

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΕΛΕΝΗ Δ. ΜΑΡΙΝΟΥ

Κατασκευή του χιμαιρικού γονιδίου *gfp-virp1* και δημιουργία
διαγονιδιακών φυτών *gfp-virp1 Nicotiana benthamiana* //

Επιβλέπουσα καθηγήτρια

Επικ. καθ. Ε. Τσαγρή

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	I
Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ VIRP1	1
<i>Μετα-μετα γραφική τροποποίηση της Virp1</i>	<i>3</i>
<i>Η περιοχή bromodomain της Virp1</i>	<i>3</i>
GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)	5
<i>Φυσικοχημικές ιδιότητες της GFP</i>	<i>5</i>
<i>Φάσματα εκπομπής της GFP και το μετάλλαγμα S65T</i>	<i>6</i>
<i>Εφαρμογές της GFP</i>	<i>7</i>
<i>Ο φορέας pAVA321</i>	<i>8</i>
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΣΗ	9
<i>Ο δυαδικός φορέας pGreen</i>	<i>9</i>
<i>Ο δυαδικός φορέας pART27</i>	<i>10</i>
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	11
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	12
ΥΛΙΚΑ.....	12
ΜΕΘΟΔΟΙ.....	14
<i>Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων</i> <i>E.coli</i>	<i>14</i>
<i>Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα.....</i>	<i>15</i>
<i>Έκλουση γραμμικών τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....</i>	<i>15</i>
<i>Αντίδραση λιγάσης: ένθεση συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα.</i>	<i>16</i>
<i>Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.coli με πλασμιδιακό φορέα.....</i>	<i>16</i>
<i>Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με τη μέθοδο της αλκαλικής</i> <i>λύσης κυττάρων.....</i>	<i>17</i>
<i>Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας με τη χρήση κολώνας Qiagen.</i>	<i>19</i>
<i>Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....</i>	<i>21</i>
<i>Μέθοδος τριγωνικής σύζευξης.....</i>	<i>22</i>

Εισαγωγή

Μετασχηματισμός φυλλικών δίσκων μέσω αγροβακτηρίου	23
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	25
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΧΙΜΑΙΡΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>GFP-VIRP1</i>	25
Απομόνωση της κωδικής περιοχής του γονιδίου της <i>Virp1</i>	26
ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΗΣ ΧΙΜΑΙΡΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ <i>GFP-VIRP1</i> , ΣΕ ΔΥΑΔΙΚΟ ΦΟΡΕΑ	
ΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΦΥΤΩΝ ΜΕΣΩ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ.....	31
Απομόνωση της κασσέτας 35S : <i>gfp-virp1: terminator</i> από τον <i>pAVA321</i>	32
Γραμμοποίηση του δυαδικού φορέα <i>pGreen nos-kan</i> και αντίδραση αποφωσφορυλίωσης (<i>CIP</i>).	34
Υποκλωνοποίηση της κασσέτας 35S : <i>gfp-virp1: terminator</i> στο δυαδικό φορέα <i>pART27</i>	36
ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ <i>N. BENTHAMIANA</i> ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ	
<i>pART2735S : GFP-VIRP1: TERMINATOR</i>	40
Ονοματολογία.....	41
Διαγονιδιακά φυτά μεταμορφωμένα με την 35S : <i>gfp-virp1: terminator</i> κατασκευή	41
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	52

Εισαγωγή

Η έρευνα στον τομέα της αλληλεπίδρασης φυτών και ιοειδών έχει αποδώσει σημαντική πληροφορία για τον τρόπο με τον οποίο τα ιοειδή κινούνται και πολλαπλασιάζονται μέσα στο φυτό αλλά και για τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα φυτά-ξενιστές προκειμένου να εντοπίσουν και να καταπολεμήσουν τα ιοειδή. Στις στρατηγικές που έχουν αναπτυχθεί από τα φυτά για το σκοπό αυτό, καθοριστικό ρόλο παίζουν πρωτεϊνικοί παράγοντες των φυτών, οι οποίοι αλληλεπιδρούν άμεσα με το RNA των ιοειδών και με τον τρόπο αυτό εμπλέκονται σε κρίσιμα στάδια του κύκλου ζωής τους. Στην εργασία αυτή ασχολούμαστε με μια τέτοια πρωτεΐνη, τη Virp1, η οποία αναγνωρίζει και προσδένεται στο RNA του ιοειδούς PSTVd (Potato Spindle Tuber Viroid).

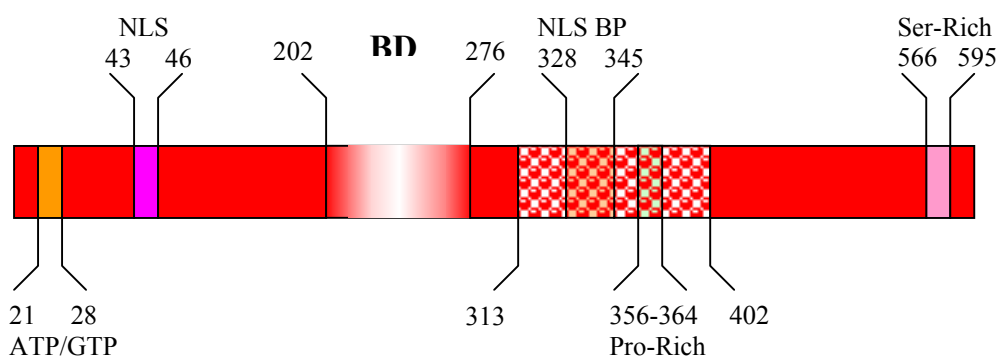
Η πρωτεΐνη Virp1

Η πρωτεΐνη Virp1, απομονώθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών, του Πανεπιστημίου Κρήτης, ύστερα από σάρωση c-DNA βιβλιοθήκης από φύλλα τοματιάς, χρησιμοποιώντας σαν ανιχνευτή το RNA του PSTVd (E. Martinez, 2000). Κατά τη διαδικασία αυτή, απομονώθηκαν κλώνοι διαφορετικού μεγέθους, όμως όλοι από αυτούς φάνηκε ότι κωδικοποιούν τμήματα της Virp1 πρωτεΐνης. Ο μεγαλύτερος από τους κλώνους που απομονώθηκαν αποτελείται περίπου από 2400 νουκλεοτίδια, ενώ ο μικρότερος αποτελείται περίπου από 1400 νουκλεοτίδια.

Η πρωτεΐνη Virp1, προσδένεται στο RNA του ιοειδούς PSTVd και η αλληλεπίδραση αυτή έχει ειδικότητα ως προς την αλληλουχία που αναγνωρίζεται. Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζει η Virp1 στο ιοειδές έχει φανεί ότι παίζουν κάποιον επιπλέον λειτουργικό ρόλο για το ιοειδές. Είναι πιθανό να χρησιμεύουν κυρίως για την αναγνώριση από την Virp1 ή ίσως και από άλλους παράγοντες του ξενιστή.

Εισαγωγή

Παρά το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Virp1 απομονώθηκε σαν RNA-binding πρωτεΐνη, δεν αναγνωρίζεται στην αλληλουχία της κανένα από τα γνωστά μοτίβα αναγνώρισης RNA (RNA Recognition Motif), όπως είναι το arginine-rich μοτίβο, το RGG box, το hnRNP K homology μοτίβο, το μοτίβο δακτύλων ψευδαργύρου (Zn) και το double stranded RNA binding μοτίβο, τα οποία είναι χαρακτηριστικά σε ορισμένες αλληλεπιδράσεις RNA-πρωτεϊνών, εάν η αλληλουχία ελεγχθεί με προγράμματα αναγνώρισης πρωτεϊνικών μοτίβων. Οι πρωτεΐνες που προσδέουν RNA, έχουν συνήθως αρθρωτή (modular) δομή που μοιάζει με αυτή των μεταγραφικών παραγόντων. Συνήθως περιέχουν ένα ή περισσότερα μοτίβα αναγνώρισης RNA όπως είναι αλληλουχίες πλούσιες σε γλυκίνη/ αργινίνη ή σε λυσίνη (Kenan et al., 1991; Fukami, Kobayashi et al., 1993). Ωστόσο, παρά την απουσία κάποιου μοτίβου αναγνώρισης RNA, η Virp1 έχει την ικανότητα πρόσδεσης στο RNA του ιοειδούς και στο καρβοξυτελικό της άκρο, βρίσκουμε μια περιοχή 40 αμινοξικών καταλοίπων με υψηλό ποσοστό σερίνης. Στη Virp1 που περιέχει μια περιοχή πρόσδεσης RNA θα είχε ενδιαφέρον ο χαρακτηρισμός ενός καινούργιου μοτίβου αναγνώρισης RNA καθώς επίσης και η ταυτοποίηση δευτεροταγών RNA δομών που αλληλεπιδρούν με τη Virp1. Στην εικόνα που ακολουθεί, φαίνονται οι λειτουργικές περιοχές της Virp1.



RNA - BD

Λειτουργικές περιοχές της Virp1. Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών της Virp1 κατά μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας: **aa 21-28** περιοχή πρόσδεσης ATP/GTP, **aa 43-46** NLS, σινιάλο πυρηνικού εντοπισμού, **aa 202-276** περιοχή bromodomain, **aa 313-402** περιοχή πρόσδεσης RNA, NLS-BP διμερές σινιάλο πυρηνικού εντοπισμού, **aa 356-364** περιοχή πλούσια σε προλίνες, **aa 566-595** περιοχή πλούσια σε σερίνες (A.E. Martinez, PhD. Thesis, 2000).

Μετα-μετα γραφική τροποποίηση της Virp1

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας σάρωσης της βιβλιοθήκης έκφρασης της τοματιάς, εντοπίστηκαν τέσσερις κλώνοι που αποτελούσαν διαφορετικά ανοιχτά πλαίσια διαβάσματος, τα a, b, c, d. Αυτά έδειχναν μια ασυνήθιστη οργάνωση στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR).

Και οι τέσσερις UTRs έχουν κοινή την αλληλουχία των πρώτων 341bp. Το UTRa φαίνεται να είναι μια πιο κοντή εκδοχή του UTRb, ενώ τα UTRb, UTRc και UTRd, εμφανίζουν μια αλληλεπικαλυπτόμενη περιοχή των 695 bp. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι αυτές οι τέσσερις UTRs, σχετίζονται μεταξύ τους ανά ζεύγη. Οι διαφορές που εντοπίζονται στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή, αποκαλύπτουν την ύπαρξη ενός πολύπλοκου μοτίβου μορίων RNA, το οποίο πιθανώς ελέγχεται αναπτυξιακά. Τα είδη αυτά του m-RNA, είναι πιθανό να εμπλέκονται σε διαδικασίες που ελέγχουν την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης ή και τη σταθερότητα του μηνύματος κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είτε προωθώντας τη γρήγορη αποδόμηση του μηνύματος, είτε ενισχύοντας τη μετάφραση, σε κρίσιμες φάσεις της ανάπτυξης.

Η περιοχή bromodomain της Virp1

Μια συντηρημένη περιοχή που εντοπίζεται στη Virp1, είναι μια ακολουθία 110 αμινοξικών καταλοίπων τα οποία χαρακτηρίζονται ως bromodomain και είναι χαρακτηριστικά σε πολλούς ευκαρυωτικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Jeanmougin et al., 1997). Τα bromodomains απαντώνται σε πολλούς οργανισμούς, από τη *Drosophila* και το ποντίκι, έως τον άνθρωπο και συνήθως βρίσκονται μέσα στις πρωτεΐνες, είτε μοναχικά, είτε σε ζεύγη, είτε σε πολλαπλά αντίτυπα. Η θέση στην οποία βρίσκονται μέσα στις πρωτεΐνες, δεν

Εισαγωγή

είναι σταθερή. Η λειτουργική σημασία των bromodomains, δεν είναι απολύτως ξεκάθαρη. Ωστόσο, υπάρχει ένα πλήθος ενδείξεων και πειραματικών δεδομένων, τα οποία υποστηρίζουν ότι οι πρωτείνες που περιέχουν bromodomains, εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται περιπτώσεις πρωτεϊνών με bromodomains, οι οποίες παίζουν ρόλο στη μεταγραφική διαδικασία, και μάλιστα κατά τρόπο τέτοιο που υποδηλώνει ότι πιθανώς, τα bromodomains σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις με τη χρωματίνη (Syntichaki et al., 2000). Η συντήρηση περιοχών όπως τα bromodomains κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, δείχνει ότι έχουν μια γενική και κοινή στους διάφορους οργανισμούς λειτουργία. Το μοτίβο των bromodomains, θα μπορούσε να είναι η επιφάνεια πάνω στην οποία θα πραγματοποιούνταν αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό, τη συγκρότηση ή τη λειτουργικότητα πολυπαραγοντικών συμπλόκων τα οποία σχετίζονται με την ενεργοποίηση της μεταγραφικής διαδικασίας (Haynes et al., 1992).

Σε ότι αφορά τη Virp1, στοιχεία όπως η παρουσία σινιάλων πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signals, NLSs) ή πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι η Virp1, επηρεάζει τη μεταγραφή (A.E. Martinez, 2000), ενισχύουν τη θεωρία ότι η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στο σχηματισμό μεταγραφικών συμπλόκων. Η Virp1 πιθανώς μεσολαβεί σε δύο στάδια της μεταγραφής, στον ανασχηματισμό χρωματίνης/έναρξη μεταγραφής, και στη συνέχεια της μεταγραφικής διαδικασίας/επιμήκυνσης του μεταγράφου. Με κάποιον παρόμοιο μηχανισμό, είναι δυνατόν το RNA του ιοειδούς PSTVd, να επάγει τροποποιήσεις στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης και συνακόλουθα να ξεκινάει ένα μονοπάτι αντιδράσεων και αλληλεπιδράσεων, που έχουν τελικό στόχο να διευκολυνθεί η μολυσματική ικανότητα του παθογόνου. Ο μηχανισμός με τον οποίο υποστηρίζεται η μολυσματική ικανότητα του ιοειδούς δεν είναι γνωστός. Ωστόσο, το γεγονός ότι η πρόσδεση της Virp1 στο RNA του ιοειδούς είναι εξαρτώμενη από την αλληλουχία, και επιπλέον υπάρχει ένδειξη για συμμετοχή στη διαδικασία της μεταγραφής, λόγω της

Εισαγωγή

ύπαρξης της περιοχής bromodomain, θα μπορούσε να στηρίξει την υπόθεση ότι η Virp1 συμμετέχει στη διαδικασία πολλαπλασιασμού του PSTVd.

Green Fluorescent Protein (GFP)

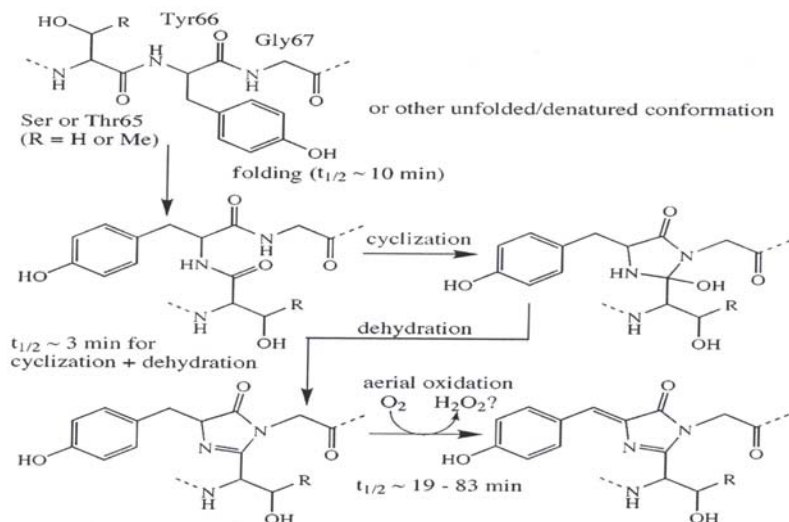
Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein), προέρχεται από τη μέδουσα *Aequorea victoria*. Ανακαλύφθηκε το 1962 (Shimomura et al), όταν κατά την απομόνωση μιας πρωτεΐνης από τη μέδουσα αυτή, παρατήρησαν πως υπήρχε μια άλλη πρωτεΐνη η οποία έδινε ένα ζωηρό πράσινο χρώμα στα διαλύματα, κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

Φυσικοχημικές ιδιότητες της GFP

Η ομάδα που έκανε αρχικά την παρατήρηση της ύπαρξης της GFP, δύο χρόνια αργότερα δημοσίευσε τη GFP πρωτεΐνη μαζί με πληροφορίες σχετικές με το φάσμα εκπομπής της και από τότε ξεκίνησε η έρευνα σχετικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της GFP.

