



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ  
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΜΠΣ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ

**“Μελέτη του μεταθετού στοιχείου της *Drosophila*,  
Minos, σε φυτά *Arabidopsis thaliana* – Μελέτη της  
έκφρασης γονιδίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού  
σε συνθήκες RNA σίγησης και μη”**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Μαρία Δασκαλάκη 314**

Τριμελής επιτροπή : Καλαντίδης Κρίτων

Σπηλιανάκης Χαράλαμπος

Τζαμαρίας Δημήτριος

Ηράκλειο, Μάρτιος 2014

# Πρόλογος

---

Φτάνοντας στο τέλος της πορείας της προσπάθειας μου για την πραγματοποίηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με στήριξαν στην προσπάθειά μου αυτή.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ Κρίτωνα Καλαντίδη για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριο του. Πρόθυμος και δεκτικός σε κάθε μου απορία και συζήτηση με βοήθησε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας δείχνοντάς μου αμέριστη εμπιστοσύνη και υπομονή. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στο Fred, ο οποίος με ανεξάντλητη υπομονή και με τη «γαλλική προφορά» του με δίδαξε όλες τις εργαστηριακές πρακτικές. Δεν μπορώ να μην αναφερθώ στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τη Νάντια, τον Κώστα, τη Μάρω, την Ελένη, τη Λίνα, τη Νικολέτα, τη Ρίτα, τον Τάσο, το Γιάννη και το Χρήστο και να τους ευχαριστήσω προσωπικά για την προθυμία τους και τη βοήθεια που μου πρόσφεραν σε κάθε μου δυσκολία. Όλοι μαζί, και καθένας ξεχωριστά, συνέβαλαν στο να δημιουργηθεί αυτό το τόσο όμορφο κλίμα στο εργαστήριο και να κάνουν την κάθε μέρα ακόμα πιο ευχάριστη.

Να ευχαριστήσω επίσης, τους κ. Σπηλιανάκη Χ. και Τζαμαρία Δ. για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγηση τους εντός και εκτός του εργαστηρίου. Ιδιαίτερη βοήθεια, στην προσπάθεια μου αυτή ήταν η υποστήριξη των φίλων μου βιολόγων και μη οι οποίοι χωρίς να τους αναφέρω ονομαστικά ξέρουν πάντα ότι βρίσκονται στη σκέψη μου.

Τέλος, ιδιαίτερη συμβολή στη μεταπτυχιακή αυτή διατριβή κατέχουν οι εξαιρετες μαμάδες μου, Χαρά και Αλεξάνδρα Σπίρτση, που χρόνια τώρα με εμπνέουν σε κάθε μου επιλογή καθώς και ο αγαπημένος μου πατέρας, ο οποίος έθεσε τα θεμέλια της επιστημονικής μου σκέψης.

# Περιεχόμενα

|   |    |
|---|----|
| 1.1.RNA σίγηση-Γενικά Στοιχεία.....   | 7  |
| 1.2.Μεθυλίωση DNA - RNA εξαρτώμενη μεταγραφική Σίγηση (Transcriptional Gene Silencing) .....  | 8  |
| 1.3. Τα μεταθετά στοιχεία.....  | 10 |
| 1.4. Τα μεταθετά στοιχεία στα φυτά .....  | 11 |
| 1.5 Το μεταθετό στοιχείο Minos .....  | 12 |
| 1.6.Τα μεταθετά στοιχεία ως εργαλείο της γενετικής μηχανικής στα φυτά .....   | 13 |
| 1.7. Φωτοσύνθεση-Γενικά στοιχεία .....  | 14 |
| 1.8.Τα γονίδια psbA, psbA, ATPa, accD, ndhI, ndhC, rps3, IF. ....   | 15 |
| 3.1.Βακτηριακά στελέχη.....   | 17 |
| 3.2.Ολιγονουκλεοτίδια-Εκκινητές PCR.....  | 17 |
| 3.3.Θρεπτικά Μέσα .....   | 19 |
| 3.3.1.Καλλιέργεια Βακτηρίων .....   | 19 |
| 3.3.2.Παραγωγή στερεού θρεπτικού μέσου MS.....  | 19 |
| 3.4.Παρασκευή Επιδεκτικών Κυττάρων E.coli με RbCl2. ....  | 20 |
| 3.5.Παρασκευή Επιδεκτικών Κυττάρων A. tumefaciens με CaCl2.....   | 20 |
| 3.6.Πέψη με περιοριστικά ένζυμα .....   | 20 |
| 3.7.Αντίδραση συγκόλλησης πλασμιδιακού φορέα-ενθέματος με τη χρήση DNA λιγάσης ..   | 21 |
| 3.8.Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....   | 21 |
| 3.9.Βακτηριακός Μετασχηματισμός E. coli με τη χρήση θερμικού σοκ .....  | 21 |
| 3.10.Βακτηριακός Μετασχηματισμός A.tumefaciens με τη χρήση θερμικού σοκ (freeze-thaw method).....                                   | 22 |
| 3.11.Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (mini-preps) με τη χρήση λυσοζύμης-πρωτόκολλο NID (Lezin, Kosaka et al. 2011). .... | 22 |
| 3.12. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....  | 23 |
| 3.13.Ηλεκτροφόρηση RNA σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης.....   | 23 |
| 3.14.Καθαρισμός DNA με Φαινόλη/Χλωροφόρμιο .....  | 23 |
| 3.15.Εξαγωγή RNA από φυτικό ιστό με τη χρήση Trizol .....   | 24 |
| 3.16.Απομάκρυνση DNA με αντίδραση DNάσης .....  | 24 |
| 3.17.Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) .....  | 25 |
| 3.17.1.Αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) .....  | 25 |
| 3.17.2.Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real-time PCR, qPCR) .....   | 25 |
| 3.18.Αγροεμποτισμός.....  | 27 |

|  |    |
|--|----|
| 3.19.Ανάπτυξη και μετασχηματισμός <i>A. thaliana</i> .....   | 27 |
| 4.1. Πείραμα 1: Δημιουργία Διαγονιδιακών Σειρών <i>A.thaliana</i> που φέρουν το μεταθετό στοιχείο Μίνος και την αντίστοιχη μεταθετάση.....   | 29 |
| 4.1.1.Πειραματική Διαδικασία-Αποτελέσματα.....   | 29 |
| 4.2.Πείραμα προσδιορισμού της έκφρασης γονιδίων των φωτοσυστημάτων σε σιγημένο και μη ,ως προς τα γονίδια GFP και GUS, ιστό διαγονιδιακών σειρών <i>N.benthamiana</i> και <i>A.thaliana</i> .....  | 34 |
| 4.2.1.Πειραματική διαδικασία .....   | 34 |
| 4.2.2.Αποτελέσματα Πειραμάτων ποσοτικής PCR (Real-Time PCR) .....  | 35 |
| 5.1.Πείραμα δημιουργίας Διαγονιδιακών Σειρών <i>A.thaliana</i> που φέρουν το μεταθετό στοιχείο Μίνος και την αντίστοιχη μεταθετάση.....  | 38 |
| 5.2. Πείραμα προσδιορισμού της έκφρασης γονιδίων των φωτοσυστημάτων σε σιγημένο και μη, ως προς τα γονίδια GFP και GUS, ιστό διαγονιδιακών σειρών <i>N.benthamiana</i> και <i>A.thaliana</i> ..... | 39 |

# Abstract

---

The non-autonomous transposable element, Minos, was first discovered in *Drosophila hydei* and is a member of the superfamily Tc1/mariner transposable elements. Members of the superfamily are found in mammals, fish, nematodes and insects. Minos ability to transpose in the presence of its corresponding transposase and create stable transgenic lines in various organisms, although phylogenetically distant, made Minos a promising genetic tool for enhancer trapping, identifying and functionally analyzing new genes. Minos has already been used in a variety of model organisms such as flies, mosquitoes, sea urchins, mice and mammalian cell cultures but not in a plant model yet. In this study, we attempt to create *A.thaliana* Wt and *dcl3<sup>-</sup>* transgenic lines which carry Minos and its corresponding transposase. In this way, we aim to study Minos mobility in the plant system both in relation to the expression of the transposase and the presence of the mutated background of the RNA-dependent DNA methylation pathway (RdDM). The importance of this study is indicated as many plant species with economic and industrial interest have not been sequenced yet; moreover, many of these do not own an efficient transformation system that would enable their biotechnological study. Solution to the above biotechnological problem could give a mutagenesis system based on the controlled transfer of Minos.

In the next part of this study, we examine the mRNA levels, of some of the photosynthetic apparatus genes in transgenic *A.thaliana* and *N.benthamiana* plants containing GUS and GFP transgene respectively. We study silenced and non silenced tissue concerning the expression of the transgene. The obtained results contradict previous studies as no statistical difference in gene expression in any of the conditions studied, could be observed.

Keywords: transposable elements, Minos, RdDM, photosynthesis, RNA silencing.

# Περίληψη

---

Το μη αυτόνομο μεταθετό στοιχείο Minos ανακαλύφθηκε στη *Drosophila hydei* και ανήκει στην υπερ-οικογένεια των Tc1/mariner μεταθετών στοιχείων. Μέλη της υπερ-οικογένειας αυτής, συναντώνται στα θηλαστικά, τα ψάρια, τους νηματώδεις και τα έντομα. Η ικανότητα του Minos να μετατίθεται παρουσία της αντίστοιχης μεταθετάσης και να δημιουργεί σταθερές διαγονιδιακές σειρές σε ποικίλους φυλογενετικά απομακρυσμένους οργανισμούς, καθιστά το Minos ένα πολλά υποσχόμενο γενετικό εργαλείο για την παγίδευση ενισχυτών καθώς και την ανίχνευση και λειτουργική ανάλυση νέων γονιδίων. Το Minos έχει χρησιμοποιηθεί ήδη σε οργανισμούς όπως η μύγα, το κουνούπι, ο αχινός, το ποντίκι καθώς και σε κυττατοκαλλιέργεια θηλαστικών, ενώ δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε κάποιο φυτικό μοντέλο. Στην παρούσα εργασία, επιχειρήσαμε να δημιουργήσουμε διαγονιδιακές σειρές *A. thaliana* Wt και dcl3<sup>-</sup> οι οποίες έφεραν το Minos καθώς και την μεταθετάση του. Έτσι, προσπαθήσαμε να μελετήσουμε την κινητικότητα του Minos φυτικό σύστημα σε συνάρτησή τόσο με την έκφραση της μεταθετάσης του όσο και με την παρουσία του μεταλλαγμένου υπόβαθρου της RNA εξαρτώμενης DNA μεθυλίωσης (RdDM). Η σημασία της μελέτης αυτής φαίνεται στο γεγονός ότι, υπάρχει μία πληθώρα φυτικών ειδών με οικονομικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον, το γονιδίωμα των οποίων δεν έχει αλληλουχηθεί, ενώ δεν διαθέτουν και ένα ικανό σύστημα μετασχηματισμού που θα επέτρεπε τη βιοτεχνολογική τους μελέτη. Λύση στο παραπάνω βιοτεχνολογικό πρόβλημα θα μπορούσε να δώσει ένα σύστημα μεταλλαξιγένεσης βασισμένο σε ελεγχόμενες μεταθέσεις του Minos.

Στο επόμενο μέρος της εργασίας, μελετήθηκε η έκφραση, σε επίπεδο mRNA, γονιδίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε διαγονιδιακά φυτά *N.benthamiana* και *A.thaliana* που φέρουν τα διαγονίδια GFP και GUS αντίστοιχα. Ο ιστός που μελετήθηκε χαρακτηρίστηκε σιγημένος ή μη σε σχέση με την έκφραση ή μη του διαγονιδίου. Τα αποτελέσματα ήρθαν σε αντίθεση με προηγούμενη μελέτη καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά στη γονιδιακή έκφραση των γονιδίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που μελετήθηκαν.

Λέξεις κλειδιά: Μεταθετά στοιχεία, Minos, RdDM, φωτοσύνθεση, RNA σίγηση

# 1.Εισαγωγή

---

## 1.1.RNA σίγηση-Γενικά Στοιχεία

Οι πρώτες αναφορές στο μηχανισμό της RNA σίγησης ξεκινούν το 1990 από δύο ερευνητικές ομάδες (Naroli, Lemieux et al. 1990, van der Krol, Mur et al. 1990). Η ανεπιτυχής υπερέκφραση του γονιδίου της συνθετάσης της χαλκόνης για την παραγωγή ανθέων πετούνιας με εντονότερο χρώμα, έδωσε λευκά άνθη και την πρώτη αναφορά για σίγηση γονιδίου, το φαινόμενο ονομάστηκε συγκαταστολή (co-suppression). Εκτεταμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε έπειτα στο *C. elegans* για τη συγκαταστολή ενώ σήμερα γνωρίζουμε ότι ο μηχανισμός αυτός πλέον αναφέρεται κυρίως ως RNA σίγηση (RNAi) και αποτελεί μία αρκετά συντηρημένη διαδικασία με διακριτά βήματα σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Mello and Conte 2004). Ο μηχανισμός της RNA σίγησης συμβάλει τόσο στη ρύθμιση ενδογενών γονιδίων όσο και στην άμυνα των φυτικών κυττάρων έναντι εξωγενών RNAs όπως είναι τα ιϊκά. Γενικό χαρακτηριστικό του μηχανισμού αποτελούν οι RNA εξαρτώμενες διαδικασίες, ειδικές προς μία συγκεκριμένη αλληλουχία, οι οποίες οδηγούν στην αναστολή της γονιδιακής έκφρασης τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο (TGS) όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (PTGS) (Kotakis, Vrettos et al. 2010).

Βασικά χαρακτηριστικά του μηχανισμού της RNA σίγησης αποτελούν η επαγωγή του μηχανισμού από δίκλινα RNA, ενδογενούς ή εξωγενούς προελεύσεως, τα οποία στη συνέχεια αναγνωρίζονται και κόβονται σε τμήματα 21-28nt από τις RNAIII τύπου εξωνουκλεάσες DICER (DCL). Τα μικρά RNAs που δημιουργούνται ενσωματώνονται στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο RISC, με πυρήνα του την ενδονουκλεάση AGO, το οποίο μέσω θερμοδυναμικών κριτηρίων ενσωματώνει τη μία μόνο αλυσίδα του dsRNA. Έπειτα, το σύμπλοκο αυτό οδηγεί στην αναγνώριση και καταστολή συμπληρωματικών μονόκλωνων RNAs καθώς επίσης και στη μεθυλίωση αλληλουχιών DNA (Meister and Tuschl 2004).

