτό να χρησιμοποιηθούν ως φυτά αναφοράς για την μέτρηση των επιπέδου του μεταγραφώματος της συνθάσης της λουπεόλης. Οι ρίζες φυτών αγρίου τύπου δεν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τον σκοπό αυτό, καθώς οι επαγόμενες από το *A.rhizogenes* ρίζες έχουν αλλαγμένα φυσιολογικά χαρακτηριστικά, εξαιτίας αλλαγής του ισοζυγίου των αυξίνης/κυτοκίνης (Εισαγωγή, 6.β). Ακόμη, πραγματοποιήθηκε και τρίτος μετασχηματισμός *A.rhizogenes* με pCambia 1303 που φέρει το γονίδιο gus, δίνοντας την δυνατότητα να κατανοηθεί ότι το πρωτόκολλο μεταφοράς αλληλουχίας στο φυτό λειτούργησε, μέσω της

ιστοχημικής χρώσης (Υλικά & Μέθοδοι 9). Τα κύτταρα απλώθηκαν σε τρυβλία YEP(Υλικά & Μέθοδοι Πίνακας 4), και πραγματοποιήθηκε τριπλή επιλογή με ριφαμπικίνη, σπεκτινομυκίνη, καναμυκίνη και επώαστηκαν στους 28<sup>0</sup>C για 2 ημέρες. Ανθεκτικότητα στην ριφαμπικίνη προσδίδει αλληλουχία στο χρωμόσωμα του *A.rhizogenes* και με τον τρόπο αυτό είναι σίγουρο ότι πλέον αποκλείονται τα *E.coli*. Η ανθεκτικότητα στην σπεκτινομυκίνη προσδίδεται από το Ri πλασμίδιο, ενώ στην καναμυκίνη από τους φορείς pCambia. Επιλέχθηκε έτσι *A.rhizogenes* στο οποίο έχει εισέλθει και αντιγράφεται το πλασμίδιο που φέρει την κασέτα αποσιώπησης.



Εικ.3.29: Τρυβλίο YEP με spe/rif/kan(250/50/50μg/ml) στο οποίο έχουν απλωθεί τα κύτταρα *A.rhizogenes* LBA1334 που έχουν μετασχηματιστεί με κενό pCambia1300.

Στην συνέχεια, μεταφέρθηκαν μοναδιαίες αποικίες από το τρυβλίο του μετασχηματισμού σε νέο τρυβλίο YEP με τα τρία αντιβιοτικά, προκειμένου να είναι σίγουρο αφενός ότι η μόλυνση θα γίνει με έναν κλώνο και αφετέρου ότι ο κλώνος ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί για την μόλυνση των φυτών έχει ανθεκτικότητα και στα τρία αντιβιοτικά, άρα είναι ο επιθυμητός. Επίσης, όπως φαίνεται στην εικ.3.30 στο τρυβλίο με την τριπλή επιλογή στρώθηκε και ποσότητα των δεκτικών κυττάρων *A.rhizogenes*. Τα δεκτικά κύτταρα δεν αναπτύχθηκαν αποδεικνύοντας ότι μόνο μετά τον μετασχηματισμό με τον pCambia μπορούν να αναπτυχθούν σε τρυβλίο που περιέχει και καναμυκίνη.



Εικ.3.30: Τρυβλίο YEP με *spe/rif/kan*. Στα τρία τμήματα του τρυβλίου(1,2,3) μεταφέρθηκαν μοναδιαίες αποικίες από το τρυβλίο του μετασχηματισμού και μετά από επώαση για 2 ημέρες στους 28°C εμφανίστηκε ανάπτυξη. Στην θέση (-) μεταφέρθηκε ποσότητα δεκτικών κυττάρων και δεν αναπτύχθηκαν.

**(6) Μόλυνση φυτών *Lotus japonicus* με το *A.rhizogenes* που φέρει την κασέτα αποσιώπησης και καλλιέργεια των φυτών για παραγωγή των «hairy roots»**

Στην συνέχεια, τα *A.rhizogenes* μετασχηματισμένα με:

(α) τον pCOSC3-3,

(β) κενό pCambia 1300 και

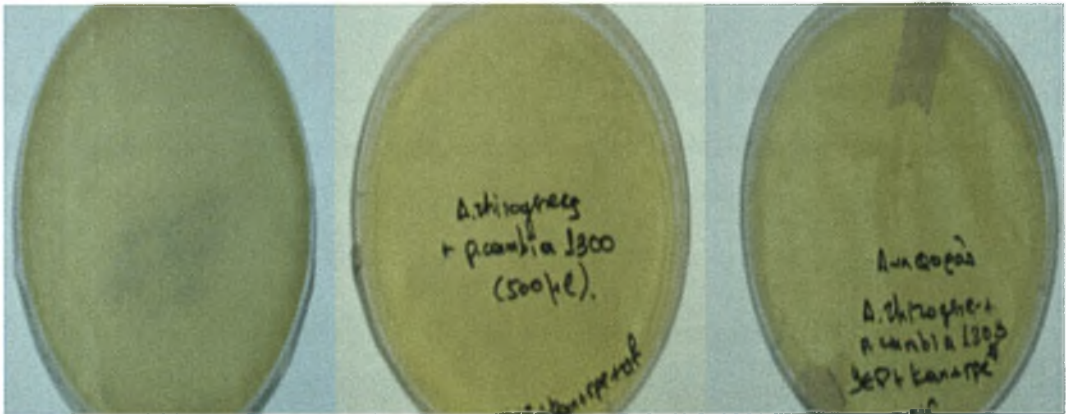
(γ) pCambia 1303

χρησιμοποιήθηκαν για να μολύνουν φυτά *Lotus japonicus* προκειμένου να επαχθεί η δημιουργία των «hairy roots» και να αποκτήσουμε «σύνθετα φυτά», των οποίων η ρίζα έχει ενσωματωμένο στο γονιδίωμα τα αντίστοιχα T-DNA. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικά πρωτόκολλα (Υλικά & Μέθοδοι 7).

### (α) Προετοιμασία του *A.rhizogenes* για την μόλυνση των φυτών

Σύμφωνα με το πρώτο πρωτόκολλο (Υλικά & Μέθοδοι 7α), για την μόλυνση χρησιμοποιήθηκε υγρή καλλιέργεια *A.rhizogenes*. Για τον λόγο αυτό τμήμα της αποικίας του κλώνου 2 (εικ.3.30) μεταφέρθηκε σε 5 ml YEB και αφού παρουσιάστηκε ανάπτυξη, με 100μl αυτής εμβολιάστηκαν 100ml YEB. Με την τελευταία καλλιέργεια έγινε η μόλυνση των φυτών. Η ίδια ακριβώς διαδικασία πραγματοποιήθηκε για τα *A.rhizogenes* μετασχηματισμένα με τον κενό pCambia 1300 και τον pCambia 1303.

Σύμφωνα με το δεύτερο πρωτόκολλο (Υλικά & Μέθοδοι 7β), για την μόλυνση χρησιμοποιήθηκε στερεή καλλιέργεια *A.rhizogenes*. Για τον λόγο αυτό, από τα 5 ml της προηγούμενης βακτηριακής καλλιέργειας στρώθηκαν 500μl σε τρυβλίο YEP με τριπλή επιλογή. Με το ελαιώρημα της καλλιέργειας αυτής έγινε η μόλυνση των φυτών. Όπως και πριν, προετοιμάστηκαν και τα *A.rhizogenes* με τους φορείς αναφοράς.

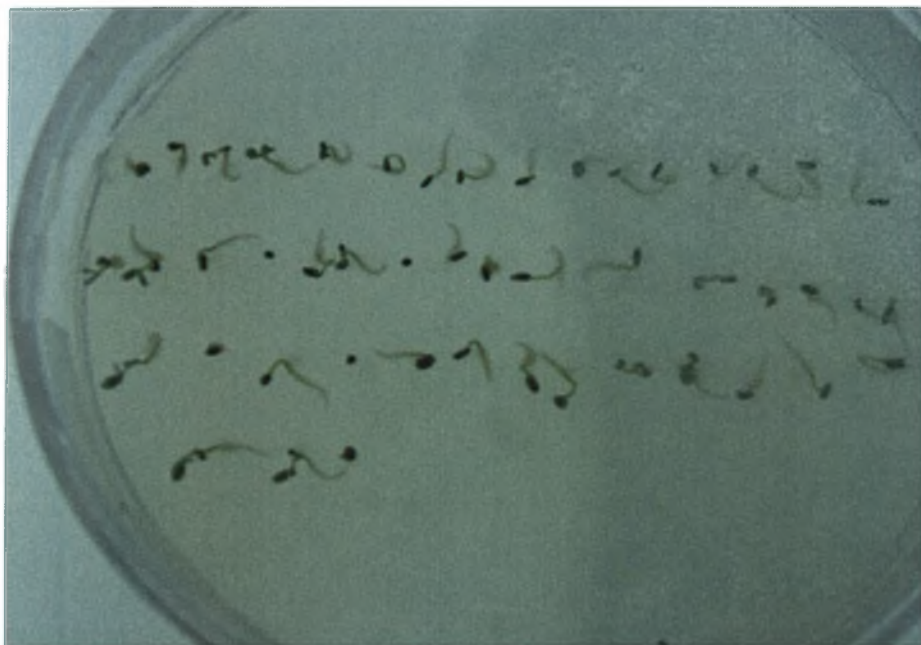


Εικ.3.31: Τρυβλία YEP με spe/rif/kan από τα αριστερά προς τα δεξιά φαίνονται τα τρυβλία στα οποία αναπτύχθηκαν 500μl *A.rhizogenes* pCambia 1300 με την κασέτα αποσιώπησης, *A.rhizogenes* pCambia 1300, *A.rhizogenes* pCambia 1303

Συνεπώς, η μόλυνση των φυτών πραγματοποιήθηκε και στα δύο πρωτόκολλα με τον ίδιο κλώνο *A.rhizogenes*.

## (β) Μόλυνση των φυτών με το *A.rhizogenes* και επαγωγή των «hairy roots»

Σπόροι φυτών *Lotus japonicus* (Υλικά & Μέθοδοι 5) ποικιλίας *Mijakojima MG-20* απολυμάνθηκαν και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με 2 % άγαρ για να βλαστήσουν σε 23<sup>0</sup> C με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι. Μετά από 4 ημέρες τα φυτά που είχαν μήκος ρίζας περίπου 1 cm και ανεπτυγμένες τις κοτυληδόνες (Εικ.3.32) μεταφέρθηκαν σε NLN μέσο (με 1% σουκρόζη και βιταμίνες) (Υλικά & Μέθοδοι 6 α) και αναπτύχθηκαν για 2 ημέρες στους 23<sup>0</sup> C. Η μεταφορά στο νέο μέσο γίνεται προκειμένου τα φυτά να προσαρμοστούν πριν την μόλυνση με το *A.rhizogenes* σε θρεπτικό πλούσιο σε στοιχεία.