Η πρωτεΐνη GFP διαθέτει μια χρωμοφόρο ομάδα, την p-υδροξυ-βενζυλιδενιμιδαζολινόνη, η οποία σχηματίζεται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 65-67 (Prasher D.C. et al.,1992), (Cody C.V. et al., 1993). Τα κατάλοιπα αυτά είναι σερίνη, τυροσίνη, γλυκίνη στη φυσική πρωτεΐνη. Με μια σειρά φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων πραγματοποιείται η βιοσύνθεση της χρωμοφόρου ομάδας της GFP και μόνο τότε το μόριο αποκτά ικανότητα απορρόφησης και φθορισμού.

Εισαγωγή



Σχηματική αναπαράσταση των αντιδράσεων με τις οποίες πραγματοποιείται η βιοσύνθεση της χρωμοφόρου ομάδας της GFP.

Ο μηχανισμός αυτός, χρειάζεται ατμοσφαιρικό οξυγόνο, το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του φθορισμού (Heim R et al., 1994), (Rei B.G. et al., 1997), (Innoye S. Et al., 1997). Το οξυγόνο είναι απαραίτητο γιατί καταλύει με αφυδρογόνωση τους α, β δεσμούς στο αμινοξικό κατάλοιπο 66 και με τον τρόπο αυτό συμμετέχει στο σχηματισμό της χρωμοφόρου ομάδας.

Φάσματα εκπομπής της GFP και το μετάλλαγμα S65T.

Η αγρίου τύπου GFP πρωτεΐνη από την *A. Victoria*, έχει το πιο πολύπλοκο φάσμα από όλες τις GFP. Εμφανίζει ένα μέγιστο διέγερσης στα 395nm, το οποίο είναι τρεις φορές μεγαλύτερου πλάτους από το ελάχιστο διέγερσης που συμβαίνει στα 475nm. Σε κανονικά διαλύματα, διέγερση στα 395nm, δίνει εκπομπή με μέγιστο στα 508nm, ενώ διέγερση στα 475nm συνεπάγεται μέγιστο εκπομπής στα 503nm (Heim R et al., 1994). Το γεγονός ότι το μέγιστο εκπομπής εξαρτάται από το μήκος κύματος της διέγερσης, δείχνει ότι υπάρχουν δύο χημικά διακριτά είδη μορίων GFP, εκ των οποίων το ένα περιέχει αποπρωτονιωμένη ή ανιονική χρωμοφόρο ομάδα, ενώ το άλλο έχει πρωτονιωμένη ή ουδέτερη χρωμοφόρο ομάδα. Η συνύπαρξη ουδέτερων και ανιονικών χρωμοφόρων που δίνουν τελικά δύο διαφορετικά μέγιστα στο φάσμα της αγρίου τύπου GFP, έχει μερικά πλεονεκτήματα αλλά και αρκετά μειονεκτήματα στις βιολογικές εφαρμογές. Αν ο φθορισμός της GFP πρόκειται

Εισαγωγή

να ανιχνευτεί με γυμνό μάτι, τότε η διέγερση με UV είναι βολική γιατί δεν τη βλέπουμε. Ωστόσο, μπορεί να προκαλέσει ζημιά στο μάτι και έτσι κρίνεται απαραίτητη η χρησιμοποίηση ενός παρεμποδιστικού φίλτρου. Η διέγερση της πρωτεΐνης στα 475nm θα μείωνε σημαντικά αυτό το πρόβλημα, αλλά δε θα ήταν το ίδιο αποτελεσματική, γιατί μόνο το 15% της πρωτεΐνης με την ανιονική χρωμοφόρο, θα απορροφούσε σε αυτό το μήκος κύματος (Yokoe H et al., 1996). Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν μεταλλάγματα της GFP με επιθυμητές ιδιότητες. Ανάμεσα σε αυτά ήταν τα μεταλλάγματα GFP με φαινολικά ανιόντα στη χρωμοφόρο ομάδα. Αυτά έγιναν γρήγορα πολύ δημοφιλή γιατί συνδύαζαν έντονη λάμψη φθορισμού με φάσματα εκπομπής που έδιναν μέγιστο σε βολικά μήκη κύματος. Το μετάλλαγμα που χρησιμοποιήθηκε περισσότερο είχε αντικατάσταση της σερίνης 65 από θρεονίνη, ή αλλιώς S65T (Heim R et al., 1995). Στο S65T μετάλλαγμα, το μέγιστο εκπομπής είναι περίπου στα 470-475nm. Στην εργασία αυτή, χρησιμοποιήθηκε το GFP μετάλλαγμα S65T.

Εφαρμογές της GFP

Η πρώτη εφαρμογή της GFP, ήταν η ανίχνευση της γονιδιακής έκφρασης *in vivo* στο νηματώδη *Caenorabditis elegans*. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ευρέως σαν γονίδιο reporter αλλά και σε σημαντής κυττάρων. Από τις εφαρμογές του φάνηκε ότι χρειάζεται να βρίσκεται κάτω από έναν ισχυρό υποκινητή έτσι ώστε να δώσει επίπεδα έκφρασης ικανά για να είναι ανιχνεύσιμος, ιδιαίτερα μάλιστα σε κύτταρα θηλαστικών και για το λόγο αυτό, στα περισσότερα δημοσιευμένα παραδείγματα, έχουν χρησιμοποιηθεί ιικοί υποκινητές, όπως του CaMV, SV40 κ.α.

Οι πιο συνηθισμένες και επιτυχείς εφαρμογές του GFP, είναι οι χιμαιρικές κατασκευές που έχουν κυρίως σα στόχο τον εντοπισμό πρωτεϊνών καθώς και την περαιτέρω παρακολούθησή τους μέσα σε ζωντανούς ιστούς. Η στρατηγική που ακολουθείται, είναι το γονίδιο *gfp*, να συντηχθεί με το γονίδιο που μας ενδιαφέρει διατηρώντας το σωστό πλαίσιο διαβάσματος, και η χίμαιρα που θα

Εισαγωγή

προκύψει να εκφραστεί μέσα στο κύτταρο ή πιο γενικά, τον οργανισμό που μελετάται. Το ιδανικό αποτέλεσμα είναι να προκύψει μια χμαιοική πρωτεΐνη η οποία θα διατηρεί τις ιδιότητες αλλά και τον εντοπισμό της, μόνο που πλέον θα φθορίζει. Το GFP χρησιμοποιήθηκε για να σημάνει επιτυχώς σχεδόν όλα τα κυτταρικά οργανίδια όπως τον πυρήνα, το ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύστημα Golgi, διάφορα εκκριτικά κυστίδια, μιτοχόνδρια, υπεροξειδιοσώματα κ.λ.π.(Tsien R, 1998). Από αυτό προκύπτει το συμπέρασμα ότι το μέγεθος και το σχήμα του GFP, καθώς και τα διαφορετικά pH και οξειδοαναγωγικά δυναμικά του κυττάρου, δε θέτουν εμπόδια στην έκφραση και τη λειτουργικότητα του GFP σε διάφορες περιοχές μέσα στο κύτταρο.

Ο φορέας pAVA321

Οι χμαιοικές κατασκευές ανάμεσα στο GFP και διάφορες πρωτεΐνες, αποτελούν ένα πολύ σημαντικό εργαλείο σε ερευνητικά πεδία που ασχολούνται με στόχευση πρωτεϊνών. Η διαδομένη χρησιμοποίηση τέτοιων κατασκευών, οδήγησε στο σχεδιασμό φορέων με ειδικά χαρακτηριστικά που διευκολύνουν τη δημιουργία χμαιοικών πρωτεϊνών. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε ένας τέτοιος φορέας, ο pAVA321 (A. G. von Arnim et al., 1998).

Ο pAVA321 ανήκει σε μια σειρά φορέων κλωνοποίησης οι οποίοι διευκολύνουν την έκφραση χμαιοικών πρωτεϊνών με το GFP, σε φυτικά κύτταρα. Η σειρά των φορέων αυτών είναι σχεδιασμένη κατά τέτοιο τρόπο που επιτρέπει τη σύντηξη των πρωτεϊνών, τόσο στο αμινο-τελικό, όσο και στο καρβοξυ-τελικό άκρο του GFP. Ο pAVA321 αποτελείται από το διπλό 35S υποκινητή του CaMV, τον ενισχυτή της μετάφρασης από τον TEV, την κωδική περιοχή του *mgfp4* (S65T) (Haseloff et al., 1997) και την 35S αλληλουχία τερματισμού της μετάφρασης από τον CaMV. Επιπλέον έχει το γονίδιο επιλογής με ανθεκτικότητα στην αμικιλίνη και τέλος το στοιχείο ColE1, από την *E.coli*, που του επιτρέπει να πολλαπλασιάζεται σε υψηλό αριθμό αντιγράφων. Ο φορέας pAVA321, επιτρέπει με την κατασκευή

Εισαγωγή

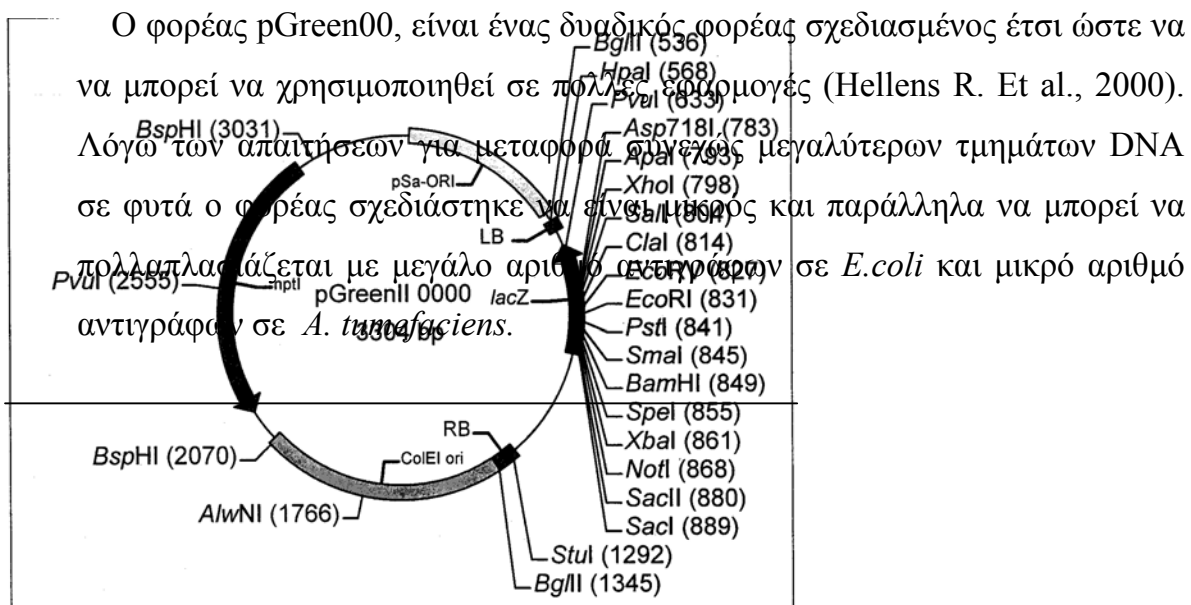
χιμαιρικών πρωτεϊνών, την οπτικοποίηση σημασμένων με φθορισμό πρωτεϊνών, σε υψηλά επίπεδα ανάλυσης, τόσο σε πειράματα παροδικής έκφρασης του διαγονιδίου, όσο και σε σταθερά μετασχηματισμένα διαγονιδιακά φυτά.

Πλασμιδιακοί φορείς και μεταμόρφωση

Οι πλασμιδιακές κατασκευές που παρουσιάζονται στην εργασία αυτή προορίζονται να μεταμορφώσουν φυτά με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens*. Για να συνδεθούν με τις κατασκευές τα στοιχεία εκείνα που θα τις καθιστούσαν ικανές να εισέλθουν στο Αγροβακτήριο, να πολλαπλασιαστούν σε αυτό, να εκφραστούν στο φυτό καθώς και να γίνει επιλογή των μεταμορφωμένων βακτηρίων και φυτών, χρησιμοποιήθηκαν δύο δυαδικοί φορείς: Ο φορέας pGreen00 και ο φορέας pART27.

Ο δυαδικός φορέας pGreen

Η σειρά των δυαδικών Ti φορέων pGreen είναι σχεδιασμένη κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις πολλαπλών διαδικασιών μετασχηματισμού, για διάφορα φυτικά είδη. Το σύστημα των φορέων αυτών, επιτρέπει πολλούς συνδυασμούς κασσετών επιλογής και γονιδίων ανθεκτικότητας και παράλληλα προσφέρει ένα μεγάλο εύρος επιλογών σε θέσεις περιορισμού στο αριστερό και το δεξί T-DNA άκρο. Αυτό οφείλεται στο ότι η σειρά αυτή των φορέων είναι βασισμένη στους πλασμιδιακούς φορείς pBluescript.

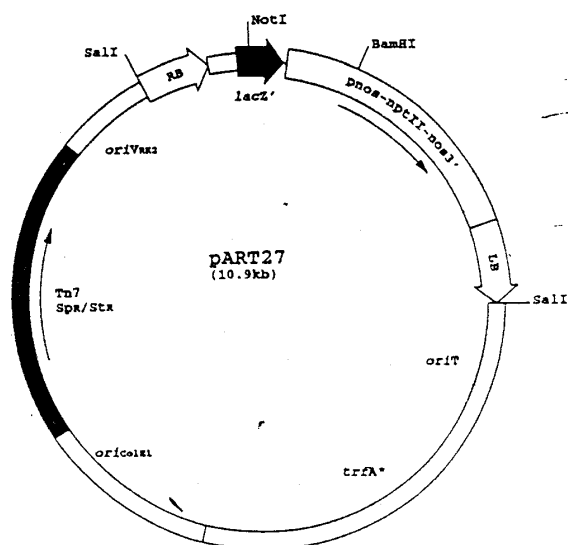


Εισαγωγή

Ο βασικός φορέας pGreen0000, έχει μέγεθος 3.304 kb και φέρει το γονίδιο επιλογής για ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Ο φορέας αυτός δεν περιέχει επιλογή για μετασχηματισμό φυτών, αλλά υπάρχουν ειδικά σχεδιασμένες κασσέτες, οι οποίες μπορούν εύκολα να κλωνοποιηθούν στο LB ή στο RB, δίνοντας με τον τρόπο αυτό ένα μεγάλο βαθμό ευελιξίας στην κατασκευή του T-DNA.

Ο δυαδικός φορέας pART27

Ο φορέας pART27 είναι ένας δυαδικός φορέας που αποτελείται από δύο λειτουργικά μέρη: I) το σκελετό που περιλαμβάνει μια περιοχή έναρξης της αντιγραφής της E.coli (ColEI), μια για το Αγροβακτήριο (RK2) και το γονίδιο ανθεκτικότητας στη σπεκτινομυκίνη (Spc^R) και τη στρεπτομυκίνη (Str^R) T17 για επιλογή σε E.coli και A.tumefaciens. II) την περιοχή T-DNA που βρίσκεται μεταξύ των δεξιών και αριστερών άκρων και περιλαμβάνει το γονίδιο lacZ για επιλογή σε μέσο με β-γαλακτοσιδάση και το χιμερικό γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (Km^R) (nopaline synthase promoter-neomycine phosphotransferase gene-nopaline synthase terminator) που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα.



Σχηματική αναπαράσταση του δυαδικού φορέα pART27

Εισαγωγή

Το σύστημα των δυαδικών φορέων αποτελείται από δύο πλασμιδία. Το ένα φέρει την περιοχή του T-DNA του *A.tumefaciens* και το άλλο τα γονίδια *vir*. Με τη μέθοδο της τριγωνικής σύζευξης ο φορέας pART27 μεταφέρεται σε ένα στέλεχος *A.tumefaciens* που περιέχει πλασμίδιο μόνο με τα *vir* γονίδια. Προκειμένου να γίνει η μόλυνση του πληγωμένου φυτού ενεργοποιούνται τα γονίδια *vir* (μέσω ανίχνευσης φαινολικών μορίων στο περιβάλλον του βακτηρίου, τα οποία προέχονται από από τα πληγωμένα φυτικά κύτταρα), το T-DNA αποκόβεται μεταξύ του δεξιού και του αριστερού άκρου και ένα μονόκλωνο DNA καλυμμένο με VIR πρωτείνες, μεταφέρεται από το βακτήριο στο φυτικό κύτταρο και ενσωματώνεται στο γένωμα. Στη συνέχεια ο υποκινητής 35S μπορεί να επάγει τη μεταγραφή του ενθέματος και επομένως επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο με καναμυκίνη.