## 1.2.Μεθυλίωση DNA - RNA εξαρτώμενη μεταγραφική Σίγηση (Transcriptional Gene Silencing)

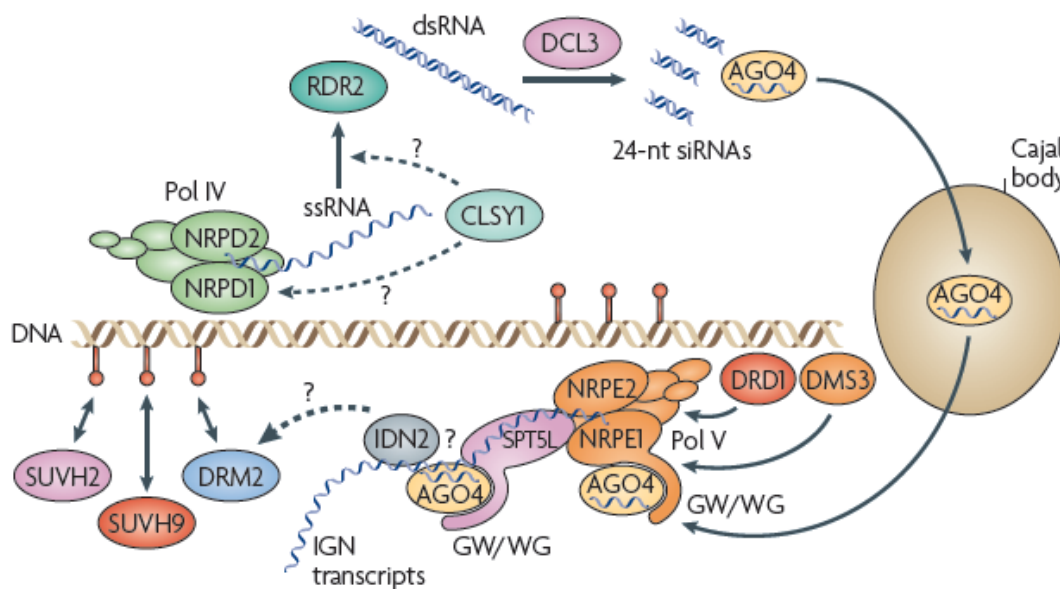
Η γενετική πληροφορία περιέχεται στο DNA. Πέρα όμως από το DNA, πλήθος πληροφοριών εμπεριέχονται στον «επιγενετικό κώδικα» ο οποίος απαρτίζεται τόσο από τροποποιήσεις στο ίδιο το DNA, όσο και τις ιστόνες. Το επόμενο αυτό επίπεδο πληροφοριών εμπλέκεται τόσο στη λειτουργία όσο και τη ρύθμιση των αντίστοιχων γονιδίων, καταδεικνύοντας ότι από ένα γονιδίωμα με τη βοήθεια των επιγενετικών τροποποιήσεων μπορούν να δημιουργηθούν πολυάριθμα επιγονιδιώματα (Zhu 2008). Μία από τις εξελικτικά αρχαιότερες επιγενετικές τροποποιήσεις είναι η μεθυλίωση του DNA σε βάσεις κυτοσίνης και σχετίζεται με τη γονιδιακή καταστολή στους ευκαρυώτες. Συγκεκριμένα, η μεθυλίωση του DNA έχει συσχετιστεί σε θηλαστικά και φυτά με διάφορες λειτουργίες όπως, η μεταγραφική καταστολή μεταθετών στοιχείων, ο μηχανισμός της RNA εξαρτώμενης μεταγραφικής σίγησης (TGS) και το γονιδιωματικό εντύπωμα (imprinting) (Matzke, Kanno et al. 2007, Zhang 2008). Αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης μπορούν να προκαλέσουν τόσο εμβρυϊκό θάνατο στα θηλαστικά όσο και μορφολογικές αλλαγές στα φυτά (Law and Jacobsen 2010).

Στα θηλαστικά, η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει σχεδόν αποκλειστικά σε νησίδες CpG σε ποσοστό 70% και σε μικρό ποσοστό σε μη CpG νησίδες κυρίως σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (Bird 2002). Αντίθετα, στα φυτά η μεθυλίωση μπορεί να συμβεί σε πολλές περισσότερες αλληλουχίες όπως σε συμμετρικές CG και CHG (H=G, A ή T) καθώς και σε ασύμμετρες CHH (Cokus, Feng et al. 2008, Chinnusamy and Zhu 2009), ενώ αφορά κυρίως μεθυλίωση RNA μεταθετών στοιχείων (Zhang, Yazaki et al. 2006).

Ο μηχανισμός της RNA εξαρτώμενης DNA μεθυλίωσης (RdDM), ο οποίος προκαλεί μεταγραφική σίγηση γενετικών τόπων, παρατηρήθηκε αρχικά από τους Wassengger et al. το 1994, κατά τον πολλαπλασιασμό του ιοειδούς PSTVd σε διαγονιδιακό καπνό που έφερε ήδη το ίδιο το ιοειδές (Wassenegger, Heimes et al. 1994). Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί έναν πρωτοποριακό μηχανισμό *de novo* μεθυλίωσης, στα φυτά, ο οποίος μέσω μικρών dsRNAs, 24 νουκλεοτιδίων, καθοδηγεί ειδικά τη *de novo* μεθυλοτρανσφεράση DRM2 σε ομόλογες αλληλουχίες DNA ώστε να επιτευχθεί η μεθυλίωση-καταστολή τους. Ειδικότερα, η Pol IV, της οποίας η πρόσδεση διευκολύνεται από την CLSY1, μεταγράφει ssRNAs από περιοχές επαναλαμβανόμενου DNA και μεταθετών στοιχείων. Έπειτα, η RNA εξαρτώμενη πολυμεράση RDR2 πολυμερίζει τα ssRNAs σε dsRNAs, τα οποία



και κόβονται σε τμήματα των 24 νουκλεοτιδίων από την εξωνουκλεάση DCL3 (DICER-3). Τα μικρά αυτά RNAs φορτώνονται στην πρωτεΐνη AGO4, η οποία εντοπίζεται στα Cajal bodies, και στη συνέχεια το σύμπλοκο αυτό αλληλεπιδρά με τις NRPE1 και NRPE2 υπομονάδες της Pol V καθώς και με τη μεθυλοτρανσφεράση DRM2. Η αλληλεπίδραση αυτή, είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του μηχανισμού και εντοπίζεται τοπολογικά στον πυρήνα στα AGO4-NRPE1 σωματίδια τα οποία πιθανώς να αποτελούν τα σημεία δράσης του RdDM (Li, Henderson et al. 2008). Η Pol V μεταγράφει περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες και τα μετάγραφα αυτά λειτουργούν ως ικρίωμα (scaffold) για την πρόσδεση της AGO4 που φέρει το αρχικό 24nt siRNA, σύμπλοκο που αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη IDN2. Επίσης, το σύμπλοκο αυτό, αλληλεπιδρά με την υπομονάδα NRPE1 της Pol V καθώς και με την πρωτεΐνη SPT5L. Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις φαίνεται να δρουν βοηθητικά στην καθοδήγηση της μεθυλοτρανσφεράσης RDM2 στις αλληλουχίες στόχους (Εικόνα 1.1)(Law and Jacobsen 2010, Dalakouras and Wassenegger 2013).

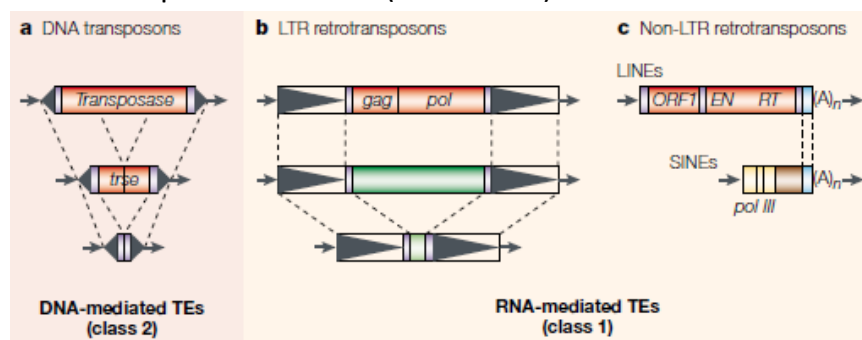


Εικόνα 1.1. Σχηματική απεικόνιση της RNA εξαρτώμενης DNA μεθυλίωσης. (Law and Jacobsen 2010)

### 1.3. Τα μεταθετά στοιχεία

Τα μεταθετά στοιχεία ανακαλύφθηκαν το 1940 από την Barbara McClintock λόγω της ικανότητάς τους να προκαλούν χρωμοσωματικές ανωμαλίες σε πυρήνες καλαμποκιού (McClintock 1956). Μετά από χρόνια μελέτης, βρέθηκαν να αποτελούν κινητές αλληλουχίες DNA μέσα στο γονιδίωμα, δηλαδή είναι ικανές να μεταφέρονται μόνες τους από μία περιοχή σε μία άλλη ενώ αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων (Feschotte, Jiang et al. 2002). Βασικό τους χαρακτηριστικό, η μη αυτόνομη μετακίνηση τους στο γονιδίωμα και η ικανότητά τους να μεταφέρουν μαζί τους μεγάλες αλληλουχίες DNA προκαλώντας αναδιάταξη του γονιδιώματος και μεταλλάξεις (Benjamin Lewin 2004).

Τα μεταθετά στοιχεία κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο που γίνεται η μετακίνησή τους στο γονιδίωμα. Τα μεταθετά στοιχεία κατηγορίας I μετακινούνται με RNA διαμεσολαβούμενο τρόπο, κωδικοποιώντας εντός τους τις απαραίτητες πρωτεΐνες για τη μετακίνησή τους, τρόπος ο οποίος ομοιάζει με τον τρόπο διπλασιασμού των ρετροϊών. Τα μεταθετά στοιχεία της κατηγορίας II μετακινούνται με τη βοήθεια του αντίστοιχου ενζύμου τους που ονομάζεται μεταθετάση και η 3<sup>η</sup> κατηγορία περιλαμβάνει τα ελιτρόνια τα οποία μετακινούνται με βάση τον μηχανισμό του «κυλιόμενου κύκλου» (Εικόνα 1.2).

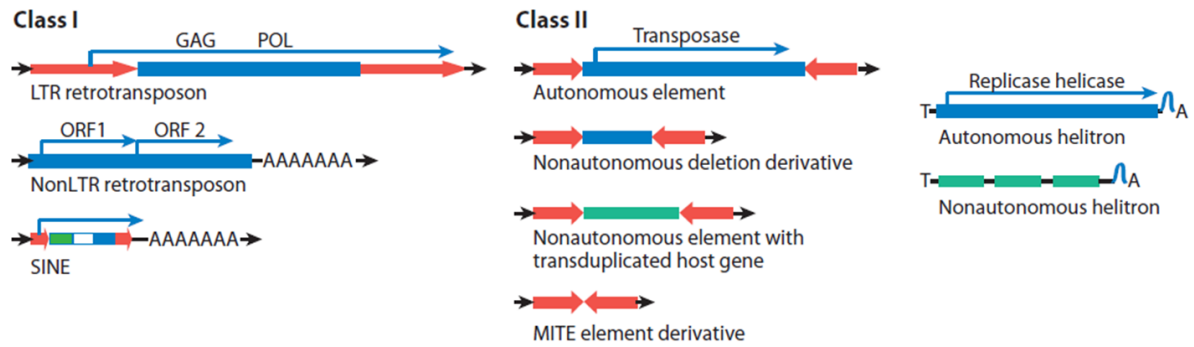


Εικόνα 2.2.Κατηγορίες μεταθετών στοιχείων στα φυτά(Feschotte, Jiang et al. 2002)

Τα μεταθετά στοιχεία κατηγοριοποιούνται επίσης και σύμφωνα με την αυτονομία στη μετακίνησή τους. Αυτόνομα μεταθετά στοιχεία ονομάζονται εκείνα τα οποία κωδικοποιούν εντός τους το αντίστοιχο ένζυμο που είναι απαραίτητο για τη μετακίνησή τους, μεταθετάση ή ρεπλικάση , έτσι το μεταφέρουν μαζί τους κατά τη μετακίνηση, ενώ μη αυτόνομα ονομάζονται τα μεταθετά στοιχεία των οποίων η μετακίνηση εξαρτάται από την ανεξάρτητη έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών τους. (Εικόνα 1.2) .

#### 1.4. Τα μεταθετά στοιχεία στα φυτά

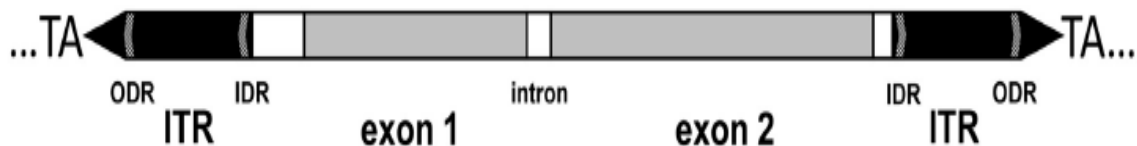
Τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να αποτελέσουν το μεγαλύτερο τμήμα των γονιδιωμάτων των ευκαρυωτών. Μάλιστα, αποτελούν το 50%-80% του γονιδιώματος ορισμένων φυτικών ειδών (grass genomes). Η ικανότητά τους αυτή να μετατίθενται και να δίνουν μία δυναμικότητα στο γονιδίωμα έχει προταθεί να αποτελεί και μία από τις αιτίες για το μεγάλο μέγεθος των φυτικών γονιδιωμάτων. Στα φυτά απαντώνται μία ποικιλία από μεταθετά στοιχεία με πληθώρα χαρακτηριστικών (Εικόνα 1.3). Οι οικογένειες των DNA μεταθετών στοιχείων LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements) και SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements) γνωστές κυρίως για τον μεγάλο αριθμό των επαναλήψεων τους στον άνθρωπο είναι παρούσες και στα φυτά και μάλιστα σε μεγάλο αριθμό επαναλήψεων σε ορισμένα είδη. Οι 2 προαναφερθείσες οικογένειες απαρτίζονται από διάσπαρτες επαναλήψεις αναλόγως του μεγέθους τους και ονομάζονται έτσι λόγω της συχνής παρουσίας και της ευρείας κατανομής τους στο γονιδίωμα. Παρόλα αυτά, η πλειοψηφία των μεταθετών στοιχείων που απαντώνται σε φυτικά γονιδιώματα ανήκουν στις κατηγορίες των MITEs (Miniature Inverted-Repeats Transposable Elements) και των LTRs (Long Terminal Repeats) ρετροτρανσποζονίων. Τα MITEs είναι μη αυτόνομα DNA μεταθετά στοιχεία που έχουν μέγεθος 200-500bp, φέρουν στα άκρα τους ανάστροφες επαναλήψεις, έχουν αλληλουχία στόχο 2-3bp και δεν περιέχουν κωδικές αλληλουχίες. Παρόλα αυτά, οι πληροφορίες που αφορούν το μηχανισμό μετάθεσης των MITEs είναι λιγοστές καθώς δεν έχουν βρεθεί ακριβώς οι αλληλουχίες που επιτρέπουν την αποκοπή και επικόλλησή τους ενώ δεν έχει βρεθεί ακόμα κανένα MITE το οποίο να είναι ενεργό. Αντίθετα από τα MITEs, τα LTRs αποτελούν την πιο συχνή κατηγορία μεταθετών στοιχείων που συναντώνται στα φυτά και ανήκουν στην κατηγορία των ρετροτρανσποζονίων (RNA μεταθετά στοιχεία). Μάλιστα μπορούν να βρεθούν σε τόσες πολλές επαναλήψεις (30.000-45.000Mbp) σε φυτικά γονιδιώματα ώστε μπορούν να εξηγήσουν εν μέρη το γεγονός ότι μεγάλου μεγέθους γονιδιώματα έχουν σχετικά λίγες κωδικοποιούσες περιοχές. Αν και όπως φαίνεται, η παρουσία των μεταθετών στοιχείων στα φυτά είναι εξαιρετικά έντονη, παραδόξως, έχουν βρεθεί ελάχιστα ενεργά μεταθετά στοιχεία. Το γεγονός αυτό εξηγείται καθώς τα στοιχεία αυτά αναγνωρίζονται και καταστέλλονται από το μηχανισμό της RNA εξαρτώμενης DNA μεθυλίωσης (RdDM).



Εικόνα 1.3 Οι τρεις κατηγορίες μεταθετών στοιχείων στα φυτά, αυτόνομα και μη μεταθετά στοιχεία μεταθετών στοιχείων κατηγορίας II (Lisch 2009).