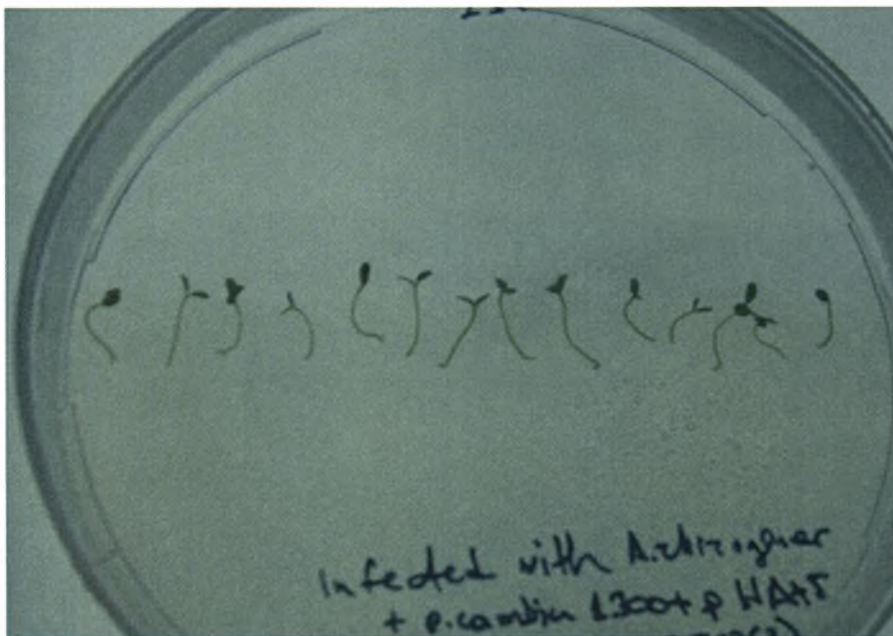
Εικ.3.32: Σπόροι *Lotus japonicus MG-20* αφού προβλάστησαν για 4 ημέρες. Μερικοί σπόροι δεν προβλάστησαν, αλλά οι περισσότεροι ανέπτυξαν ριζίδιο και κοτυληδόνες. Σε μερικά φυτά οι κοτυλυδόνες έχουν ξεδιπλωθεί.

Κατόπιν, στο ύψος του υποκοτυλίου έγινε τομή της ρίζας και ακολούθησε διαδικασία μόλυνσης όπως περιγράφεται στο τμήμα Υλικά & Μέθοδοι 7α με 3 διαφορετικές καλλιέργειες *A.rhizogenes*:

- (α) 100 φυτά με *A.rhizogenes* LBA 1334 μετασηματισμένο με pCASOSC3-3
- (β) 20 φυτά με *A.rhizogenes* μετασηματισμένο με κενό p.Cambia 1300,
- (γ) 10 φυτά με *A.rhizogenes* μετασηματισμένο με τον p.Cambia 1303

Η εκτομή του ριζικού συστήματος γίνεται εξαιτίας του γεγονότος ότι τα βακτήρια του γένους *Agrobacterium* για να μπορέσουν να μολύνουν το φυτό απαιτείται η παρουσία φαινολικών ουσιών, οι οποίες παράγονται από τις πληγές των δικότυλων φυτών(Εισαγωγή 6α). Ο λόγος για τον οποίο η τομή της ρίζας πραγματοποιείται στο ύψος του υποκοτυλίου είναι ότι έχει βρεθεί ότι τα κύτταρα της περιοχής αυτής είναι σε θέση να ανταποκριθούν στα rol γονίδια του *A.rhizogenes* και έτσι να προκύψει το διαγονιδιακό ριζικό σύστημα. Ωστόσο, δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη η μοριακή αιτιολόγηση για το γεγονός αυτό. Μία πιθανότητα είναι στην περιοχή του υποκοτυλίου να υπάρχουν μη διαφοροποιημένα κύτταρα που να μπορούν να προγραμματιστούν από τα γονίδια του *A.rhizogenes* για την παραγωγή των «hairy roots».

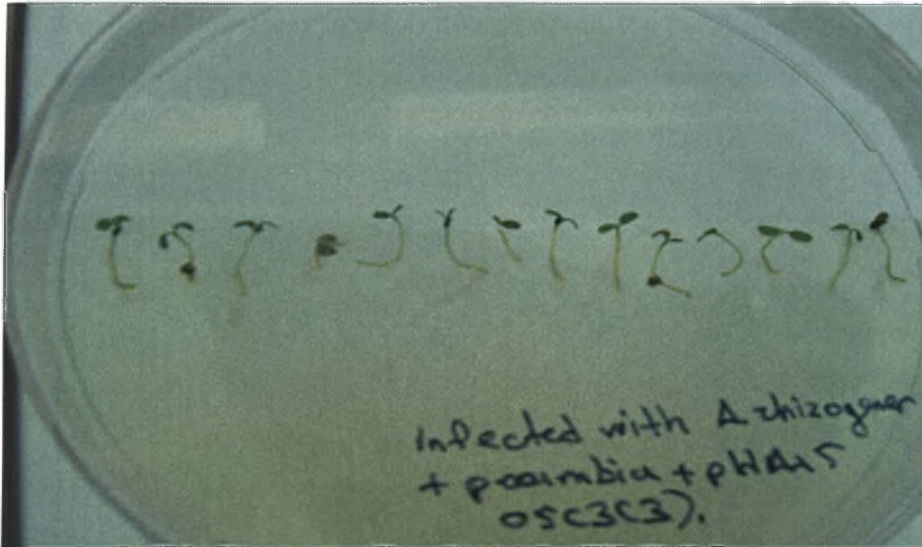
Τα μολυσμένα φυτά μεταφέρθηκαν σε NLN μέσο (με 1% σουκρόζη και βιταμίνες) και επωάστηκαν στους 23<sup>0</sup> C για 2 ημέρες. Τα φυτά φαίνονται στην Εικ. 3.33. Τα τρυβλία αυτή τη φορά τοποθετήθηκαν σε οριζόντια θέση προκειμένου να συνεχίσει να υπάρχει μεγάλη ποσότητα του βακτηρίου στο σημείο της πληγής.



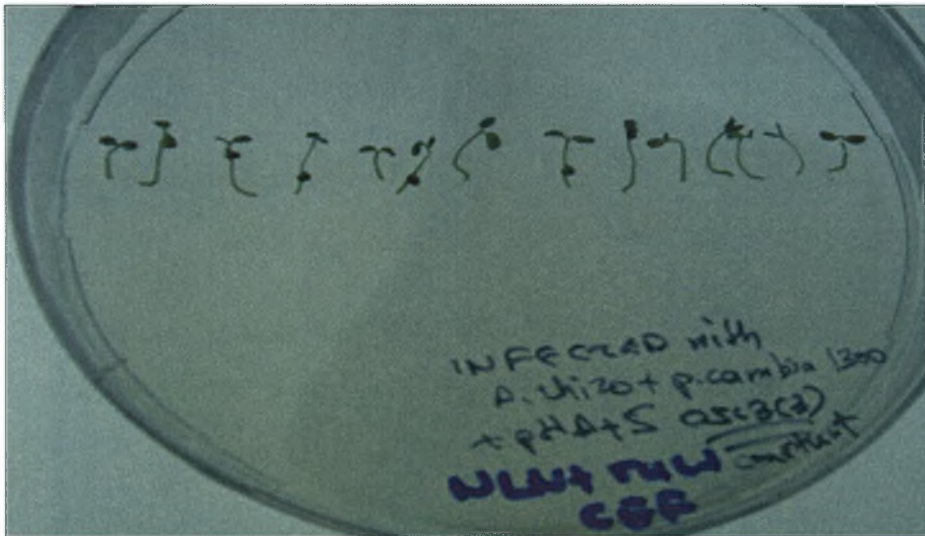
Εικ.3.33: Φυτά με κομμένη την ρίζα στο ύψος του υποκοτύλιου και μολυσμένα με *A.rhizogenes* pCambia 1300 με την κασέτα αποσιώπησης σε NLN μέσο

Μετά την πάροδο 2 ημερών τα φυτά ξεπλύθηκαν 8 διαδοχικές φορές σε αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O και τελικά αφέθηκαν για 1 λεπτό σε διάλυμα σεφοταξάμης (200 μg/ml). Η διαδικασία αυτή γίνεται για να απομακρυνθεί το *A.rhizogenes* καθώς τα

φυτά ήταν καλυμμένα με τα βακτήρια (Εικ.3.34) και θεωρείται πως οι 2 ημέρες που μεσολάβησαν ήταν αρκετές για να ολοκληρώσει το *A.rhizogenes* τον κύκλο του και να ενσωματώσει τα T-DNA στο φυτικό γονιδίωμα. Στη συνέχεια, τα φυτά τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί για να απορροφηθούν τα υγρά και μεταφέρθηκαν σε νέο NLN μέσο (με 1% σουκρόζη και βιταμίνες) που περιείχε και σεφοταξάμη συγκέντρωσης 200 µg/ml (Ει.3.35). Τα φυτά αφέθηκαν να αναπτυχθούν στους 23<sup>0</sup> C για 2 ημέρες. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν υπό γωνία.



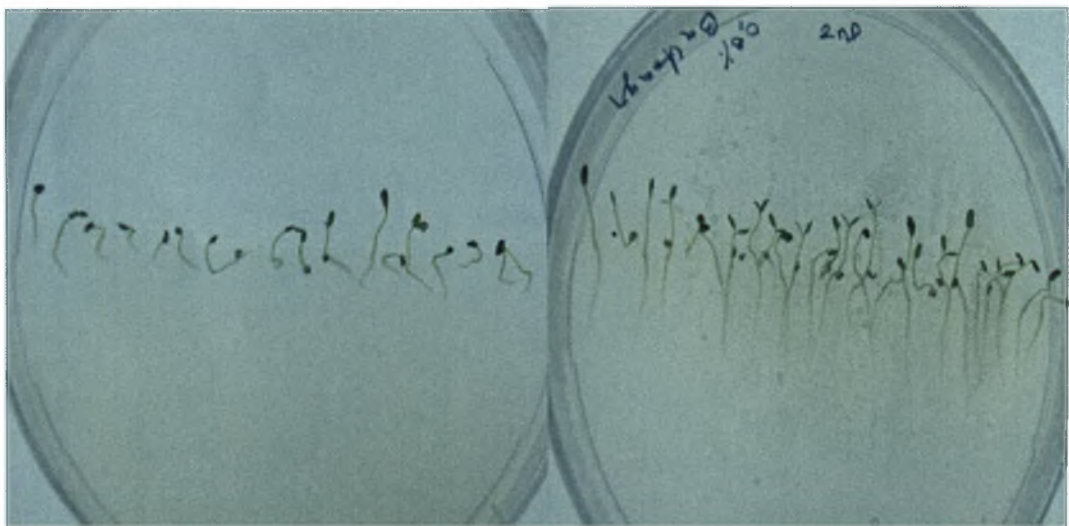
Εικ.3.34: Φυτά σε NLN μέσο μετά την πάροδο 2 ημερών από την μόλυνση με το *A.rhizogenes*. Φαίνεται ότι τα φυτά είναι καλυμμένα με τα βακτήρια.