Σκοπός της εργασίας

Θέλοντας να διερευνήσουμε το ρόλο της πρωτεΐνης Virp1 στο κύτταρο, αλλά και σε συνδυασμό με τη μόλυνση από το ιοειδές PSTVd, αποφασίσαμε το σχεδιασμό μιας χιμαιρικής κατασκευής της Virp1 με τη GFP. Η στρατηγική που ακολουθείται, είναι το γονίδιο της GFP, να συντηχθεί με το γονίδιο της Virp1, διατηρώντας το σωστό πλαίσιο διαβάσματος, και η χίμαιρα που θα προκύψει να εκφραστεί μέσα στα κύτταρα σταθερά μετασχηματισμένων φυτών *N.benthamiana*. Ο στόχος μας είναι, ο εντοπισμός με μικροσκοπική παρατήρηση στα φυτά αυτά της χιμαιρικής πρωτεΐνης, η οποία θα διατηρεί τις ιδιότητες και τον εντοπισμό της, και επιπλέον θα φθορίζει. Στη συνέχεια, θα μπορούσε να γίνει παρακολούθηση της χιμαιρικής πρωτεΐνης μετά από μόλυνση του φυτού με το ιοειδές PSTVd. Στην περίπτωση αυτή, θα είχε ενδιαφέρον με βάση τα όσα γνωρίζουμε μέχρι στιγμής για τη Virp1, να παρατηρήσουμε αν κατά τη μόλυνση με το ιοειδές, η πρωτεΐνη οδηγείται σε άλλες θέσεις μέσα στο φυτό.

Υλικά και Μέθοδοι

Υλικά

Ένζυμα

- Περιοριστικά ένζυμα (Minotech, New England Biolabs)
- Τροποποιητικά ένζυμα DNA και πολυμεράσες:
T4 λυγάση, αλκαλική φωσφατάση (Calf intestinal alkaline phosphatase, CIP),
DNA πολυμεράση I Klenow fragment (Klenow DNA pol), Taq DNA
πολυμεράση.

Ρυθμιστικά διαλύματα ενζύμων

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρεχόμενα από τον προμηθευτή ρυθμιστικά διαλύματα που συνόδευαν τα αντίστοιχα ένζυμα.

Νουκλεοτίδια

- Δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) (dATP, dTTP dGTP, dCTP)

Θρεπτικά μέσα βακτηρίων

LB(Luria Bertani): 1lt → 10g bactotryptone, 5g bacto-yeast extract, 10g NaCl και 15g άγαρ για το στερεό μέσο.

Θρεπτικά μέσα ιστοκαλλιέργειας

- MS (Murashige Scoog,1962)

Μικροστοιχεία 1000X	(mg/l)	Μακροστοιχεία (g/l) 10x	Βιταμίνες 1000x	(mg/l)	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	NH ₄ NO ₃	16.5	Γλυκίνη	2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	KNO ₃	19	Μυοινοσιτόλη	100
FeNaEDTA	36.7	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.4	Νικοτινικό οξύ	0.5
H ₃ BO ₃	6.20	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7	Πυριδοξίνη HCl	0.5
KI	0.83	KHPO ₄	1.7	Θυαμίνη HCl	0.1
MnSO ₄	16.9				
Na ₂ MoO ₄ ·7H ₂ O	16.9				
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6				

- Μέσο καλλογένεσης: MS συμπληρωμένο με 1.6 βενζυλ-αμινοπουρίνη (BAP) (1mg/l), ναφθαλιν-οξικό οξύ (NAA) (0.1mg/l) και με 100mg/l καναμυκίνη, 250mg/l σεφοταξίμη.
- Μέσο ριζογένεσης: MS συμπληρωμένο με 100mg/l καναμυκίνη, 250mg/l σεφοταξίμη.
-

Βακτηριακά στελέχη και ανθεκτικότητες σε αντιβιοτικό

Στέλεχος	Οργανισμός	Ανθεκτικότητα	Αναφορά
DH5α	<i>E.coli</i>	*	Sambrook et al. 1989
JM83	<i>E.coli</i>	*	Vieira and Messing 1982
LBA4404	<i>A.tumefaciens</i>	Rf ^R	Hoekema et al. 1983
HB101:PRK 2013	<i>A.tumefaciens</i>	km ^R	Ditta et al. 1980

*Εξαρτάται από το πλασμίδιο που εισάγεται

Πλασμιδιακοί φορείς

Στέλεχος	Οργανισμός	Ανθεκτικότητα	Αναφορά
pBS (pBluescript)	<i>E.coli</i>	Amp	Stratagene, 1997
pART27	<i>E.coli/A.tumefaciens</i>	Km/Spr/Str	Gleave, 1992
pAVA321	<i>E.coli</i>	Amp	A.G.von Arnim, 1998
pGREEN00	<i>E.coli</i>	Tetr	R.P. Hellens, 2000
pGEM-t-easy	<i>E.coli</i>	Amp	Promega, 1997

Μέθοδοι

Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων *E.coli*.

Δεκτικά για μετασχηματισμό χαρακτηρίζονται τα βακτηριακά κύτταρα τα οποία έχουν τροποποιηθεί κατάλληλα ώστε η κυτταρική τους μεμβράνη να γίνει περισσότερο διαπερατή στην εισχώρηση πλασμιδιακού DNA. Συγκεκριμένα:

Βάζουμε να αναπτυχθεί 12-16 ώρες, καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων στελέχους DH5α σε 100 ml LB (για 1lt διαλύματος : 10g bacto-tryptone, 5g bacto-yeast extract, 10g NaCl) και την αφήνουμε να αναδεύεται στους 37°C.

Σε φλάσκα δύο λίτρων βάζουμε 50 ml LB και μολύνουμε με 200μl από την παραπάνω καλλιέργεια. Επωάζουμε τα κύτταρα αναδευόμενα στους 37° C, μέχρι η οπτική τους πυκνότητα στα 560nm να γίνει 0,450.

- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στο 4° C για 5 λεπτά, στις 2500 rpm.
- Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 20 ml διαλύματος TFB I (100mM RbCl₂, 50mM MnCl₂, 30mM CH₃COOK, 10mM CaCl₂, 87 % γλυκερόλη, ρύθμιση του pH στο 5.8 με αραιό CH₃COOH).
- Επωάζουμε για 20 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκεντρούμε ξανά στους 4°C για 5 λεπτά, στις 2500 rpm.
- Επαναιωρούμε τα βακτήρια σε 3 ml διαλύματος TFB II (0.2 % MOPS, 10mM RbCl₂, 87% γλυκερόλη, ρύθμιση του pH στο 7.0 με NaOH 1M).
- Επωάζουμε για 10 λεπτά στον πάγο. Το βακτηριακό αιώρημα, μοιράζεται σε κλάσματα των 200μl και διατηρείται στους – 80°C.

Η ποιότητα των δεκτικών κυττάρων θεωρείται καλή όταν η απόδοσή τους είναι μεγαλύτερη από την ανάπτυξη 10⁶ μετασχηματισμένων αποικιών/ 1μg DNA.

Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα.

Για να είναι δυνατή η κλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα, είναι απαραίτητη η πέψη του με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα που δημιουργούν άκρα συμβατά με αυτά που έχουν επιλεγεί για το φορέα. Μετά την επιλογή των κατάλληλων ενζύμων, πραγματοποιείται η αντίδραση της πέψης με τα ρυθμιστικά διαλύματα και στις θερμοκρασίες που υποδεικνύουν οι κατασκευάστριες εταιρείες. Είναι σημαντικό ο όγκος του ενζύμου να μην ξεπερνά το 1/10 του τελικού όγκου αντίδρασης, γιατί η γλυκερόλη στην οποία διατηρούνται τα ένζυμα, μπορεί αν βρεθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις να μειώσει σημαντικά την ενεργότητά τους.

Έκλουση γραμμικών τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.

Μετά την ηλεκτροφόρηση των υδρολυμένων μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, κόβονται με νυστέρι οι κατάλληλες ζώνες που πρόκειται να κλωνοποιηθούν. Η έκλουση γίνεται με κατάλληλο εμπορικό kit της εταιρείας BIO 101, (GENE CLEAN II, GENE CLEAN III σύμφωνα με τον κατάλογο BIO 101, 1999/2000 Guide to Protocols Procedures). Με χρησιμοποίηση του kit επιτυγχάνεται δέσμευση των γραμμικών μορίων DNA σε σφαιρίδια πυριτολίθου, σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης χαοτροπικού άλατος.

Συγκεκριμένα τα κομμάτια αγαρόζης που περιέχουν το DNA, θερμαίνονται μέσα σε διάλυμα NaI, όπου γίνεται υδρόλυση των υδρογονοδεσμών των σακχάρων μέσα στο πολυμερές, με αποτέλεσμα να ελευθερώνεται το DNA και να δεσμεύεται από τα σφαιρίδια πυριτολίθου (EZ-GLASSMILK), που προστίθενται κατόπιν στο μίγμα.

Τα σφαιρίδια με τα δεσμευμένα μόρια DNA ξεπλένονται στη συνέχεια με διάλυμα NEW WASH, το οποίο περιέχει αιθανόλη και απομακρύνει τα άλατα.

Υλικά και μέθοδοι

Τελικά το DNA εκλύεται με διάλυμα το οποίο έχει χαμηλή συγκέντρωση άλατος, όπως νερό ή διάλυμα Tris-EDTA 10 mM.

Αντίδραση λιγάσης: ένθεση συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα.

Για να πραγματοποιηθεί κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, γίνεται αντίδραση σύνδεσης (ligation), σε θερμοκρασία δωματίου για τρεις ώρες ή στους 16°C για 12-16 ώρες, χρησιμοποιώντας τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- 50-80ng φορέα
- ποσότητα ενθέτου η οποία καθορίζεται από την αναλογία μορίων φορέα ως προς τα μόρια ενθέτου.
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (10x : 0.5 Tris, pH 7.4, 0.1M MgCl₂, 0.1M DTT, 10mM spermidine, 10mM ATP, 1mg/ml BSA).
- 1μl T4 DNA λιγάση (3-5 units)
- H₂O μέχρι τελικού όγκου αντίδρασης 15μl.

Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* με πλασμιδιακό φορέα.

Ο μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* πραγματοποιείται έτσι ώστε σε κατάλληλο στέλεχος ικανών κυττάρων να ενθέσουμε το πλασμίδιο που παρέχει το κομμάτι του DNA που μας ενδιαφέρει. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται ως εξής:

Διατηρούμε 100μl δεκτικών κυττάρων, για κάθε μετασηματισμό, για μικρό χρονικό διάστημα στον πάγο μέχρι να ξεπαγώσουν από τους -80°C στους οποίους φυλάσσονταν.

Υλικά και μέθοδοι

Προσθέτουμε 10μl από το επιθυμητό DNA εφόσον αυτό βρίσκεται σε συγκέντρωση 1ng/μl, ανακατεύουμε με τα κύτταρα και τα αφήνουμε στον πάγο για 30 λεπτά.

Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C, για 90 δευτερόλεπτα.

Αφήνουμε τα κύτταρα στον πάγο περίπου 2 λεπτά να κρυώσουν και προσθέτουμε στη συνέχεια 300μl LB (Luria Bertani medium) και τα επωάζουμε στους 37°C για 50 λεπτά. Απλώνουμε τα κύτταρα σε τριβλίο που περιέχει LB και το κατάλληλο επιλεκτικό μέσο (αντιβιοτικό), ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα που επιλέξαμε. Επωάζουμε τα κύτταρα στους 37°C για 16-20 ώρες.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης κυττάρων.

Από βακτηριακές αποικίες που έχουμε επιλέξει μετά το μετασχηματισμό, απομονώνουμε μικρή ποσότητα DNA για να ελέγξουμε αν είναι επιτυχημένη η κλωνοποίηση του ενθέτου στον πλασμιδιακό φορέα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Ετοιμάζουμε καλλιέργειες σε 3ml LB με το κατάλληλο επιλεκτικό μέσο και τις επωάζουμε ολονύκτια στους 37° C.

Την επόμενη μέρα, μεταφέρουμε σταδιακά σε σωλήνες erendorff τα 4.5ml της καλλιέργειας και φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 5 λεπτά. Το 0.5 ml καλλιέργειας που μένει, το διατηρούμε με ίσο όγκο γλυκερόλης στους -20°C.

Μετά από κάθε φυγοκέντρηση, αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 100μl διαλύματος I (solution I), και επωάζουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Προσθέτουμε 200μl διαλύματος II (solution II), αναδεύουμε προσεκτικά και επωάζουμε στον πάγο για 5 λεπτά.

Υλικά και μέθοδοι

Προσθέτουμε 150μl διαλύματος III (solution III) και αφήνουμε για άλλα 5 λεπτά στον πάγο. Τα συστατικά των 3 διαλυμάτων είναι τα εξής:

Solution I	25mM Tris_HCl pH 8.0 1M	10mM EDTA pH 8.0 (0.5M)	H2O μέχρι 50ml
Solution II	0.2 M NaOH (1M)	1% SDS	H2O μέχρι 50ml
Solution III	30mM CH3COOK 5M pH 5.2	5.75 CH3COOH	ml H2O μέχρι 50 ml

Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 30 λεπτά στους 4°C στις 13000 rpm. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε σε αυτό, ίσο όγκο φαινόλης-χλωροφορμίου, αναδεύουμε έντονα (vortex) και φυγοκεντρούμε για μισή ώρα στις 13000rpm στους 4°C.

Συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml απόλυτης αιθανόλης και φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες για 5 λεπτά.

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά έτσι ώστε να μη διαταράζουμε την πελέττα και στη συνέχεια την ξεπλένουμε με 1ml αιθανόλης 70%.

Επαναλαμβάνουμε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε το ίζημα στον αέρα.

Τέλος επαναδιαλύουμε το ίζημα του DNA σε TE ή νερό με ριβονουκλεάση A 100μg/μl.

Για να ελέγξουμε αν στον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήσαμε, έχει κλωνοποιηθεί το επιθυμητό ένθεμα, τέμνουμε το ανασυνδυασμένο DNA με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, και ελέγχουμε με ηλεκτροφόρηση το μοτίβο των ζωνών που προκύπτει.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας με τη χρήση κολώνας Qiagen.

Κάθε φορά που ήταν απαραίτητη η απομόνωση μεγάλης ποσότητας DNA από βακτηριακή καλλιέργεια και μάλιστα σε κατάσταση υψηλής καθαρότητας, χρησιμοποιήθηκε κολώνα Qiagen (tip 100 cat. No 12145), με την οποία επιτυγχάνεται πολύ μεγαλύτερη αποδοτικότητα σε σχέση με τη παραλαβή DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης και επίσης μεγαλύτερη καθαρότητα στο DNA που απομονώνεται. Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

Ετοιμάζουμε καλλιέργειες 50 ή 100 ml LB με το κατάλληλο επιλεκτικό μέσο και τις επωάζουμε ολονύκτια στους 37°C.

Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 30 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 3000 rpm.

Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε την πελλέτα των κυττάρων σε 4ml διαλύματος P₁, στο οποίο έχουμε προσθέσει ριβονουκλεάση.

Προσθέτουμε 4ml διαλύματος P₂, αναδεύουμε προσεκτικά και αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

Προσθέτουμε 4ml κρύου διαλύματος P₃, ανακατεύουμε ήπια και επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά.

Τα συστατικά των χρησιμοποιούμενων, παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

P₁ (20ml)	25mM Tris-HCl pH 8.0 1M	10mM EDTA pH 8.0 (0.5M)	100μg/μl Rnase A (10mg/ml)
P₂ (50ml)	0.2M NaOH (1M)	1% SDS	
P₃ (50ml)	30ml CH ₃ COOK 5M pH 5.2	5.75ml CH ₃ COOH	

Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στους 4°C, στις 10000rpm.

Μεταφέρουμε σε καινούργιο σωλήνα το υπερκείμενο και φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες για ακόμα 20 λεπτά.

Συγχρόνως, εξισορροπούμε την κολώνα Qiagen προσθέτοντας 4ml διαλύματος QBT, το οποίο αφήνουμε να περάσει με τη βαρύτητα.