## 1.5 Το μεταθετό στοιχείο Minos

Η πρώτη αναφορά στο μεταθετό στοιχείο Minos έγινε το 1991 από τους G.Franz και C. Savakis από τους οποίους και ανακαλύφθηκε σε μία διαλογή (screening) στο γονιδιωματικό DNA της μύγας *Drosophila hydei*. Το Minos ανήκει στην υπερ-οικογένεια των μεταθετών στοιχείων Tc1/mariner οποία στην πλειονότητά της αποτελείται από μη ενεργά μεταθετά στοιχεία τα οποία απαντώνται τόσο σε έντομα, ψάρια αλλά και θηλαστικά. Με μήκος 1.8kb αποτελείται στα άκρα του από 2 τέλειες ανάστροφες αλληλουχίες 254bp η κάθε μία και ανάμεσά τους περικλείονται 2 μη επικαλυπτόμενα ανοικτά πλαίσια διαβάσματος, τα οποία αργότερα αναγνωρίστηκαν ως η μεταθετάση του με αλληλουχία 153 αμινοξέων (Εικόνα 1.4). Από το γεγονός αυτό, φαίνεται ότι το Minos αποτελεί μεταθετό στοιχείο το οποίο μετατίθεται στο γονιδίωμα με τρόπο αποκοπής-επικόλλησης.



Εικόνα 1.4. Δομή του Minos. ITR=Inverted Terminal Repeats. (Pavlopoulos, Oehler et al. 2007)

Μετά την ανακάλυψή του, το μεταθετό στοιχείο Minos προτάθηκε ως ένα νέο εργαλείο της γενετικής μηχανικής από πολυάριθμες ερευνητικές ομάδες. Το Minos έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι στιγμής για μελέτες σε

ποικίλους οργανισμούς όπως το κουνούπι, τη μύγα, το ποντίκι και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές δείχνοντας ότι το μεταθετό αυτό στοιχείο, μπορεί να μετατεθεί στους οργανισμούς αυτούς με μεγάλη συχνότητα, να μεταθέσει μαζί του μεγάλες αλληλουχίες που έχουν κλωνοποιηθεί εντός του και απουσία της μεταθετάσης του μπορεί να δημιουργήσει σταθερές διαγονιδιακές σειρές. Το γεγονός της μη αυτόνομής του μετακίνησης σε αυτή την πληθώρα οργανισμών χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση άλλων πρωτεϊνών καθιστά το Μίνος ως ένα πολλά υποσχόμενο γενετικό εργαλείο σε σχέση με άλλα ήδη χρησιμοποιούμενα μεταθετά στοιχεία (Loukeris, Arca et al. 1995, Catteruccia, Nolan et al. 2000, Drabek, Zagoraiou et al. 2003, Hozumi, Kawai et al. 2010).

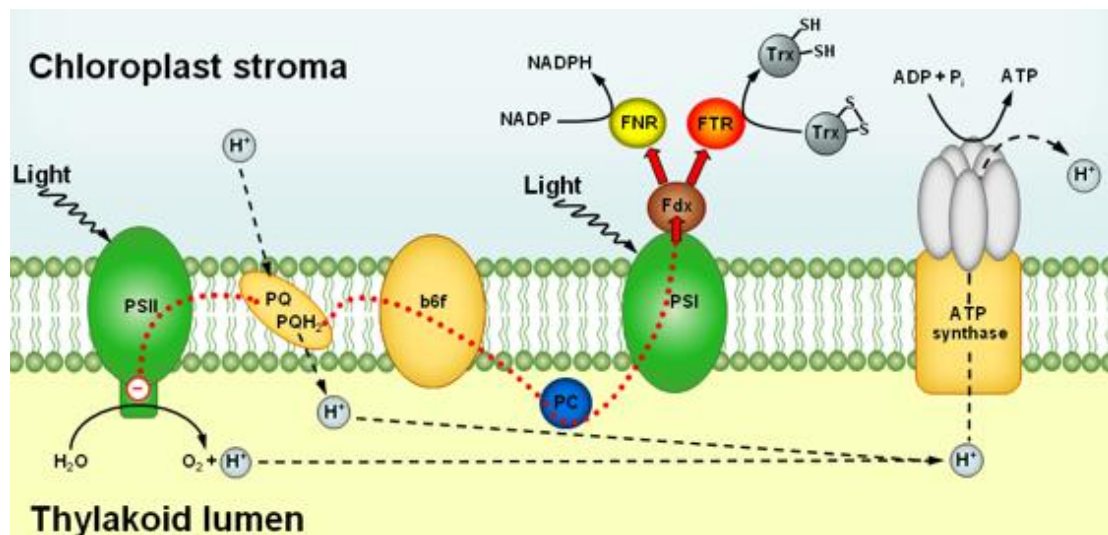
### **1.6. Τα μεταθετά στοιχεία ως εργαλείο της γενετικής μηχανικής στα φυτά**

Η ανάπτυξη κατάλληλων τεχνικών για τη γενετική τροποποίηση τόσο των ευκαρυωτών όσο και των προκαρυωτών αποτέλεσε βασικό στοιχείο μελέτης της μοριακής βιολογίας. Επιπλέον, τόσο η οικονομική εκμετάλλευση φυτικών ειδών όσο και η μαζική παραγωγή ετερόλογων γονιδιακών προϊόντων αποτέλεσαν κινητήρια δύναμη για την ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας φυτών. Η χρήση της τυχαίας μεταλλαξιγένεσης (EMS mutagenesis), της μεταλλαξιγένεσης μέσω ένθεσης (T-DNA mutagenesis), της ένθεσης με τη χρήση ιϊκών φορέων και της φυτικής αναγέννησης μέσω φυτικού κάλλου αποτελούν τα πλέον βασικά εργαλεία της βιοτεχνολογίας φυτών. Επιπλέον, η χρήση σημασμένων μεταθετών στοιχείων για την παγίδευση ενισχυτών (enhancer trapping) καθώς και η μεταλλαξιγένεση μέσω μεταθετών στοιχείων (transposon tagging), αποτελεί επανάσταση στη βιοτεχνολογία φυτών, ειδικότερα για το μετασηματισμό ειδών των οποίων το γονιδίωμα δεν έχει αλληλουχηθεί ή σε και φυτικά είδη στα οποία δεν μπορεί να εφαρμοστεί ένα αποδοτικό σύστημα μετασηματισμού. Με αρχή το μεταθετό στοιχείο P της δροσόφιλας (Rubin and Spradling 1982) ξεκίνησε η ένθεση μεταθετών στοιχείων σε χρωμοσώματα της γαμετικής σειράς εμβρύων. Η χρήση σημασμένων μεταθετών στοιχείων για τη λειτουργική ανάλυση γονιδίων έχει πραγματοποιηθεί σε πληθώρα οργανισμών μεταξύ των οποίων φυτά, έντομα, ψάρια, νηματώδεις και θηλαστικά. Ειδικότερα στα φυτά, η χρήση σημασμένων μεταθετών στοιχείων για τη λειτουργική ανάλυση γονιδίων

προτάθηκε το 1994 από τους *Walden et al.* που μελέτησαν πρωτοπλάστες οι οποίοι μπορούσαν να αναπτυχθούν απουσία αυξίνης ή κυτοκίνης (*Walden, Fritze et al. 1994*). Έπειτα, περισσότερες ομάδες τελειοποίησαν το σύστημα αυτό με τη χρήση ισχυρών υποκινητών και ενισχυτών πραγματοποιώντας τεχνικές εμπρόσθιας γενετικής (*forward genetics*) και απομονώνοντας φαινοτυπικά μεταλλάγματα τα οποία στη συνέχεια αναλύονταν με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών (*Kardailsky, Shukla et al. 1999, Weigel, Ahn et al. 2000, Marsch-Martinez, Greco et al. 2002*).

### 1.7. Φωτοσύνθεση-Γενικά στοιχεία

Η φωτοσυνθετική διαδικασία αποτελεί την κεντρικότερη λειτουργία του φυτικού κυττάρου καθώς η ενδεδειγμένη ρύθμιση και λειτουργία της, επιτυγχάνει τη βέλτιστη και επαρκή παραγωγή ATP για την κάλυψη όλων των λειτουργιών του φυτικού κυττάρου. Η φωτοσύνθεση πραγματοποιείται εντός των θηλακοειδών και των *grana* των χλωροπλαστών και βασικά πρωτεϊνικά μέρη του μηχανισμού αποτελούν οι φωτοσυνθετικές χρωστικές, το φωτοσύστημα II (PSII), το φωτοσύστημα I (PSI) και το κυτόχρωμα  $b_6f$ . Οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή αποτελούν τις φωτοσυνθετικές χρωστικές οι οποίες διεγείρονται στο ορατό φάσμα φωτός και μεταφέρουν την ενέργειά τους στα 2 φωτοσυστήματα. Κατά τη φωτοσύνθεση, αφού τα 2 κέντρα αντίδρασης των φωτοσυστημάτων I και II έχουν τροφοδοτηθεί με ηλεκτρόνια ( $e^-$ ) ακολουθεί μία ορθολογική διοχέτευση της ενέργειας στη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων η οποία τελικά θα καταλήξει να τροφοδοτήσει την ATPάση. Συγκεκριμένα, το PSII τροφοδοτεί τους μεταφορείς ηλεκτρονίων, πλαστοκινόνη και πλαστοκυανίνη, μέσω του κυτοχρώματος  $b_6f$  ενώ τελικός αποδέκτης της ροής είναι το PSI.



Εικόνα 3.5 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης (<http://www.photobiology.info/Schurmann.html>)

Η αποδοτικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε ATP, οπότε και η έκφραση των γονιδίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, δεν είναι σταθερή και επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες τόσο βιοτικούς όσο και αβιοτικούς όπως οι μικροβιακές μολύνσεις, η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και CO<sub>2</sub>, η ένταση και ποιότητα του φωτός καθώς και η συγκέντρωση των πολυαμινών (Ioannidis and Kotzabasis 2007).

### 1.8. Τα γονίδια *psaA*, *psbA*, *ATPa*, *accD*, *ndhI*, *ndhC*, *rps3*, *IF*.

Τα γονίδια *psaA*, *psbA*, *ATPa*, *accD*, *ndhI*, *ndhC*, *rps3* και *IF* αποτελούν όλα μέρος του χλωροπλαστικού γονιδιώματος και μέρος του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

| Γονίδιο     | Πρωτεΐνη                                 |
|-------------|--|
| <i>psaA</i> | Φωτοσύνθεση I/Αποπρωτεΐνη A1             |
| <i>psbA</i> | Φωτοσύνθεση II/ Πρωτεΐνη D1              |
| <i>ATPa</i> | ATP συνθάση/Υπομονάδα A                  |
| <i>accD</i> | β- υπομονάδα της ακετυλ-CoA καρβοξυλάσης |
| <i>ndhI</i> | Υπομονάδα της NADH αφυδρογονάσης         |
| <i>ndhC</i> | Υπομονάδα D3 της NADH αφυδρογονάσης      |
| <i>rps3</i> | Ριβοσωματική πρωτεΐνη S3                 |
| <i>IF</i>   | Παράγοντας έναρξης 1                     |

## 2.Σκοπός

---

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών Ι του Πανεπιστημίου Κρήτης με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Κ. Καλαντίδη και μέλη της τριμελούς επιτροπής τους κυρίους Χ. Σπηλιανάκη και Δ. Τζαμαρία.

Η εργασία αυτή χωρίζεται σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος σκοπός των πειραματικών διαδικασιών που ακολουθήθηκαν ήταν η ανάπτυξη ενός συστήματος ελεγχόμενης μετάθεσης του μεταθετού στοιχείου *Minos* της Δροσόφιας, στο φυτό *A.thaliana*. Με τη δημιουργία κατάλληλων διαγονιδικών φυτών *A.thaliana* που να φέρουν το μεταθετό στοιχείο, τον προσδιορισμό της συχνότητας μετάθεσής του, την μελέτη των περιοχών αποκοπής και επικόλλησής του στο φυτικό γονιδίωμα καθώς και την πιθανή μεθυλίωσή του εξετάστηκε το μεταθετό στοιχείο *Minos* ως ένα πολλά υποσχόμενο γενετικό εργαλείο για τη βιοτεχνολογία φυτών, κατάλληλο για τη μεταλλαξιγένεση γενετικών τόπων μέσω της εισαγωγής του σε αυτούς, την παγίδευση εξωνίων και ενισχυτών. Η ανάπτυξη και εφαρμογή ενός τέτοιου συστήματος στα φυτά έχει ιδιαίτερη σημασία για τη μελέτη φυτών που μέχρι σήμερα δεν έχουν αναπτυχθεί αποδοτικοί τρόποι δημιουργίας μεταλλαγμάτων τους (με τη δημιουργία ενός μεταλλαγμένου οργανισμού που φέρει το μεταθετό στοιχείο και την ενεργοποίησή του, δημιουργούνται μία πληθώρα μεταλλαγμάτων).

Στη συνέχεια, σκοπός του δεύτερου μέρους των πειραματικών διαδικασιών ήταν ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης βασικών γονιδίων των φωτοσυστημάτων του διαγονιδιακού καπνού *N.benthamiana* 6.4 σε συνθήκες σίγησης και μη του διαγονιδίου της GFP και του φυτού *A.thaliana* σε συνθήκες σίγησης και μη του διαγονιδίου GUS. Η πειραματική αυτή προσέγγιση βασίστηκε σε προηγούμενα δεδομένα (Χ. Κωτάκης, μη δημοσιευμένα δεδομένα) τα οποία έδειξαν σημαντικές διαφορές στη στοιχειομετρία βασικών γονιδίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στις αντίστοιχες συνθήκες. Η σημασία της προσέγγισης αυτής αντικατοπτρίζεται στο γεγονός ότι η RNA σίγηση στα φυτά φαίνεται να είναι ένας μηχανισμός ο οποίος «συνομιλεί» και εμπλέκεται με τη γενικότερη φυσιολογία του κυττάρου.



## 3.Υλικά και Μέθοδοι

### 3.1.Βακτηριακά στελέχη

| Βακτήριο             | Στέλεχος | Χρήση                   |
|----------------------|----------|-------------------------|
| <i>E. coli</i>       | DH5a     | Κατασκευή πλασμιδίων    |
| <i>E. coli</i>       | JM109    | Κατασκευή πλασμιδίων    |
| <i>A.tumefaciens</i> | AGL-1    | Φυτικός μετασχηματισμός |

### 3.2.Ολιγονουκλεοτίδια-Εκκινητές PCR

- Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών για την εργασία πάνω στο μεταθετό στοιχείο *Minos*.

| Γονίδιο                                     | Όνομα εκκινητή      | Αλληλουχία 5'-3'                                 | Tm (°C) | Πολλαπλασιαζόμενο τμήμα (bps) |
|---|---------------------|--|---------|-------------------------------|
| Minos                                       | Minos_EcoRI_for     | GACT <b>GAATTC</b> TAAATTATGCCAA<br>GCACGTTAG    | 60      | 835                           |
|   | Minos_XmaI_rev      | GACT <b>CCCGGG</b> TAGCTTAAGATAT<br>TTTTCGTTTTTC | 60      |                               |
| Μεταθετάση (κλωνοποίηση στο Nos πλασμίδιο)  | Transpo_XhoI_for    | GACT <b>CTCGAG</b> ATGGTTCGTGGTA<br>AACCTAT      | 60      | 1043                          |
|   | Transpo_XbaI_rev    | GACT <b>TCTAGA</b> TTAGAATTGTGTA<br>ACGTCGC      | 60      |                               |
| Μεταθετάση (κλωνοποίηση στο 35s πλασμίδιο)  | Transpo_HindIII_for | GACT <b>AAGCTT</b> ATGGTTCGTGGTA<br>AACCTAT      | 60      | 1045                          |
|   | Transpo_SacI_rev    | GAGACT <b>GAGCTC</b> TTAGAAATTGT<br>GTAACGTCGC   | 60      |                               |
| Μεταθετάση (κλωνοποίηση στο OP10 πλασμίδιο) | Transpo_SalI_for    | GACT <b>GTTCGAC</b> ATGGTTCGTGGTA<br>AACCTAT     | 60      | 1043                          |
|   | Transpo_BamHI       | GACT <b>GGATCC</b> TTAGAATTGTGTA<br>ACGTCGC      | 60      |                               |

- Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολ/μό γονιδίων που εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση και χρησιμοποιήθηκαν για ποσοτική PCR.