Εικ.3.35: Φυτά σε NLN μέσο με σεφοταξάμη μετά το ξέπλυμα των βακτηρίων. Φαίνεται ότι τα φυτά δεν είναι πλέον καλυμμένα με τα βακτήρια.

Στην συνέχεια, τα φυτά μεταφέρθηκαν σε B5/2 μέσο (1% σουκρόζη, βιταμίνες και σεφοταξάμη 200  $\mu\text{g/ml}$ ) (Υλικά & Μέθοδοι 6 β). Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν υπό γωνία στους 20<sup>0</sup> C και αφέθηκαν για 12 ημέρες προκειμένου να αναπτυχθούν τα «hairy roots». Κατά το διάστημα αυτό τα ριζικά τριχίδια που αναπτύχθηκαν πάνω από το σημείο κοπής κόβονταν. Τα φυτά που πλέον είχαν ριζικό σύστημα 2 cm μεταφέρθηκαν σε Jensen medium και αφέθηκαν να αναπτυχθούν και να απορροφήσουν μικροστοιχεία και μακροστοιχεία για 6 ημέρες

Στο εναλλακτικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε οι αποστειρωμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με 0,8% άγαρ. Τα τρυβλία καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο έτσι ώστε να βρίσκονται στο σκοτάδι και τοποθετήθηκαν υπό γωνία σε θάλαμο ανάπτυξης στους 23<sup>0</sup> C για 2 ημέρες. Οι σπόροι έτσι προβλαστάνουν υπό την επίδραση της βαρύτητας. Μετά την πάροδο 2 ημερών (Εικ.3.36), το αλουμινόχαρτο απομακρύνεται και αφήνονται να αναπτυχθούν σε φωτοπερίοδο 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι στους 23<sup>0</sup> C για 2 ημέρες (Εικ.3.36).



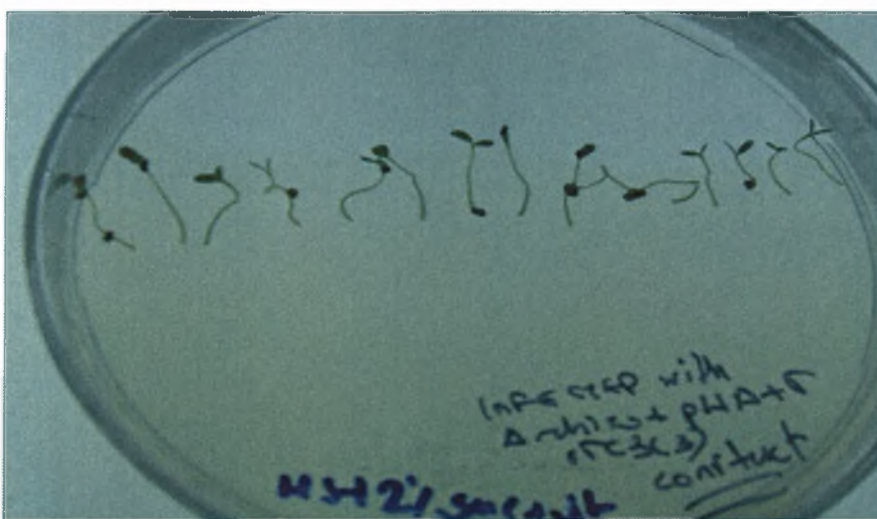
Εικ.3.36: Αριστερά φαίνονται σπόροι *Lotus japonicus* MG-20 αφού προβλάστησαν για 2 ημέρες σε 0,8% άγαρ στο σκοτάδι και υπό την επίδραση της βαρύτητας. Δεξιά φαίνονται οι ίδιοι σπόροι μετά το πέρασμα άλλων δύο ημερών και καθώς βρισκόταν πλέον στο φως. Παρατηρούνται οι ανεπτυγμένες κοτυληδόνες και το ριζίδιο.



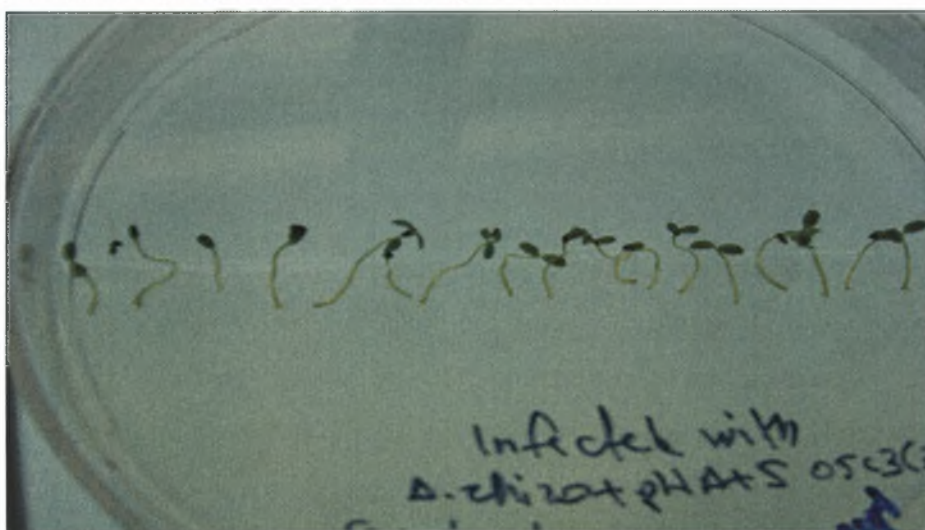
Τα φυτά μολύνθηκαν με εναιώρημα στερεής καλλιέργειας *A.rhizogenes* με τρόπο που περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι στην 7β ενότητα. Συγκεκριμένα μολύνθηκαν:

- α) 100 φυτά με *A.rhizogenes* που περιείχε τον pCASOSC3-3
- β) 30 φυτά με *A.rhizogenes* που περιείχε το κενό p.Cambia 1300
- γ) 20 φυτά με *A.rhizogenes* που περιείχε το p.Cambia 1303.

Μετά την κοπή και τη μόλυνση τα φυτά μεταφέρθηκαν σε MS μέσο (Εικόνα 3.37), τα τρυβλία καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν οριζόντια στο θάλαμο ανάπτυξης για 2 ημέρες. Κατόπιν το αλουμινόχαρτο αφαιρέθηκε και αφέθηκαν να αναπτυχθούν για άλλες 3 ημέρες (Εικ.3.38).



Εικ.3.37: Φυτά με κομμένη την ρίζα στο ύψος του υποκοτύλιου και μολυσμένα με *A.rhizogenes* pCambia 1300 με την κασέτα αποσιώπησης σε MS μέσο



Εικ.3.38: Φυτά σε MS μέσο μετά την πάροδο 2 ημερών από την μόλυνση με το *A.rhizogenes*. Φαίνεται ότι τα φυτά είναι καλυμμένα με τα βακτήρια.

Κατόπιν, τα φυτά μεταφέρθηκαν σε B5 μέσο που περιείχε και σεφοταξάμη για να θανατωθεί το *A.rhizogenes*. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν υπό γωνία και αφέθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης για μία εβδομάδα προκειμένου να αναπτυχθούν τα “hairy roots”. Τα φυτά μεταφέρθηκαν σε Jensen μέσο για μία εβδομάδα προκειμένου να απορροφήσουν μικροστοιχεία και μακροστοιχεία.



Εικ.3.39: Φυτά σε Jensen μέσο μετά την πάροδο μίας εβδομάδας. Φαίνεται χαρακτηριστικά η ανάπτυξη των «hairy roots».

## 7. Μόλυνση των «hairy roots» με *Mesorhizobium loti* για την επαγωγή της δημιουργίας φυματίων

Πραγματοποιήθηκε μόλυνση με *Mesorhizobium loti* στέλεχος *Rfa*, προκειμένου να επαχθεί η δημιουργία φυματίων. Ο λόγος για τον οποίο θέλουμε να σχηματιστούν φυμάτια είναι για να μελετήσουμε τον ρόλο της συνθάσης της λουπεόλης και κατ' επέκταση της λουπεόλης στον σχηματισμό αυτών. Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή(Ενότητα 4) τα επίπεδα του μεταγραφήματος της συνθάσης της λουπεόλης είναι υψηλά στα φυμάτια όχι μόνο του *Lotus* αλλά και σε άλλα ψυχανθή φυτά, εγείροντας ,έτσι, υπόνοιες για πιθανό ρόλο της λουπεόλης στην δημιουργία των φυματίων. Προκειμένου, λοιπόν, να μελετηθεί αυτή η πιθανότητα, τα

μεταμορφωμένα «hairly roots» με την κασέτα αποσιώπησης για την συνθάση της λουπεόλης μολύνθηκαν με το ριζόβιο. Στόχος είναι η παρατήρηση ανατομικών και λειτουργικών διαφορών στα φυμάτια των παραπάνω φυτών και φυτών αναφοράς (χωρίς την κασέτα αποσιώπησης, μολυσμένα με *A.rhizogenes* με κενό φορέα). Οι διαφορές αυτές πιθανώς να ανάγονται στην μείωση των επιπέδων του ενζύμου που καταλύει στην παραγωγή της λουπεόλης από πρόδρομες ενώσεις.

Τα φυτά μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο μείγμα περλίτη- βερμικουλίτη(1:1) και αμέσως πριν το φύτεμα τους πραγματοποιήθηκε μόλυνση με 500-750 μl εναιωρήματος σε PBS ριζόβιου κατά μήκος ολόκληρης της ρίζας(Υλικά & Μέθοδοι 8 Εικ.3.40). Τα φυτά αφήθηκαν για 3 εβδομάδες να αναπτυχθούν προκειμένου να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός των φυματίων.



Εικ.3.40: Αμέσως μετά την απομάκρυνση των φυτών από το Jensen μέσο, τα φυτά φυτεύτηκαν στο μίγμα περλίτη- βερμικουλίτη και έγινε ταυτόχρονα η μόλυνση με το ριζόβιο κατά μήκος της ρίζας.

Κατά το διάστημα αυτό ποτιζόταν κατά τακτά διαστήματα με θρεπτικό διάλυμα Holand χωρίς άζωτο (Υλικά & Μέθοδοι 6δ) περνώντας διαδοχικά από 25% σε 100% με ενδιάμεσα ποτίσματα με απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Ο λόγος για τον οποίο τα φυτά ποτίστηκαν με Holand χωρίς πηγή αζώτου είναι για να υπάρχει ανάγκη στο φυτό να

αναπτύξει συμβιωτική σχέση με το ριζόβιο ώστε να μπορέσει να αποκτήσει άζωτο. Ο περλίτης και ο βερμικουλίτης είναι ανόργανα υποστρώματα, που είναι ιδανικά για υδροπονικές καλλιέργειες φυτών, καθώς δίνουν την δυνατότητα να ελέγχονται τα θρεπτικά συστατικά που προστίθενται. Επιπλέον, ο βερμικουλίτης παρουσιάζει καλή υδατοχωρητικότητα, συγκρατεί δηλαδή υγρασία, ενώ ο περλίτης εξαιτίας της δομής του συμβάλει στο καλό αερισμό της ρίζας και των φυματίων.