Προσθέτουμε στην κολώνα το υπερκείμενο της δεύτερης φυγοκέντρωσης και το αφήνουμε να περάσει απ'την κολώνα με τη βαρύτητα. Το πλασμιδιακό DNA συγκρατείται μέσα στην κολώνα.

Ξεπλένουμε την κολώνα δύο φορές με 10ml διαλύματος QC.

Εκλούουμε το DNA, προσθέτοντας στην κολώνα 5ml διαλύματος QF.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στο στάδιο αυτό, αποτελούνται από τα εξής συστατικά:

QBT (100ml): 750mM NaCl (5M), 50mM MOPS pH 7.0, 15% EtOH, 0.15% Triton X-100

QC (100ml): 1M NaCl (5M), 50mM MOPS pH 7.0, 15% EtOH

QF (100ml): 1.25M NaCl (5M), 50mM Tris-HCl pH 8.0, 15% EtOH

Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με 0.7 του όγκου ισοπροπανόλη και φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, στους 4⁰C, στις 10000 rpm.

Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο και ξεπλένουμε το ίζημα με 70% παγωμένη αιθανόλη.

Φυγοκεντρούμε ξανά στις ίδιες συνθήκες για 10 λεπτά, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε την πελλέτα του DNA στον αέρα.

Επαναδιαλύουμε το DNA σε 100-200μl H₂O ή TE, ανάλογα με την ποσότητα του DNA που απομονώθηκε.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, είναι μια αντίδραση που επιτρέπει με μεγάλη ευαισθησία τον πολλαπλασιασμό σε πολλά αντίγραφα, ενός μόνο κομματιού DNA. Ανάλογα με το υπόστρωμα, τους υποκινητές και γενικά τις συνθήκες που χρησιμοποιούμε μεταβάλλεται και η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης. Ωστόσο, μπορεί να περιγραφεί ένα γενικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε, το οποίο επιδέχεται τροποποιήσεις έτσι ώστε να μεγιστοποιηθεί η απόδοση της αντίδρασης σε κάθε περίπτωση.

Έτσι έχουμε:

Σε μια αντίδραση τελικού όγκου 50μl:

- Υπόστρωμα DNA: 10 ng
- Διάλυμα PCR 10x: 2 mM
- Εκκινητές: περίπου 10pM από καθένα (από την MWG ή IMBB-ITE)
- MgCl₂: 2 mM
- DNTPs: 2 mM από καθένα
- Taq DNA πολυμεράση: 1 unit
- H₂O: μέχρι τελικού όγκου.

Υλικά και μέθοδοι

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε σωλήνες erpendorf των 1.5 ml, στους οποίους μόλις βάλουμε το μίγμα της αντίδρασης, προσθέτουμε μια σταγόνα paraffin oil.

Για μια αντίδραση πραγματοποιούμε περίπου 25-35 κύκλους χρησιμοποιώντας παρακάτω προφίλ θερμοκρασιών:

Αποδιάταξη του DNA: 96°C ,15 sec. Στο στάδιο αυτό μπορεί να παραταθεί ο αρχικός χρόνος.

Υβριδοποίηση των εκκινητών: 55°C, 30 sec.

Επιμήκυνση των εκκινητών: 72°C, 1.5 min.

Τελικό στάδιο επιμήκυνσης: 72°C, 5 min.

Η αντίδραση σταματάει στους 4°C.

Μέθοδος τριγωνικής σύζευξης

Η μέθοδος τριγωνικής σύζευξης που περιγράφεται από τους Horsch (Horsch et al., 1985) και Drapper (Drapper et al., 1988) χρησιμοποιείται για τη σύζευξη των μετασχηματισμένων πλασμιδιακών φορέων από τα στελέχη της *E.coli* στο *A. tumefaciens*.

Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, ο φορέας pART27 που περιέχει το προς μεταφορά τμήμα DNA, γονίδια-μάρτυρες ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη και στρεπτομυκίνη/ σπεκτινομυκίνη καθώς και τα Αριστερό και Δεξιό όριο του T-DNA, εισάγεται στο στέλεχος-βοηθό που περιέχει το πλασμίδιο-βοηθό pRK2013. Αυτό προσδίδει στο κύτταρο ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη και την ικανότητα να μεταφέρει το pART27 και τον εαυτό του στο Αγροβακτήριο μέσω σύζευξης. Το pRK2013 δε μπορεί να αναπαραχθεί στο Αγροβακτήριο και έτσι δε διατηρείται στα αναδιπλασιαζόμενα βακτήρια. Τα συζευγμένα κύτταρα, επιλέγονται με βάση την ανθεκτικότητα τόσο στην καναμυκίνη/ στρεπτομυκίνη/ σπεκτινομυκίνη, όσο και στη ριφαμπικίνη (που προσδίδεται από μεταλλαγή σε γονίδιο του γενώματος του αγροβακτηρίου).

Η διαδικασία της μεθόδου είναι η ακόλουθη: Κύτταρα των δύο στελεχών *E.coli* επωάζονται στους 37⁰C σε 3ml LB+ Km (50mg/ml) για >12 h, ενώ το στέλεχος του *A. tumefaciens* LBA 4404 επωάζεται στους 28⁰C σε 3ml LB+Rf, επίσης για >12h, θερμοκρασία που είναι η βέλτιστη για την ανάπτυξη του βακτηρίου και που επιτρέπει την έκφραση των γονιδίων *vir*. Στη συνέχεια, 100μl από την κάθε καλλιέργεια αναμιγνύονται σε σωλήνα erpendorf και σταγόνες όγκου 10μl, ρίχνονται σε τριβλία με LB. Το τριβλίο επωάζεται για > 12h στους 28⁰C. Με τη χρήση στείρας στεφάνης συλλέγονται κύτταρα και διαλύονται σε 500 μl LB, 100 μl εκ των οποίων απλώνονται σε στερεό μέσο LB+Km/Rf και επωάζονται για δύο μέρες στους 28⁰C.

Μετασηματισμός φυλλικών δίσκων μέσω αγροβακτηρίου

Νεαρά φύλλα από *Nicotiana benthamiana* αποκόπτονται από το μίσχο και αφήνονται σε διάλυμα 70% αιθανόλης για 2 min. Τα φύλλα αποστειρώνονται σε μείγμα 10% ενεργού χλωρίου και 0.1 % Tween 20 για 10 min και πλένονται 3 φορές με αποστειρωμένο H₂O. Στη συνέχεια αποκόπτονται φυλλικοί δίσκοι διαμέτρου ~5mm μέσα σε τριβλίο που περιέχει υγρό MS χωρίς ορμόνες και αντιβιοτικά. Για κάθε μετασηματισμό, χρησιμοποιούνται περίπου 50 φυλλικοί δίσκοι. Η καλλιέργεια του Αγροβακτηρίου (~20 ml) στο οποίο έχει εισαχθεί η επιθυμητή κατασκευή, φυγοκεντρείται για 5 min στις 3500 rpm (2330g σε κεφαλή KUBOTA) και η βακτηριακή πελλέττα επαναδιαλύεται σε 5 ml MS. Οι φυλλικοί δίσκοι μπαίνουν στο κυτταρικό εναιώρημα και προστίθεται MS μέχρι τελικού όγκου 50ml. Εναλλακτικά, η συνεπώαση μπορεί να γίνει σε στείρο γυάλινο τριβλίο. Οι δίσκοι και τα Αγροβακτήρια συνεπώάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min με συχνή ανάδευση.

Το πλεονάζον υγρό απομακρύνεται από τους δίσκους χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο χαρτί Whatmann. Στη συνέχεια αυτοί τοποθετούνται σε τριβλία με

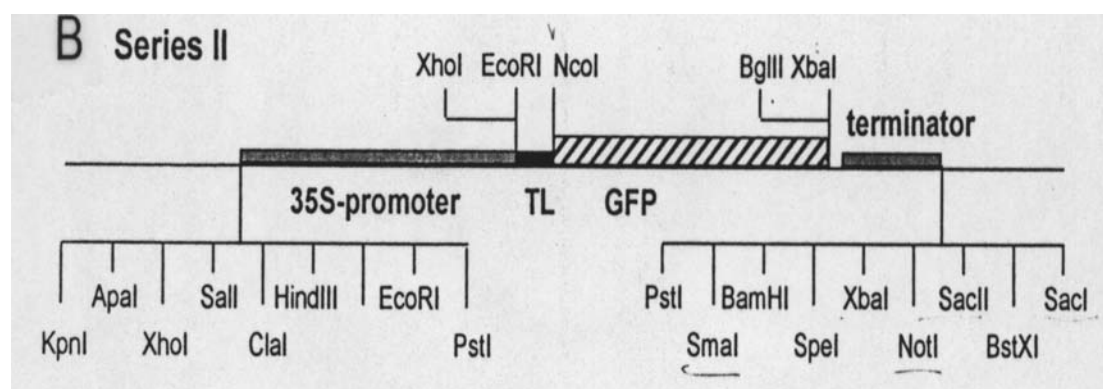
στερεό MS συμπληρωμένο με τις ορμόνες ανάπτυξης του καπνού 1,6 βενζυλ-αμινοπουρίνη (BAP) (1mg/l) και ναφτιλ-οξικό οξύ (NAA) (0,1mg/l) και επωάζονται στο θάλαμο ανάπτυξης υπό 16 h φως (24^0), 8 h σκοτάδι (18^0) για 2 ημέρες. Οι παραπάνω αναλογίες ορμονών ευνοούν την καλλογένεση καθώς και την επιμήκυνση του βλαστού. Μετά την πάροδο των δύο ημερών οι δίσκοι ξεπλένονται από τα Αγροβακτήρια μέσα σε υδατικό διάλυμα του αντιβιοτικού σεφατοξίμη (Cf) (500mg/ml) το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη των υπολειπόμενων βακτηρίων και τέλος τοποθετούνται σε MS+km/Cf μέσο προς επιλογή των μετασχηματισμένων αναγεννημένων φυτικών κυττάρων

Αποτελέσματα

Σχεδιασμός του χμαιοικου γονιδίου *gfp-virp1*

Στην εργασία αυτή, στόχος ήταν η δημιουργία του χμαιοικου γονιδίου *gfp-virp1*, ενός γονιδίου δηλαδή, το οποίο θα διατηρούσε τις ιδιότητες της πρωτεΐνης Virp1 σε συνδυασμό με το GFP, το οποίο θα προσέδιδε στην πρωτεΐνη μας την ικανότητα να φθορίζει κάτω από φωτεινή ακτινοβολία σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Για το σκοπό αυτό χρειάστηκε να συνδυαστεί το γονίδιο *gfp*, με την κωδική περιοχή του γονιδίου της πρωτεΐνης Virp1. Για το *gfp* γονίδιο, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pAVA321, ο οποίος περιγράφεται στο κεφάλαιο της εισαγωγής.

Στην εικόνα (1) φαίνεται η περιοχή του πολυσυνδέτη του φορέα.



Εικ.1 Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής του πολυσυνδέτη στα άκρα του γονιδίου *gfp* στο φορέα pAVA 321.

Οι θέσεις οι οποίες επιλέχθηκαν για υποκλωνοποίηση της κωδικής περιοχής του γονιδίου *virp1*, ήταν οι *BglII* και *XbaI*.

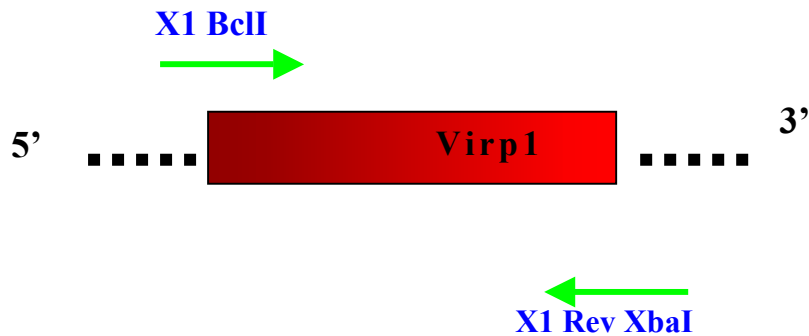
Ο φορέας pAVA 321 επώαστηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *BglII* και *XbaI*. Η αντίδραση περιορισμού ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 0.7%. Ο γραμμοποιημένος φορέας pAVA321, απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης, με τη χρήση των αντιδραστηρίων του

Αποτελέσματα

GENECLEAN III (BIO 101), ακολουθώντας τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

Απομόνωση της κωδικής περιοχής του γονιδίου της *Virp1*

Η κωδική περιοχή του γονιδίου της *Virp1*, απομονώθηκε από το φορέα pBSX1. Στον φορέα αυτό βρισκόταν κλωνοποιημένος ο πλήρης κλώνος της *Virp1*, από τον A.E. Martinez. Η απομόνωση του θραύσματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές, τέτοιοι που να απομονώνουν μόνο την κωδική περιοχή του γονιδίου της *Virp1*, εισάγοντας παράλληλα, δύο νέες θέσεις περιορισμού. Οι θέσεις αυτές ήταν ικανές για να διευκολύνουν την περαιτέρω υποκλωνοποίηση του κομματιού, στο φορέα του *gfp*. Συγκεκριμένα οι θέσεις αυτές ήταν *BclI* στο 5' μέρος και *XbaI* στο 3' μέρος της κωδικής περιοχής της *Virp1*.



Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν οι εξής:

X1 BclI

5' GCG TGA TCA ATG GCA TCC GCC GTC TTA 3'

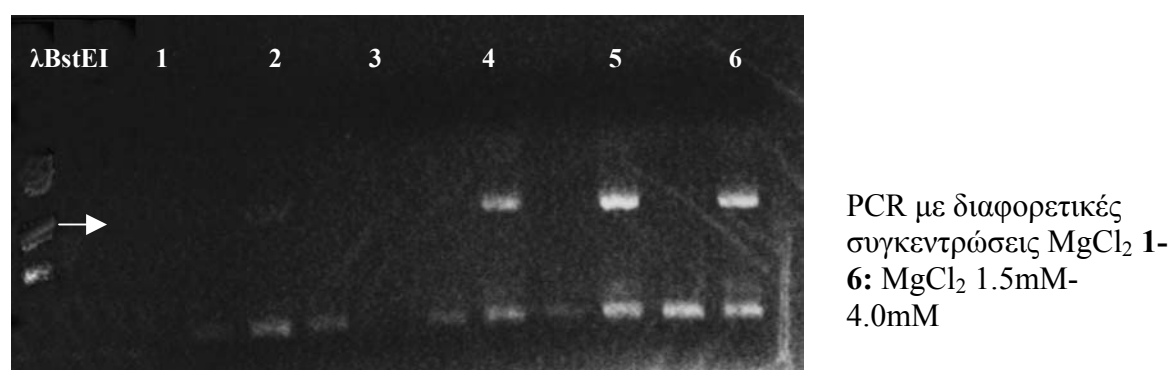
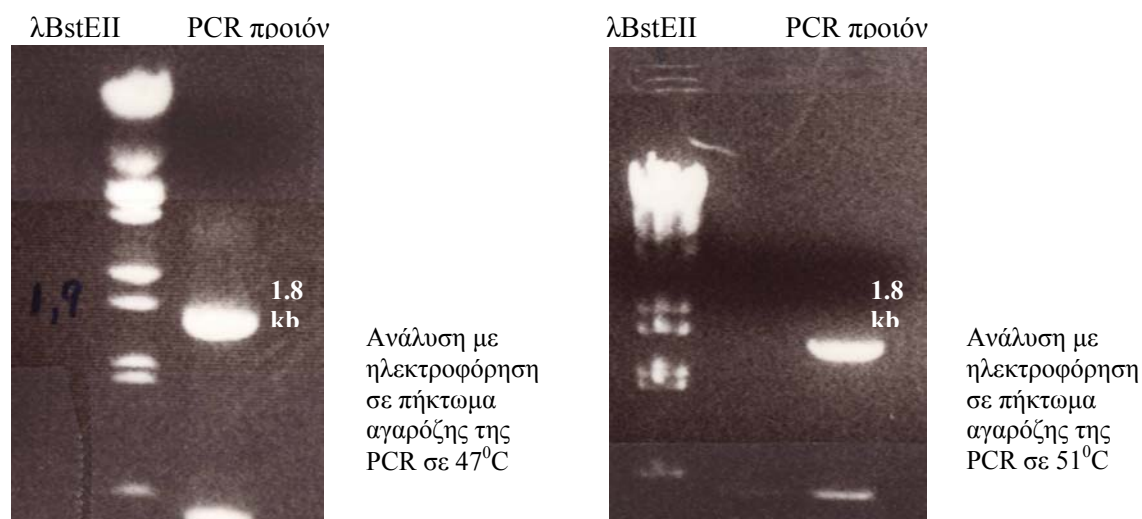
X1 Rev XbaI

5' GGGG TCT AGA CTC AAG AGT GTG CAC ATC AGC 3'

Αποτελέσματα

Από την ανάλυση μέσω ηλεκτροφόρησης του προϊόντος της PCR, μαζί με το αναμενόμενο θραύσμα, παρατηρήθηκε η ύπαρξη ενός μικρότερου υποπροϊόντος. Για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν συνθήκες οι οποίες ευνοούν ή παρεμποδίζουν το σχηματισμό του υποπροϊόντος αυτού, δοκιμάστηκαν παραλλαγές στο πρωτόκολλο της αντίδρασης, σε ό,τι αφορούσε τις θερμοκρασίες annealing, καθώς και στη συγκέντρωση του $MgCl_2$.