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολ/μό τμημάτων DNA του φυτού *A.thaliana*.

| Γονίδιο | Όνομα εκκινητή | Αλληλουχία 5'-3'       | Tm (°C) | Πολλαπλασιαζόμενο τμήμα (bps) |
|---------|----------------|------------------------|---------|-------------------------------|
| At psaA | At_psaA_For_1  | GAATGGGCTAAACCCGGTCA   | 65      | 165                           |
|         | At_psaA_Rev_1  | AGAGAGTTGGCCGAAATGGG   | 65      |                               |
| At psbA | At_psbA_For_1  | GCGAAAGCGAAAGCCTATGG   | 65      | 147                           |
|         | At_psbA_Rev_1  | GAGGAGCAGCAATGAATGCG   | 65      |                               |
| At ATPa | At_ATPa_For_1  | AGATACCGGTGAGTGAGGCT   | 65      | 120                           |
|         | At_ATPa_Rev_1  | TACCTGGGGCAGGAGATTCA   | 65      |                               |
| At accD | At_accD_For_1  | TGAAGACATGGTCTCTGCGG   | 65      | 151                           |
|         | At_accD_Rev_1  | CCCAAGGGCTACCGGAATAC   | 65      |                               |
| At ndhI | At_ndhI_For_1  | ACAAACCCTACGAGCTGCAA   | 65      | 137                           |
|         | At_ndhI_Rev_1  | AATGGATTCGACCGCGGAAA   | 65      |                               |
| At ndhC | At_ndhC_For_1  | CAATTAGGAAGGGGCCGGAG   | 65      | 158                           |
|         | At_ndhC_Rev_1  | ACTCATTGCCACGGATACA    | 65      |                               |
| At rps3 | At_rps3_For_1  | TCCAATCCGTATGGGGATCCTA | 65      | 161                           |
|         | At_rps3_Rev_1  | TTTCCGTCGATACGTCCTGC   | 65      |                               |
| At IF   | At_IF_For_1    | GTCTAGAAAATGGCTGTCCCCT | 65      | 165                           |
|         | At_IF_Rev_1    | CGAACGGCATGGTTCGATTT   | 65      |                               |

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολ/μό τμημάτων DNA του φυτού *N.benthamiana*.

| Γονίδιο | Όνομα εκκινητή | Αλληλουχία             | Tm(°C) | Πολλαπλασιαζόμενο τμήμα (bps) |
|---------|----------------|------------------------|--------|-------------------------------|
| Nb psaA | Nb_psaA_For_1  | GTAGACCGGCCAAATGGTGA   | 60     | 123                           |
|         | Nb_psaA_Rev_1  | GTGCATTGGTCTTTGCAACCT  | 60     |                               |
| Nb psbA | Nb_psbA_F2     | TCCGGTGCCGTTATTCCTAC   | 60     | 163                           |
|         | Nb_psbA_R2     | AAGCTCTCACTCACGACCCA   | 60     |                               |
| Nb ATPa | Nb_ATPa_F2     | TGTATCAACAAACCATCGCCC  | 60     | 136                           |
|         | Nb_ATPa_R2     | TTGCTCGTATTCACGGTCTT   | 60     |                               |
| Nb accD | Nb_accD_F2     | GGCCAACTAAACAGCATTCCA  | 60     | 195                           |
|         | Nb_accD_R2     | CCATTTGCATCAAGCTCAAACC | 60     |                               |

|         |               |                            |    |     |
|---------|---------------|----------------------------|----|-----|
| Nb ndhI | Nb_ndhI_For_1 | TGGTCAACAAACAATACGAGCC     | 60 | 142 |
|         | Nb_ndhI_Rev_1 | AGTGGATTCGGCCTCGGAAA       | 60 |     |
| Nb ndhC | Nb_ndhC_F2    | GAACCAATGGGCGATGCTTG       | 60 | 128 |
|         | Nb_ndhC_R2    | TCACCCAATACGTCGAAACTCA     | 60 |     |
| Nb rps3 | Nb_rps3_For_1 | TGAGAACGTCCTCCAGCGT        | 60 | 143 |
|         | Nb_rps3_Rev_1 | AGTTCGTTTGTAAATTCCTCGATTCC | 60 |     |
| Nb IF   | Nb_IF_F2      | GGTCTGTTCCGGGTTTGT         | 60 | 200 |
|         | Nb_IF_R2      | CCCACGAAAGGAATGGTGAAG      | 60 |     |

### 3.3.Θρεπτικά Μέσα

#### 3.3.1.Καλλιέργεια Βακτηρίων

Για τις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani), περιεκτικότητας 1% (w/v) πεπτόνη – 0,5% εκχύλισμα ζύμης – 0,5% (w/v) NaCl , με την προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού επιλογής, σύμφωνα με τις ανάγκες. Η καλλιέργεια επώαστηκε στον κλίβανο των 37°C υπό έντονη ανακίνηση. Για τις στερεές καλλιέργειες σε τρυβλία Petri χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο LB, ίδιας σύστασης με το υλικό της υγρής καλλιέργειας και περιεκτικότητας 1,5% (w/v) σε άγαρ.

#### 3.3.2.Παραγωγή στερεού θρεπτικού μέσου MS

Για την παραγωγή στερεού θρεπτικού μέσου MS σε τρυβλία Petri κατάλληλων για την εκβλάστηση σπόρων ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των (Murashige & Skoog, 1962) δηλαδή προσθήκη:

- μακροστοιχεία 100ml/L (CaCl<sub>2</sub> 2.99M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25M, KNO<sub>3</sub> 18.79M, MgSO<sub>4</sub> 1.50M, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 20.61M)
- μικροστοιχεία 1g/L (CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.11μM, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0.10mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.10mM, KI 5.00μM, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.10mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 1.03μM, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 29.91μM) Βιταμίνες 0-103 mgr/ L (Γλυκίνη 26.61mM, Μυο-Ινοσιτόλη 0.56mM, Νικοτινικό οξύ 4.06mM, Πυριδοξίνη HCl 2.43mM, Θειαμίνη HCl 0.30mM)
- άγαρ 8 gr/L
- Κατάλληλο αντιβιοτικό

### 3.4. Παρασκευή Επιλεκτικών Κυττάρων *E. coli* με $RbCl_2$ .

Εμβολιάστηκε θρεπτικό μέσο PSI (0.5% yeast extract, 2% Tryptone, 0.5%  $MgSO_4$ ) των 250ml με μικρότερη καλλιέργεια των 2.5ml, η οποία είχε αναπτυχθεί στους 37°C για ~16 ώρες, και αφέθηκε να αναπτυχθεί στους 37°C μέχρι να φτάσει σε οπτική πυκνότητα 0.48 (550nm). Έπειτα, η καλλιέργεια επώαστηκε στον πάγο για 15 λεπτά και τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση (5000rpm/5 λεπτά/4°C). Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100ml παγωμένου διαλύματος TFB I (30mM  $CH_3CO_2K$ , 100mM  $RbCl_2$ , 10mM  $CaCl_2$ , 50mM  $MnCl_2$ , 15% v/v γλυκερόλη) και τα κύτταρα επώαστηκαν στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολούθησε νέα κατακρήμνιση (5000rpm/5 λεπτά/4°C) και μετά την απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 10ml παγωμένου διαλύματος TFB II (10mM MOPS, 75mM  $CaCl_2$ , 10mM  $RbCl_2$  και 15% v/v γλυκερόλη) όπου και παρέμειναν στον πάγο για 30 λεπτά. Τέλος, τα κύτταρα φυλάχθηκαν στους -80°C σε ποσότητες των 100μl.

### 3.5. Παρασκευή Επιλεκτικών Κυττάρων *A. tumefaciens* με $CaCl_2$

Εμβολιάστηκε καλλιέργεια θρεπτικού μέσου LB των 250ml με μικρότερη καλλιέργεια των 10ml, η οποία είχε αναπτυχθεί στους 28°C για ~16 ώρες, και αφέθηκε να αναπτυχθεί στους 28°C μέχρι να φτάσει σε οπτική πυκνότητα 0.6 (600nm). Έπειτα, το ίζημα συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρηση (3000rpm/5 λεπτά/4°C) και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 5ml παγωμένου  $CaCl_2$  20mM. Τέλος, τα κύτταρα φυλάχθηκαν στους -80°C σε ποσότητες των 100μl.

### 3.6. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Η πέψη μορίων DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (New England Biolabs, Minotech) πραγματοποιήθηκε με επώαση στην προτεινόμενη θερμοκρασία και παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος της

αντίδρασης, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης, η ποσότητα του προστιθέμενου ενζύμου, καθώς και ο χρόνος επώασης καθορίστηκαν ανάλογα με την ποσότητα του DNA.

### **3.7.Αντίδραση συγκόλλησης πλασμιδιακού φορέα-ενθέματος με τη χρήση DNA λιγάσης**

Η αντίδραση συγκόλλησης πραγματοποιήθηκε σε όλα τα προς κλωνοποίηση τμήματα DNA με τη χρήση T4 DNA λιγάσης (Promega, 1-3u/μl) και σε αναλογία 3 μόρια ενθέματος:1 μόριο φορέα. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε τα προς κλωνοποίηση τμήματα σε αναλογία 3:1, 1μl 10x promega ligation ρυθμιστικό διάλυμα, 1μl Promera ligase (1-3u/μl) και ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 10μl. Η αντίδραση επώαστηκε για ~16 ώρες στους 16°C.

### **3.8.Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης**

Μετά την ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο, η ζώνη του πηκτώματος που περιείχε το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει κόπηκε με νυστέρι μετά από παρατήρηση του πηκτώματος στο υπεριώδες φως. Στη συνέχεια, ο καθαρισμός του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel, Germany) ακολουθώντας τις οδηγίες της εταιρείας.

### **3.9.Βακτηριακός Μετασχηματισμός E. coli με τη χρήση θερμικού σοκ**

Μετά το ξεπάγωμα των επιδεκτικών κυττάρων στον πάγο και την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πλασμιδίου (~10pg) ή προϊόντος συγκόλλησης (2μl από αντίδραση 10μl), το βακτηριακό εναιώρημα επώαστηκε στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολούθησε επώαση στους 42°C για 30 δευτερόλεπτα και έπειτα νέα επώαση στον πάγο για 2 λεπτά. Μετά την

προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB, τα βακτήρια επώαστηκαν υπό συνεχή ανάδευση στους 37°C για 1 ώρα (ανάκαμψη). Τέλος, μετά από φυγοκέντρηση (1 λεπτό/13000rpm), συλλέχθηκε το βακτηριακό ίζημα και απλώθηκε κατάλληλη ποσότητα αυτού σε τρυβλία petri με LB/άγαρ και κατάλληλο αντιβιοτικό. Επώαστηκαν στους 37°C ολονύκτια.

### **3.10.Βακτηριακός Μετασχηματισμός *A.tumefaciens* με τη χρήση θερμικού σοκ (freeze-thaw method)**

Μετά το ξεπάγωμα των επιδεικτικών κυττάρων στον πάγο και την προσθήκη 5μg πλασμιδίου το βακτηριακό εναιώρημα παγώθηκε αμέσως σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια, τα βακτήρια επώαστηκαν ξεπαγώνοντας σταδιακά στους 37°C για 30 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκε στο βακτηριακό εναιώρημα 1mL LB και επώαστηκε στους 28°C υπό συνεχή ανάδευση για 2 ώρες (ανάκαμψη). Τέλος, το βακτηριακό ίζημα συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρωσή του (1 λεπτό/13000rpm) και μέρος του απλώθηκε σε τρυβλία petri με κατάλληλο αντιβιοτικό. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 28°C για 2-3 μέρες.

### **3.11.Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (minipreps) με τη χρήση λυσοζύμης-πρωτόκολλο NID (Lezin, Kosaka et al. 2011).**

Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε από καλλιέργειες βακτηρίων του 1-1.5ml, που είχαν αναπτυχθεί για περίπου 16 ώρες στους 37°C. Οι καλλιέργειες αυτές είχαν προκύψει από εμβολιασμό θρεπτικού υλικού LB με κατάλληλο αντιβιοτικό και μεμονωμένες αποικίες από το μετασχηματισμό βακτηρίων. Τα βακτήρια συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση (7000rpm/1 λεπτό/RT) και επαναιωρήθηκαν σε 150μl NID extraction buffer (5% sucrose, 20-50mM EDTA, 50mM Tris pH 8, 0,75M NH<sub>4</sub>Cl, 0,5% IGEPAL CA-630 or Triton X-100, 20-50mM CaCl<sub>2</sub>) και 1.5μl λυσοζύμης (100μg/ml, RNase A 25μg/ml). Ακολούθησε επώαση του βακτηριακού εναιωρήματος στους 65°C για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση του (13000rpm/10 λεπτά/RT). Μετά την απομάκρυνση του

ιζήματος, προστέθηκαν στο υπερκείμενο 120μl ισοπροπανόλης και μετά από ισχυρή ανάδευση τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (7000rpm/10 λεπτά/RT). Ακολούθησε πλύσιμο του ιζήματος με 750μl 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση ξανά (7000rpm/5 λεπτά/RT). Μετά το στέγνωμα του ιζήματος, το πλασμιδιακό DNA επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο ddH<sub>2</sub>O

### **3.12. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η ηλεκτροφορητική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen) πυκνότητας 1-2%, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (0,3μg/ml), σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE [0,04M Tris – 0,1% (v/v) οξικό οξύ – 1mM EDTA, pH 8]. Ακολούθησε παρατήρηση του πηκτώματος σε συσκευή παραγωγής υπεριώδους φωτός.

### **3.13. Ηλεκτροφόρηση RNA σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης**

Η ηλεκτροφορητική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 1.2% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (0,3μg/ml), σε ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΐδης 1.8% και 1x MOPS [0.02M MOPS (pH 7.0), 2mM CH<sub>3</sub>COONa, 1mM EDTA (pH 8.0)]. Τα δείγματα φορτώθηκαν με ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος και αφού ήρθαν σε βρασμό για 5 λεπτά στους 100°C ηλεκτροφορήθηκαν για περίπου 1 ώρα στα 100V. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα φωτογραφίστηκε σε συσκευή παραγωγής υπεριώδους φωτός.

### **3.14. Καθαρισμός DNA με Φαινόλη/Χλωροφόρμιο**

Ο καθαρισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 400μl (όγκος V). Προστέθηκαν 400μl (V) PhOH/CHCl<sub>3</sub> (25:24) και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση. Συλλέχθηκε η υδατική φάση (υπερκείμενη) μετά από φυγοκέντρηση (1 λεπτό/13000rpm/RT) και προστέθηκαν σε αυτή 400μl (V) CHCl<sub>3</sub>:ισοαμυλική αλκοόλη (24:1). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση (1 λεπτό/13000rpm/RT). Συλλέχθηκε και πάλι η υδατική φάση (υπερκείμενη) και προστέθηκαν σε αυτή 40μl (1/10 V) CH<sub>3</sub>COONa 3M και 1ml

(2,5V) αιθανόλη 100%. Ακολούθησε πάγωμα των δειγμάτων στους -80°C για 30 λεπτά ή στους -20°C ολονύκτια και έπειτα κατακρήμνισή τους με φυγοκέντρηση (15 λεπτά/13000rpm/RT). Το ίζημα πλύθηκε με 1ml 70% αιθανόλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση (5 λεπτά/13000rpm/RT). Τέλος, το ίζημα στεγνώθηκε και το DNA επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο ddH<sub>2</sub>O.