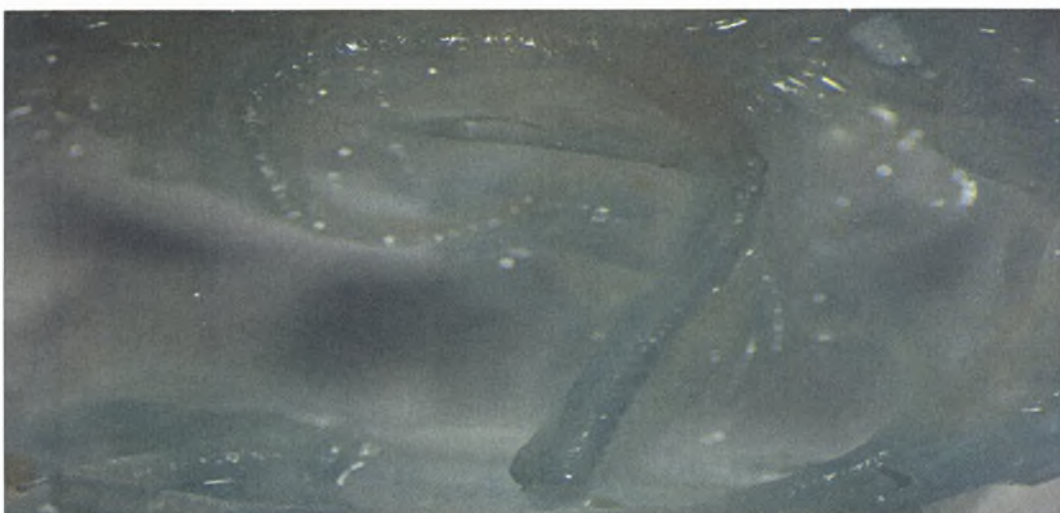


Εικ.3.41: Τα φυτά αφού μολύνθηκαν με το ριζόβιο και καλύφθηκαν οι ρίζες τους.

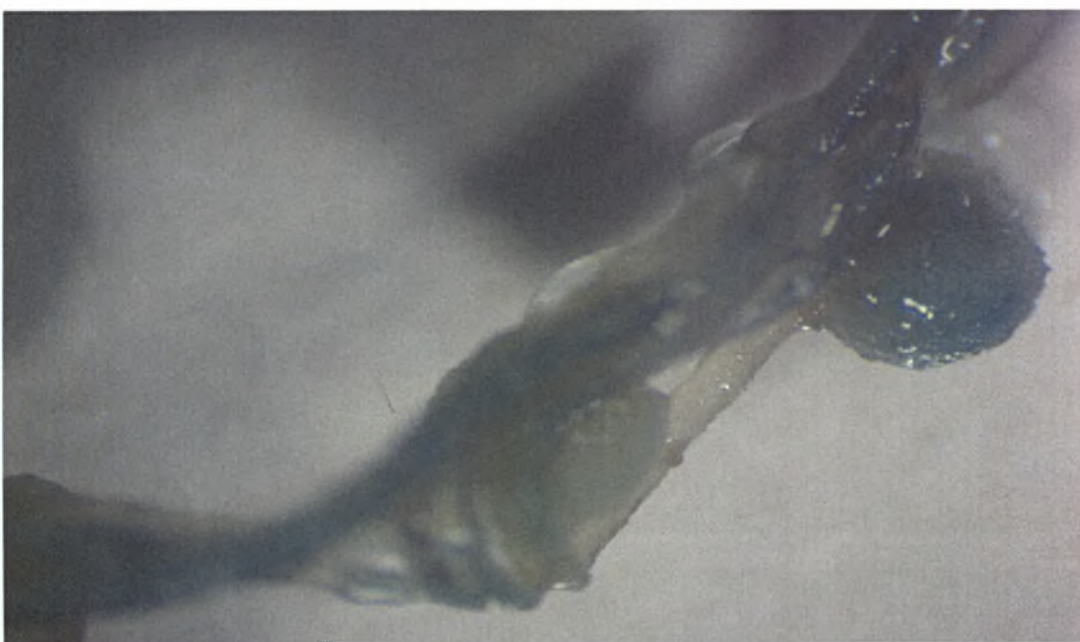
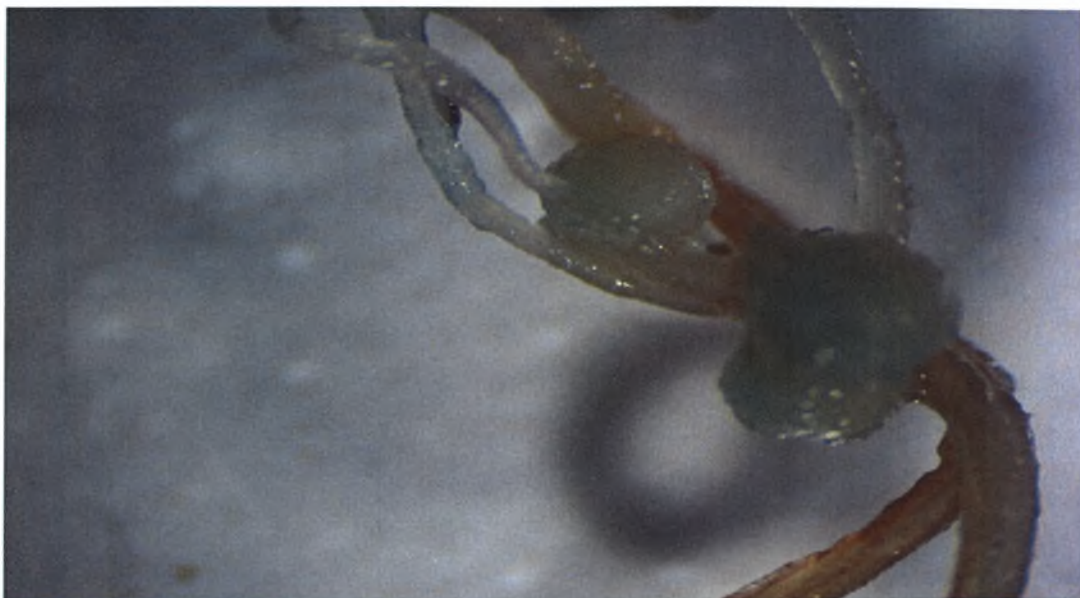
## 8. Χρώση *gus* φυτών αναφοράς

Μετά την πάροδο τριών εβδομάδων, όπου ολοκληρώθηκε ο σχηματισμός των φυματίων, πραγματοποιήθηκε χρώση *gus* (Υλικά & Μέθοδοι 9) των ριζών των οποίων η ανάπτυξη τους είχε επαχθεί από *A.rhizogenes* μετασηματισμένο με τον πλασμιδιακό φορέα pCambia 1303 (Υλικά & Μέθοδοι 1α). Συγκεκριμένα, οι μισές ρίζες από το σύνολο των ριζών στις οποίες έγινε η χρώση βάφτηκαν μπλε. Ακόμη, βάφτηκαν αρκετά φυμάτια (Εικ. 3.42). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι για να αποκτήσει δραστηριότητα η β-γλουκουρονιδάση που κωδικοποιείται από τον pCambia 1303 απαιτείται η γλυκοζυλίωση της, γίνεται αντιληπτό ότι η παρουσία του ενζύμου της β-γλουκουρονιδάσης οφείλεται σε έκφραση της ύστερα από ενσωμάτωση στο φυτικό γένωμα. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι η διαδικασία μεταφοράς του T-DNA από το

*A.rhizogenes* στο γονιδίωμα του φυτού με τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έχει επιτευχθεί για ένα τμήμα των φυτών.



Εικ. 3.42: Τμήμα «hairy root», η ανάπτυξη του οποίου είχε επαχθεί από *A.rhizogenes* μετασηματισμένο με pCambia 1303 μετά από ιστοχημική χρώση gus. Παρατηρείται χαρακτηριστικά η βαφή χρώματος μπλε σε όλο το μήκος του ριζικού τριχιδίου αλλά και σε φυμάτια.



Εικ. 3.42: Τμήματα «hairy root», η ανάπτυξη των οποίων είχε επαχθεί από *A. rhizogenes* μετασηματισμένο με pCambia 1303 μετά από ιστοχημική χρώση gus. Παρατηρείται χαρακτηριστικά η βαθιά χρώματος μπλε κατά μήκος του ριζικού τριχιδίου αλλά και σε φυμάτια.