Συγκεκριμένα, η αντίδραση επαναλήφθηκε σε εύρος θερμοκρασιών $47^{\circ}-51^{\circ}C$ και $62^{\circ}-67^{\circ}C$. Η συγκέντρωση του $MgCl_2$, δοκιμάστηκε ανά $0.5mM$ από $1.5mM-1.0mM$, δηλαδή σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Τελικά, συγκρίνοντας την εικόνα του προϊόντος που παίρναμε από κάθε αντίδραση, το πρωτόκολλο της PCR που ακολουθήσαμε ήταν το εξής:

Αποτελέσματα

7' 94⁰C

30'' 94⁰C

30'' 51⁰C

2' 72⁰C

5 κύκλοι

30'' 94⁰C

30'' 67⁰C

2' 72⁰C

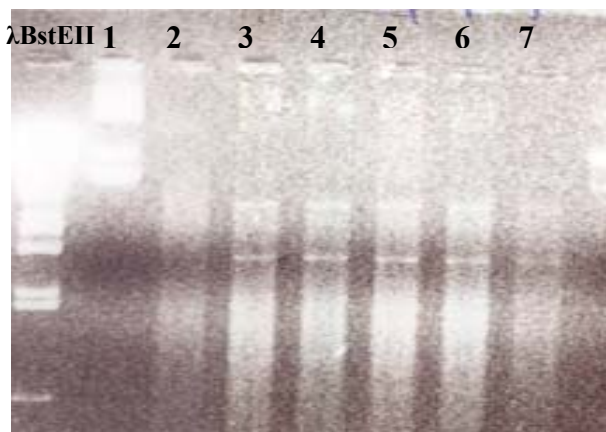
30 κύκλοι

10' 72⁰C

Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιήθηκε με συγκέντρωση MgCl₂ 2mM.

Το PCR προϊόν, απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση των αντιδραστηρίων του GENE CLEAN III (BIO 101), ακολουθώντας τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

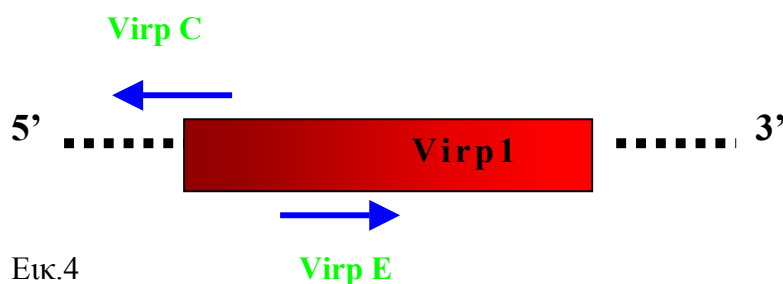
Στη συνέχεια ποσοτικοποιήθηκε με ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% και κατόπιν κλωνοποιήθηκε σε γραμμοποιημένο φορέα pGEM-t-easy. Το ένθεμα συγκολλήθηκε στο φορέα με αντίδραση λιγάσης T4. Η αντίδραση χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματίσει ικανά κύτταρα *E.coli* του στελέχους JM 83, και η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε σε τριβλία με LB+ Amp. Από τις ανθεκτικές αποικίες απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA, με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Για να ελεγχθεί αν η συγκόλληση ήταν επιτυχής, τα πλασμίδια επώαστηκαν με BclI και XbaI (εικ.3)



Εικ 3. 1. άκοπο πλασμίδιο 2. πέψη με BclI 3-7 διαφορετικές αποικίες επωασμένες με BclI/XbaI

Αποτελέσματα

Οι κλώνοι που έδωσαν το σωστό πρότυπο περιορισμού, αναλύθηκαν περαιτέρω με αλληλούχιση (sequencing), με τους εκκινητές SP6 και T7. Τα πρότυπα του χρωματογράμματος που έδωσε η αλληλούχιση, επεξεργάστηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα DNAMAN, και από εκεί βρήκαμε τον κλώνο που είχε τη μεγαλύτερη ομολογία με την αρχική αλληλουχία της Virp1. Στον κλώνο αυτό έγινε περαιτέρω ανάλυση μέσω αλληλούχισης με τους εκκινητές X1Virp E και X1Virp C (εικ.4)



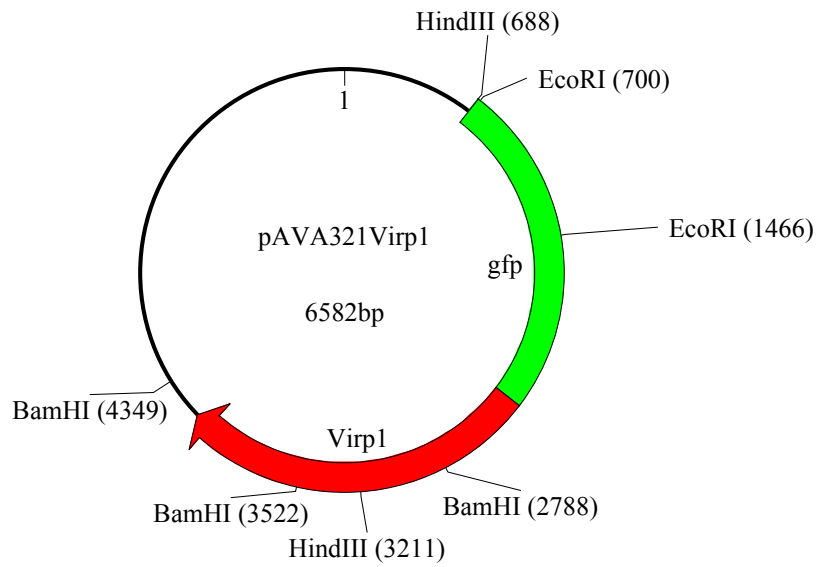
Στη συνέχεια ο ίδιος κλώνος χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση του ενθέματος κατόπιν επώασης με τα περιοριστικά ένζυμα BclI και XbaI. Το απομονωμένο πλέον θραύσμα της κωδικής περιοχής της Virp1 υποκλωνοποιήθηκε στο γραμμοποιημένο φορέα pAVA321.

Η συγκόλληση του ενθέματος στο φορέα, πραγματοποιήθηκε με αντίδραση λιγάσης T4. Στη συνέχεια, ακολούθησε μετασχηματισμός ικανών κυττάρων *E.coli* JM83. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα, επιλέχθηκαν σε τριβλία LB+Amp. Από τις ανθεκτικές αποκίες απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.

Η αντίδραση συγκόλλησης ελέγχθηκε με πέψεις περιορισμού, χρησιμοποιώντας τα ένζυμα EcoRI, BamHI καθώς και διπλή πέψη περιορισμού με BamH και HindIII.

Στο χάρτη που ακολουθεί σημειώνονται οι παραπάνω θέσεις περιορισμού.

Αποτελέσματα

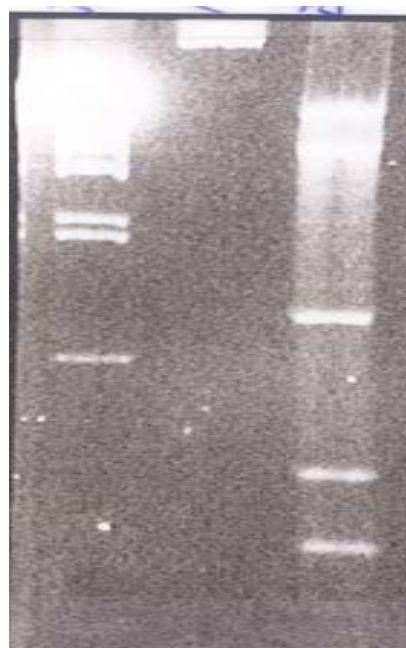


Τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (εικ. 5)

λBstEII άκοπο -EcoRI -BamHI
 πλασμίδιο



λBstEII άκοπο -BamHI/HindIII
 πλασμίδιο



Εικ.5 Ανάλυση της αντίδρασης περιορισμού σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα μεγέθη των θραυσμάτων περιορισμού είναι τα αναμενόμενα.

Αποτελέσματα

Τα πρότυπα των θραυσμάτων μετά την αντίδραση περιορισμού ήταν τα αναμενόμενα και πλέον είχε ολοκληρωθεί η δημιουργία της χμαιορικής κατασκευής *gfp-virp1*.

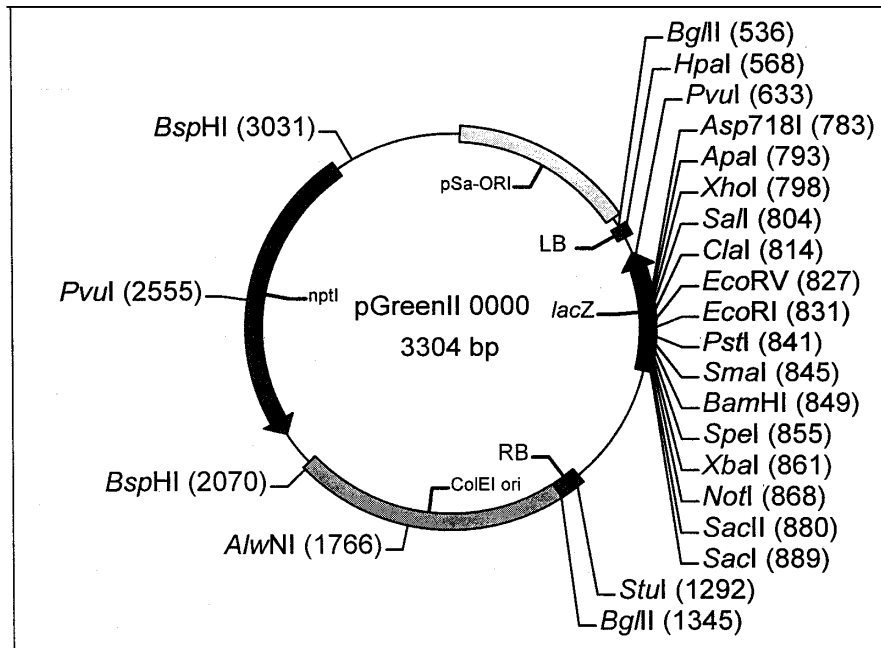
Μεταφορά της χμαιορικής κατασκευής *gfp-virp1*, σε δυαδικό φορέα κατάλληλο για μετασχηματισμό φυτών μέσω Αγροβακτηρίου.

Η κατασκευή *gfp-virp1*, θα έπρεπε να μεταφερθεί στη συνέχεια σε κάποιο δυαδικό φορέα κατάλληλο για μετασχηματισμό φυτών μέσω Αγροβακτηρίου. Αρχικά επιλέχθηκε ο φορέας pGreen00 (Hellens R. et al.). Για να είναι δυνατή στη συνέχεια η επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών, θα έπρεπε στον φορέα pGreen, να κλωνοποιήσουμε μια κασσέτα επιλογής με μάρτυρα επιλογής. Έτσι, επιλέχθηκε η κασσέτα nos-kan, η οποία έφερε γονίδιο επιλογής με ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη (εικ. 6)



Εικ. 6 Η κασσέτα επιλογής nos-kan, ειδικά σχεδιασμένη με δύο EcoRV θέσεις στα άκρα που διευκολύνουν περεταίρω κλωνοποίηση, στις θέσεις *HpaI* ή *StuI*, του βασικού pGreen00.

Λόγω του σχεδιασμού της, η παραπάνω κασσέτα nos-kan, κλωνοποιείται εύκολα στον pGreen, στη θέση *HpaI* (εικ. 7)



Εικ. 7 Χάρτης του pGreen00. Η κασσέτα nos-kan υποκλωνοποιήθηκε στη θέση HpaI.

Απομόνωση της κασσέτας 35S : *gfp-virp1*: terminator από τον pAVA321

Στη συνέχεια ακολούθησε υποκλωνοποίηση της κασσέτας *gfp-virp1*, μαζί με το διπλό 35S υποκινητή και την περιοχή 35S terminator, στο δυαδικό φορέα pGreen nos-kan. Για να πραγματοποιηθεί η υποκλωνοποίηση αυτή, έπρεπε αρχικά να αποσπαστεί η κασσέτα *gfp-virp1* από το φορέα pAVA321, μαζί με το διπλό 35S υποκινητή και την terminator αλληλουχία. Η απομόνωση της κασσέτας πραγματοποιήθηκε με τριπλή πέψη περιορισμού στο πλασμίδιο pAVA321 *gfp-virp1*, με τα ένζυμα NotI, Sall και PvuI. Η NotI και η Sall απομονώνουν την κασσέτα 35S : *gfp-virp1*: terminator από τον υπόλοιπο φορέα, ενώ η PvuI κόβει μέσα στο φορέα με αποτέλεσμα να γίνεται καλύτερος

Αποτελέσματα

διαχωρισμός των προϊόντων περιορισμού, όταν αυτά αναλυθούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα αναμενόμενα μεγέθη των θραυσμάτων περιορισμού, ήταν τα εξής:

- 3.4 kb, μήκος ένθετου *35S : gfp-virp1: terminator*
- 1.4kb
- 0.9kb

Η αντίδραση περιορισμού ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 0.9% (εικ.8)

λBsteII -NotI -NotI /-SalI -NotI/-SalI/ -PvuI
 1 2 3 4 5



Εικ. 8 Ανάλυση της αντίδρασης περιορισμού: μάρτυρας μεγέθους, 1. πέψη με NotI, 2. δ. πέψη με NotI/SalI, 3-5. τ.πέψη με NotI/SalI/PvuI

Το πρότυπο των ζωνών από την αντίδραση περιορισμού ήταν σωστό, οπότε ακολούθησε απομόνωση του ενθέματος από το πήκτωμα αγαρόζης, με τη χρήση των αντιδραστηρίων του GENECLEAN III (BIO 101), ακολουθώντας τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Το προϊόν μετά τον καθαρισμό του από το πήκτωμα αγαρόζης, ελέγχθηκε εκ νέου με ηλεκτροφόρηση, έτσι ώστε να εκτιμηθεί η ποσότητα του.

Γραμμοποίηση του δυαδικού φορέα pGreen nos-kan και αντίδραση αποφωσφορυλίωσης (CIP).

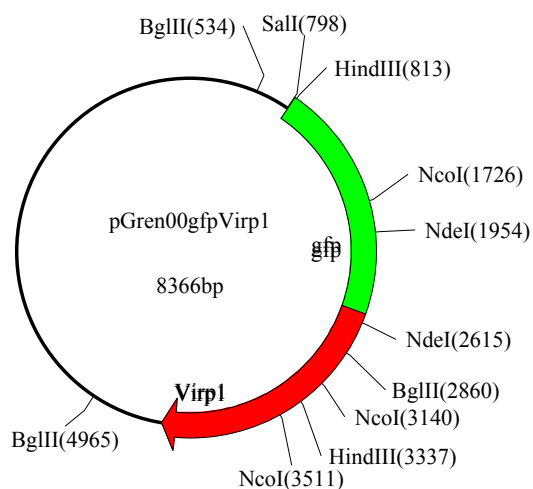
Για τη γραμμοποίηση του δυαδικού φορέα pGreen nos-kan, πραγματοποιήθηκε αντίδραση περιορισμού με το ένζυμο Hpa I. Το προϊόν της αντίδρασης περιορισμού ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και ακολούθησε καθαρισμός από το μίγμα της αντίδρασης με φαινόλη και CHCl_3 . Ακολούθησε αντίδραση αποφωσφορυλίωσης, όπου τα ελεύθερα μόρια φωσφόρου που δημιουργήθηκαν στα ανοιγμένα από την HpaI άκρα του πλασμιδίου, αποκόπηκαν με δράση του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση (CIP) σύμφωνα με τις οδηγίες του καταλόγου της New England Biolabs, 199./.. Κατόπιν, αφού ελέγχθηκε ο γραμμοποιημένος pGreen nos-kan, πραγματοποιήθηκε αντίδραση συγκόλλησης του ενθέματος *35S : gfp-virp1: terminator* με το φορέα pGreen nos-kan. Η συγκόλληση πραγματοποιήθηκε με αντίδραση λιγάσης T4. Στη συνέχεια, ακολούθησε μετασχηματισμός ικανών κυττάρων *E.coli* JM83. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα, επιλέχθηκαν σε τριβλία LB+Km. Από τις ανθεκτικές αποικίες απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Η αντίδραση συγκόλλησης ελέγχθηκε με πέψεις περιορισμού, χρησιμοποιώντας τα ένζυμα BglIII, NdeI, NcoI, SalI, καθώς και διπλές πέψεις περιορισμού με BamHI/ SalI και BglIII/ HindIII.