### **3.15.Εξαγωγή RNA από φυτικό ιστό με τη χρήση Trizol**

Φρέσκος φυτικός ιστός συλλέχθηκε και λιοτριβήθηκε παρουσία υγρού αζώτου. Προστέθηκε Trizol (38% όξινη φαινόλη, Guanidine thiocyanate 0.8M, ammonium thiocyanate 0.4M, CH<sub>3</sub>CONa pH 5 0.1M, γλυκερόλη 5%) σε αναλογία 1ml ανά 0.1g φυτικού ιστού και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (10 min/3400rpm/4°C) και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε αυτό 200μl χλωροφόρμιο/ ml Trizol και τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση (3400rpm/ 15min/ 4°C) και συλλογή του υπερκειμένου. Ακολούθησε κατακρήμνιση του RNA με 250μl ισοπροπανόλη + 250μl διαλύματος αλάτων (1.2M NaCl, 0.8M κιτρικό νάτριο) / ml TRizol και φυγοκέντρηση των δειγμάτων (13000rpm/ 30min/ 4°C). Ακολούθησε έκπλυση των αλάτων από τα ιζήματα με 1ml αιθανόλη (70% v/v) και φυγοκέντρηση (13000rpm/ 10min/ 4°C). Στεγνώθηκε το ίζημα και επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο ddH<sub>2</sub>O.

### **3.16.Απομάκρυνση DNA με αντίδραση DNάσης**

Η απαλλαγή των RNAs από εναπομείναντα μόρια DNA ήταν απαραίτητη για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και της ποσοτικής PCR που ακολούθησε. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της TURBO™ DNase kit (2U/mL) (Ambion®) και η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ως εξής: 15μg ολικού RNA επώαστηκαν με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα 1x και 2U DNάσης σε τελικό όγκο 50μl για 30 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια, τα δείγματα καθαρίστηκαν με πρωτόκολλο φαινόλης/χλωροφόρμιο.



### 3.17.Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

#### 3.17.1.Αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR)

Για τη μετατροπή του RNA σε cDNA ακολουθήθηκε η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιώντας την SuperScript® III αντίστροφη μεταγραφάση (Life Technologies) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Ειδικότερα, για τα RNAs με προέλευση την *A.thaliana* έγινε χρήση 1μg ολικού RNA και 100ng τυχαίων εκκινητών (random hexameres, Invitrogen), ενώ για τα RNAs με προέλευση τη *N.benthamiana* έγινε χρήση 5μg ολικού RNA και 100ng τυχαίων εκκινητών (random hexameres, Invitrogen). Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν επίσης 500μM dNTPs. Σε κάθε αντίδραση που πραγματοποιήθηκε προστέθηκε μίγμα με 1x κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, 5μM DTT, 2U SuperScript III, 20U RNaseOUT™ (Invitrogen) και συμπληρώθηκε με ddH<sub>2</sub>O ελεύθερο ριβονουκλεασών μέχρι το τελικός όγκος να φτάσει τα 20μl. Στο τέλος της αντίδρασης προστέθηκαν 2U RNase H για την καταστοφή του RNA. Το πρόγραμμα PCR που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

65°C, 5 min

πάγος, 1 min

25°C, 5 min Προσθήκη μίγματος

50°C, 60 min

70°C, 15 min

πάγος, 1 min

37°C, 20 min

#### 3.17.2.Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real-time PCR, qPCR)

Σε όλες τις αντιδράσεις ποσοτικής PCR χρησιμοποιήθηκε το KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (KAPA BIOSYSTEMS) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας (1x ρυθμιστικό διάλυμα KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix, 200nM από κάθε εκκινητή και κατάλληλη ποσότητα cDNA). Όλες οι αντιδράσεις που αναλύθηκαν επιλέχθηκαν με κριτήριο την ποιότητα των δειγμάτων, την ποιότητα της πρότυπης καμπύλης [σε όλες τις αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις (10x) πλασμιδίου που φέρει το

προς πολλαπλασιασμό τμήμα] και με επιπλέον κριτήρια την απόδοση αντίδρασης (efficiency) που έπρεπε να είναι 90-110% και  $R^2 > 0.99$ . Σε όλες τις αντιδράσεις πραγματοποιήθηκε αντίδραση σε 2 βήματα (2 step PCR).

Για τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά *N.benthamiana*: χρησιμοποιήθηκε αρχική ποσότητα RNA 5μg για κάθε αντίδραση σύνθεσης cDNA. Στη συνέχεια, το παραγόμενο cDNA αραιώθηκε 10 φορές και 5μl από αυτό χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση. Τα γονίδια στόχοι ήταν τα *psaA*, *psbA*, *ATPa*, *ndhI* και *ndhC* και τα γονίδια αναφοράς τα *rps3* και *IF*. Η μέγιστη συγκέντρωση πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς ήταν 10pg με 5 διαδοχικές 10x αραιώσεις. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν:

95°C για 3 λεπτά

95°C για 3 δευτερόλεπτα

60°C για 30 δευτερόλεπτα

40 κύκλοι

Καμπύλη αποδιάταξης (melting curve)

Για τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά *A.thaliana*: χρησιμοποιήθηκε αρχική ποσότητα 1μg RNA για κάθε αντίδραση σύνθεσης cDNA. Έπειτα, το παραγόμενο cDNA αραιώθηκε 40 φορές και 5μl από αυτό χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση. Τα γονίδια στόχοι όπως και παραπάνω ήταν τα *psaA*, *psbA*, *ATPa*, *ndhI* και *ndhC* και τα γονίδια αναφοράς τα *rps3* και *IF*. Η μέγιστη συγκέντρωση πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς ήταν 1ng με 5 διαδοχικές 10x αραιώσεις. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν:

95°C για 3 λεπτά

95°C για 3 δευτερόλεπτα

65°C για 30 δευτερόλεπτα

40 κύκλοι

Καμπύλη αποδιάταξης (melting curve)

Για την πραγματοποίηση όλων των αντιδράσεων έγινε χρήση του Biorad Connect™ 96 well Cycler και για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα qBASE<sup>+</sup> (Biogazelle) καθώς και τα προγράμματα Bestkeeper και Normfinder για την εύρεση των πιο σταθερών γονιδίων αναφοράς για τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν. Επίσης, η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων πιστοποιήθηκε με t-test.

### 3.18.Αγροεμποτισμός

Ο αγροεμποτισμός αποτελεί τεχνική η οποία προσφέρει το πλεονέκτημα του παροδικού φυτικού μετασχηματισμού καθώς εισάγει στο φυτό το επιθυμητό γονίδιο μέσω Αγροβακτηρίων. Επώαστηκαν ολονύκτια στους 28°C καλλιέργειες των 3ml *Agrobacterium tumefaciens* των στελεχών C58C1 ή AGL1 που έχουν μετασχηματιστεί με τις κατάλληλες πλασμιδιακές κατασκευές. Από την κορεσμένη καλλιέργεια εμβολιάστηκαν με 200μl νέες καλλιέργειες των 10ml LB με κατάλληλο αντιβιοτικό και επώαστηκαν ομοίως ολονύκτια. Στη συνέχεια, τα κύτταρα κατακρημνίστηκαν στις 4000rpm/4°C για 10 λεπτά και αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο. Έπειτα, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 10ml MMA [MS (Murashige & Skoog) pH 5.6, 10mM MES pH 5.6, 200μM Acetosyringone)] και επώαστηκαν στους 28°C για 1h. Ακολούθησε κατακρήμιση ξανά στις 4000rpm/4°C για 10 λεπτά και τα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με 5ml 10mM MgCl<sub>2</sub>. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 5ml 10mM MgCl<sub>2</sub> όπου και φωτομετρήθηκαν σε OD<sub>600nm</sub>. Με βάση τη μέτρηση αυτή, αραιώθηκαν τα βακτήρια σε 0.1-0.2 OD. Τα φυτά εμποτίστηκαν με τα βακτήρια και ποτίστηκαν καλά.

### 3.19.Ανάπτυξη και μετασχηματισμός *A. thaliana*

Για το μετασχηματισμό της γαμετικής σειράς φυτών *A.thaliana* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος floral dip όπως περιγράφεται από τους M. Narusaka et al. 2010. Φυτά καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες μικρής φωτοπεριόδου (8h φως/μέρα) για 3 εβδομάδες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε συνθήκες μεγάλης φωτοπεριόδου (16h/μέρα) μέχρι να ανθίσουν. Ετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες LB με κατάλληλο αντιβιοτικό, οι οποίες εμβολιάστηκαν με Αγροβακτήριο το οποίο φέρει τον κατάλληλο φορέα μετασχηματισμού. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 28°C για 2 ημέρες περίπου. Στη συνέχεια, εμβολιάστηκε νέα καλλιέργεια LB με αντιβιοτικό με την αρχική καλλιέργεια και επώαστηκε εκ νέου στους 28 °C για 16h περίπου. Έπειτα, τα βακτήρια κατακρημνίστηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 1-1.2ml ρυθμιστικό διάλυμα μετασχηματισμού (1/2xMS plant salt mixture, 1x Gamborg's vitamin solution, 5% (w/v) sucrose, pH 5.7 (ρύθμιση με KOH). Ακολούθησε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών οι οποίες και ρυθμίστηκαν σε 1.5-2 OD. Αμέσως πριν το μετασχηματισμό προστέθηκε Silwet L-77 0.02% (v/v). Τέλος, 5μl διαλύματος αγροβακτηρίων προστέθηκαν

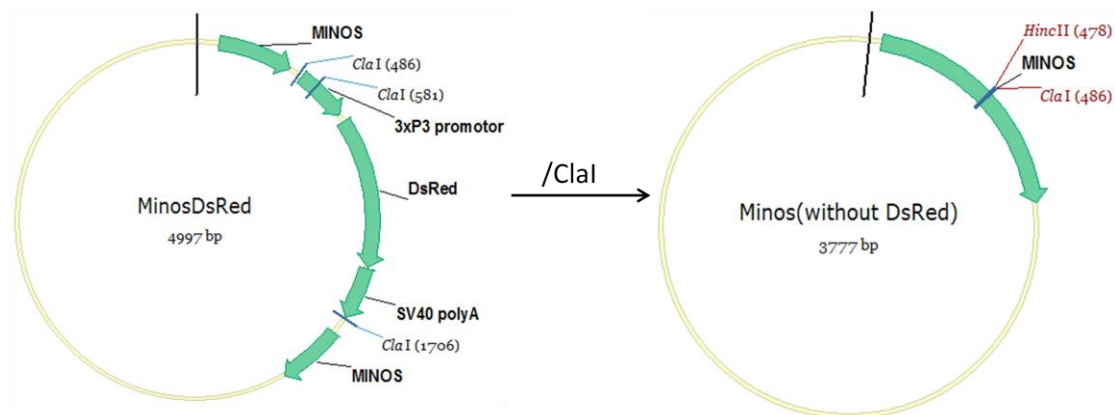
σε κάθε άνθος για να γίνει ο μετασχηματισμός. Τα φυτά καλύφθηκαν ολονύκτια με διαφανή μεμβράνη και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ήπιο φωτισμό. Στη συνέχεια, η διαλογή των πιθανώς μετασχηματισμένων σπόρων πραγματοποιήθηκε με ψεκασμό Basta 100mg/L στο στάδιο του σπορόφυτου με συχνότητα 2 φορές την εβδομάδα.

## 4.Αποτελέσματα

### 4.1. Δημιουργία Διαγονιδιακών Σειρών *A.thaliana* που φέρουν το μεταθετό στοιχείο Minos και την αντίστοιχη μεταθετάση.

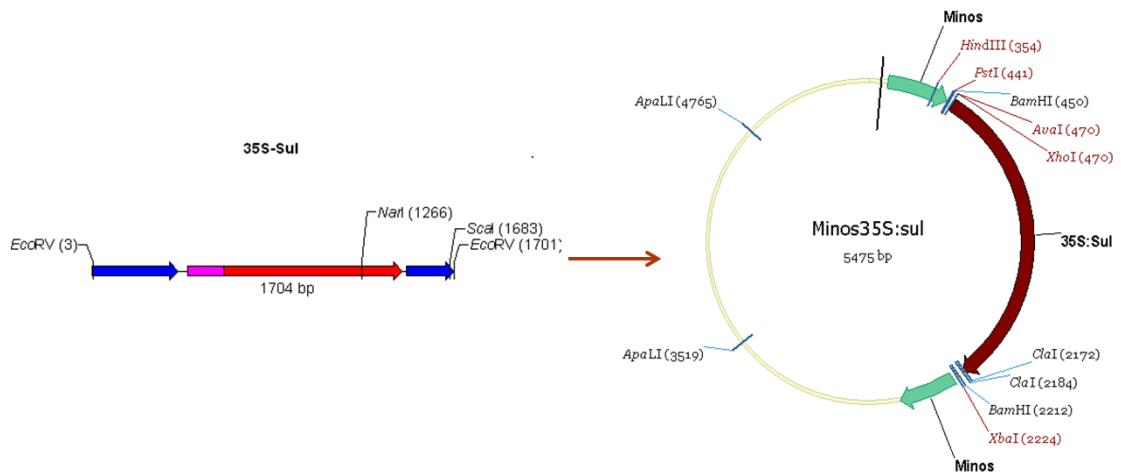
#### 4.1.1.Πειραματική Διαδικασία-Αποτελέσματα

Η πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία των διαγονιδιακών σειρών *A.thaliana* που θα έφεραν το μεταθετό στοιχείο Minos και την αντίστοιχη μεταθετάση περιελάμβανε τη δημιουργία κατάλληλων κατασκευών T-DNA για τον φυτικό μετασχηματισμό. Αρχικά, έγινε παραλαβή του μεταθετού στοιχείου Minos σε φορέα κλωνοποίησης pBluescript SK II<sup>+</sup> με κλωνοποιημένο μεταξύ των ανάστροφων αλληλουχιών του το γονίδιο αναφοράς DsRed (κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη). Με πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Cla I αφαιρέθηκε η αλληλουχία που κωδικοποιούσε την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη και ο φορέας επανακυκλοποιήθηκε (Εικόνα 4.1).

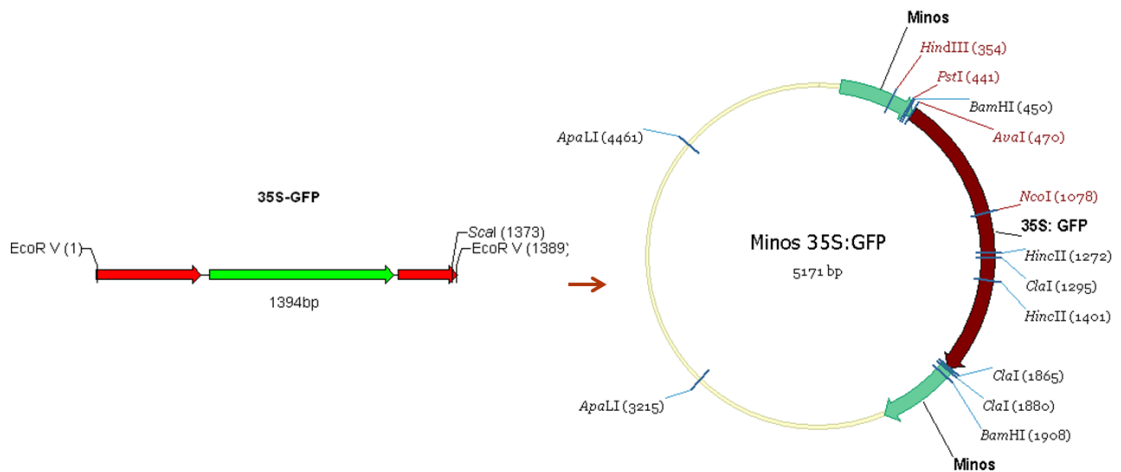


Εικόνα 4.1 Πέψη του φορέα Minos pBluescript SK II<sup>+</sup> με το περιοριστικό ένζυμο ClaI και αφαίρεση του γονιδίου μάρτυρα DsRed.

Στη συνέχεια, προστέθηκαν μεταξύ των ανάστροφων αλληλουχιών του Minos νέα, επιθυμητά γονίδια αναφοράς υπό τον ισχυρό υποκινητή 35S. Τα γονίδια αναφοράς ήταν τα GFP (πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) και SuI<sup>R</sup> (αντίσταση το αντιβιοτικό σουλφοναμίδη). Η κλωνοποίηση που πραγματοποιήθηκε ήταν με λεία άκρα και έγινε με τα περιοριστικά ένζυμα HincII για το φορέα και EcoRV για τα γονίδια αναφοράς. Οι χάρτες των πλασμιδιακών κατασκευών που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στις εικόνες 4.2 και 4.3.