## 9. Εύρεση φυτών με ενσωματωμένη την κασέτα αποσιώπησης

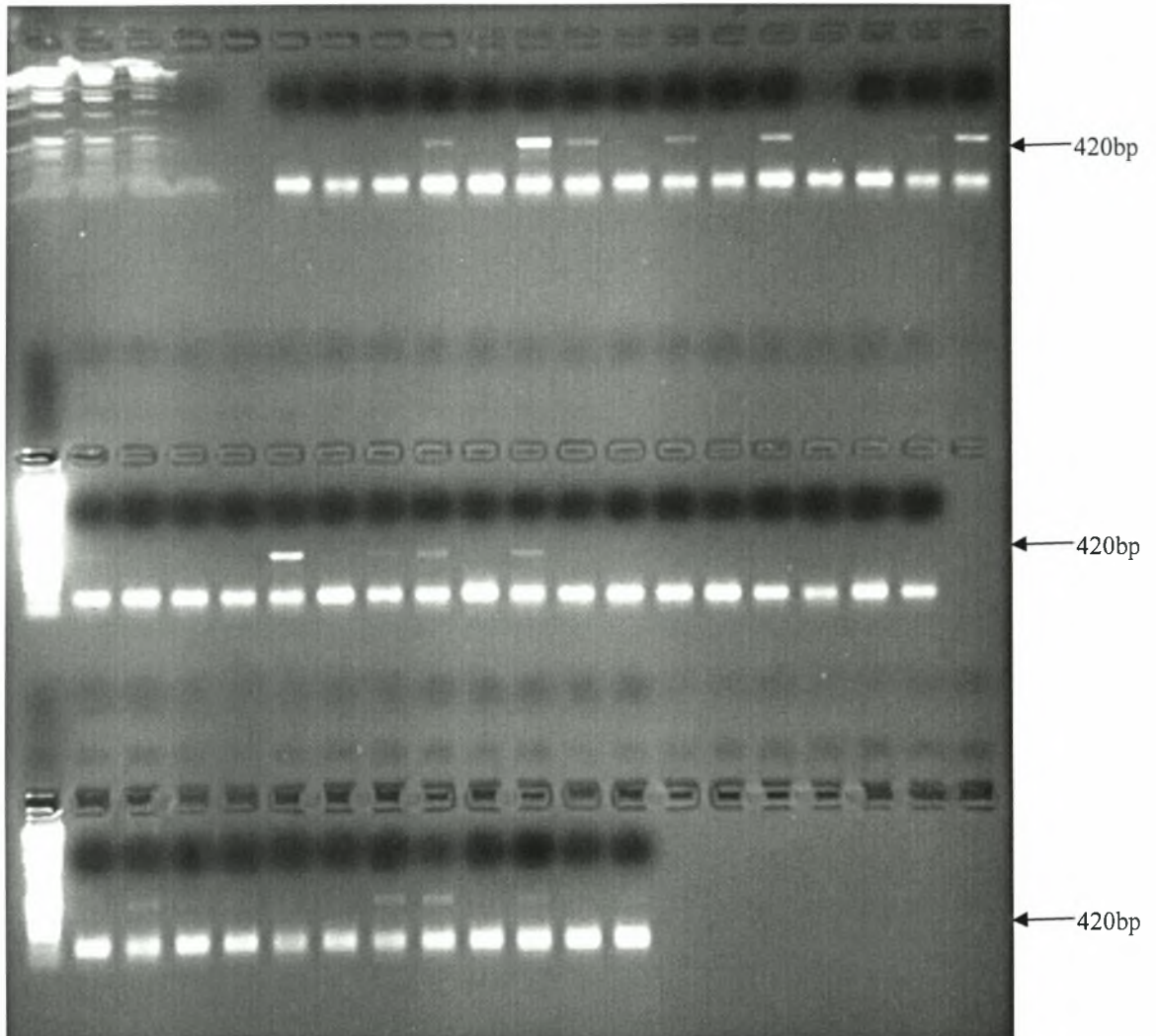
Ο επόμενος στόχος ήταν να βρεθούν τα επιτυχώς μετασχηματισμένα φυτά με την κασέτα αποσιώπησης από το σύνολο των φυτών που μολύνθηκαν με *A.rhizogenes* με τον pCASOSC3-3. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία μετά από τέσσερις εβδομάδες από τη μεταφορά τους στον περλίτη-βερμικουλίτη και την ταυτόχρονη μόλυνση τους με το ριζόβιο. Συγκεκριμένα, αφαιρέθηκε μικρό τμήμα από την ρίζα του κάθε φυτού και από αυτό απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA (Υλικά & μέθοδοι 4.η.) Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των φυματίων που είχαν αναπτυχθεί σε κάθε φυτό, αλλά και διαχωρισμός τους σε κλάσεις ανάλογα με τον φαινότυπο των «hairy roots»: στην Α κλάση κατατάχθηκαν 47 φυτά που είχαν έντονα διακλαδισμένα και μεγάλα σε μήκος «hairy roots» (Εικ. 3.43), στην Β κλάση κατατάχθηκαν 75 φυτά με λιγότερο «ζωηρά» «hairy roots» και στην C κλάση κατατάχθηκαν 16 φυτά με είτε πολύ μικρή ρίζα είτε η ρίζα να έχει αναπτυχθεί από σημείο πιο πάνω από την θέση κοπής. Ο λόγος του διαχωρισμού κατά κλάσεις είναι ότι στα φυτά με έντονα ανεπτυγμένο το «hairy root» φαινόμενο αναμένεται θεωρητικά να έχει επιτύχει η διαδικασίας μεταφοράς του διαγονιδίου από το *A.rhizogenes*.



Εικ. 3.43: Φυτό Α κλάσης. Φαίνεται το έντονα διακλαδισμένο hairy root

Προκειμένου, λοιπόν, να βρεθούν τα φυτά που περιέχουν την κασέτα αποσιώπησης από το σύνολο των 137 φυτών πραγματοποιήθηκε σάρωση στο γονιδιωματικό τους DNA με εκκινητές που στοχεύουν στον ιντρόνιο του rHannibal και στα ενθέματα. Συγκεκριμένα, τα 137 φυτά ομαδοποιήθηκαν κατά πέντε και

πραγματοποιήθηκε PCR με την χρήση εκκινητών που έχουν ομολογία με τμήματα της κασέτας αποσιώπησης. Το αποτέλεσμα ήταν σε 18 πεντάδες να υπάρχει προϊόν PCR. Κατόπιν, έγινε σάρωση μεμονωμένων φυτών με τους ίδιους εκκινητές και το αποτέλεσμα ήταν σε 18 γονιδιωματικά DNA να υπάρχει ενίσχυση τμήματος της κασέτας αποσιώπησης(Εικ.3.44)



Εικ. 3.44: Ηλεκτροφόρηση σε 1,2 % πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR από την σάρωση μεμονωμένων φυτών με εκκινητή τον οπισθόδρομο του ενθέματος και τον εκκινητή που έχει ομολογία με το τμήμα του ιντρονίου που βρίσκεται στην θέση εισχώρησης του αντι-νοηματικού ενθέματος.



## 10. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Αρχικά, παρατηρήθηκε το θεωρητικά αναμενόμενο αποτέλεσμα, κατά το οποίο φυτά με έντονα ανεπτυγμένα και διακλαδισμένα «hairy roots» έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να έχουν ενσωματωμένο στο γονιδίωμα τους το T-DNA. Συγκεκριμένα, από τα 18 φυτά στα οποία ενσωματώθηκε η κασέτα αποσιώπησης 9 άνηκαν στην Α κλάση, 8 στην Β και μόνο 1 στην C κλάση.

Ο στόχος, λοιπόν, είναι να γίνει ανάλυση αριθμητική, μορφολογική, λειτουργική των φυματίων που αναπτύχθηκαν στις μεταμορφωμένες ρίζες. Αρχικά, ο αριθμός των φυματίων που αναπτύχθηκαν στις «hairy root» ρίζες που η ανάπτυξη τους είχε επαχθεί από το *A.rhizogenes* είναι πολύ μικρότερος συγκριτικά με τα φυμάτια που αναπτύχθηκαν σε ρίζες φυτών αγρίου τύπου.. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς οι ρίζες που επάγονται από το *A.rhizogenes* έχουν τροποποιημένη φυσιολογία.

Όσον αφορά τα φυμάτια των ριζών που έχει ενσωματωθεί η κασέτα αποσιώπησης, ανέπτυξαν κατά μέσο όρο 2,5 φυμάτια ανά φυτό με τυπική απόκλιση 0,58. Ο αριθμός των φυματίων στα φυτά αναφοράς, δηλαδή σε αυτά που η ανάπτυξη των ριζών είχε επαχθεί από *A.rhizogenes* με κενό πλασμιδιακό φορέα pCambia 1300 είναι 1,42 με τυπική απόκλιση 0,41. Σε αντιδιαστολή, στις ρίζες των οποίων η ανάπτυξη είχε επαχθεί από *A.rhizogenes* με pCambia 1303 καταμετρήθηκε αριθμός φυματίων με μέσο όρο 8,55 (SD=0,68). Η διαφοροποίηση που παρατηρείται στον αριθμό των φυματίων που αναπτύσσονται στις ρίζες αναφοράς (ρίζες που επάχθηκαν από *A.rhizogenes* με κενό pCambia 1300 και ρίζες που επάχθηκαν από *A.rhizogenes* με pCambia 1303) είναι πιθανόν να οφείλεται στο ότι τα «hairy root» που επάχθηκαν από τον κενό pCambia 1300 παρουσίαζαν μικρότερη ανάπτυξη συγκριτικά με τα άλλα αναφοράς. Αυτό ίσως να επηρέασε τον αριθμό των φυματίων που αναπτύχθηκαν τελικά από την μόλυνση με το ριζόβιο.

Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι σε αρκετές ρίζες των φυτών με την κασέτα αποσιώπησης παρατηρήθηκαν φυμάτια με διαφορετική μορφολογία. Πιο ειδικά, παρατηρήθηκαν μικρά και ατροφικά φυμάτια.

Ωστόσο, στην συγκεκριμένη μελέτη, αφού σε κάθε φυτό η ενσωμάτωση του T-DNA έχει γίνει τυχαία σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος, ίσως ο μέσος όρος του αριθμού των φυματίων να μην δίνει ουσιαστικές πληροφορίες. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η ενσωμάτωση ενός γονιδίου στο γονιδίωμα δεν σημαίνει απαραίτητα ότι συμπεριλαμβάνει και την έκφραση αυτού, καθώς εξαρτάται από την

θέση ενσωμάτωσης στο γένωμα. Πρόκειται για το φαινόμενο της επίδρασης λόγω θέσης (Position Effect Variegation, PEV), κατά την οποία η έκφραση ενός γονιδίου εξαρτάται από τις γειτονικές περιοχές. Με αυτό το σκεπτικό, καταμετρήθηκαν από τα 18 φυτά που έχουν ενσωματωμένη την κασέτα αποσιώπησης, τα 7 να μην έχουν φυμάτια, τα 6 να έχουν από 1 έως 3 και 5 φυτά να έχουν πάνω από τρία φυμάτια. Στην παρούσα φάση, δεν μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα για το ποιος φαινότυπος είναι αυτός που προκύπτει από την αποσιώπηση της συνθάσης της λουπεόλης.

### **11. Μελλοντική εργασία**

Ο άμεσος στόχος είναι να γίνει προσδιορισμός των επιπέδων του μεταγραφήματος της συνθάσης της λουπεόλης στις ρίζες και στα φυμάτια φυτών με την κασέτα αποσιώπησης και φυτών αναφοράς. Η διαδικασία αυτή κρίνεται απαραίτητη, προκειμένου να βρεθούν τα φυτά, από το σύνολο των 18 φυτών που έχουν ενσωματωμένη την κασέτα αποσιώπησης, στα οποία έχει αποσιωπηθεί η συνθάση της λουπεόλης. Μετά την εύρεση αυτών των φυτών θα είναι δυνατόν να βρεθεί εάν υπάρχει συσχετισμός μεταξύ της δράσης της συνθάσης της λουπεόλης και τον αριθμό των φυματίων που αναπτύσσονται.

Ένας δεύτερος στόχος είναι στα παραπάνω φυμάτια να γίνει στερεοσκοπική παρατήρηση αυτών για την εύρεση μορφολογικών αλλαγών. Ο τρίτος στόχος αφορά την μελέτη της λειτουργικότητας αυτών των φυματίων με την δοκιμή της αζωτοδέσμευσης. Μελετώντας, λοιπόν, τα φυμάτια αυτά θα είναι δυνατόν να αναγνωριστεί με ποιόν τρόπο συμβάλλει η συνθάση της λουπεόλης ως πρώιμη νοντουλίνη στην δημιουργία των φυματίων. (Εισαγωγή τμήμα 4 & 7).

Επιπλέον, θα μπορούσε να γίνει *in situ* υβριδισμός για την ανίχνευση του μεταγραφήματος της συνθάσης της λουπεόλης στα φυμάτια που θα βρεθεί ότι έχει γίνει αποσιώπηση της συνθάσης της λουπεόλης.