Οι αναμενόμενες ζώνες περιορισμού ήταν :

- **BglIII:** 3.9 kb, 2.3 kb, 2.1 kb
- **NdeI:** 7.7 kb, 0.66 kb
- **NcoI:** 6.6 kb, 1.4 kb, 0.37 kb
- **SalI:** 8.3 kb
- **BamHI/ SalI:** 4.7 kb, 2.1 kb, 0.8 kb, 0.7 kb
- **BglIII/ Hind III:** 3.9 kb, 2.0 kb, 1.6 kb, 0.47 kb, 0.27 kb

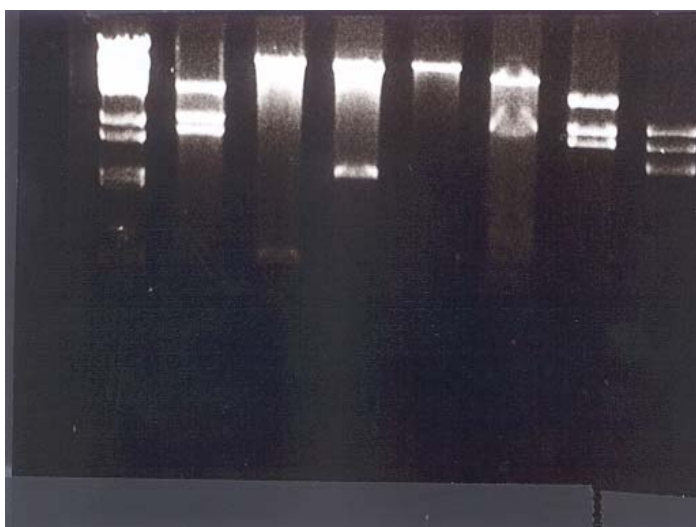
Στον παρακάτω χάρτη φαίνονται οι θέσεις περιορισμού με τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν.

Αποτελέσματα



Οι αντιδράσεις περιορισμού ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1%. Το πρότυπο των ζωνών που πήραμε, ήταν σύμφωνο με τα μεγέθη που περιμέναμε από τις αντιδράσεις περιορισμού. Το μοτίβο των προϊόντων της αντίδρασης περιορισμού, φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί.

λBstEII 1 2 3 4 5 6 7



Εικ. 9 Ανάλυση της αντίδρασης περιορισμού: μάρτυρας μεγέθους και πέψεις με :**1.** BglIII, **2.** NdeI, **3.** NcoI, **4.** SalI, **5.** BamHI/SalI, **6.** BglII, **7.** BglII/HindIII

Ο κλώνος ο οποίος έδωσε σε όλες τις περιπτώσεις το σωστό πρότυπο περιορισμού, επιλέχθηκε για μέθοδο τριγωνικής σύζευξης μαζί με: α) Το στέλεχος *E.coli* που περιείχε το πλασμίδιο-βοηθό pJIC-Sa Rep, και β) το

Αποτελέσματα

στέλεχος *A.tumefaciens* LBA 4404, του οποίου το Ti πλασμίδιο, περιείχε μόνο τη *vir* περιοχή. Πριν πραγματοποιηθεί η συνεπώαση των τριών καλλιιεργειών, έπρεπε να μετασχηματιστούν δεκτικά κύτταρα *E.coli* με το πλασμίδιο-βοηθό pJIC-Sa Rep. Στο σημείο αυτό, λόγω προβλημάτων στο μεγάλωμα των κυττάρων, η διαδικασία καθυστέρησε αρκετά αφού δοκιμάστηκαν επανηλειμένως διάφορες συνθήκες στο μεγάλωμα των κυττάρων, το οποίο τελικά δεν επιτεύχθηκε.

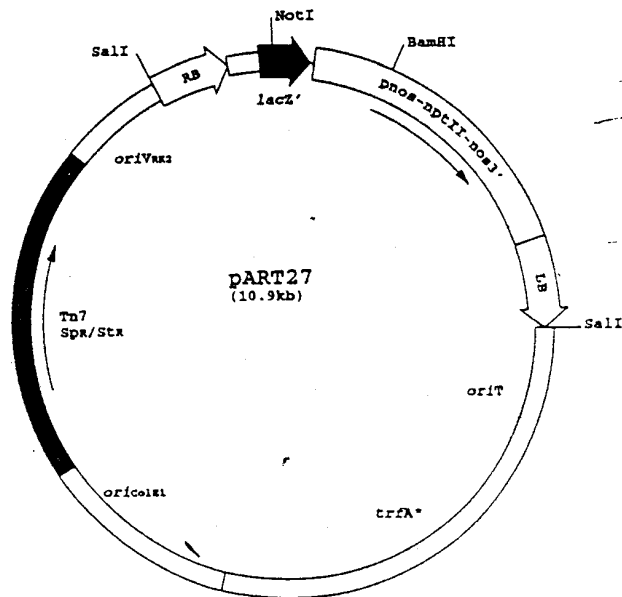
Έτσι, επιλέχθηκε νέος δυαδικός φορέας για την υποκλωνοποίηση της κασσέτας 35S : *gfp-virp1: terminator* και αυτός ήταν ο pART27.

Υποκλωνοποίηση της κασσέτας 35S : *gfp-virp1: terminator* στο δυαδικό φορέα pART27

Ο pART27 επώαστηκε με ένζυμο περιορισμού NotI, και στη συνέχεια αφού ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για να διαπιστωθεί αν έχει πλήρως γραμμοποιηθεί, καθαρίστηκε από το μίγμα της αντίδρασης περιορισμού με φαινόλη και CHCl₃. Ακολούθησε γέμισμα των προεξεχόντων άκρων του pART27 μετά την πέψη με NotI, με αντίδραση που καταλήθηκε από το θραύσμα Klenow της DNA pol. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αποφωσφορυλίωση των ανοιγμένων από την NotI, άκρων του πλασμιδίου.

Η κασσέτα 35S : *gfp-virp1: terminator* απομονώθηκε από τον pGreen nos-kan, κατόπιν αντίδρασης περιορισμού με τα ένζυμα NotI και SalI. Ακολούθησε αντίδραση με το θραύσμα Klenow, έτσι ώστε να γεμίσουν τα προεξέχοντα άκρα του ενθέματος για να διευκολυνθεί η υποκλωνοποίηση στον pART27. Η συγκόλληση του ενθέματος στο φορέα, πραγματοποιήθηκε με αντίδραση λιγάσης T4. Στη συνέχεια, ακολούθησε μετασχηματισμός ικανών κυττάρων *E.coli* JM83.

Αποτελέσματα



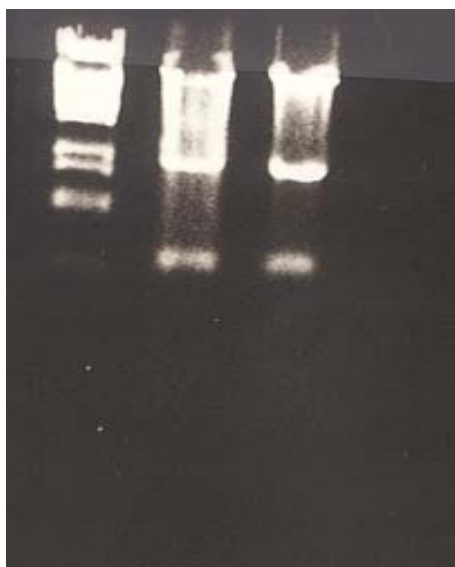
Τα μετασηματισμένα κύτταρα, επιλέχθηκαν σε τριβλία LB+ Km. Από τις ανθεκτικές αποικίες απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Τα πλασμίδια των ανθεκτικών αποικιών ελέγχθηκαν κατόπιν με αντίδραση περιορισμού με BamHI.

Οι αναμενόμενες ζώνες περιορισμού ήταν :

- 11.0 kb
- 2.3 kb
- 0.7 kb

Η αντίδραση περιορισμού αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0.6% (εικ.11)

λBstEII -BamHI -BamHI



Εικ.11 Ανάλυση της αντίδρασης περιορισμού: μάρτυρας μεγέθους, κλώνος 2 -BamHI, κλώνος 3 -BamHI. Και οι δύο κλώνοι δίνουν το σωστό πρότυπο περιορισμού.

Ο κλώνος 3 επιλέχθηκε για τριγωνική μέθοδο σύζευξης μαζί με: α) Το στέλεχος *E.coli* που περιείχε το πλασμίδιο-βοηθό pRK2013, και β) το στέλεχος *A.tumefaciens* LBA 4404, του οποίου το Ti πλασμίδιο, περιείχε μόνο τη *vir* περιοχή. Κάποιες από τις μετασχηματισμένες αποικίες των Αγροβακτηρίων, επώαστηκαν σε υγρό μέσο LB+Km/ Rif, και τα πλασμίδιά τους (μετασχηματισμένα pART27) απομονώθηκαν με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Ο αριθμός όμως των πλασμιδίων που έχει κάθε κύτταρο αγροβακτηρίου είναι μικρός επειδή αυτά διπλασιάζονται με πολύ πιο αργούς ρυθμούς απ'ότι τα *E.coli*, οπότε τελικά δεν καταλήγουμε να απομονώνουμε αρκετό DNA, το οποίο μετά την πέψη να είναι ορατό σε πήκτωμα αγαρόζης. Για να διαπιστωθεί λοιπόν η επιτυχία της εισαγωγής, ένα μέρος της απομόνωσης επανεισάγεται σε *E.coli* και ελέγχεται με τις ίδιες διαδικασίες. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση αυτή, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις περιορισμού με τα ένζυμα EcoRI, BamHI και Sall. Ανάλογα με τα μεγέθη των θραυσμάτων από περιορισμό που πήραμε ελέγξαμε αν έχουμε τους σωστούς κλώνους και επιπλέον, με ποιιά

Αποτελέσματα

κατεύθυνση μπήκε η κασσέτα *35S : gfp-virp1 : terminator* , στο δυαδικό φορέα pART27.

Η καλλιέργεια του μετασχηματισμένου Αγροβακτηρίου που επιλέξαμε, χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό φυλλικών δίσκων *N.benthamiana*.

**Δημιουργία διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* με την κατασκευή
pART2735S : *gfp-virp1: terminator***

Οι καλλιέργειες των *A. tumefaciens* που είχαν μετασχηματιστεί με την κατασκευή pART27 *gfp-virp1*, χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταμόρφωση 60-70 φυλλικών δίσκων νεαρών φύλλων *N.benthamiana*. Η διαδικασία περιγράφεται στο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων. Η αλλαγή των τριβλίων με το ίδιο θρεπτικό μέσο, γινόταν αρχικά κάθε 7 ημέρες και μετά από τις τρεις πρώτες αλλαγές κάθε 14 μέρες. Οι αδιαφοροποίητοι κάλλοι άρχισαν να εμφανίζονται 2-3 εβδομάδες μετά τη μεταμόρφωση. Κάθε φυλλικός δίσκος έδωσε κατά μέσο όρο δύο διαφορετικούς κάλλους, καθένας από τους οποίους αποτελούσε και διαφορετικό συμβάν αναγέννησης. Οι κάλλοι διαχωρίζονταν από το υπόλοιπο φύλλο και συνέχιζαν να αναπτύσσονται αυτόνομα στο ίδιο θρεπτικό μέσο. Προοδευτικά άρχισε η διαφοροποίηση των ιστών και αναπτύχθηκαν βλαστοί και φυλλάρια. Οι κάλλοι που έφεραν τα φυτάρια μεταφέρθηκαν σε δοχεία ιστοκαλλιέργειας (pots), με μεγαλύτερη χωρητικότητα στο ίδιο θρεπτικό μέσο, 6-7 εβδομάδες μετά από το μετασχηματισμό, προκειμένου να ευνοηθεί η ανάπτυξή τους.

Τελικά από κάθε κάλλο που συνιστούσε διαφορετικό γεγονός αναγέννησης, αποκόπηκαν 3-4 φυτάρια που αποτελούνταν από διαμορφωμένο βλαστό και φύλλα και μεταφέρθηκαν σε ξεχωριστά η κάθε ομάδα δοχεία, με το ίδιο μέσο, χωρίς όμως ορμόνες. Αυτό το στάδιο είναι το κύριο στάδιο επιλογής, αφού τα φυτάρια πρέπει να επιβιώσουν αυτοτελώς στην Km, ενώ όσο βρίσκονταν στον υπόλοιπο κάλλο υπήρχε περίπτωση να επιβιώνουν επειδή γειτονικά σε αυτά κύτταρα διασπούσαν την Km και δημιουργούσαν έτσι μια περιοχή, όπου δεν ασκούνταν πίεση από το αντιβιοτικό για μετασχηματισμένα κύτταρα.

Μετά από 1-2 εβδομάδες στα δοχεία, τα φυτάρια είχαν αναπτύξει ρίζες και μπορούσαν να μεταφερθούν σε χώμα. Αρχικά παρέμειναν σκεπασμένα με διαφανή πλαστικά καλύμματα, και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο σταθερών συνθηκών, προκειμένου να γίνει ο εγκλιματισμός στις συνθήκες περιβάλλοντος. Τέσσερις μέρες περίπου αργότερα, τα καλύμματα αποκόπτονταν στις άκρες τους και έτσι τα φυτά εκτίθονταν στην

Αποτελέσματα

υγρασία και θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Αφού δεν παρατηρήθηκε σημαντική νέκρωση, τα φυτά μεταφέρθηκαν στο θερμοκήπιο για το τελευταίο στάδιο εγκλιματισμού. Εκεί τελικά αφαιρέθηκαν τελείως τα καλύμματα και τα φυτά μετά από περίπου 5 ημέρες και συνολικά 4-5 μήνες από τη μεταμόρφωση, ήταν έτοιμα για περαιτέρω παρακολούθηση.

Ονοματολογία

Κάθε γεγονός μεταμόρφωσης που έδωσε τελικά πλήρως ανεπτυγμένα φυτά, αποτελούσε μια σειρά στην οποία δόθηκε ένας αριθμός από 1-15. Τα φυτά που προέρχονταν από την ίδια σειρά, έχουν αύξοντες αριθμούς που αντιστοιχούν στην αρχική αρίθμηση των βλαστών που είχαν αποσπαστεί από τους κάλλους.

Κάποια φυτά, έχουν προκύψει από ριζοβολία τμημάτων ενός βλαστού που κόπηκε σε 2-3 τμήματα πολύ νωρίς, και αυτά έχουν την ίδια ονομασία μεταξύ τους και επιπλέον ένα δείκτη a, b, c. Ο δείκτης αυτός υποδηλώνει σε πόσα μέρη είχε κοπεί ο αρχικός βλαστός.

Διαγονιδιακά φυτά μεταμορφωμένα με την 35S : gfp-virp1: terminator κατασκευή

Από 70 περίπου αρχικούς φυλλικούς δίσκους, προέκυψαν συνολικά 42 φυτά που ανήκαν σε 15 διαφορετικές σειρές.

Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται συνοπτικά οι διαφορετικές σειρές και τα επιμέρους φυτά.