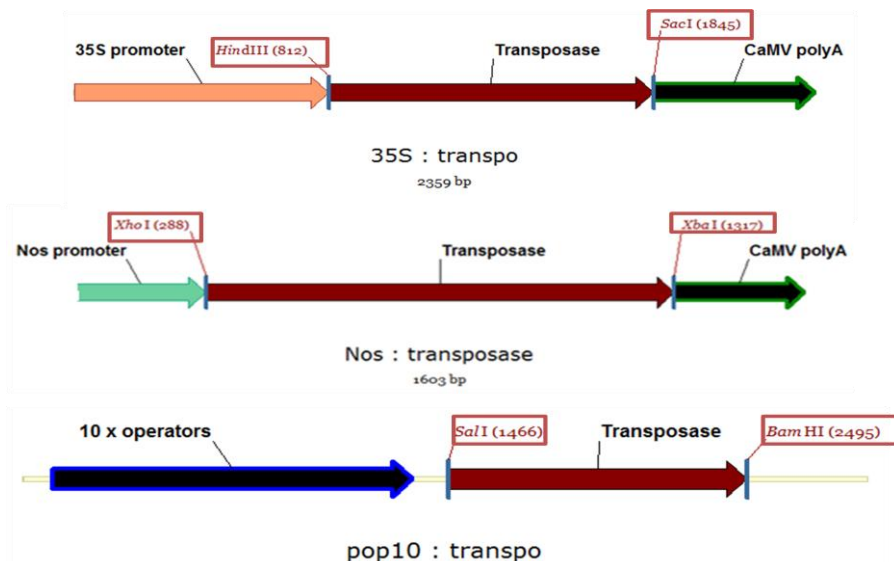


Εικόνα 4.2. Κλωνοποίηση του γονιδίου αναφοράς 35S:SuI<sup>R</sup> εντός των ανάστροφων αλληλουχιών του Minos (φορέας εικόνας 4.1)



Εικόνα 4.3. Κλωνοποίηση του γονιδίου αναφοράς 35S:GFP εντός των ανάστροφων αλληλουχιών του Minos (φορέας εικόνας 4.1)

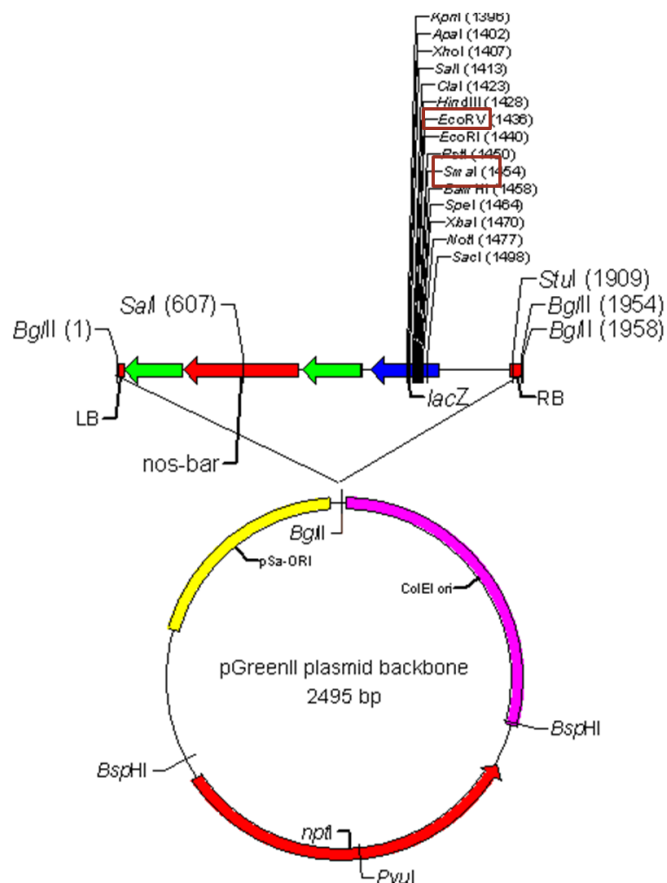
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας που



Εικόνα 4.4. Κλωνοποίηση της μεταθέτσης του Minos υπό τους 3 διαφορετικούς υποκινητές, Nos, 35S και OP10.

κωδικοποιεί τη μεταθετάση του Μίνος με τη βοήθεια εκκινητών που έφεραν θέσεις περιορισμού και ειδικής πολυμεράσης υψηλής πιστότητας. Έπειτα, τα 3 αντίγραφα της αλληλουχίας της μεταθετάσης που δημιουργήθηκαν, κόπηκαν με τα αντίστοιχα περιοριστικά ένζυμα στις άκρες τους (Εικόνα 4.4). Ακόμη, με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα κόπηκαν και οι πλασμιδιακοί φορείς που φέρουν τις αντίστοιχες αλληλουχίες υποκινητή και τερματισμού της μεταγραφής. Οι υποκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 35S (ισχυρός υποκινητής), Nos (μέτριος υποκινητής), OP10 (επαγόμενος υποκινητής). Ακολούθησε κλωνοποίηση της αλληλουχίας της μεταθετάσης υπό των 3 υποκινητών και οι πλασμιδιακές κατασκευές που δημιουργήθηκαν απεικονίζονται στην Εικόνα 4.4.

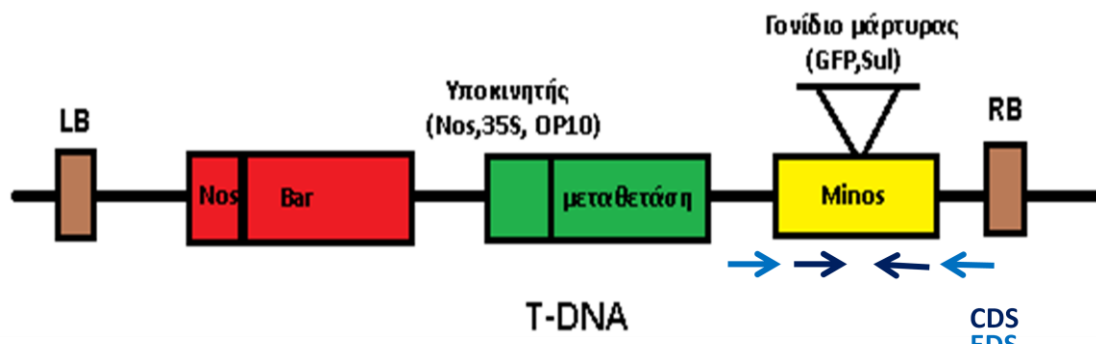
Στο επόμενο βήμα της κλωνοποίησης, τόσο η πλασμιδιακές κατασκευές του μεταθετού στοιχείου Μίνος με και χωρίς τα γονίδια αναφοράς (Εικόνες 4.1, 4.2 και 4.3) όσο και οι διαφορετικές πλασμιδιακές κατασκευές της μεταθετάσης με τους υποκινητές κλωνοποιήθηκαν στον δυαδικό φορέα pGreen0229 (Εικόνα 4.5) όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.6. Η εισαγωγή όλων των κατασκευών πραγματοποιήθηκε σε λεία άκρα. Οι πλασμιδιακές κατασκευές της μεταθετάσης με τους υποκινητές Nos και 35S κόπηκαν με τη βοήθεια του περιοριστικού ενζύμου EcoRV και η κατασκευή με τον επαγόμενο υποκινητή OP10 κόπηκε αρχικά με το περιοριστικό ένζυμο NotI



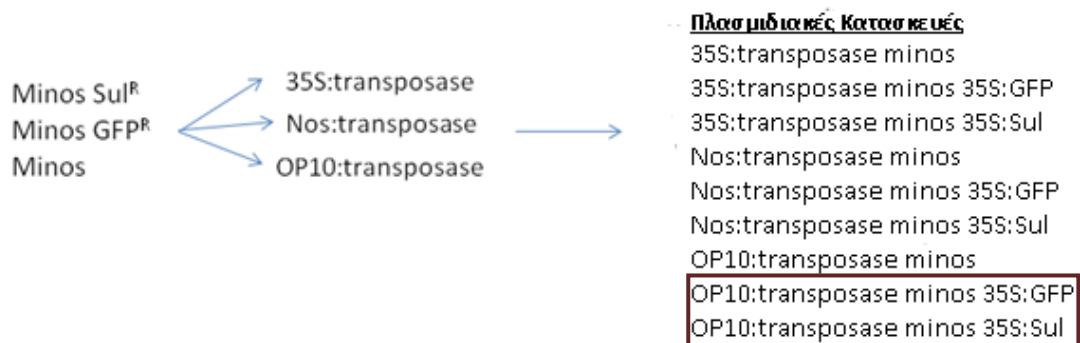
Εικόνα 4.5. Ο δυαδικός φορέας pGreen0229. Οι θέσεις κλωνοποίησης SmaI και EcoRV είναι σημασμένες. (<http://www.pgreen.ac.uk/JIT/pG0229.htm>)

και στη συνέχεια με τη βοήθεια της T4 πολυμεράσης τα άκρα έγιναν λεία. Οι κατασκευές αυτές κλωνοποιήθηκαν στη θέση EcoRV του φορέα pGreen0229. Έπειτα, οι κατασκευές του μεταθετού στοιχείου Minos (με και χωρίς τα γονίδια αναφοράς) κόπηκαν με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων SacI και XhoI και ακολούθησε αντίδραση T4 πολυμεράσης ώστε να δημιουργηθούν λεία άκρα στην αλληλουχία. Η κλωνοποίησή τους στο φορέα pGreen0229 πραγματοποιήθηκε στη θέση SmaI.

Οι τελικές κατασκευές που κατασκευάστηκαν απεικονίζονται στην εικόνα 4.7, ενώ οι κατασκευές των οποίων η δημιουργία απέτυχε βρίσκονται εντός του πλαισίου.



Εικόνα 4.6 Σχηματική απεικόνιση των T-DNAs που δημιουργήθηκαν. Απεικόνιση των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλεκτική PCR.



Εικόνα 4.7. Πλασμιδιακές κατασκευές που σχεδιάστηκαν και δημιουργήθηκαν. Εντός του πλαισίου βρίσκονται πλασμιδιακές κατασκευές των οποίων η δημιουργία απέτυχε.

Στη συνέχεια, οι με τις παραπάνω πλασμιδιακές κατασκευές μετασηματίστηκαν αγροβακτήρια στελέχους AGL-1 τα οποία έφεραν το



Εικόνα 4.9. Πιθανώς μετασηματισμένο φυτό WT *A.thaliana* με την κατασκευή OP10:transposase minos



βοηθητικό πλασμίδιο pSoup. Οι κατασκευές που έφεραν το μεταθετό στοιχείο Minos χωρίς κάποιο γονίδιο αναφοράς και τη μεταθετάση με τους 3 διαφορετικούς υποκινητές (35S:transposase minos, Nos:transposase minos, OP10:transposase minos) χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για το μετασχηματισμό φυτών *A.thaliana* αγρίου τύπου με τη μέθοδο floral dip. Από τα μετασχηματισμένα φυτά, συλλέχθηκαν σπόροι και έγινε διαλογή πιθανώς μετασχηματισμένων σπόρων με τη βοήθεια ψεκασμού με το φυτοφάρμακο Basta. Από τη διαλογή προέκυψαν 4 πιθανώς μετασχηματισμένα φυτά με την κατασκευή Nos:μεταθετάση minos, ένα πιθανώς μετασχηματισμένο φυτό με την κατασκευή OP10:μεταθετάση minos και κανένα μετασχηματισμένο φυτό με την κατασκευή 35S:transposase (οι σπόροι που συλλέχθηκαν από αυτά τα φυτά ήταν 10 φορές λιγότεροι σε σχέση με τις άλλες πλασμιδιακές

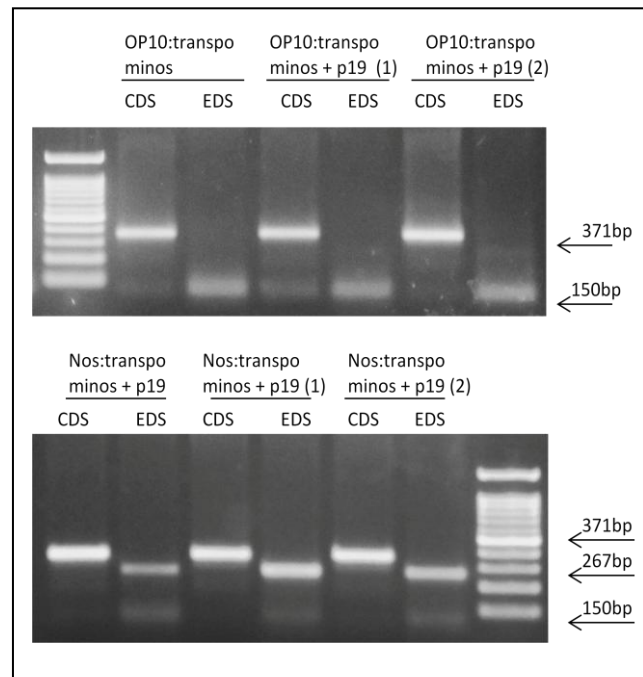
Εικόνα 4.8. Πιθανώς μετασχηματισμένα φυτά WT *A.thaliana* με την κατασκευή Nos:transposase minos



κατασκευές). Ο ρυθμός μετασχηματισμού υπολογίστηκε σε περίπου 1 φυτό ανά 1000 σπόρους. Τα πιθανώς μετασχηματισμένα φυτά παρουσιάζονται στις εικόνες 4.8 και 4.9.

Σε επόμενα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, έγινε έλεγχος της κινητικότητας του μεταθετού στοιχείου Minos σε φυτά καπνού *N.benthamiana*. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε αγροεμποτισμός φυτών αγρίου τύπου καθώς και διαγονιδιακών σειρών που έφεραν τον ιικό καταστολέα της RNA σίγησης p19. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε PCR στον αγροεμποτισμένο ιστό με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές ώστε να εντοπίζεται η πιθανή μετακίνηση του Minos. Οι εκκινητές που κατασκευάστηκαν φαίνονται στην Εικόνα 4.6. Συγκεκριμένα το ζεύγος CDS (Containing Donor Site) πολλαπλασίαζε ειδικά μέρος του μεταθετού στοιχείου Minos ενώ το ζεύγος EDS (Empty Donor Site) υβριδοποιούνταν πάνω στο T-DNA και πολλαπλασίαζε ειδικά μία αλληλουχία 267 βάσεων εφόσον το μεταθετό στοιχείο είχε μετακινηθεί. Το αποτέλεσμα της PCR φαίνεται στην εικόνα 4.10. Όπως είδαμε, ανεξάρτητα από το στέλεχος του αγροεμποτισμένου ιστού, το Minos έδειξε να μην μετακινείται όταν η μεταθετάση βρίσκεται υπό τον επαγόμενο υποκινητή (επαγωγή του

υποκινητή δεν είχε προηγηθεί), ενώ έδειξε μία ισχυρή μετακίνηση του Minos όταν η μεταθετάση βρίσκεται υπό τον μέτρια εκφραζόμενο υποκινητή Nos.



Εικόνα 4.10. πήκτωμα αγαρόζης 2%. Επιλεκτική PCR σε φυτά εμποτισμένα με το Minos και τους υποκινητές Nos και OP10. Η ζώνη DNA με κινητικότητα στις 371 βάσεις DNA υποδεικνύει την παρουσία του Minos. Η ζώνη DNA με κινητικότητα στις 267 βάσεις DNA υποδεικνύει τη μετακίνηση του Minos. Η ζώνη DNA με κινητικότητα στις 150 βάσεις DNA αποτελεί διμερή εκκινητών.