Τμήματα των ριζών και των φυματίων θα μπορούσαν θεωρητικά να δώσουν ένα νέο φυτό που θα είχε πλέον την κασέτα αποσιώπησης για την συνθάση της λουπεόλης σταθερά ενσωματωμένη σε όλα τα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή στηρίζεται στην ξεχωριστή ιδιότητα των φυτών, την ολοδυναμικότητα (*totipotency*), κατά την οποία

οποιοδήποτε τμήμα του φυτού εάν βρεθεί στο κατάλληλο μέσο (π.χ. MS) είναι δυνατό να αποδιαφοροποιηθεί και να δώσει γένεση σε νέο φυτό.

Τέλος, σημαντικό είναι ο φαινότυπος που τελικά θα προκύψει από την απουσία της συνθάσης της λουπεόλης να επιβεβαιωθεί επαναλαμβάνοντας την διαδικασία χρησιμοποιώντας μία δεύτερη κατασκευή( Αποτελέσματα τμήμα 4), δηλαδή εκκινητές που να έχουν ομολογία με διαφορετική περιοχή του mRNA της συνθάσης της λουπεόλης. Με τον τρόπο αυτό, θα είναι βέβαιο ότι ο προκύπτων φαινότυπος άρα και τα συμπεράσματα για την λειτουργική σημασία της συνθάσης της λουπεόλης θα είναι έγκυρα.

## IIAPAPTHMA I

> lupeol synthase [*Lotus japonicus*] OSC3

MWKLKVAEGGKGLVSVSNFGRQHWVFDNAGTPQEHEETERMRQEFTKNRFSIKQSADLLMRMQLRKENPCGPIPPAVKLRDVEK  
VTAEALITTIIRRSITFYSSIQAHDGHWPAESAGPLFFVQPLVMALYITGSLDDVLGPQHKKIIRYLYNHQNEDEGGWGFHIEGHS  
MFGSALSyalRLVGLGQSLDEGEDMAVARGRkWILDHGGLVAIPSWGKFWVTVLGVYEWGSGCNPLPPEFWLLPKIFPIHPGKMLCYC  
RLVYMPMSYLYGKRFVGPITALVRSRKLKELYNEPYDRVDNKNARNTVAKEDLYYPHPLIQDMLWGLFHHVGERVLTNWPFSMLRQK  
AIEVAINHVRYEDETRYLCIGSVEKVLCLIAVWVEDPNSEAYKLHLARIIDYFWLAEDGLKIQSFGCQMWDAFAIQAILSGNVS  
EYEGPTLKAHFFVKASQVRENPSGDFKAMYRHISKGAWTFMSMDHGWQVSDCTAEGKVALLLSEMSDDLVGAKMETEQFYDAVN  
VILSLQSSNGGFPWEPQRAYQWLEKFNPTFEFFETLIEREYVECTGSAMQALALFRKLYPKHRRKEIDRCISKAIRYIENTQNP  
GSWYGCWGCICYTYGTWFAVEGLTACGKNFQNSVTLRRACKFLLSKQLPNGGWGESYLSQDKVYTNIEGKRANLVQSSWALLSLMR  
AGQAEIDPTPIHRGIRLLINSQMEDGDFPQOEITGVFMRNCTLNYSYRNIFPIWALGEYRRRVLCA

> lupeol synthase [*Glycyrrhiza glabra*]

MWKLKIGEGGAGLISVNNFGRQHWVFDNAGTPQEHAETERLRREFTKNRFSIKQSADLLMRMQLRKENHYGTNNNIPAAVKLSD  
AENITVEALVTTITRAISFYSSIQAHDGHWPAESAGPLFFLQPLVMALYITGSLDDVLGPEHKKIIRYLYNHQNEDEGGWGFHIEG  
HSTMFSGALSVALRILGEGPQDKAMAKGRkWILDHGGLVAIPSWGKFWVTVLGAYEWGSGCNPLPELWLLPKFAPFHPGKMLCYC  
RLVYMPMSYLYGKRFVGPITALIRSLREELYNEPYQINWNTARNTVAKEDLYYPHPLIQDMLWGLFHHVGERFLNCWPFMSLRK  
ALEIAINHVHYEDENSRYLCIGSVEKVLCLIAVWVEDPNSEAYKLHLARIIDYFWLAEDGLKIQSFGCQMWDAFAIQAILACNVS  
EYEGPTLKAHFFVKASQVRENPSGDFNAMYRHISKGAWTFMSMDHGWQVSDCTAEGKVALLLSEMPSELVGGKMETERFYDAVN  
VILSLQSSNGGFPWEPQKAYRWLEKFNPTFEFFETMIEREYVECTGSAMQGLALFRKQFPQHRKSEIDRCIAKAIKYIENTQNP  
GSWYGCWGCICYTYGTWFAVEGLTACGKNCHNSLSLRKACQFLLSKQLPNAWGYESYLSQNKVYTNIEGKRANLVQSSWALLSLTH  
AGQAEIDPTPIHRGMKLLINSQMEDGDFPQOEITGVFMRNCTLNYSYRNIFPIWAMGEYRRRVLCA

> lupeol synthase [*Betula platyphylla*]

MWKLKIAEGGPGLVSGNDFGRQHWVFDNAGTPQERAEVEKREEFKTRNFQMKQSADLLMRMQLRKENPCQPIPPPVKVKEVEV  
ITEEAVITTLRRLSIFYSSIQAHDGHWPGESAGPLFFLQFVVMALYITGDLNTIFSPAQKEIIRYLYNHQNEDEGGWGFHIEGHS  
MFGSALSyalRILGEGLEDGEDGAMAKSRkWILDHGGLVAIPSWGKFWVTVLGLYEWGSGCNPLPPEFWFLPDIFFPIHPGKMLCYC  
RLVYMPMSYLYGKRFVGPITGLIQSLRQELYNEPYHINWKNARSTVAKEDLYYPHPLIQDMLWGLFHHVAEPVLTWRPFSMLREK  
ALKAIGHVHYEDENSKYLCIGSVEKVLCLIAVWVEDPNSEAYKLHLGRIIDYFWVAEDGLKIQSFGCQMWDAFAIQAILSCNLS  
EYWPPTLRKAHEFVKASQVRENPSGDFKAMYRHINKGAWTFMSQDHGWQVSDCTAEGKVALLLSQMPDVLVGEKIEKERLYDAVN  
VILSLQSSNGGFPWEPQRAYGWLEKFNPTFEFFETLIEREYVECTSPAVHGLALFRKQFPVPRHGTEDISSYRGIQYIEDVQEPD  
GSWYGHWGCICYTYGTWFAVAGALACGRNYKNCPALRKSCEFLLSKQLPNGGWGESYLSQNKVYTNIEGKRANLVQAWALLSLID  
ARQAEIDPTPIHRGVRVLLINSQMEDGDFPQOEITGVFMRNCTLNYSYRNIFPIWALGEYRRRVLFA

> lupeol synthase [*Olea europaea*]

MWKLKIAADGTGPWLTITNNHIGRQHWVFDNAGTPDERVEVERLREEFKNRFRTKQSADLLMRMQLVKENQRVQIPPAIKIKETE  
GITEEAVITTLRRAISFYSTIQAHDGHWPAESAGPLFFLPLVLAALYVTGAINVVLREHQQEITRYLYNHQNEDEGGWGFHIEGHS  
TMFGSALSyalITLRLGEGQEDGEDKAVARGRkWILDHGGAAGVPSWGKFWLTVLGVYEWGSGCNPMPEFWLLPNSPIHPGKMLCY  
CRLVYMPMSYLYGKRFVGPITGLVLSRQEIYTEPYHGINWNRARNTCAKEDLYYPHPLAQDMLWGLFHHFAEPVLTWRPFSKLR  
KALKVAMEHVHYEDENSRYLICIGSVEKVLCLIAVWVEDPNSEAYKRHARIIDYFWVAEDGLKMQSFGCQMWDAFAIQAILSSNL  
AEEYGPPTLKAHNFVKASQVRENPSGDFNEMYRHISKGAWTFMSQDHGWQVSDCTAEGKVALLLSQMPIELVGAIEIETGHLVDAV  
NVILTLQASAGGFPWEPQKAYRWLEKFNPTFEFFEDVLIEREYVECTSSAVQALKLFLKQHPGHRKEIASCISKAIQYIEATQNP  
DGSWDGSGWGCICYTYGTWFAVEGLVACGKNYHNSPTLRRACEFLLSKQLPDGGWSEYLSSSNKVYTNIEGKRANLVQTSWALLSLI  
KAGQVEIDPPIHRGIKLLVNSQMEDGDFPQOEITGAFMKNCTLNYSYRNIFPIWALGEYRRRILHA

> lupeol synthase [*Taraxacum officinale*]

MWKLKIAEGGDDEWLTITNNHIGRQHWVFDNAGTEEERAEIEKIRLNFKLNRFQFKQSADLLMRTQLRKENPINKIPDAIKNET  
EEVTNDAVTTTLKRAISFYSTIQAHDGHWPAESAGPLFFLPLVLAALYVTGAMNDILTPAHQLEIKRYLYNHQNEDEGGWGLHIEG  
STIFGSVLSYITLRLGEEADSVADMALVKGRkWILDHGGAAGVPSWGKFWLTVLGVYEWGSGCNPMPEFWLLMPPKFFPIHPGKML  
CYCRLVYMPMSYLYGKRFVGPITELVDRQLQELYTDPYDEINWKNARNTCAKEDLYYPHPLVQDMVGVVGLHNVPEVLTSRPISL  
REKALKVAMDHVHYEDKSSRYLCIGSVEKVLCLIAVWVEDPNSEAYKRHLARIIDYFWVAEDGMKMQSFGCQMWDAFAIQAISS  
NLTEYGPPTLKAHEFVKASQVRENPSGDFSKMYRHISKGAWTFIQDHGWQVSDCTAEGKVALLLSQMNPKLVEKVEHELYD  
AVNVILSLQSENGGFPWEPQRAYAWLEKFNPTFEFFEDVLIEREYVECTSSAIQGLTLFVKLHPGHRTKEIEHCISRAVKYVEDTQ  
ESDGSWYGCWGCICYTYGTWFAVDALVACGKNYHNCALQKACKFLLSKQLPDGGWGESYLSQNKVYTNIEGKRANLVQTSWALLS  
LIKAGQAEIDPTPISNGVRLINSQMEGDFPQOEITGVFMKNCTLNYSYRNIFPIWALGEYRRIV

> ATLUP2 (*Arabidopsis thaliana* lupeol synthase 2)