Αποτελέσματα

Αριθμός σειράς	Όνομασία φυτού	Αριθμός σειράς	Όνομασία φυτού
1	A1, A1a A2, A2a	8	A28 A34
2	A4, A4a A6, A6a, A7, A7a	9	A41 A44a
3	A8, A8a A9, A9a A10	10	B1, B1a, B1b, B1c B3
4	A11, A11a	11	C2
5	A12 A13, A13a A14a	12	C3
6	A18 A19a	13	C4 C5
7	A23 A24 A26	14	C6
8	A28 A34	15	C7 C8
9	A41 A44a		

Στα φυτά αυτά, όπως ήταν ο αρχικός μας στόχος, θέλαμε να παρατηρήσουμε α) αν υπάρχει φθορισμός όπως ήταν αναμενόμενο λόγω του GFP και β) αν ο φθορισμός αυτός είναι πιο εντοπισμένος σε σύγκριση με άλλα διαγονιδιακά GFP φυτά που θα χρησιμοποιούσαμε ως control.

Από τα μετασηματισμένα GFP: *Virp1* φυτά, κόπηκαν φύλλα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για μικροσκοπική παρατήρηση. Περίπου από όλες τις σειρές εξετάστηκαν δείγματα ενώ χρησιμοποιήθηκαν και διαγονιδιακά GFP φυτά καθώς και φυτά αγρίου τύπου σαν control.

Στον πίνακα που ακολουθεί, περιγράφονται τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν.

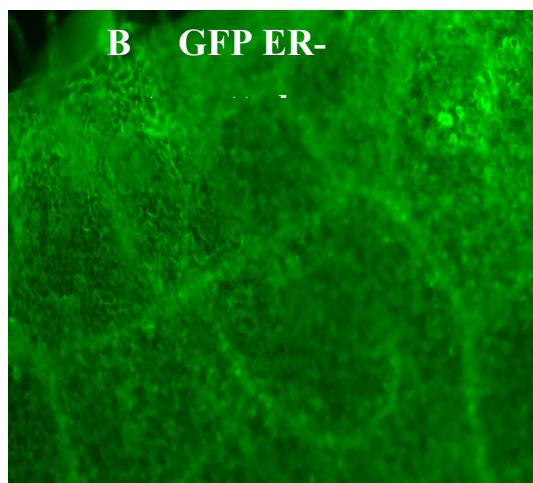
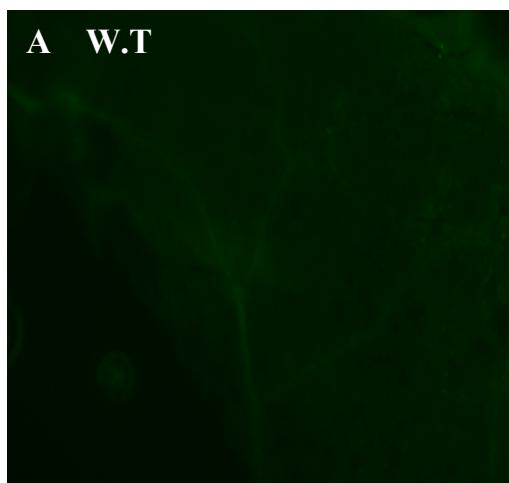
Αποτελέσματα

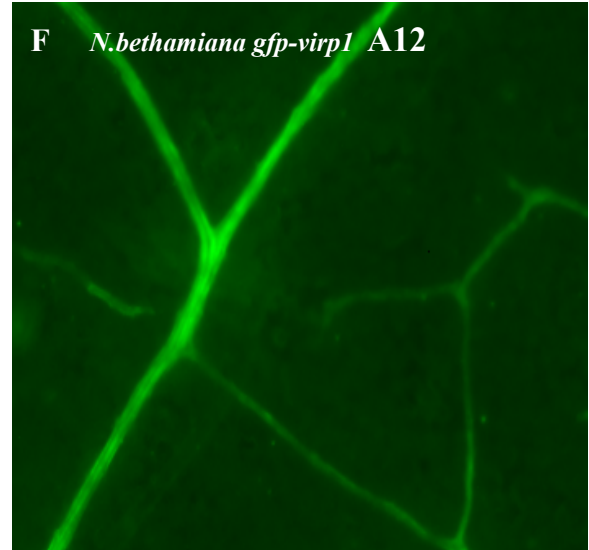
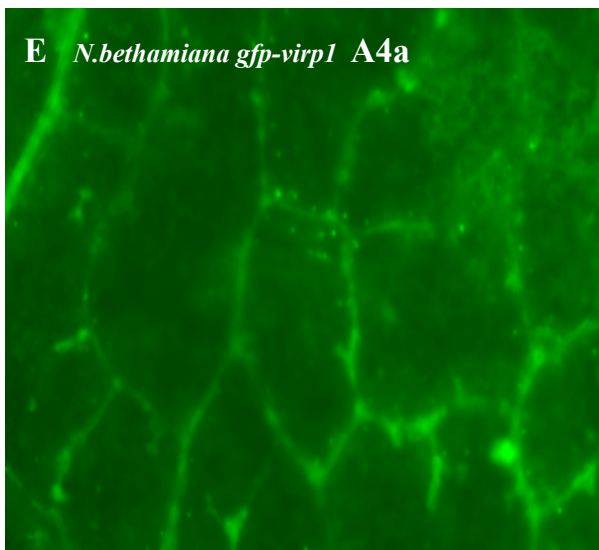
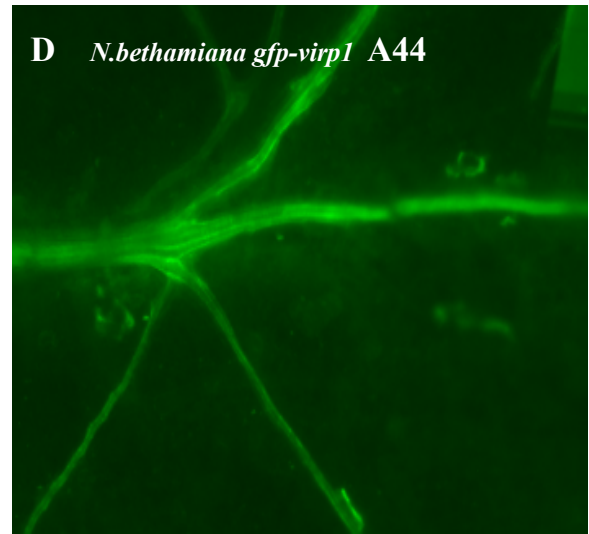
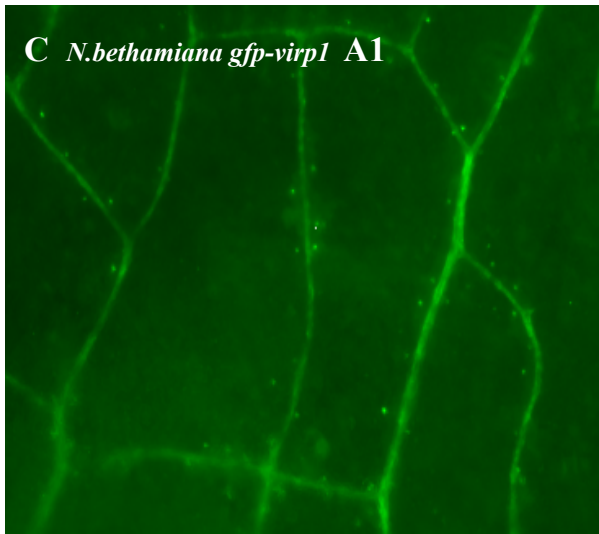
Είδος	Διαγονίδιο
<i>N.benthamiana</i>	<i>gfp</i> - ER targetted
<i>N.benthamiana</i>	<i>gfp</i>
<i>N.benthamiana</i>	<i>gfp-virp1</i>
<i>N.benthamiana</i>	W.T

Τα φυτά με το διαγονίδιο *gfp*-ER targetted, ήταν μια ευγενική προσφορά από το εργαστήριο του Dr. D. Baulcombe ενώ τα φυτά με το *gfp* καθώς και τα W.T. ήταν προσφορά του Δρ. Καλαντίδη και της Α. Μπούτλα.

Τα φυτά αυτά χρησιμοποιήθηκαν για μικροσκοπική παρατήρηση κάτω από φωτεινή ακτινοβολία μήκους 400-500 nm σε οπτικό μικροσκόπιο. Από κάθε φυτό εξετάστηκαν κυρίως νεαρά φύλλα και σε κάθε φύλλο εξετάστηκαν διαφορετικές περιοχές. Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε τις ακραίες περιοχές των φύλλων όπου κυρίαρχη δομή ήταν τα τριχίδια καθώς και άλλες περιοχές του ελάσματος των φύλλων όπου παρατηρήσαμε το μεσαίο νεύρο αλλά και τις λεπτότερες δευτεροβάθμιες, τριτοβάθμιες ή ακόμα και τέταρτης τάξης ηθμαγγειώδεις δεσμίδες.

Για την λήψη φωτογραφιών από το οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε ενσωματωμένη ψηφιακή κάμερα.





Εικόνα 12 **A-F**. Φωτογραφίες φύλλων φυτών control και διαγονιδιακών φυτών *gfp*, *gfp-virp1 N.benthamiana* : **A**. W.T *N.benthamiana*, **B**. *gfp-ER* targeted *N.benthamiana*, **C-F**. *gfp-virp1 N.benthamiana*.

Όλα τα φυτά στα οποία έγινε μικροσκοπική παρατήρηση, εξετάστηκαν κάτω από ακριβώς ίδιες συνθήκες φωτισμού. Μελετώντας τα φυτά μας στο μικροσκόπιο, η πρώτη παρατήρηση ήταν ότι υπάρχει φθορισμός, όπως ήταν αναμενόμενο εφόσον εισάγαμε διαγονίδιο που είχε και το *gfp*.

Όπως φαίνεται και στις παραπάνω εικόνες, το φυτό αγρίου τύπου, τοποθετημένο κάτω από UV ακτινοβολία στο μικροσκόπιο, μας έδωσε μια πολύ σκοτεινή εικόνα, σχεδόν κενή από οποιοδήποτε σήμα. Ωστόσο, αν το παρατηρήσουμε καλύτερα και όσο είναι δυνατό με τη δεδομένη ανάλυση και πιστότητα των φωτογραφιών, μπορούμε να διακρίνουμε πάρα πολύ χαμηλά επίπεδα αυτοφθορισμού, τα οποία δίνουν αμυδρό πράσινο χρώμα. Με την εικόνα αυτή, είχαμε ένα πολύ καλό control για να συγκρίνουμε τόσο τα *gfp* φυτά, όσο και αυτά που μετασχηματίσαμε με το διαγονίδιο *gfp-virp1*.

Τα *gfp* φυτά (εργαστήριο Dr. D. Baulcombe) κάτω από UV ακτινοβολία, έδωσαν όπως φαίνεται στην εικόνα 12 B, ζωηρό πράσινο χρώμα, το οποίο εντοπιζόταν σε ολόκληρη την επιφάνεια του φύλλου. Στην περίπτωση αυτή, είχαμε έντονο φθορισμό στην περιοχή των νεύρων, άλλα και σε όλο το μεσόφυλλο. Στα φυτά αυτά ήταν αναμενόμενο να εκπέμπεται φθορισμός σε όλη την επιφάνεια του φύλλου, μια και το γονίδιο *gfp* που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό τους είχε στόχο το ενδοπλασματικό δίκτυο και επομένως θα περιμέναμε να το δούμε σε κάθε δομή από την οποία απαρτίζεται το φύλλο.

Έχοντας σα σημείο αναφοράς τα παραπάνω φυτά ελέγχου, παρατηρήσαμε τα δικά μας διαγονιδιακά φυτά με το διαγονίδιο *gfp-virp1*. Η αρχική μας υπόθεση ήταν ότι χρησιμοποιώντας τη GFP σαν δείκτη για τη Virp1, θα μπορούσαμε κατά πάσα πιθανότητα να παρατηρήσουμε αν η Virp1 εντοπίζεται σε συγκεκριμένες θέσεις. Αν ίσχυε αυτό και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα *gfp* φυτά ελέγχου, έδιναν φθορισμό παντού, θα περιμέναμε μια εικόνα όπου ο φθορισμός θα ήταν εντοπισμένος. Από αυτή θα μπορούσαμε να κάνουμε υποθέσεις για τον εντοπισμό της ενδογενούς Virp1 και περαιτέρω να προσεγγίσουμε θεωρητικά και πειραματικά τη λειτουργία της.

Αποτελέσματα

Πράγματι, όπως φαίνεται στις εικόνες 12 C-F, σε φύλλα διαγονιδιακών φυτών *gfp-virp1 N.benthamiana*, ο φθορισμός εκπέμπεται κυρίως στην περιοχή των νεύρων. Ταυτόχρονα, το μεσόφυλλο παραμένει σκοτεινό και η εικόνα δε μας θυμίζει τα *gfp* φυτά ελέγχου. Ασφαλώς με την ένδειξη αυτή δε μπορέσαμε να αποκλείσουμε την εκπομπή φθορισμού και στο μεσόφυλλο σε ορισμένες περιπτώσεις, αλλά και εκεί ο φθορισμός ήταν κατά πολύ ασθενέστερος από τα φυτά ελέγχου. Μια άλλη πληροφορία που πήραμε από τη μελέτη των φυτών στο μικροσκόπιο, ήταν ότι στα *gfp-virp1 N.benthamiana* φυτά, δεν παρατηρήθηκε φθορισμός στα κύτταρα της επιδερμίδας. Το στοιχείο αυτό ήταν μια επιπλέον διαφορά από τα *gfp* φυτά ελέγχου, όπου είχαμε εκπομπή φθορισμού στα κύτταρα της επιδερμίδας.

Στην εργασία αυτή, μια και η GFP συντήχθηκε με τη Virp1, υποθέτουμε ότι ο φθορισμός της χμιαρικής πρωτεΐνης, εκπέμπεται από το σημείο όπου εντοπίζεται κανονικά, η ενδογενής Virp1.

Θέλοντας να εντοπίσουμε τη χμιαρική πρωτεΐνη με ανοσοαποτύπωση, κάναμε Western σε δείγματα που προέρχονταν από εκχύλιση πρωτεϊνών από τα φυτά *gfp-virp1 N.benthamiana*. Σαν δείγματα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν, καθαρισμένη Virp1 πρωτεΐνη, καθώς και πρωτεϊνικό εκχύλισμα από τα GFP-φυτά του Dr. D. Baulcombe. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν anti-Virp1 και anti-GFP. Ο εντοπισμός της χμιαρικής πρωτεΐνης με Western, δεν ήταν δυνατός. Είναι πιθανό, λόγω του εντοπισμού της χμιαρικής πρωτεΐνης στην περιοχή των νεύρων, να απαιτούταν μια πιο ευαίσθητη μέθοδος εκχύλισης, ή ένας διαφορετικός χειρισμός των ιστών, έτσι ώστε να μην απομακρυνθεί η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει με την πελλέτα του ιζήματος.

Συζήτηση

Η πρωτεΐνη Virp1 απομονώθηκε από τοματιά, σαν πρωτεΐνη που προσδέεται με RNA κατόπιν σάρωσης c-DNA βιβλιοθήκης του φυτού αυτού. Η Virp1 αλληλεπιδρά με ειδικό τρόπο με τα ιοειδή και επιπλέον φέρει σινιάλα πυρηνικού εντοπισμού (A. E. Martinez, 2000). Θέλοντας να διερευνήσουμε το ρόλο της πρωτεΐνης στο κύτταρο, αλλά και σε συνδυασμό με τη μολυσματικότητα του ιοειδούς, σχεδιάσαμε μια χιμαιρική πρωτεΐνη της Virp1 με το GFP. Η χιμαιρική κατασκευή, μεταφέρθηκε σε δυαδικό φορέα κατάλληλο για μετασχηματισμό φυτών μέσω Αγροβακτηρίου. Με τη χρήση του φορέα αυτού και ακολουθώντας ένα πρωτόκολλο για σταθερό μετασχηματισμό φυτών *N.benthamiana*, δημιουργήσαμε διαγονιδιακές σειρές των φυτών, οι οποίες έφεραν το διαγονίδιο *gfp-virp1*. Τα φυτά αυτά τα μελετήσαμε στο μικροσκόπιο θέλωντας να εντοπίσουμε από ποιές θέσεις εκπέμπεται ο φθορισμός, και αν αυτό μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για τον εντοπισμό της ενδογενούς Virp1 στο φυτό. Συγκριτικά με τα διαγονιδιακά φυτά, παρατηρήθηκαν και φυτά ελέγχου, τα οποία ήταν αγρίου τύπου *N.benthamiana*, αλλά και *N.benthamiana*, μετασχηματισμένη μόνο με *gfp* διαγονίδιο. Η μικροσκοπική παρατήρηση, μας έδωσε σαφή εικόνα ότι στα *gfp-virp1* φυτά, εντοπίζουμε φθορισμό, ο οποίος προέρχεται από την περιοχή των νεύρων. Στα φυτά αγρίου τύπου, είχαμε ελάχιστο αυτοφθορισμό, τόσο που σε πρώτη ματιά δεν ήταν καν εμφανής, ενώ στα GFP φυτά ελέγχου, παρατηρήσαμε φθορισμό, σε όλη την επιφάνεια του δείγματος. Αυτό σημαίνει ότι σε όλες τις δομές του ιστού που εξετάσαμε, είχαμε έκφραση της GFP πρωτεΐνης. Η εικόνα δεν ήταν η ίδια στην περίπτωση των *gfp-virp1* φυτών. Θα ήταν αναμενόμενο, μια και το γονίδιο της GFP, δε φέρει σινιάλα εντοπισμού, στα φυτά αυτά, να εκπέμπεται φθορισμός από τις θέσεις όπου πρωταρχικά θα είχαμε έκφραση και εντοπισμό της Virp1 πρωτεΐνης. Η εκπομπή φθορισμού στα φυτά αυτά από την περιοχή των νεύρων έδινε σαφώς πολύ διαφορετική εικόνα από τα φυτά ελέγχου και είχε το δυναμικό να στηρίξει την αρχική μας υπόθεση.