## 4.2. Πείραμα προσδιορισμού της έκφρασης γονιδίων των φωτοσυστημάτων σε σιγημένο και μη ,ως προς τα γονίδια GFP και GUS, ιστό διαγονιδιακών σειρών *N.benthamiana* και *A.thaliana*.

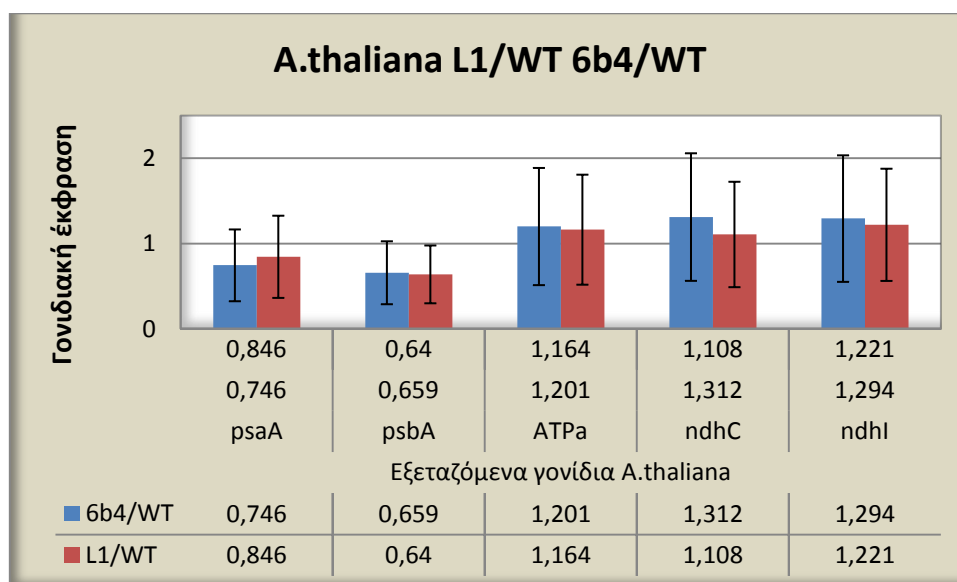
### 4.2.1. Πειραματική διαδικασία

Ξεκινώντας το πείραμα αυτό, η πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν αρχικά η ανάπτυξη φυτών *A.thaliana* και *N. benthamiana* σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας (~ 22°C) και φωτοπεριόδου, συνθήκες «μεγάλης μέρας» (16h) με κανονικό φως (~130μmol/m<sup>2</sup>s). Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν *A. thaliana*: αγρίου τύπου, L1, 6b4 και *N. benthamiana* : GFP 6.4. Στη συνέχεια, στο αναπτυξιακό στάδιο των 20 φύλλων περίπου, με τη βοήθεια λάμπας UV επιλέχθηκαν 6 φυτά *N.benthamiana* 6.4 GFP, από τα οποία 3 παρουσίαζαν μετά-

μεταγραφική σίγηση της GFP και 3 που δεν παρουσίαζαν σίγηση της GFP. Στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο, όσον αφορά τα φυτά *A.thaliana*, επιλέχθηκαν 3 φυτά αγρίου τύπου (WT), 3 φυτά L1 (έφεραν το διαγονίδιο GUS σε μη σιγημένη μορφή) και 3 φυτά 6b4 (έφεραν το διαγονίδιο GUS σε σιγημένη μορφή). Στη συνέχεια, στους ιστούς αυτούς έγινε μοριακή ανάλυση για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού *psaA*, *psbA*, *ATPa*, *ndhI* και *ndhC* με τη χρήση ποσοτικής PCR και του ειδικού υπολογιστικού προγράμματος (qBASE<sup>+</sup>). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση t-test.

#### 4.2.2.Αποτελέσματα Πειραμάτων ποσοτικής PCR (Real-Time PCR)

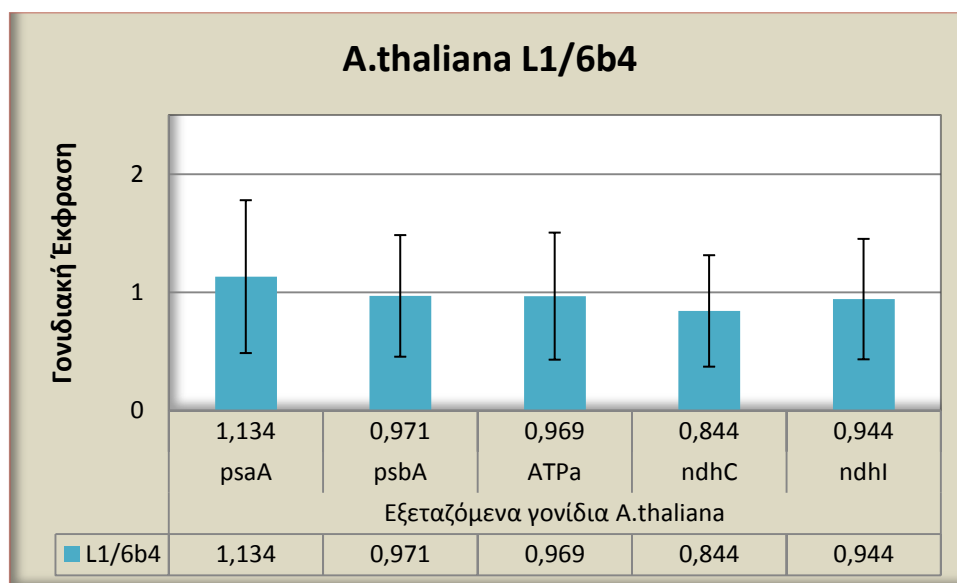
Για τις ανάγκες της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων της ποσοτικής PCR και τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων των φωτοσυστημάτων (*psaA*, *psbA*, *ATPa*, *ndhI*, *ndhC*) στις διαγονιδιακές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, έγινε σε κάθε περίπτωση η σύγκριση σιγημένου προς μη σιγημένο ιστό. Συγκεκριμένα για τα φυτά *A.thaliana*, έγινε χρήση των L1/WT, 6b4/WT και L1/6b4, ενώ για τα *N.benthamiana* χρήση του SS/NS (systemically silenced/non silenced).



Διάγραμμα 4.1. Σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων *psaA*, *psbA*, *ATPa*, *ndhI*, *ndhC* στις διαγονιδιακές σειρές *A.thaliana* L1 και 6b4. Τιμές αναφοράς αποτελούν αυτές που αγρίου τύπου(WT=1) και τα γονίδια αναφοράς *rps3* και *IF*.

Εξετάζοντας το παραπάνω διάγραμμα 4.1, βλέπουμε ότι σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στην

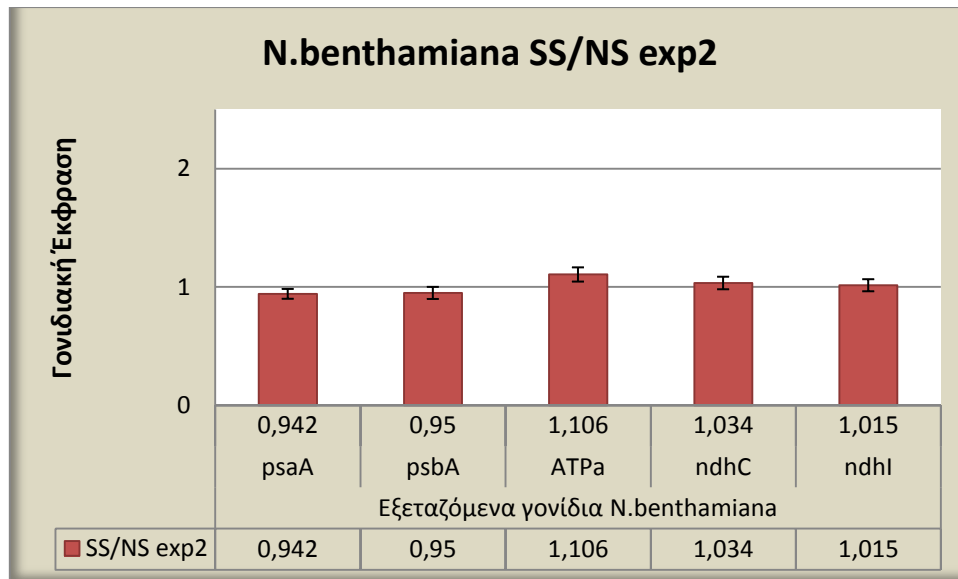
έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση τόσο στη διαγονιδιακή σειρά L1 όσο και στην 6b4. Στην περίπτωση των γονιδίων των 2 φωτοσυστημάτων, *psaA* και *psbA* μπορούμε να πούμε ότι και στις 2 διαγονιδιακές σειρές παρουσιάζεται μία τάση μείωσης που κυμαίνεται από 15-36%. Επιπλέον, βλέπουμε ότι η τυπικές αποκλίσεις των τιμών είναι αρκετά υψηλές καταδεικνύοντας τις μεγάλες αποκλίσεις στις τιμές μεταξύ φυτών της ίδιας διαγονιδιακής σειράς.



Διάγραμμα 4.2. Σχετική έκφραση γονιδίων *psaA*, *psbA*, *ATPa*, *ndhI*, *ndhC* στις διαγονιδιακές σειρές *A.thaliana* L1 και 6b4. Σύγκριση σιγημένου/μη σιγημένου ιστού. Τιμές αναφοράς αποτελούν αυτές του 6b4(6b4=1) και των γονιδίων αναφοράς *rps3* και *IF*.

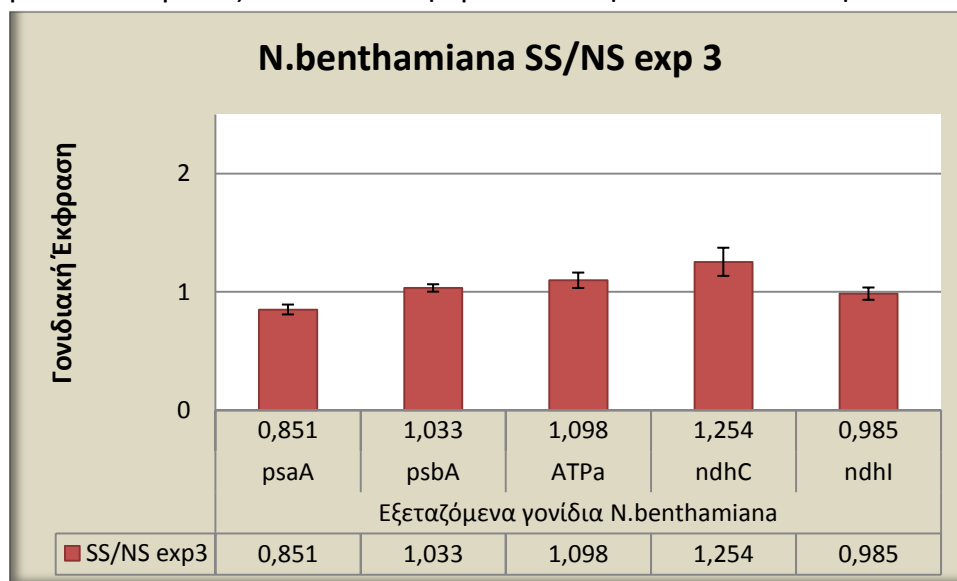
Το παραπάνω διάγραμμα 4.2, επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα και του διαγράμματος 4.1 καθώς δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές στη γονιδιακή έκφραση των εξεταζόμενων γονιδίων ανάμεσα σε καταστάσεις σίγησης και μη του διαγονιδίου GUS στην *A.thaliana*. Μάλιστα, τη μεγαλύτερη διαφορά στη γονιδιακή έκφραση παρουσιάζει το γονίδιο *ndhC* με μία πτώση της τάξεως του 15% στο σιγημένο σε σχέση με το μη σιγημένο ιστό. Και στην περίπτωση αυτή φαίνεται η μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται μεταξύ φυτών της ίδιας διαγονιδιακής σειράς λόγω των μεγάλων τυπικών αποκλίσεων που παρατηρούνται.

Εξετάζοντας τη γονιδιακή έκφραση στο είδος *N.benthamiana*, παραθέτονται 2 ανεξάρτητα πειράματα στα παρακάτω διαγράμματα 4.3 και 4.4. Και τα 2 αυτά πειράματα επιβεβαίωσαν και σε αυτό το είδος το ίδιο πρότυπο έκφρασης με αυτό της *A.thaliana* που προηγήθηκε. Σε κανένα από τα 2 πειράματα δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά στη γονιδιακή έκφραση σε κάποιο γονίδιο ανάμεσα στις 2 καταστάσεις σίγησης και έκφρασης του διαγονιδίου GFP.



Διάγραμμα 4.3. Σχετική έκφραση γονιδίων *psaA*, *psbA*, *ATPa*, *ndhI*, *ndhC* σε κατάσταση σίγησης και έκφρασης του διαγονιδίου της GFP στις σειρές *N.benthamiana* 6,4 GFP (πείραμα 2). Τιμές αναφοράς αποτελούν αυτές του μη σιγημένου ιστού (NS=1) και των γονιδίων αναφοράς *rps3* και *IF*

Επιπλέον, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε φυτά *N.benthamiana* παρατηρείται μικρότερη διακύμανση στη γονιδιακή έκφραση όλων των γονιδίων μεταξύ των διαφορετικών φυτών. Αυτό φαίνεται από τις



Διάγραμμα 4.4 Σχετική έκφραση γονιδίων *psaA*, *psbA*, *ATPa*, *ndhI*, *ndhC* σε κατάσταση σίγησης και μη του διαγονιδίου της GFP στις σειρές *N.benthamiana* 6,4 GFP (πείραμα 3). Τιμές αναφοράς αποτελούν αυτές του μη σιγημένου ιστού (NS=1) και των γονιδίων αναφοράς *rps3* και *IF*.

μικρές τυπικές αποκλίσεις που παρατηρούνται.

## 5. Συζήτηση

---

### 5.1. Πείραμα δημιουργίας διαγονιδιακών Σειρών *A. thaliana* που φέρουν το μεταθετό στοιχείο Minos και την αντίστοιχη μεταθετάση.

Η λειτουργική ανάλυση γονιδίων με τη χρήση σημασμένων μη αυτόνομων μεταθετών στοιχείων αποτελεί τεχνική η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα από τις αρχές της δεκαετίας του 90. Το μεταθετό στοιχείο Minos μετά την ανακάλυψή του στο γονιδίωμα της μύγας *Drosophila hydei* έχει μελετηθεί σε πληθώρα σπονδυλωτών και ασπόνδυλων ως προς την ικανότητα μετάθεσής του. Το μεταθετό αυτό στοιχείο της υπερ-οικογένειας TC1/mariner χρησιμοποιήθηκε σε μύγες του είδους *D. melanogaster* και έδειξε ένα σταθερό πρότυπο μετακίνησης σε δινοκλεοτίδια TA διπλασιάζοντας το δινοκλεοτίδιο αυτό κατά τη μετακίνησή του τόσο στο σώμα όσο και στη γαμετική σειρά της μύγας. Επίσης, δημιούργησε σταθερές διαγονιδιακές σειρές απουσία της μεταθετάσης και κατάφερε να επαναενεργοποιηθεί με την έκφραση της αντίστοιχης μεταθετάσης του (Loukeris, Arca et al. 1995). Επιπλέον, το μεταθετό στοιχείο Minos έδειξε κινητικότητα εξαρτώμενη από την έκφραση της μεταθετάσης του στο κουνούπι *A. stephensi*, καθιστώντας το, το πρώτο αξιόπιστο μοντέλο για το μετασχηματισμό της γαμετικής σειράς του είδους αυτού (Catteruccia, Nolan et al. 2000). Αν και φυλογενετικά απομακρυσμένα, το Minos κατάφερε να δείξει μετακίνηση και μάλιστα μοναδιαίες μεταθέσεις και σε θαλάσσιους οργανισμούς όπως ο *C. Intestinalis* (Hozumi, Kawai et al. 2010) καθώς και στον αχινό, στον οποίο μάλιστα, δεν έδειξαν μετακίνηση άλλα μεταθετά στοιχεία της υπερ-οικογένειας Tc1/mariner όπως το Sleeping Beauty (Sasakura, Yaguchi et al. 2010). Μελετώντας το minos στα θηλαστικά, έδειξε ότι τόσο σε κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών (Klinakis, Zagoraiou et al. 2000, Zagoraiou, Drabek et al. 2001) όσο και στη γαμετική σειρά ποντικού (Drabek, Zagoraiou et al. 2003) έδωσε σταθερές μεταθέσεις παρουσία της αντίστοιχης μεταθετάσης του. Μάλιστα, παρατηρήθηκε ότι στη γαμετική σειρά ποντικού δίνει μεγαλύτερο ποσοστό μεταθέσεων που συμβαίνουν σε διαφορετικά χρωμοσώματα σε σχέση με το ευρέως χρησιμοποιούμενο μεταθετό στοιχείο Sleeping Beauty. Όσον αφορά τα φυτά, η προσπάθεια της εργασίας αυτής να δημιουργήσει ένα σύστημα μελέτης της συμπεριφοράς του μεταθετούς στοιχείου στο φυτό *A. thaliana* αποτελεί την πρώτη προσπάθεια μελέτης του Minos σε φυτικό σύστημα.

Λαμβάνοντας υπόψη την ικανότητα του *Minos* να μετατίθεται στην πληθώρα των παραπάνω οργανισμών καθώς και το γεγονός ότι παρουσιάστηκαν στην εργασία αυτή ενδείξεις για τη μετακίνησή του στο φυτικό σύστημα όταν η μεταθετάση εκφράζεται υπό τον υποκινητή *Nos* (Εικόνα 4.10), μπορούμε να πούμε ότι υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι το *Minos* θα μετακινείται και στα φυτά *A.thaliana*. Μάλιστα, το γεγονός ότι η μετακίνηση δεν εμφανίστηκε κατά τη χρήση του επαγόμενου υποκινητή *OP*, εφόσον δεν έγινε επαγωγή, ενισχύει ακόμα περισσότερο την άποψη της ειδικής μετακίνησής του μόνο υπό την έκφραση της αντίστοιχης μεταθετάσης του. Μια ακόμα πληροφορία που μπορούμε να αντλήσουμε είναι το γεγονός της ανεξάρτητης μετακίνησής του από το γενετικό υπόβαθρο *Wt* και *p19*, γεγονός που μας δείχνει ότι πιθανώς να μη συμβαίνει στο στάδιο αυτό σίγηση της έκφρασης της μεταθετάσης. Σε επόμενα βήματα των πειραματικών αυτών διαδικασιών, μεγαλύτερες διαλογές σπόρων από τα φυτά που μετασχηματίστηκαν, θα μας δώσουν περισσότερα πιθανώς μετασχηματισμένα φυτά στα οποία θα μελετηθεί η μετακίνηση του *Minos*. Επιπλέον, η σύγκριση των αποτελεσμάτων, μεταξύ του *Wt* και του *dcl3<sup>-</sup>* γενετικού υπόβαθρου θα μας δώσει πληροφορίες σχετικά με τον πιθανό τρόπο αλλαγής της μετακίνησης του μεταθετού στοιχείου σε υπόβαθρο διαταραχής του μηχανισμού της μεταγραφικής σίγησης.

## **5.2. Πείραμα προσδιορισμού της έκφρασης γονιδίων των φωτοσυστημάτων σε σιγημένο και μη, ως προς τα γονίδια GFP και GUS, ιστό διαγονιδιακών σειρών *N.benthamiana* και *A.thaliana*.**

Βασικά συστατικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αποτελούν τα φωτοσυστήματα I (PSI) και II (PSII). Τα γονίδια *psaA* και *psbA* αποτελούν υπομονάδες του πυρήνα των φωτοσυστημάτων I και II αντίστοιχα ενώ το *ATPa* αποτελεί βασική υπομονάδα της ATP συνθάσης. Τα γονίδια *ndhI* και *ndhC* αποτελούν και αυτά βασικά γονίδια που εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση καθώς κωδικοποιούν 2 από τις υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH, η οποία εδράζεται στη μεμβράνη των θυλακοειδών και συμμετέχει στη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά μήκος της μεμβράνης του χλωροπλάστη. Η ρύθμιση της λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, η οποία είναι υψίστης σημασίας για την εύρυθμη λειτουργία του φυτικού κυττάρου, έρχεται σε άμεση συνάρτηση με

τη ρύθμιση της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων. Τα γονίδια του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ρυθμίζονται τόσο από βιοχημικούς παράγοντες του ίδιου του κυττάρου όσο και από αβιοτικούς παράγοντες (συγκέντρωση CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, ποιότητα και ποσότητα φωτός) . Μάλιστα, η μετα-μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού/πλαστιδιακών γονιδίων (σταθερότητα RNA, RNA processing, RNA editing) εξαρτάται από την έκφραση πυρηνικών γονιδίων τόσο στα κυανοφύκη όσο και στα ανώτερα φυτά (Rochaix 1996, Barkan and Goldschmidt-Clermont 2000). Γνωρίζουμε ότι και η γονιδιακή σίγηση, αποτελεί αισθητήριο μηχανισμό τόσο σε ενδοκυττάρια σήματα όσο και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, η παραγωγή των siRNAs και κατά συνέπεια η αποδοτικότητα του μηχανισμού της RNA σίγησης έχειδειχθεί ότι επηρεάζεται αρνητικά από τη μείωση της θερμοκρασίας (Kalantidis, Psaradakis et al. 2002, Szittyá, Silhavy et al. 2003). Επιπλέον, η αύξηση ποσότητας του φωτός, χωρίς όμως αυτή να γίνεται στρεσογόνα, προκαλεί την αύξηση της λειτουργίας του μηχανισμού της RNA σίγησης και την αύξηση της διασυστηματικής σίγησης (Kotakis, Vrettos et al. 2010, Kotakis, Vrettos et al. 2011). Το ερώτημα προς απάντηση ήταν κατά πόσον υπάρχει και μία αντίστροφη σχέση στην παραπάνω αλληλεπίδραση. Προηγούμενα δεδομένα, έδειξαν ότι σε σταθερές συνθήκες φωτός, προκαλείται αύξηση της παραγωγής του mRNA γονιδίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε φυτά *N. benthamiana* GFP 6.4 τα οποία έχουν σιγήσει το διαγονίδιο της GFP σε σχέση με εκείνα που το εκφράζουν συστατικά (Κωτάκης Χρ. μη δημοσιευμένα δεδομένα). Συγκεκριμένα, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 8 φορές της έκφρασης του γονιδίου *psaA* σε σιγημένο ιστό, σε σύγκριση τόσο με μη σιγημένο ιστό όσο και με ιστό φυτού αγρίου τύπου. Όπως μπορούμε να δούμε από την εργασία αυτή, τα αποτελέσματα δεν συμπίπτουν με αυτά της προηγούμενης εργασίας καθώς δεν παρατηρείται καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά σε κανένα από τα γονίδια που εξετάστηκαν σε κανένα από τα 2 είδη φυτών *A.thaliana* και *N.benthamiana*. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε δικαιολογηθεί καθώς ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός αποτελεί μία πολύ δυναμική διαδικασία που επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες. Σε μία επόμενη πειραματική προσέγγιση θα μπορούσαν να ληφθούν υπόψη και άλλες παράμετροι όπως η χρήση του ίδιου φυτού για λήψη σιγημένου και μη ιστού με την παρακολούθηση της σίγησης όταν αυτή ξεκινάει καθώς και η λήψη του ίδιου ηλικιακά φύλλου για τη σύγκριση. Για να ελέγξουμε τη γονιδιακή έκφραση των γονιδίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε συνθήκες σίγησης και μη θα μπορούσε να ελεγχθεί η έκφραση και σε επίπεδο πρωτεΐνης.



## 6. Βιβλιογραφία

---

- Barkan, A. and M. Goldschmidt-Clermont (2000). "Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression." *Biochimie* **82**(6-7): 559-572.
- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." *Genes Dev* **16**(1): 6-21.
- Catteruccia, F., T. Nolan, T. G. Loukeris, C. Blass, C. Savakis, F. C. Kafatos and A. Crisanti (2000). "Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*." *Nature* **405**(6789): 959-962.
- Chinnusamy, V. and J. K. Zhu (2009). "RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants." *Sci China C Life Sci* **52**(4): 331-343.
- Cokus, S. J., S. Feng, X. Zhang, Z. Chen, B. Merriman, C. D. Haudenschild, S. Pradhan, S. F. Nelson, M. Pellegrini and S. E. Jacobsen (2008). "Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning." *Nature* **452**(7184): 215-219.
- Dalakouras, A. and M. Wassenegger (2013). "Revisiting RNA-directed DNA methylation." *RNA Biol* **10**(3).
- Drabek, D., L. Zagoraiou, T. deWit, A. Langeveld, C. Roumpaki, C. Mamalaki, C. Savakis and F. Grosveld (2003). "Transposition of the *Drosophila hydei* Minos transposon in the mouse germ line." *Genomics* **81**(2): 108-111.
- Feschotte, C., N. Jiang and S. R. Wessler (2002). "Plant transposable elements: where genetics meets genomics." *Nat Rev Genet* **3**(5): 329-341.
- Hozumi, A., N. Kawai, R. Yoshida, Y. Ogura, N. Ohta, H. Satake, N. Satoh and Y. Sasakura (2010). "Efficient transposition of a single Minos transposon copy in the genome of the ascidian *Ciona intestinalis* with a transgenic line expressing transposase in eggs." *Dev Dyn* **239**(4): 1076-1088.
- Ioannidis, N. E. and K. Kotzabasis (2007). "Effects of polyamines on the functionality of photosynthetic membrane in vivo and in vitro." *Biochim Biophys Acta* **1767**(12): 1372-1382.
- Kalantidis, K., S. Psaradakis, M. Tabler and M. Tsagris (2002). "The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus." *Mol Plant Microbe Interact* **15**(8): 826-833.
- Kardailsky, I., V. K. Shukla, J. H. Ahn, N. Dagenais, S. K. Christensen, J. T. Nguyen, J. Chory, M. J. Harrison and D. Weigel (1999). "Activation tagging of the floral inducer FT." *Science* **286**(5446): 1962-1965.
- Klinikis, A. G., L. Zagoraiou, D. K. Vassilatis and C. Savakis (2000). "Genome-wide insertional mutagenesis in human cells by the *Drosophila* mobile element Minos." *EMBO Rep* **1**(5): 416-421.
- Kotakis, C., N. Vrettos, M. G. Daskalaki, K. Kotzabasis and K. Kalantidis (2011). "DCL3 and DCL4 are likely involved in the light intensity-RNA silencing cross talk in *Nicotiana benthamiana*." *Plant Signal Behav* **6**(8): 1180-1182.
- Kotakis, C., N. Vrettos, D. Kotsis, M. Tsagris, K. Kotzabasis and K. Kalantidis (2010). "Light intensity affects RNA silencing of a transgene in *Nicotiana benthamiana* plants." *BMC Plant Biol* **10**: 220.
- Law, J. A. and S. E. Jacobsen (2010). "Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals." *Nat Rev Genet* **11**(3): 204-220.
- Lezin, G., Y. Kosaka, H. J. Yost, M. R. Kuehn and L. Brunelli (2011). "A one-step miniprep for the isolation of plasmid DNA and lambda phage particles." *PLoS One* **6**(8): e23457.
- Li, C. F., I. R. Henderson, L. Song, N. Fedoroff, T. Lagrange and S. E. Jacobsen (2008). "Dynamic regulation of ARGONAUTE4 within multiple nuclear bodies in *Arabidopsis thaliana*." *PLoS Genet* **4**(2): e27.

Lisch, D. (2009). "Epigenetic regulation of transposable elements in plants." Annu Rev Plant Biol **60**: 43-66.

Loukeris, T. G., B. Arca, I. Livadaras, G. Dialektaki and C. Savakis (1995). "Introduction of the transposable element Minos into the germ line of *Drosophila melanogaster*." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9485-9489.

Marsch-Martinez, N., R. Greco, G. Van Arkel, L. Herrera-Estrella and A. Pereira (2002). "Activation tagging using the En-I maize transposon system in *Arabidopsis*." Plant Physiol **129**(4): 1544-1556.

Matzke, M., T. Kanno, B. Huettel, L. Daxinger and A. J. Matzke (2007). "Targets of RNA-directed DNA methylation." Curr Opin Plant Biol **10**(5): 512-519.

McClintock, B. (1956). "Controlling elements and the gene." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **21**: 197-216.

Meister, G. and T. Tuschl (2004). "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA." Nature **431**(7006): 343-349.

Mello, C. C. and D. Conte, Jr. (2004). "Revealing the world of RNA interference." Nature **431**(7006): 338-342.

Napoli, C., C. Lemieux and R. Jorgensen (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." Plant Cell **2**(4): 279-289.

Pavlopoulos, A., S. Oehler, M. G. Kapetanaki and C. Savakis (2007). "The DNA transposon Minos as a tool for transgenesis and functional genomic analysis in vertebrates and invertebrates." Genome Biol **8 Suppl 1**: S2.

Rochaix, J. D. (1996). "Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Mol Biol **32**(1-2): 327-341.

Rubin, G. M. and A. C. Spradling (1982). "Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors." Science **218**(4570): 348-353.

Sasakura, Y., J. Yaguchi, S. Yaguchi and M. Yajima (2010). "Excision and transposition activity of Tc1/mariner superfamily transposons in sea urchin embryos." Zool Sci **27**(3): 256-262.

Szittyá, G., D. Silhavy, A. Molnar, Z. Havelda, A. Lovas, L. Lakatos, Z. Banfalvi and J. Burgyan (2003). "Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation." EMBO J **22**(3): 633-640.

van der Krol, A. R., L. A. Mur, M. Beld, J. N. Mol and A. R. Stuitje (1990). "Flavonoid genes in *petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression." Plant Cell **2**(4): 291-299.

Walden, R., K. Fritze, H. Hayashi, E. Miklashevichs, H. Harling and J. Schell (1994). "Activation tagging: a means of isolating genes implicated as playing a role in plant growth and development." Plant Mol Biol **26**(5): 1521-1528.

Wassenegger, M., S. Heimes, L. Riedel and H. L. Sanger (1994). "RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants." Cell **76**(3): 567-576.

Weigel, D., J. H. Ahn, M. A. Blazquez, J. O. Borevitz, S. K. Christensen, C. Fankhauser, C. Ferrandiz, I. Kardailsky, E. J. Malancharuvil, M. M. Neff, J. T. Nguyen, S. Sato, Z. Y. Wang, Y. Xia, R. A. Dixon, M. J. Harrison, C. J. Lamb, M. F. Yanofsky and J. Chory (2000). "Activation tagging in *Arabidopsis*." Plant Physiol **122**(4): 1003-1013.

Zagoraoui, L., D. Drabek, S. Alexaki, J. A. Guy, A. G. Klinakis, A. Langeveld, G. Skavdis, C. Mamalaki, F. Grosveld and C. Savakis (2001). "In vivo transposition of Minos, a *Drosophila* mobile element, in mammalian tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11474-11478.

Zhang, X. (2008). "The epigenetic landscape of plants." Science **320**(5875): 489-492.

Zhang, X., J. Yazaki, A. Sundaresan, S. Cokus, S. W. Chan, H. Chen, I. R. Henderson, P. Shinn, M. Pellegrini, S. E. Jacobsen and J. R. Ecker (2006). "Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*." Cell **126**(6): 1189-1201.

Zhu, J. K. (2008). "Epigenome sequencing comes of age." Cell **133**(3): 395-397.