MWKLKIGEGNGEDPYLFSNNFVGRQTEWFDPKAGTPEERAIVEDARNYLDNRPRVKGCSDDLWRMQFLKEAKFEQVIPPVKID  
DGEGLTYKNATDALRRVAVSFYSALQSSDGHWPAEITGTLFFLPLVFCFYITGHLEKIFDAEHRKEMLRHIYCHQNEDEGGWGLHIE  
GKSVMFCTVNLNICYLRLMGEPPNGGRNACKRARQWILDHGVTYIPSWGKIWLSILGIYDWSGTPMPPEIWLPSFFPIHLGKT  
LCYTRMVMYMPMSYLYGKRFVGPITPLIMLRLKELHLQPYEINWKNARLCAKEDMIYPHPLVQDMLWGLFHHVGERVLTNWPFSMLR  
LVREKALRVAMEHIHYEDENSHYITIGSVEKVLCLACIENPNGDHFKHLARIIDYFWVAEDGLKMQSFGSGLWDTVFAIQALL  
ACDLSDETDVLRKHSFIKKSQVRENPSGDFKSMYRHISKGAWTFMSDRDHGWQVSDCTAEGKVALLLSQMNPMPAEVVGKIDPEQL  
YDSVNLSSLQGEKGLTAWEPVRAQEWLELLNPTDFFTCVMAEREYVECTSAVIQALVLFKQLYPDHRTKEIKSIEKGVQFIES  
KQTPDGSWHGNWGCICYTYGTWFAVGLAAAGKTYKSLAVRKGVDFLLAIQEEDGGWGESHLSCEPQRYIPLGKRANLVQTAWAM  
MGLIHAGQAEIDPTPLHRAAKLIITSQLENGDFPQOEITGVFMNCTMLHYATYRNIFPIWALAEYRK

>LUP1 (LUPEOL SYNTHASE 1); lupeol synthase

MWKLKIGKNGEDPHLFSNNFVGRQTKWFDHKAGSPEERAAVEEARRGFLDNRFRVKGCSDLLWRMQFLREKKEFGQIPQLKATN  
IEEITYETTNNALRRGVRYFTALQASDGHWPGEITGPLFFLPPLIFCLYITGHLEEVFDAEHRKEMLRHIYCHQNEGGWGLHIES  
KSMFCTVLNYICLRMLGENPEQDACKRARQWILDRGGVIFIPSWGKFWLSILGVYDWSGTNPTPELMLPSFLPIHPGKILCYS  
RMVSIPIPSYLYGKRFVGPITPLILLREELYLEPYEEINWKSRRLYAKEDMYAHPLVQDLLSDTLQNFVEPLLTRWPLNKLKLVRE  
KALQLTMKHIHYETGFAIQALLASNLPEDETDALKRGHNYIKASQVRENPSGDFRSMYRHSKGAWTFSDRDHWQVSDCTAEALK  
CCLLSMMSADIVGQKIDDEQLYDSVNLNLLSLQSGNGGVNAWEPSPRAYKWELELLNPTFEFMANTMVEREFVECTSSVVIQALDLFRKL  
YDPHRKKEINRSIEKAVQFIQDNQTPDGSWYGNWGVCFIYATWFWALGGLAAAGETYNDCIAMRNGVHFLTTQRDDGGWGESYLSL  
SEQRYPSEGERSNLVQTSWAMMALIHTGQAEERDILPHRAAKLIINSQLENGDFPQOEIVGAFMNTCMLHYATYRNTFPLWALAE  
YRKVVVF

>lupeol synthase [Bruguiera gymnorrhiza]

MWRLKIAEGGNPIYISTNNFVGRQTFEFDPEAGTPEERAQVEEARENFWDRFLIKPSSDLLWRFQFLSEKFKFKQRI  
QVKVQDGEITREIATLARRSVHLVSLQASDGHWCAENSGPMFFVPPMVFSLYITGHLNAVSAEHCKEILRYIYCHP  
NEDGGWGLHIEGHSAMFSTVLNYNWLGKLEGRDGGKDNACERARRRILDHGSATAISSWGKTWLAILGVYEWDC  
NPMPEFWAFPTFFPIHPARMLCYCRLTYMAMSYLYGKKFVGPITPLILQLREEIYNEPYDQINWSRMRHLCAKEDNYY  
AHTLTQIILWDIYMLGEPILLKRWPFNKLEKALKITMDHIHYEDENSQYITIGSVEKPLMLACWHEDPNGDAFKHL  
ARIPDYVWLGEDGIKIQSFGSQVWDTSFVLQALIASNLPSSETGPTLEKGFHNFIKNSQVTQNPSSGDFRMRFRHISKGSWTF  
SDKDHGWQVSDCTAESLKCCLLFSMMPPELVGKMGQRMVYDAVNVHSLQSKNGGCSAWEPAGAGSWMWELNPVE  
FLADLVIEHEYVECTSSSLQALVLFKLYPEHRRKEIEIFILNAVRFTEEQPDGSWYGNWVICFLSGTWFLGKGLAAA  
GKTYYNCTAVRKGVFELLQTRDDGGWGESYLSLCPKKIYVPLEGNRSNLVQALAMMGLILGGQGERDPTPLHRAAK  
LLINSQTELGDFFPQOELSGCFMRNMLHYSEYRDIPTWALAEY

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ATGTGGAAGTTGAAGGTAGCAGAAGGAGGAAAAGGGTTGGTTCTGTGAGCAATTTTCATCGGAAGGCAACACTGGG  
TGTTCCGACCCAAATGCAGGGACACCACAAGAACATGAGGAGATTGAAAGGATGCGCCAAGAATTCACCAAAAATCG  
ATTCTCCATCAACAAAGTGCAGACCTCTTGATGAGAATGCACTGAGAAAGGAGAACCCTTGTGGGCCATCCCA  
CCAGCAGTTAAATGAGAGATGTGAAAAGGTAAGTGCAGAACGATGATCACTACAATTAGAAGGTCCATCACCT  
TTTATTCTCAATTCAGCCCATGATGGCCACTGGCCTGCTGAATCTGCAGGCCATTATTCTTCGTTCAACCTTT  
GGTACTGCCACTGTACATTCAGGATCCCTTGATGATGTAT **TAGGACCTCAACACAAGGAAAATTATTCGATAT**  
**TTGTATAATCATCAGAACGAAGATGGGGGTTGGGGATTCCACATAGAGGGTCATAGTACCATGTTTGGATCTGCAT**  
**TGAGCTACATTGCATTGAGGGTACTTGGACAAAGCCTTGAAGATGGTGAGGACATGGCAGTGGCCAGAGGCAGAAA**  
**ATGGATCCTCGATCATGGCGGTTTAGTAGCTATTCATCATGGGAAAGTTCGGGTCACGGTGCTAGGGGTTTAT**  
**GAGTGGTCAGGGTCAATCCCTTCCACCAGAGTTCT**GGGCTTCTACCCAAAATTTTCCCTATTCATCCAGGAAAA  
TGTTATGTTACTGTGCTTAGTTTACATGCCCATGTCAATTTATATGAAAAGAAGTTTGTAGGCCCAATCACTGC  
CTTAGTCAGATCACTAAGAAAAGAATGTACAATGAGCCTTATGATCGAGTTGACTGGAATAAGGCCCGCAACACT  
GTTGCTAAGGAGGATCTATACATCCCATCCTCTAATCCAAAGACATGTTATGGGGATTCTTCATCATCTGGGAG  
AGCGTGTTCTGAACACTTGGCCATTTCAATGCTAAGACAGAAGGCAATAGAAGTTGCTATTAATCATGTACGTTA  
CGAGGATGAGACCACTAGGTACCTTTGCATTGGAAGTGTAGAGAAGGTGTTATATTTGATTGCGCGTTGGGTTGAA  
GACCCCAACTCAGAGGCTTACAACTTCATTTAGCCCGAATCCCTGATTACTTCTGGCTTGCAGAAGATGGCTTGA  
AAATCCAGAGTTTGGCTGCCAAATGTGGGATGCAGCATTGCTATTCAAGCAATACTGAGTGGTAATGTGAGTGA  
AGAGTATGGACCAACATTAAGAAAAGCACACCACTTTGTGAAGGCTTCGAGGTACGTGAAAACCCATCCGGTGAC  
TTCAAAGCAATGTACAGACACATTTCCAAAGGGCATTGGACATTCATCAATGCATGATCATGGATGGCAAGTCTCTG  
ATTGCACAGCAGAAGGACTAAAGGTTGCACTCCTACTGTGAGAAATGTGAGATGATCTAGTTGGGGCAAAAATGGA  
AACAGAGCAATTCATGATGCTGTTAATGTCACTCCTCTCTACAAAGCAGCAATGGTGGTTTCCCTGCTTGGGAG  
CCTCAAAGAGCCTACCAATGGTTAGAGAAATCAATCCAAGTGAATTTTGAAGAACTCTGATTGAGAGGGAGT  
ATGTAGAGTGCATGGTTGAGCAATGCAAGCCCTGGCTCTTTTCCAGAAAGCTATACC **CGAAGCATAGGGCGAAAAGGA**  
**AAATAGATCGCTGCATTTCCAAAGCAATCCGATACATTGAAAACACACAAAATCCTGATGGGCTTGGTATGGTTGC**  
**TGGGGAATTTGCTACACTTATGTTACTGGTTTGCAGTGGAAAGGACTAACAGCTTGTGGGAAGAATCCAAAATA**  
**GTGTTACCTTGCAGTACAGCATGTAATTTTTGTTGTCAAAGCAGCTTCTAATGGAGGGTGGGAGAAAAGTTACTT**  
**GTCAAGCCAAGACAAGGTGTACACAAACATTGAAGGAAAACGTGCAAAATTTGGTTCAAAGTTTATGGCTTTGTTG**  
**TCACCTATGGCT**GCTGGGCAGGCTGAGATAGATCCGACACCAATTCACCGTGAATAAGGTTACTCATTAATTCAC  
AAATGGATGATGGAGACTTCCACAACAGGAGATTACAGGAGTATTTATGAGGAACTGTACCCTAAACTACTCATC  
ATATCGAAACATCTTTCCCTATATGGGCTCTTGGAGAGTACCGTCGAGAGTCTTATGTGCATGA

Αλληλουχία του cDNA της συνθάσης της λουπεόλης. Με τα υπογραμμισμένα και έντονα γράμματα φαίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχυθούν οι περιοχές που χρησιμοποιήθηκαν για την γονιδιακή αποσίωση στην παρούσα μελέτη και με τα πλάγια γράμματα οι περιοχές που ενισχύθηκαν