Συζήτηση

Η περίπτωση της Virp1 πρωτεΐνης είναι αρκετά πολύπλοκη, αφού απ'ότι έχει φανεί μέχρι τώρα, πρόκειται για έναν πρωτεϊνικό παράγοντα ο οποίος εμπλέκεται σε κρίσιμα στάδια του κύκλου ζωής του φυτού, και συγχρόνως, με ένα τρόπο που δεν έχει διευκρινιστεί, συμμετέχει και στον κύκλο ζωής του ιοειδούς PSTVd από το οποίο το φυτό, προσβάλλεται. Η διακυτταρική κίνηση και η συστηματική μεταφορά του RNA έχει θεωρηθεί πολύ σημαντικός μηχανισμός στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, σε θεμελιώδεις βιολογικές λειτουργίες του φυτού, αλλά και στις αλληλεπιδράσεις φυτών και παθογόνων (Ding et al., 1999). Σε όλες αυτές τις διαδικασίες, είναι απαραίτητη η παρουσία πρωτεϊνικών παραγόντων και άλλων μορίων, τα οποία διακινούνται μέσα από ένα πολύ καλά οργανωμένο δίκτυο, τα πλασμοδέσματα.

Τα πλασμοδέσματα είναι κανάλια κυτταροπλάσματος τα οποία σχηματίζονται στα ανώτερα φυτά προκειμένου να εξασφαλιστεί η διακυτταρική επικοινωνία. Μέσα από το δίκτυο των πλασμοδεσμάτων, κινούνται μόρια, πρωτεΐνες και ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία συμβάλλουν στη ρύθμιση αναπτυξιακών και άλλων φυσιολογικών διαδικασιών. Ο συνδυασμός πρωτογενών και δευτερογενών πλασμοδεσμάτων ανάμεσα σε μεριστωματικούς και ώριμους ιστούς, δημιουργεί ένα δίκτυο, του οποίου κύρια λειτουργία είναι η διακίνηση θρεπτικών και 'πληροφοριακών' μακρομορίων (Haywood et al., 2002). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού, πραγματοποιούνται δραματικές αλλαγές στη δομή και τη λειτουργία των πλασμοδεσμικών συνδέσεων, και δημιουργούνται νέα δίκτυα που ονομάζονται συμπλασμικές περιοχές. Η συμπλασμική απομόνωση επιτρέπει σε ομάδες κυττάρων να ακολουθήσουν ξεχωριστά αναπτυξιακά προγράμματα (Lucas et al., 1993; Ding et al., 1997; Zambryski and Crawford, 2000; Pfluger and Zambryski, 2001). Το πώς οι συμπλασμικά απομονωμένες περιοχές επικοινωνούν μεταξύ τους, δεν είναι γνωστό. Μια πιθανότητα είναι μέσω σινιάλων (Clark, 2001) ή μέσω συμπλασμικής κίνησης ειδικών μορίων μέσω των πλασμοδεσμάτων (Itaya A. et al., 2002). Μια πολύ σημαντική συμπλασμική περιοχή, είναι το σύμπλοκο των ηθμώδων κυττάρων, στα συνοδά κύτταρα του φλοιώματος. Τα στοιχεία του ηθμώδους κυττάρου,

Συζήτηση

συνενώνονται για να σχηματίσουν μια σειρά ηθμοσωλήνων, που συνδέουν με ένα εξαιρετικό δίκτυο, τους βλαστούς, τα φύλλα και τις ρίζες. Οι θρεπτικές ουσίες μεταφέρονται από το ένα στο άλλο μέσω διατρήσεων που ονομάζονται ηθμώδεις πλάκες. Η μεταφορά ουσιών στο φλοιώμα μέσω του συμπλόκου αυτού, είναι θεμελιώδης για πολλές λειτουργίες, όπως είναι η ανάπτυξη του άνθους, η κυκλοφορία σινιάλων που σχετίζονται με άμυνα, αλλά και η μετακίνηση των ιόν μέσα στους φυτικούς ξενιστές τους. Ωστόσο, παρά τη συμπλασμική απομόνωση, οι φυτικοί ιοί, μπορούν να μετακινούνται εντός και εκτός του συμπλόκου αυτού, έτσι ώστε να εξαπλωθούν συστηματικά στο φυτό (Carrington et al., 1996; Gilbertson and Lucas, 1996; Ghoshroy et al., 1997; Nelson and Van Bel, 1998). Στην περίπτωση των ιοειδών, η συστηματική μόλυνση, λόγω του ότι τα περισσότερα πολλαπλασιάζονται στον πυρήνα, περιλαμβάνει είσοδο στον πυρήνα, έξοδο, διακυτταρική κίνηση και μεταφορά μέσω φλοιώματος (Ding et al., 1999). Για το λόγο αυτό, το RNA των ιοειδών χρειάζεται να αλληλεπιδρά άμεσα με κυτταρικούς παράγοντες του ξενιστή, τόσο για τον πολλαπλασιασμό του, όσο και για τις διαδικασίες μεταφοράς. Όλα τα στοιχεία για τα πλασμοδέσματα, δείχνουν ότι υπάρχει μια ειδικότητα ως προς το ποιά μόρια μπορούν να διαπεράσουν το δίκτυο που αυτά δημιουργούν, και σε πολλές περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητη η μεταφορά τέτοιων μορίων, μεσολαβούν ειδικές πρωτείνες οι οποίες διευκολύνουν ή επιτρέπουν τη διαδικασία μεταφοράς. Πολλές ενδείξεις συνηγορούν στο ότι η Virp1 μπορεί να παίζει έναν τέτοιο ρόλο. Ο εντοπισμός της χημεικής πρωτεΐνης GFP-Virp1 στην περιοχή των νεύρων, μπορεί να αποτελέσει ένα επιπλέον κομμάτι στη βάση που θα στηρίξει τη θεωρία αυτή.

Η Virp1 επιπλέον, λόγω της ικανότητάς της να αλληλεπιδρά με το RNA του PSTVd με ειδικό ως προς την αλληλουχία τρόπο, είναι ένας καλός υποψήφιος κυτταρικός παράγοντας ο οποίος μπορεί συμμετέχει στη διαδικασία μετακίνησης του ιοειδούς (E. Μανιατάκη 2000), δημιουργώντας ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που μετακινείται μέσω των πλασμοδεσμάτων. Αν ισχύει μια τέτοια θεωρία, σύμφωνα με την οποία η Virp1 παίζει ρόλο σε μετακίνηση μέσω πλασμοδεσμάτων ή γενικότερα μέσω

Συζήτηση

φλοιώματος, τότε θα ήταν αναμενόμενο ή θα στήριζε τη θεωρία αυτή, ο εντοπισμός της πρωτεΐνης στην περιοχή των ηθμαγγειωδών δεσμίδων.

Από την άλλη, η διάρθρωση των λειτουργικών περιοχών της Virp1, και πιο συγκεκριμένα η περιοχή bromodomain, δείχνει ότι η πρωτεΐνη αυτή θα μπορούσε να λειτουργεί σα μεταγραφικός παράγοντας ή να εμπλέκεται σε σύμπλοκα που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η Virp1 θα μπορούσε να μεσολαβεί ανάμεσα στο στάδια ανασχηματισμού της χρωματίνης/έναρξη της μεταγραφής και στην επιμήκυνση του μεταγράφου. Σε ότι αφορά το RNA του PSTVd, θα μπορούσε αυτό να λειτουργεί ως ενεργοποιητής για τη Virp1, και ίσως επιπλέον ως τροποποιητής της πρωταρχικής λειτουργίας της, και έτσι να ξεκινάει ένα μονοπάτι αντιδράσεων οι οποίες τελικά προάγουν τη μόλυνση στον ξενιστή. Με τον ένα ή τον άλλο τρόπο, βοηθώντας στη μεταφορά ή τον πολλαπλασιασμό του ιοειδούς μέσα στο φυτό, η Virp1 είναι σίγουρο ότι εμπλέκεται σε κρίσιμα στάδια του κύκλου ζωής του και πιθανότατα και ο ρόλος της σαν ενδογενής πρωτεΐνη, αφορά εξίσου σημαντικά στάδια των βιολογικών λειτουργιών.

Μελλοντικές προοπτικές

Γενικά, για τη μελέτη της Virp1, η χιμαιρική κατασκευή με το GFP δημιουργεί ένα υλικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλαπλές εφαρμογές. Το GFP σημαίνει την πρωτεΐνη χωρίς να επηρεάζει τη λειτουργικότητά της και αυτό δίνει πλεονέκτημα σε οποιαδήποτε στρατηγική ακολουθήσει κανείς για να προσεγγίσει πειραματικά το ερώτημα 'ποιά είναι η λειτουργία της Virp1 πρωτεΐνης'. Με βάση τα δεδομένα που έχουμε ως τώρα, η Virp1 συμμετέχει με κάποιον τρόπο στον κύκλο ζωής του ιοειδούς.

Στο μέλλον, θα είχε ενδιαφέρον να μελετήσει κανείς τα διαγονιδιακά *gfp-virp1* *N.benthamiana* φυτά, κατόπιν μόλυνσεως με το ιοειδές. Παρακολουθώντας τα φυτά στο μικροσκόπιο, όπως έγινε στην εργασία αυτή, θα μπορούσαμε πιθανώς να δούμε διαφορετικό εντοπισμό της χιμαιρικής πρωτεΐνης, γεγονός

Συζήτηση

το οποίο θα σήμαινε ότι η παρουσία του ιοειδούς, για κάποιο λόγο προκαλεί μετατόπιση της πρωτεΐνης. Ταυτόχρονα, θα ήταν απαραίτητο η παρακολούθηση αυτή να γίνει σε υποκυτταρικό επίπεδο, έτσι ώστε να συνδέσουμε την παρουσία της Virp1 με συγκεκριμένα οργανίδια του κυττάρου, και να παρατηρήσουμε αν και πώς αυτή μεταβάλλεται, ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες βρίσκεται το φυτό.

Βιβλιογραφία

- Arnim A.G, Deng X.B., Stacey M.G. (1998), Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants, *Gene* 221:35-48.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K., Schaad, M.C., (1996) Cell-to-cell and long distance transport of viruses in plants, *Plant Cell*, **8**: 1669-1681.
- Clark, S.E (2001) Cell signalling at the shoot meristem. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:276-284.
- Cody, C.W, Prasher, D.C, Westler, W.M, Prendergast, F.G, Ward, W.W. (1993), *Biochemistry*, **32**: 1212-1218.
- Denti M, Martinez E., Sägesser R., Tsagris M., Tabler M. A novel RNA binding from *Triturus carnifex* identified by RNA-ligand screening with the new hammerhead ribozyme. *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, no 5 1045-1052.
- Ding, B., Itaya, A., Woo, Y.M., (1999) Plasmodesmata and cell-to cell communication in plants, *Int. Rev. Cytol.*, **190**: 251-316.
- Ding, B., Kwon, M.O., Hammond, R. and Owens, R. (1997) Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant J*, **12**, 931-6.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., Helsinki, D. R. (1980) Broad host range DNA cloning system for gram- negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, **77**: 7347-7351.
- Drapper, J., Scott, R., Armitage, P., Walden, R. (1988). *Plant Genetic Transformation and Gene Expression*. Blackwell scientific publications.
- Fukami-Kobayashi, K., Tomoda, S. Go, M., (1993) Evolutionary clustering and functional similarity of RNA binding proteins, *FEBS letters*, **355**: 289-293.

-
 Gilbertson, RL., Lucas WJ., (1996) How do viruses traffic on the "vascular highway", *Trends Plant Sci.*,**1**: 260-268.
-
 Haseloff Jim, Siemering Kirby, Prasher Douglas, Hodge Sarah (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94. pp2122-2127.
-
 Haywood, V., Kragler, F., Lucas, W. (2002). Plasmodesmata: Pathways for Protein and Ribonucleoprotein Signaling. *The Plant Cell*, supplement, S303-S325.
-
 Heim, R., Cubitt, AB, Tsien, RY, (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**:12501-12504.
-
 Heim, R., Cubitt, AB, Tsien, RY, (1995) *Nature*, **373**: 663-664.
-
 Hellens, R., Edwards, A., Leyland, N., Bean, S., Mullineaux, P. (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation, *Plant Molecular Biology*, **42**: 819-832.
-
 Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykas, P. J. J., Schlperoort, R. A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T-region of the *A. tumefaciens* Ti plasmid. *Nature*, **303**: 179-180.
-
 Horsch, R. B., Rogers, S. G., Fraley, R. T. (1985). Transgenic Plants: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **50**: 433-437.
-
 Itaya, A., Ma, F., Qi, Y., Matsuda, Y., Zhu, Y., Liang, G., Ding, B. (2002) Plasmodesma-Mediated Selective Protein Traffic between "Symplasmically Isolated" Cells Probed by a Viral Movement Protein. *The Plant Cell*,**14**, 2071-2083.
-
 Kenan, DJ, Query CC, Keene, JD (1991). RNA recogniton: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.*, **16**: 214-220.
-
 Martinez E 2000, Ph.D. thesis, University of Crete, Dept. of Biology, Plant Molecular Biology aboratory.

-
 • Μανιατάκη Ε. 2000 Δύο προσεγγίσεις στο ζήτημα της αλληλεπίδρασης των
 ιοειδών με τους ξενιστές τους, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο
 Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών.
 •
 • Prasher, DC, Eckenrode, VK, Ward, WW, Prendergast, FG, Cormier, MJ
 (1992) *Gene*, **111**: 229-233.
 •
 • Rhodes Daniela, Burley Stephen (2000) Protein-nucleic acid interactions –
 Editorial overview, *Current opinion in structural biology* 10:75-77.
 •
 • Sägesser, R., Martínez, E., Tsagris, M. and Tabler, M. (1997) Detection and
 isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of a cDNA
 expression library. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3816-22.
 •
 • Sambrook J, Fritsch E. F., Maniatis T., (1989) *Molecular cloning: A
 Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory
 •
 • Sheen Jen, Seongbin Hwang, Yasuo Niwa, Hirokazu Kobayashi, David
 Galbraith (1995), Green fluorescent protein as a new vital marker in plant
 cells *The plant journal* 8(5): 777-784.
 •
 • Siemering Kirby, Golbik Rudolph, Richard Sever and Jim Haseloff, (1996),
 Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein
Current biology vol.6 No 12:1653-1663.
 •
 • Syntichaki, P., Topalidou, I., Thireos, G., (2000) The Gcn5 bromodomain
 co-ordinates nucleosome remodelling, *Nature*, **404**: 414-417.
 •
 • Tsien Roger, (1998) The Green Fluorescent Protein *Annu. Rev. Biochem.*
 67:509-44.
 •
 • Vieira, J., Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived
 system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal
 primers, *Gene*, **19**: 259-268.
 •
 • Yokoe, H., Meyer, T. (1996) *Nat. Biotechnol.* **14**: 1252-1256.
 •
 • Zambryski, P and Crawford K. (2000) Plasmodesmata: Gatekeepers for
 cell-to-cell transport of developmental signal in plants. *Annu. Rev. Cell Dev.
 Biol.* **16**: 393-421.