## 12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Sato, Tabata, 2005: LOTUS JAPONICUS AS A PLATFORM FOR LEGUME RESEARCH, *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 128-132
- (2) Auria John, Gershenzon Jonathan, 2005: THE SECONDARY METABOLISM OF ARABIDOPSIS THALIANA: GROWING LIKE A WEED, *Current Opinion in Plant Biology*, 8:308-316
- (3) Τσέκος, 2004: ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ, *Φυσιολογία φυτών*, 541-568
- (4) Papadopoulou K., Melton, Leggett, Daniels, Osbourn, 1999: COMPROMISED DISEASE RESISTANCE IN SAPONIN –DEFICIENT PLANTS, *Pnas*, 12923-12928
- (5) Haralampidis, Bryan, Papadopoulou, Bakht, Melton, Osbourn, 2001: A NEW CLASS OF OXIDOSQUALENE CYCLASES DIRECTS SYNTHESIS OF ANTIMICROBIAL PHYTOPROTECTANTS IN MONOCOTS, *Pnas*, 13431-13436
- (6) Stryer Lubert 1997: ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ, *Βιοχημεία*, τόμος 2: 597-624
- (7) Phillips Dereth, Rasbery Jeanne, Bartel Bonnie, Matsuda Seiichi, 2006: BIOSYNTHETIC DIVERSITY IN PLANT TRITERPENE CYCLISATION, *Current Opinion in Plant Biology*, 9:305-314
- (8) Sawai, Shindo, Sato, Kaneko, Tabata, Ayabe, Aoki, 2006: FUNCTIONAL AND STRUCTURAL ANALYSIS OF GENES ENCODING OXIDOSQUALENE CYCLASES OF LOTUS JAPONICUS, 247-257
- (9) Greenhagen, Maille, Noel, Chappell, 2006: IDENTIFYING AND MANIPULATING STRUCTURAL DETERMINATES LINKING CATALYTIC SPECIFICITIES IN TERPENE SYNTHASES, *Pnas*, 9826-9831
- (10) Bosso, Gasch, Taramino, Scaldaferrì, Viola, Balliano, 2005: ACCESS OF THE SUBSTRATE TO THE ACTIVE SITE OF SQUALENE AND OXIDOSQUALENE CYCLASES, *Biochemical Society Transactions*, 1202-1205
- (11) Abe, Prestwich, 1993, ACTIVE SITE MAPPING OF AFFINITY-LABELED RAT OXIDOSQUALENE CYCLASE, *The journal of biological chemistry*, 802-804
- (12) Herrera, Bartel, Wilson, Matsuda, 1998: CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE ARABIDOPSIS THALIANA LUPEOL SYNTHASE GENE, *Phytochemistry*, 1905-1911
- (13) Γεωργάτσος, Γιουψάνης, Κυριακίδης, 2001: ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΙΣΟΜΕΡΕΙΩΣΗΣ, *Ενζυμολογία*, 22,115

- (14) Kushiro, Shibuya, Masuda, Ebizuka, 2000: MUTATIONAL STUDIES ON TRITERPENE SYNTHASES: ENGINEERING LUPEOL SYNTHASE INTO  $\beta$ -AMYRIN SYNTHASE, American Chemical Society, 6816-6824
- (15) Ebizuka, Katsube, Tsutsumi, Kushiro, Shibuya, 2003: FUNCTIONAL GENOMICS APPROACH TO THE STUDY OF TRITERPENE BIOSYNTHESIS, Pure Appl. Chem., 369-374
- (16) Kushiro, Shibuya, Ebizuka, 1999: CRYPTIC REGIOSPECIFICITY IN DEPROTONATION STEP OF TRITERPENE BIOSYNTHESIS CATALYSED BY NEW MEMBERS OF LUPEOL SYNTHASE, Eur J Biochem
- (17) Shibuya, Zhang, Endo, Shishikura, Kushiro, Ebizuka, 1999: TWO BRANCHES OF THE LUPEOL SYNTHASE IN THE MOLECULAR EVOLUTION OF PLANT OXIDOSQUALENE CYCLASES, Eur. J. Biochem, 302-307
- (18) Hayashi, Huang, Takada, Obinata, Inoue, Shibuya, Ebizuka, 2004: DIFFERENTIAL EXPRESSION OF THREE OXIDOSQUALENE CYCLASE mRNAs IN GLYCYRRHIZA GLABRA, Biol.Pharm.Bull, 1086-1092
- (19) Hartman, Peiter, Koch, Schubert, Schreiber, 2002: CHEMICAL COMPOSITION AND ULTRASTRUCTURE OF BROAD BEAN NODULE ENDODERMIS IN COMPARISON TO THE ROOT ENDODERMIS, Planta, 14-25
- (20) Gammas, Niebel, Lescure, Cullimore, 1996, USE OF A SUBSTRUCTIVE HYBRIDATION APPROACH TO IDENTIFY NEW MEDICADO TRUNCULATA GENES INDUCED DURING ROOT NODULE DEVELOPMENT, MPMI, 233-242
- (21) Χατζόπουλος, 2001: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΑΝΤΙΝΟΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝ-ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ, Βιοτεχνολογία φυτών, 444-451
- (22) Thackray Jonathan, 2004: RNA INTERFERENCE: FROM PETUNIAS TO A PANACEA?
- (23) Γεωργάτσος, Γιαννακούρου, 2005: RNA ΠΑΡΕΜΒΟΛΗΣ, Έλεγχος του μεταβολισμού στο μοριακό επίπεδο, 185
- (24) Waterhouse, Wang, Lough, 2001: GENE SILENCING AS AN ADAPTIVE DEFENCE AGAINST VIRUSES, Nature, 834-842
- (25) Blaszczyk, Tropea, Bubunencko, Routzahn, Waugh, Court, Ji, 2001: CRYSTALLOGRAPHIC AND MODELING STUDIES OF RNASE III SUGGEST A MECHANISM FOR DOUBLE-STRANDED RNA CLEAVAGE, Structure, 1225-1236
- (26) Elbashir, Lendeckel, Tuschl, 2001: RNA INTERFERENCE IS MEDIATED BY 21 AND 22 NUCLEOTIDE RNAs, Genes and Development, 188-200

- (27) Waterhouse, Wang, Lough, 2001: GENE SILENCING AS AN ADAPTIVE DEFENCE AGAINST VIRUSES, *Nature*, 834-842
- (28) Voinnet, 2001: RNA SILENCING AS A PLANT IMMUNE SYSTEM AGAINST VIRUSES, *Trends in Genetics*, 449-459
- (29) Tabara, Sarkissian, Kelly, Fleenor, Grishok, Timmons, Fire, Mello, 1999: THE RDE-1 GENE, RNA INTERFERENCE AND TRANSPOSON SILENCING IN *C. ELEGANS*, *Cell*, 123-132
- (30) Sijen, Plasterk, 2003: TRANSPOSON SILENCING IN THE CAENO RHABDITIS *ELEGANS* GERM LINE BY NATURAL RNAI, *Nature*, 310-314
- (31) Wang, Waterhouse, 2001: APPLICATION OF GENE SILENCING IN PLANTS, *Current Opinion In Plant Biology*, 146-150
- (32) Wielposka, Townley, Moore, Waterhouse, Helliwell, 2005: A HIGH-THROUGHPUT INDUCIBLE RNAI VECTOR FOR PLANTS, *Plant Biotechnology Journal*, 583-590
- (33) Maeda, Ashida, Iguchi, Chechetka, Hijikata, Okusato, Deguchi, Izui, Hata, 2006: KNOCKDOWN OF AN ARBUSCULAR MYCORRHIZA-INDUCIBLE PHOSPHATE TRANSPORTER GENE OF *LOTUS JAPONICUS* SUPPRESSES MUTUALISTIC SYMBIOSIS, *PlantCell Physiol*, 807-817
- (34) Kumagai, Kouchi, 2003: GENE SILENCING BY EXPRESSION OF HAIRPIN RNA IN *LOTUS JAPONICUS* ROOTS AND ROOT NODULES, *MPMI*, 663-668
- (35) Han, Kwon, Yang, Jung, Choi, 2006: EXPRESSION AND RNA INTERFERENCE-INDUCED SILENCING OF THE DAMMARENEDIOL SYNTHASE GENE IN *PANAX GINSENG*, *Plant Cell Physiol*, 1653-1662
- (36) Χατζόπουλος Πολυδεύκης, 2001: AGROBACTERIUM ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ DNA, ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ, *Βιοτεχνολογία Φυτών*, 71-126, 127-146
- (37) Richardson, Palmer, 2007: HORIZONTAL GENE TRANSFER IN PLANTS, *Journal of Experimental Biology*, 1-9
- (38) Petit, David, Dahl, Ellis, Guyon, 1983: FURTHER EXTENSION OF THE OPINE CONCEPT: PLASMIDS IN *AGROBACTERIUM RHIZOGENES* COOPERATE FOR OPINE DEGRADATION, *Mol Gen*, 204-214
- (39) Navarrete, Affantranger, Olivares, Camino, Santana, Murillo, Guillen, Guevara, Acosta, Quinto, Li, Gresshof, Sanchez, 2006: *AGROBACTERIUM RHIZOGENES* TRANSFORMATION OF THE *PHASEOLUS* SPP.: A TOOL FOR FUNCTIONAL GENOMICS, *MPMI*, 1385-1393
- (40) Combard, Baucher, 1988: A COMMON ORGANIZATION OF THE T-DNA GENES EXPRESSED IN PLANT HAIRY ROOTS INDUCED BY DIFFERENT



- PLASMIDS OF AGROBACTERIUM RHIZOGENES, *Plant Molecular Biology*, 499-509
- (41) Schmulling, Schell, Spena, 1988: SINGLE GENES FROM AGROBACTERIUM RHIZOGENES INFLUENCE PLANT DEVELOPMENT, *EMBO*, 2621-262
- (42) Spena, Schmulling, Koncz, Schell, 1987: INDEPENDENT AND SYNERGISTIC ACTIVITY OF ROL A, B AND C LOCI IN STIMULATING ABNORMAL GROWTH IN PLANTS, *EMBO*, 3891-3899
- (43) Sinkar, Pythoud, White, Nester, Gordon, 1988: ROLA LOCUS OF THE Ri PLASMID DIRECTS DEVELOPMENTAL ABNORMALITIES IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS, *Genes and Development*, 688-697
- (44) White, Taylor, Huffman, Gordon, Nester, 1985: MOLECULAR AND GENETIC ANALYSIS OF THE TRANSFERRED DNA REGIONS OF THE ROOT-INDUCING PLASMID OF AGROBACTERIUM RHIZOGENES, 33-44
- (45) Estruch, Schell, Spena, 1991: THE PROTEIN ENCODED BY THE ROLB PLANT ONCOGENE HYDROLYSES INDOLE GLYCOSIDES, *EMBO*, 3125-3128
- (46) Offringa, Melchers, Regensburg, Constantino, Schilperoort, Hooukaas, 1986: COMPLEMENTATION OF AGROBACTERIUM TUMEFACIANS TUMOR-INDUCING AUX MUTANS BY GENES FROM THE T<sub>R</sub>-REGION OF THE Ri PLASMID OF AGROBACTERIUM RHIZOGENES, *Genetics*, 6935-6939
- (47) Lee, Gelvin, 2008: T-DNA BINARY VECTORS AND SYSTEMS, *Plant Physiology*, 325-332
- (48) Crane, Wright, Dixon, Wang, 2006: TRANSGENIC MEDICAGO TRUNCULATA PLANTS OBTAINED FROM AGROBACTERIUM TUMEFACIANS-TRANSFORMED ROOTS AND AGROBACTERIUM RHIZOGENES-TRANSFORMED HAIRY ROOTS, *Planta*, 1344-1354
- (49) Παπαδοπούλου Καλλιόπη, 1995: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΜΑΤΙΝΩΝ( ΝΟΝΤΟΥΛΙΝΩΝ) ΣΤΗ ΣΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΦΑΣΟΛΙ, Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωργικής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας

