



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 'ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΦΥΤΩΝ'

Μέρος 1^ο : Παραγωγή τερπενοειδών υψηλής εμπορικής αξίας με μεθόδους
ιστοκαλλιέργειας σε φυτά *Nicotiana benthamiana*

Μέρος 2^ο : Παραγωγή πρωτεϊνών υψηλής εμπορικής αξίας με τη μέθοδο του
Αγροεμποτισμού σε φυτά *Nicotiana benthamiana*

Κάτσαβου Ευαγγελία

Επιβλέπων: Αν. Καθηγητής Κρίτων Καλαντίδης

ΚΡΗΤΗ 2017

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
Μέρος 1 ^ο	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
Ιστοκαλλιέργεια φυτών.....	6
Δευτερογενής μεταβολισμός και Τερπένια	7
Βιοσυνθετικά μονοπάτια τερπενίων.....	8
Βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις για την αύξηση της παραγωγής τερπενοειδών ενώσεων σε ετερόλογα συστήματα	9
Το ένζυμο DXP συνθάση (DXS).....	10
Τα ιοειδή	11
Το ιοειδές PSTVd και η πρωτεΐνη Virp1	12
Το σύστημα CRISPR/Cas	14
Δομικές περιοχές του γενετικού τόπου του συστήματος CRISPR/Cas	14
Τρόπος λειτουργίας του συστήματος CRISPR/Cas	14
Σύστημα CRISPR τύπου II	15
Το σύστημα CRISPR/Cas9 ως βασικό βιοτεχνολογικό εργαλείο	16
Μόρια RNA-οδηγοί	17
Σκοπός της εργασίας	18
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
Πλασμιδιακές κατασκευές	18
Συνθήκες ανάπτυξης φυτικών οργανισμών	20
Χρησιμοποιούμενα βακτηριακά στελέχη	20
Μετασχηματισμός φυτικού ιστού με τη μέθοδο του αγροβακτηρίου	20
<i>De novo</i> οργανογένεση	21
Ανάλυση διάσχισης (segregation analysis)	21
Συχνά χρησιμοποιούμενα διαλύματα.....	22
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	23
Δημιουργία διαγονιδιακών φυτών	23
Ανάλυση διάσχισης (segregation analysis)	25
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	27
Μέρος 2 ^ο	30
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	30
Η χρήση των φυτών ως πλατφόρμα παραγωγής ενζύμων	30
Το αντικείμενο της γλυκοβιολογίας.....	31
Οι πρωτεογλυκάνες.....	32
Οι βασικές δομικές μονάδες των πρωτεογλυκανών είναι οι μονοσακχαρίτες.....	32
Οι βασικές κατηγορίες των γλυκανών	33
Η χρησιμότητα των γλυκανών.....	34
Γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών	34
Από- γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών (protein de glycosilation)	34
Peptide:N-Glycanases (PNGases)	35

PNGases A	37
Βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις για την παραγωγή της PNGaseA	38
Η πρωτεΐνη hRI	39
Στόχος της εργασίας	39
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	40
Πλασμιδιακές κατασκευές	40
Φυτικό υλικό	40
Καλλιέργειες βακτηρίων	41
Παρασκευή δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> DH10b	41
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (mini preparation)	41
Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	42
Αντίδραση Klenow	42
Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης	42
Αντίδραση λιγάσης	42
Αντίδραση LR κλωνάσης (Invitrogen)	42
Μετασχηματισμός βακτηρίων	43
Αγροεμποτισμός (Schöb et al. 1997)	43
Παρατήρηση των φυτών	43
Απομόνωση ολικού RNA	44
Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων	45
Μεταχείριση των δειγμάτων ολικού RNA με DNase (ROCHE)	45
Καθαρισμός δειγμάτων ολικού RNA με φαινόλη- χλωροφόρμιο	45
Ανάλυση ολικού RNA σε αποδιατακτικό πηκτή αγαρόζης 1,2%	45
Αντίστροφη μεταγραφή (cDNA synthesis Minotech)	46
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	46
Απομόνωση πρωτεϊνών	48
Χρωματογραφία συγγένειας	49
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS PAGE)	50
Ανάλυση κατά Western	51
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	52
Απομόνωση του γονιδίου PNGaseA από το φυτό <i>Prunus amygdalus var. dulcis</i>	52
Κλωνοποίηση του γονιδίου PNGaseA σε πλασμιδιακούς φορείς	54
Αγροεμποτισμός σε φύλλα <i>Nicotiana benthamiana</i>	56
Επιβεβαίωση της λειτουργίας του γονιδίου PNGaseA (με semiq RT PCR)	57
Διαδικασίες ανίχνευσης της πρωτεΐνης PNGaseA	57
Σήμανση της PNGaseA με επίτοπο FLAG	60
Κλωνοποίηση του γονιδίου hRI	62
Αγροεμποτισμός σε φύλλα <i>Nicotiana benthamiana</i>	64
Επιβεβαίωση της λειτουργίας του γονιδίου hRI (με semiq RT PCR)	64
Διαδικασίες ανίχνευσης της πρωτεΐνης hRI	65
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας μου, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κρίτων Καλαντίδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλο αυτό τον καιρό κατά την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, την καθοδήγησή του αλλά και την ευκαιρία που μου έδωσε να εξελίξω τις δεξιότητές μου. Ακόμα, ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, Καθηγητή Βασίλη Μπουριώτη και Καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση για την εποικοδομητική συζήτηση και τα σχόλια τους.

Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες στη Νικολέτα Κρυσοβρυσανάκη για την ατελείωτη υπομονή της, τη μεταδοτικότητα της, την προθυμία της να βοηθήσει και όλες εκείνες τις ημέρες που δημιουργούσε υπέροχο κλίμα στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ πολύ τη Νάντια Κατσαρού για την βοήθεια και την υπομονή της, καθώς και τη Ρίτα, το Fred, την Αιμιλία για την καθοδήγησή τους. Ακόμα, ευχαριστώ όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Τόνια, για τις ευχάριστες 'ώρες διαλείμματος' που περνούσαμε παρέα και τους φίλους μου από την Κρήτη αλλά και από την Αθήνα για την πολύ σημαντική υποστήριξή τους όλο αυτό το διάστημα.

Στη μητέρα μου, που καταφέρνει να είναι δίπλα μου πάντα και σε όλα, σε εκείνα που μπορεί αλλά ακόμα και σε εκείνα που δεν μπορεί.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας σε φυτά αποτελεί έναν ταχέως αναπτυσσόμενο τομέα της βιοτεχνολογίας, λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που προσφέρει, όπως το μειωμένο κόστος παραγωγής, οι μειωμένοι κίνδυνοι επιμόλυνσης, η ευκολία αύξησης της παραγωγής κ.α. Τα τερπένια είναι δευτερογενείς μεταβολίτες με μεγάλη φαρμακευτική και βιοτεχνολογική αξία. Το ένζυμο DXS αποτελεί το περιοριστικό σημείο για το σχηματισμό τερπενίων στα φυτικά κύτταρα (MEP μονοπάτι-χλωροπλάστες) και για αυτό έχει προσεκλύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας επιχειρείται η υπερέκφραση του γονιδίου DXS (1-deoxyxylulose 5- phosphate synthase). Απομονωμένο από το φυτό *Cistus creticus* κλωνοποιημένο σε φορέα υπερέκφρασης χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό βακτηρίων *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. Φυλλικοί δίσκοι από φυτά *Nicotiana benthamiana* επωάζονται με τα βακτήρια και ξεκινά η διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας. Τελικά παράγονται τέσσερις ανεξάρτητες σειρές φυτών που φέρουν από μία ένθεση του διαγονιδίου. Παράλληλα, μέσω ιστοκαλλιέργειας παράγονται φυτά *Nicotiana benthamiana* ολικής απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *Virp1* (η πρωτεΐνη *Virp1* αλληλεπιδρά με το ιοειδές PSTVd κατά την είσοδό του στον ξενιστή) με τη χρήση της τεχνολογίας των sgRNAs.

Το ένζυμο PNGaseA (Peptide:N-glycanase) αποτελεί ένζυμο απογλυκοζυλίωσης, αποκοπής δηλαδή μορίων σακχάρων από γλυκοπρωτεΐνες. Ενώ λίγα είναι γνωστά για το βιολογικό του ρόλο, αποτελεί ένζυμο μεγάλης βιοτεχνολογικής αξίας λόγω της χρήσης του στον τομέα της γλυκοβιολογίας. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, επιχειρείται η υπερέκφραση της πρωτεΐνης PNGaseA από το αμύγδαλο (*Prunus amygdalus* var. *dulcis*) σε φυτά *Nicotiana benthamiana*, μέσω Αγροεμποτισμού. Το γονίδιο απομονώνεται και κλωνοποιείται με επιτυχία και φαίνεται να είναι μεταγραφικά ενεργό.

ABSTRACT

Plants have emerged as a promising alternative expression system for production of high value proteins because they offer several potential advantages, including low production costs, ease of scale-up to commercial quantities of production and reduced risk of product contamination by mammalian viruses or toxins. Terpenes have properties as chemicals in food, cosmetics, pharmaceutical and biotechnology industries, with great economical importance. The DXS (1-deoxyxylulose 5- phosphate synthase) enzyme catalyzes the first step of the MEP pathway for terpene production in plants. That step is rate limiting, underlying the importance of the DXS enzyme for the production of terpenes. In the first part of this thesis the DXS (isolated from the *Cistus creticus* plant) which is cloned in an overexpression vector, is used for *Agrobacterium* transformation. *Nicotiana benthamiana* leaf discs are transformed and four independent plant lines that bring one copy of the transgene are generated through tissue culture. Additionally, plants that have a *Virp1* (bromodomain-containing protein that interacts with PSTVd) knock out are generated using the system of sgRNAs.

PNGaseA (Peptide:N-glycanase) is a deglycosylation enzyme, of major economical importance for the study of the glycome. In the second part of this thesis, the PNGaseA gene is isolated from almond seeds, cloned in proper overexpression vector and expressed transiently through Agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana* plants. The gene is successfully isolated and transcriptionally active.

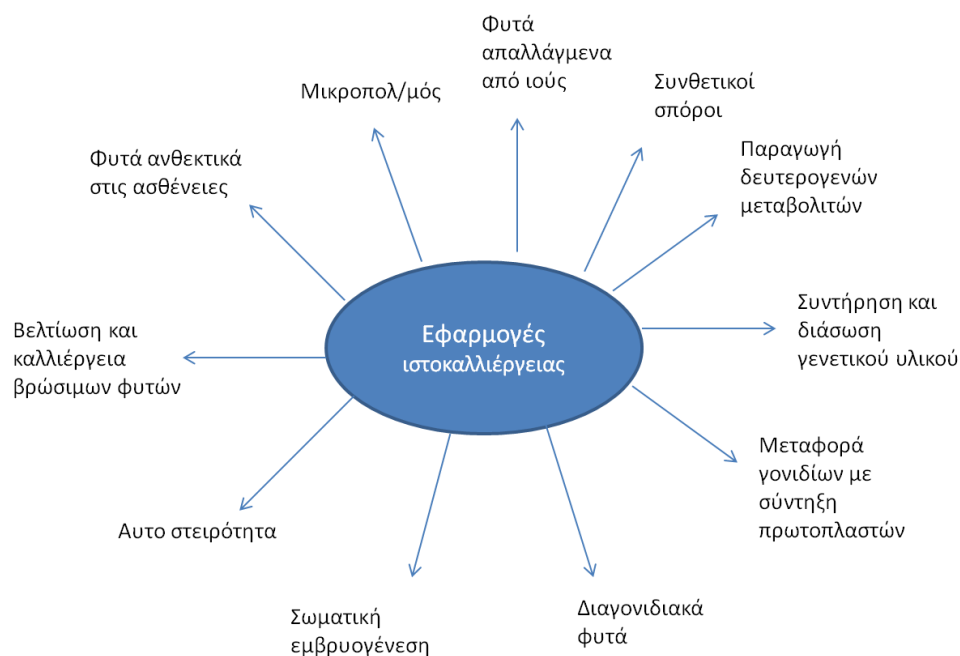
Μέρος 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ιστοκαλλιέργεια φυτών

Αν και θεωρείται εξαιρετικά σύγχρονος, ο επιστημονικός κλάδος της ιστοκαλλιέργειας έχει ήδη ιστορία περίπου δύο αιώνων. Η ιδέα της ιστοκαλλιέργειας για τα φυτά ξεκίνησε να γίνεται πράξη το 1898 από τον Γερμανό βοτανολόγο Gottlieb Haberlandt.

Η ιστοκαλλιέργεια είναι ο κατεξοχήν κλάδος της βιοτεχνολογίας ο οποίος σχετίζεται με την βελτίωση των φυτών, δηλαδή την παραγωγή νέων ποικιλιών και υβριδίων. Οι σχετικές εφαρμογές είναι πολλές και διαφορετικές (Εικόνα 1): για παράδειγμα, με την απομόνωση και συγχώνευση πρωτοπλαστών μπορούμε να μεταφέρουμε στα φυτά μεμονωμένα γονίδια ή ακόμα και ολόκληρες ομάδες γόνων από εντελώς διαφορετικά είδη (όχι μόνο φυτικά αλλά και μικροβιακά ή ζωικά ακόμα και ανθρώπινα). Επίσης με την ιστοκαλλιέργεια μπορούμε να αντικαταστήσουμε με επιτυχία συμβατικές τεχνικές πολλαπλασιασμού των φυτών, οι οποίες για διάφορους λόγους είναι δύσκολες, ακριβές ή χρονοβόρες. Παραδειγματικά αναφέρονται ο εμβολιασμός, η πρόκληση ανθοφορίας και η αποθήκευση του πολλαπλασιαστικού υλικού. Συνήθως οι εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας που σχετίζονται με τη βελτίωση των φυτών απαιτούν ένα υψηλό επίπεδο τεχνικής και επιστημονικής κατάρτισης και εργαστηριακής υποδομής. Η παραγωγή φαρμακευτικών και άλλων ουσιών (π.χ. εντομοκτόνων) μέσα από την ιστοκαλλιέργεια αποτελεί έναν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα επιστημονικό κλάδο με γοργή εξέλιξη κατά το διάστημα των τελευταίων ετών.



Εικόνα 1. Εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας

Στη συνέχεια, θα εστιάσουμε σε δύο κατηγορίες εφαρμογών ιστοκαλλιέργειας, την παραγωγή γενετικά τροποποιημένων φυτών με σκοπό την παραγωγή τερπενίων και την παραγωγή γενετικά τροποποιημένων φυτών με σκοπό την στοχευμένη μετάλλαξη μίας πρωτεΐνης *Bromodomain*, που αποτελούν αντικείμενο της παρούσας εργασίας.

Δευτερογενής μεταβολισμός και Τερπένια

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι χημικές ενώσεις με μικρό μοριακό βάρος που παράγονται από οργανισμούς (φυτά, φαιοφύκη, μύκητες, βακτήρια) και δεν φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα στην ανάπτυξη ή στην αναπαραγωγή ενός οργανισμού. Σε αντίθεση με τους πρωτογενείς μεταβολίτες, η απουσία των δευτερογενών δεν οδηγεί σε άμεσο θάνατο, αλλά σε μακροπρόθεσμη βλάβη της επιβίωσης, της γονιμότητας, ή του φαινότυπου του οργανισμού ή ενδεχομένως σε κάποια σημαντική αλλαγή σε όλα. Τα βιομόρια αυτά συντίθενται από πρόδρομα μόρια του πρωτογενούς μεταβολισμού και δεν έχουν γενικά αναγνωρισμένους άμεσους ρόλους σε βασικές μεταβολικές διεργασίες όπως η φωτοσύνθεση, η αναπνοή, η μεταφορά διαλυμένων ουσιών και η αφομοίωση θρεπτικών ουσιών κ.α. Για τον λόγο αυτό οι ενώσεις αυτές ονομάστηκαν δευτερογενείς μεταβολίτες ή προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού.

Η διασπορά των δευτερογενών μεταβολιτών είναι περιορισμένη στο φυτικό βασίλειο (σε αντίθεση με τους πρωτογενείς), δηλαδή κάποιοι από αυτούς βρίσκονται μόνο σε συγκεκριμένο φυτικό είδος ή σε ομάδα συγγενών φυτικών ειδών, δημιουργώντας έτσι μία ξεχωριστή φυτοχημική ταυτότητα σε κάθε είδος. Οι φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να διακριθούν σε τρεις χημικά διακριτές ομάδες: τις φαινολικές ενώσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη τουλάχιστον ενός αρωματικού δακτυλίου στο μόριο τους, τα αζωτούχα δευτερογενή προϊόντα και τα τερπένια, τα οποία έχουν ως βασική μονάδα το ισοπεντάνιο (Φυσιολογία Φυτών, Κεφάλαιο 13, Taiz L. & Zeiger E.).

Τα τερπένια (αλλιώς, τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή) αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών. Η σύνθεσή τους γίνεται από το ακέτυλο-συνένζυμο Α (ακέτυλο- CoA) ή ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης. Η βασική δομική μονάδα του μορίου τους είναι το ισοπρένιο (C₅H₈) ένα μόριο υδρογονάνθρακα με 5 άτομα άνθρακα. Με τον πολυμερισμό των βασικών ομάδων (2,4,6,8,...,n) δημιουργούνται μεγαλύτερα μόρια, διαφορετικά μεταξύ τους, τα οποία ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των μορίων ισοπρενίου στο μόριο τους σε μονοτερπένια (C₅H₈)₂, σεοκιτερπένια (C₅H₈)₃, διτερπένια (C₅H₈)₄, τριτερπένια (C₅H₈)₆, τετρατερπένια (C₅H₈)₈, πολυτερπένια (C₅H₈)_n (Φυσιολογία Φυτών, Κεφάλαιο 10, Γεώργιος Καραμπουρνιώτης).

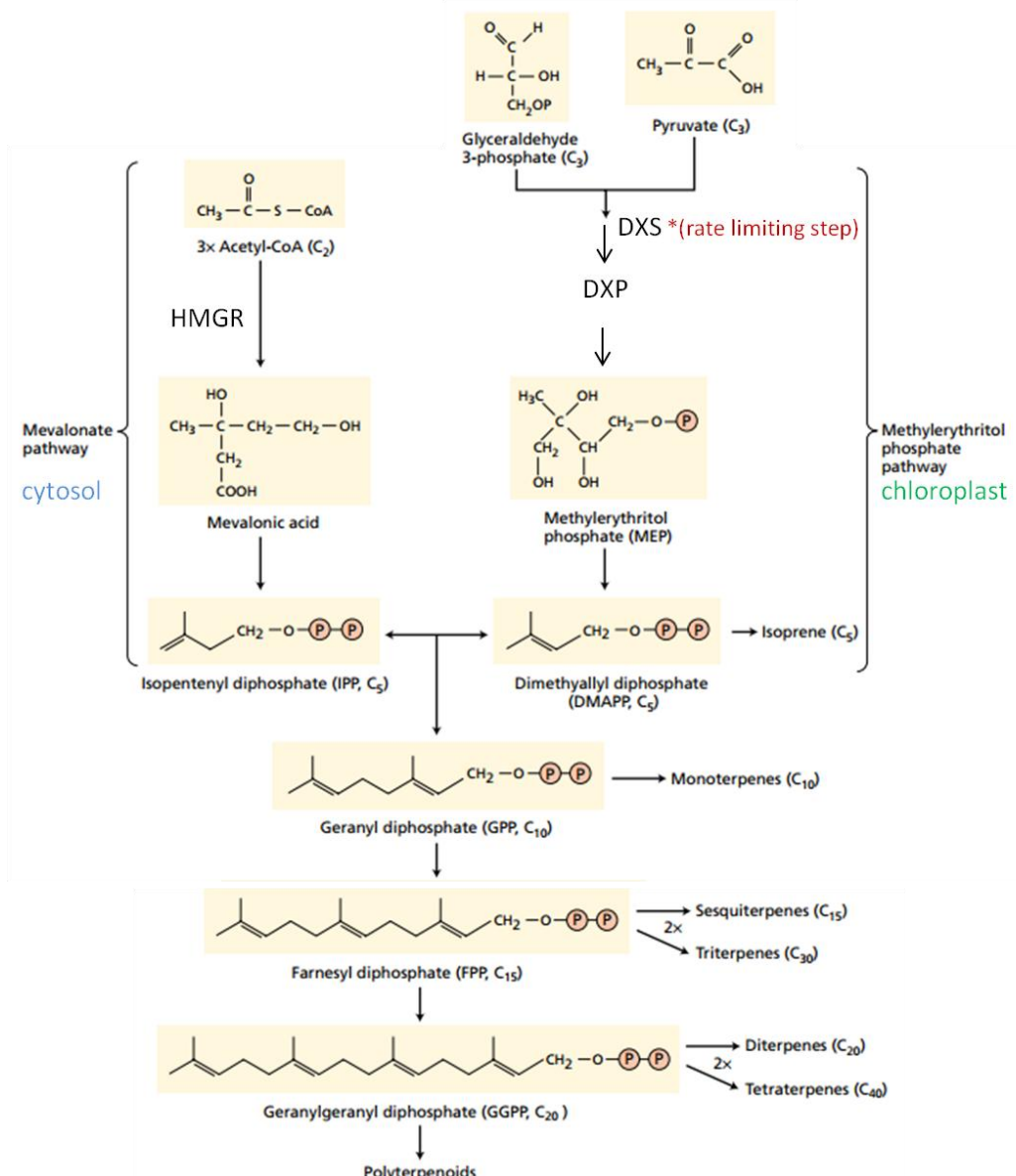
Τα τερπένια απαντώνται στα φυτά σε μεγάλη ποικιλία. Ορισμένα έχουν καλά αναγνωρισμένες λειτουργίες στην αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών που θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν πρωτογενείς μεταβολίτες. Παραδείγματα αποτελούν οι φυτοορμόνες γιββερελλίνες και τα βρασσινοστεροειδή. Τα περισσότερα τερπένια όμως είναι δευτερογενείς μεταβολίτες και θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του φυτού, με παραδείγματα τα πυρεθροειδή, τα αιθέρια έλαια, τα λιμονοειδή, οι φυτοεκδυσόνες κ.α. Ακόμα κάποια τερπένια έχουν φαρμακευτική αξία, ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε άλλους τομείς οικονομικού ενδιαφέροντος, όπως η αρωματοποιεία. Για παράδειγμα, το διτερπενοειδές ταξόλη χρησιμοποιείται ευρύτατα

στη θεραπεία ενάντια σε διάφορα είδη καρκίνου (S. & R., 2001), οι αρτεμισινίνες, που προέρχονται από το φυτό *Artemisia annua*, χρησιμοποιούνται σε φάρμακα ενάντια στην ελονοσία (Martin et al., 2003)(Paddon et al., 2013) ενώ η στεβιόλη από το φυτό *Stevia rebaudiana* αποτελεί φυσικό υποκατάστατο γλυκαντικών ουσιών (Philippe, De Mey, Anderson,&Ajikumar,2014).

Βιοσυνθετικά μονοπάτια τερπενίων

Τα τερπένια συντίθενται από πρωτογενείς μεταβολίτες με τουλάχιστον δύο διαφορετικούς τρόπους. Με την καλά μελετημένη οδό του μεβαλονικού οξέος (mevalonic acid pathway-MVA), τρία μόρια ακέτυλο- CoA ενώνονται διαδοχικά για να σχηματίσουν το μεβαλονικό οξύ (Εικόνα 1.). Αυτή η σημαντική ενδιάμεση ένωση έξι ατόμων άνθρακα στη συνέχεια πυροφωσφορυλιώνεται, αποκαρβοξυλιώνεται και αφυδατώνεται για να σχηματιστεί διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (isopentenyl diphosphate, IPP). Το IPP είναι η ενεργοποιημένη δομική μονάδα των τερπενίων που αποτελείται από πέντε άτομα άνθρακα. Το IPP μπορεί επίσης να σχηματιστεί από ενδιάμεσους μεταβολίτες της γλυκόλυσης ή του φωτοσυνθετικού κύκλου αναγωγής του άνθρακα μέσω μίας σειράς ξεχωριστών αντιδράσεων που ονομάζεται οδός της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (methylethritol phosphate [MEP] pathway), οποία διεξάγεται στους χλωροπλάστες και σε άλλα πλαστίδια (Lichtenthaler 1999). Η 3- φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και άλλα δύο άτομα άνθρακα που προέρχονται από το πυροσταφυλικό συμπυκνώνονται για να σχηματίσουν τον ενδιάμεσο μεταβολίτη με 5 άτομα άνθρακα, την 1-δεοξυ-D-ξυλουλόζη-5-φωσφορικού οξέος (1- deoxy-D-xylulose 5-phosphate, DXP), αντίδραση που καταλύεται από την DXP συνθετάση (DXS). Η αντίδραση αυτή θεωρείται ως το περιοριστικό βήμα (rate limiting step) για το σχηματισμό ισοπρενοειδών στα πλαστίδια μέσω του MEP μονοπατιού σε κάποιους οργανισμούς (Estevez et al., 2001, Wright LP, et al., 2014). Στη συνέχεια, το DXP μετατρέπεται σε 2-C-μεθυλ-D-ερυθριτολ-4-φωσφορικό οξύ (MEP) μέσω της DXP αναγωγομεράσης (DXR) που τελικά οδηγεί σε μετατροπή σε IPP (Εικόνα 2) Τα μόρια IPP και DMAPP που προκύπτουν από το MVA και το MEP μονοπάτι χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για την σύνθεση τελικών προϊόντων ισοπρενοειδών στο κυτταρόπλασμα ή στα πλαστίδια αντίστοιχα.

Τα δύο προαναφερθέντα μονοπάτια είναι διαφορετικά διαμερισματοποιημένα, το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος (MVA) στο κυτταρόπλασμα, ενώ αυτό της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (methylethritol phosphate [MEP] pathway) στους χλωροπλάστες. Παρότι οι περισσότεροι οργανισμοί χρησιμοποιούν ένα από τα δύο βιοσυνθετικά μονοπάτια, τα φυτά και κάποια φύκη έχουν την ικανότητα να εκμεταλλεύονται και τα δύο, βελτιστοποιώντας την παραγωγή ισοπρενοειδών ενώ ταυτόχρονα η διαμερισματοποίηση των μονοπατιών δίνει την δυνατότητα εξειδικευμένης σύνθεσης συγκεκριμένων μορίων τερπενοειδών (Vranová et al., 2013).



Εικόνα 2. Περίγραμμα της βιοσύνθεσης των τερπενίων. Οι βασικές μονάδες τερπενίων με 5 άτομα άνθρακα συντίθενται μέσω δύο διαφορετικών οδών. Τα φωσφορυλιωμένα ενδιάμεσα προϊόντα IPP και DMAPP, ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν τερπένια αποτελούμενα από 10,15 ή περισσότερα άτομα άνθρακα (Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Secondary Metabolites and Plant Defense. Τροποποιημένη)

Βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις για την αύξηση της παραγωγής τερπενοειδών ενώσεων σε ετερόλογα συστήματα

Η μεγάλη οικονομική και εμπορική σημασία ορισμένων τερπενοειδών σε συνδυασμό με τις χαμηλές παραγόμενες ποσότητες από φυτικούς οργανισμούς, έχουν οδηγήσει σε εκτεταμένες ερευνητικές προσεγγίσεις. Στόχος είναι η αύξηση της συνολικής παραγωγής τους στα φυτά, μέσω κυρίως βελτιστοποίησης του συνολικού μεταβολισμού των ισοπρενοειδών. Οι έρευνες βασίζονται στην αύξηση της ποσότητας του άνθρακα που διοχετεύεται στα μονοπάτια βιοσύνθεσης των βασικών δομικών λίθων των ισοπρενοειδών ώστε να αυξηθεί ο μεταβολισμός των τελικών βιολογικά ενεργών ενώσεων (Ikram et al.,

2015). Σε αυτό το πλαίσιο έχουν δοκιμαστεί διάφορες προσεγγίσεις, όπως η στόχευση υποκινητών ή μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν τα γονίδια σημαντικών ενζύμων των βιοσυνθετικών μονοπατιών των τερπενοειδών. Συγκεκριμένα, η παραγωγή των αρτεμισινών από το φυτό *Artemisia annua* φαίνεται να κυμαίνεται σε διαφορετικά επίπεδα ανάμεσα σε ποικιλίες του φυτού, στις οποίες διαφέρει η θέση του υποκινητή του γονιδίου DBR2, το οποίο ελέγχει το μονοπάτι σύνθεσης της ένωσης (Yang et al., 2015), καθιστώντας την επιλογή του κατάλληλου υποκινητή σημαντική για την βελτίωση της παραγωγής των τερπενίων. Παράλληλα, ορισμένες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην αύξηση δευτερογενών πρόδρομων μορίων των τερπενίων μέσω υπερέκφρασης των πρενυλ-τρανσφερασών GPS, FPS και GGPPS (Brückner & Tissier, 2013). Επιπλέον στρατηγικές περιλαμβάνουν την καταστολή (knockdown) βιοσυνθετικών μονοπατιών που ανταγωνίζονται τα πρόδρομα μόρια των τερπενοειδών όπως η σύνθεση του σκουαλενίου (Wu & Chappell, 2008). Σε πολλές μελέτες έχει γίνει προσπάθεια υπερέκφρασης των γονιδίων που ελέγχουν τα περιοριστικά στάδια (rate limiting step) των βιοσυνθετικών μονοπατιών MVA και MEP και κωδικοποιούν για τα ένζυμα HMGR και DXS αντίστοιχα. Στο MVA μονοπάτι, η υπερέκφραση της HMGR, η οποία ελέγχει καθολικά το μονοπάτι, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιθυμητών μεταβολιτών (Song et al., 2012; Ohto et al., 2009). Όσον αφορά το MEP μονοπάτι, η υπερέκφραση του ενζύμου DXS φαίνεται ότι επιδρά σημαντικά στην παραγωγή συνολικά των τερπενοειδών ενώσεων. Παραδείγματα μελετών που αφορούν τον έλεγχο της παραγωγής τερπενίων από το DXS, περιγράφονται παρακάτω.

Το ένζυμο DXP συνθάση (DXS)

Το ένζυμο συνθάση του 1-δεοξυ-D-ξυλουλόζη-5-φωσφορικού οξέος (1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase, DXS) είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο της παραγωγής τερπενοειδών στα πλαστίδια, συμμετέχοντας στη δημιουργία των βασικών δομικών λίθων, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Εμφανίζει μεγάλο βαθμό συντήρησης μεταξύ των ανώτερων φυτών, ενώ ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν για το ένζυμο ποικίλει μεταξύ των ειδών (Cordoba et al., 2009; Khemvong & Suvachittanont, 2005). Η θέση του στο MEP μονοπάτι καθιστά το DXS βασικό στόχο βιοτεχνολογικής μελέτης στη προσπάθεια βελτιστοποίησης της παραγωγής τερπενίων. Σε πολλές μελέτες έχουν επιτευχθεί υψηλότερα επίπεδα παραγωγής τερπενοειδών μέσω της υπερέκφρασης του ενζύμου. Για παράδειγμα, σε διαγονιδιακά φυτά λεβάντας που υπερέκφραζαν το DXS, παρατηρήθηκε συνολική αύξηση της παραγωγής του αιθέριου ελαίου καθώς και της περιεκτικότητας του σε τερπενοειδείς ενώσεις (Munoz-Bertomeu et al., 2006). Παράλληλα η ίδια στρατηγική έχει ως αποτέλεσμα και την αύξηση συγκεκριμένων μεταβολιτών, όπως στην περίπτωση διαγονιδιακών κυττάρων *Ginkgo biloba* με την αύξηση των γκιγκολιδίων B (Gong et al., 2006) καθώς και σε διαγονιδιακά κύτταρα του αρωματικού φυτού *Salvia sclarea*, όπου η υπερέκφραση του DXS σε ριζικά τριχίδια του φυτού προκάλεσε αύξηση της παραγωγής αμπιετανικών διτερπενίων (Vaccaro et al., 2014). Αυξημένη παραγωγή τερπενοειδών ενώσεων, όπως χλωροφύλλες, καροτενοειδή κ.α., παρατηρήθηκε και σε καλά μελετημένα φυτά μοντέλα, όπως διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis thaliana* (Estevez et al., 2001) ή διαγονιδιακά φυτά *Nicotiana benthamiana* (Brückner & Tissier, 2013), κατά την υπερέκφραση του DXS. Τα αποτελέσματα από πειράματα υπερέκφρασης του DXS σε βακτηριακά κύτταρα συνάδουν με αυτά που προκύπτουν από μελέτες στα φυτά (Lv et al., 2013). Ωστόσο, τα συστήματα ετερόλογης έκφρασης σε προκαρυώτες (πχ στα βακτήρια

Escherichia coli) δεν είναι πάντα τα κατάλληλα για την υπερπαραγωγή τερπενοειδών ενώσεων καθώς προκύπτουν προβλήματα κατά την μετα-μεταφραστική τροποποίηση των προϊόντων των διαγονιδίων- ενζύμων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των τερπενοειδών, ενώ δεν υπάρχει πάντα ολόκληρος ο βιοσυνθετικός μηχανισμός, σε αντίθεση με την παραγωγή τερπενοειδών *in planta* (Ikram et al., 2015). Μεταγενέστερη προσέγγιση κλωνοποίησης και υπερέκφρασης (με μεθόδους παροδικού μετασχηματισμού φυτών) του DXS γονιδίου φυτών *Pelargonium* spp τόσο σε ομόλογο όσο και σε ετερόλογο φυτικό σύστημα (*Withania somnifera*), οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (αιθέρια έλαια και στεροειδή [withanolides] αντίστοιχα) (Jadaun et al., 2016).

Εκτός από την υπερέκφραση του γονιδίου DXS, ενδιαφέρον παρουσιάζει η επίδραση της αλλαγής ενζυμικής δραστηριότητας του DXS στον μεταβολισμό των τερπενοειδών. Στην μελέτη των Battilana και συνεργατών (2011), περιγράφεται η αλλαγή στην παραγωγή της συνολικής παραγωγής τερπενοειδών ως αποτέλεσμα μιας σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο του DXS της ποικιλίας Μοσχάτο του αμπελιού (*Vitis vinifera*). Η ποικιλία αυτή οφείλει το ιδιαίτερα πλούσιο, χαρακτηριστικό άρωμα της στην παραγωγή μονοτερπενίων, η οποία είναι δραστικά μικρότερη σε λιγότερο αρωματικές ποικιλίες αμπελιού. Σε παλαιότερες μελέτες των Emanuelli et al., (2010) εντοπίστηκε ένας πολυμορφισμός μοναδιαίας θέσης (single nucleotide polymorphism, SNP) στο αλληλόμορφο VnDXS, ο οποίος συνδεόταν με το έντονο άρωμα της συγκεκριμένη ποικιλίας και είχε ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση της λυσίνης στη θέση 284 (284K) με ασπαραγίνη (284N). Αυτή η αμινοξική αλλαγή εντοπίζεται σε μία α-έλικα κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και επιδρά στην στερεοδιαμόρφωση και την θερμοδυναμική σταθερότητα του ενζύμου, αυξάνοντας την καταλυτική του δραστηριότητα. Μετά από μετασχηματισμό φυτών καπνού (*Nicotiana tabacum*) με αγροβακτήρια που υπερέκφραζαν το N284 αλληλόμορφο του VnDXS, παρατηρήθηκε αύξηση έως 20 φορές της συγκέντρωσης των μονοτερπενίων, σε σχέση με τα φυτά που υπερέκφραζαν το K284 αλληλόμορφο, όπως έδειξαν αναλύσεις αέριας χρωματογραφίας.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται το απομονωμένο γονίδιο DXS από το φυτό *Cistus creticus*.

Τα ιοειδή

Μια τάξη φυτικών παθογόνων είναι τα ιοειδή, παθογόνα που έχουν απομονωθεί από ανώτερα φυτά που έχουν εμφανίσει χαρακτηριστικά συμπτώματα. Οι ξενιστές των ιοειδών περιλαμβάνουν ποώδη και ξυλώδη είδη- αγρονομικά αλλά και διακοσμητικά. Πολλές από τις ασθένειες που προκαλούν έχουν σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο στις καλλιέργειες τρόπος μετάδοσης των ιοειδών δεν είναι γνωστός (<http://www.apsnet.org>). Οι επιπτώσεις στις καλλιέργειες κάνουν πιο επιτακτική την ανάγκη περαιτέρω μελέτης των ιοειδών.

Τα ιοειδή αποτελούν τα μικρότερα γνωστά παθογόνα των ανώτερων φυτών. Αποτελούνται από ένα μολυσματικό μόριο μονόκλωνου RNA (200-400 νουκλεοτίδια). Αντιγράφονται αυτόνομα, προκαλώντας συχνά αναπτυσσόμενες διαταραχές στα φυτικά είδη που προσβάλλουν. Δεν υπάρχουν ενδείξεις για παραγωγή πολυπεπτιδίων από τα ιοειδή, συνεπώς, οι γενετικές πληροφορίες για την αντιγραφή, την είσοδο στο κύτταρο και την κίνηση, την εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή και την παθογένεια, πρέπει να

κωδικοποιούνται από την αλληλουχία RNA και τη δευτεροταγή δομή, που φαίνεται να παρέχει συγκεκριμένα σινιάλα για πρωτεϊνικούς παράγοντες του ξενιστή (Martínez de Alba et al., 2003). Αρχικά, είχε διατυπωθεί η υπόθεση πως για την αντιγραφή τα ιοειδή χρησιμοποιούν ένζυμα του ξενιστή αλλά ανακαλύφθηκε πως ιοειδή της οικογένειας *Ansunviroidae* χρησιμοποιούν ριβοένζυμα ενεργότητας RNase, που κωδικοποιούνται από τις αλυσίδες και με τις δύο πολικότητες (Flores et al., 2005). Η μεταφορά τους μέσω του φλοιώματος γίνεται πιθανά με τη βοήθεια πρωτεϊνών του ξενιστή (Gomez et al., 2001). Φαίνεται πιθανό πως οι διάφορες αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες του ξενιστή για την αντιγραφή, μετακίνηση και συσσώρευση των ιοειδών, να αποτελούν το εναρκτήριο γεγονός για την παθογένεση του ιοειδούς. Κατά συνέπεια, ο χαρακτηρισμός αυτών των πρωτεϊνών ίσως οδηγήσει στη διεκρίνιση των μονοπατιών που ακολουθούνται κατά τη μόλυνση του ξενιστή.

Το ιοειδές PSTVd και η πρωτεΐνη Virp1

Το ιοειδές *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) ανήκει στο γένος *Pospiviroid* και στην ευρύτερη οικογένεια των *Pospiviroidae*. Το PSTVd περιέχει σήμα που το κατευθύνει στον πυρήνα, όπου και πολλαπλασιάζεται με μηχανισμό κυλιόμενου κύκλου (rolling circle). Το PSTVd (+ RNA) μετακινείται από κύτταρο σε κύτταρο μέσω των πλασμοδεσμών, και διασυστηματικά μέσω του φλοιώματος (Kalantidis et al., 2007).

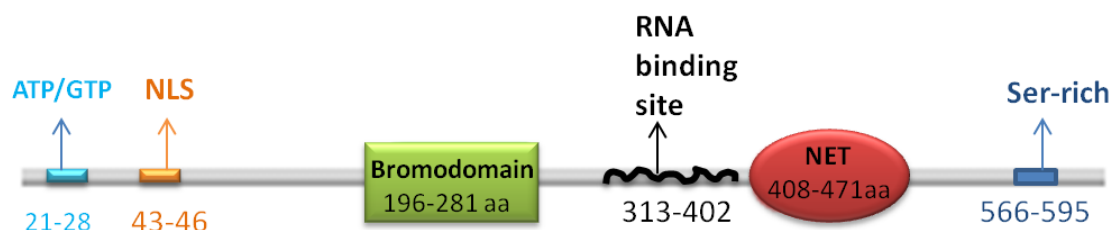
Η πρωτεΐνη Virp1, απομονώθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών, του Πανεπιστημίου Κρήτης, ύστερα από σάρωση c-DNA βιβλιοθήκης από φύλλα τοματιάς, χρησιμοποιώντας σαν ανιχνευτή το RNA του PSTVd (E. Martinez, 2000). Η πρωτεΐνη Virp1, προσδέεται στο RNA του ιοειδούς PSTVd και η αλληλεπίδραση αυτή 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 (Μαρίνου Ε., Μεταπτυχιακή διατριβή, 2002).

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 βιοπληροφορικά 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.

Μια συντηρημένη περιοχή που εντοπίζεται στη Virp1, είναι μια ακολουθία 85 αμινοξικών καταλοίπων (Εικόνα 3) τα οποία χαρακτηρίζονται ως bromodomain και είναι χαρακτηριστικά σε πολλούς ευκαρυωτικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Jeanmougin et al.,

1997). Η περιοχή bromodomain ανακαλύφθηκε από τον John W. Tamkun , και το όνομα της προήλθε από τη συσχέτιση με το γονίδιο *Brahma/brm* της *Drosophila spp* που μελετούσε. Οι επικράτειες bromo απαντώνται σε πολλούς οργανισμούς, από τη *Drosophila* και το ποντίκι, έως τον άνθρωπο και συνήθως βρίσκονται μέσα στις πρωτεΐνες, είτε μοναδικά, είτε σε ζεύγη, είτε σε πολλαπλά αντίτυπα. Η θέση στην οποία βρίσκονται μέσα στις πρωτεΐνες, δεν είναι σταθερή. Από τις 43 γνωστές πρωτεΐνες με τέτοια μοτίβα το 2015, 11 είχαν δύο μοτίβα και μόνο μία από αυτές είχε 6 (Ntranos et al., 2016).



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών της Virp1 κατά μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας: **αα 21-28** περιοχή πρόσδεσης ATP/GTP, **αα 43-46** NLS, σινιάλο πυρηνικού εντοπισμού, **αα 196-281** περιοχή bromodomain, **αα 313-402** περιοχή πρόσδεσης RNA, **αα 408-471** περιοχή N-terminal ExtraTerminal (NET), **αα 566-595** περιοχή πλούσια σε σερίνες (A.E. Martinez, PhD. Thesis, 2000)(<http://pfam.xfam.org>).

Οι bromodomains αναγνωρίζουν ακετυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης, όπως αυτά που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο των ιστονών και είναι υπεύθυνες για τη μεταγωγή σήματος από τα κατάλοιπα (Ntranos et al., 2016). Η αναγνώριση που περιγράφεται παραπάνω αποτελεί πολλές φορές προαπαιτούμενο για συσχέτιση πρωτεϊνών με ιστόνες, και αναδόμηση χρωματίνης (chromatin remodeling). Το μοτίβο σχηματίζει δευτεροταγή δομή με α -έλικες, που σχηματίζουν μια υδρόφοβη 'τσέπη' που αναγνωρίζει τα κατάλοιπα ακετυλιωμένης λυσίνης (Zeng et al., 2002). Οι πρωτεΐνες που περιέχουν bromodomains μπορεί να έχουν ποικίλες λειτουργίες, όπως δράση ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών, μεταγραφική μεσολάβηση ή και ρόλο στην αναδόμηση της χρωματίνης. 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).

Ακόμα, σχετικά πρόσφατα, αναγνωρίστηκε από τη βάση δεδομένων UniProt μία επιπλέον περιοχή στην πρωτεΐνη Virp1, το μοτίβο NET (N-terminal ExtraTerminal)(Εικόνα 3). Το μοτίβο αυτό ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των ET (ExtraTerminal) μοτίβων και είναι ιδιαίτερα συντηρημένο στις BET (bromodomain and extraterminal)πρωτεΐνες. Οι εν λόγω πρωτεΐνες φέρουν μία bromodomain (φυτικοί οργανισμοί) και ένα μοτίβο κατηγορίας ET. Η λειτουργία του NET μοτίβου εικάζεται πως είναι η σύνδεση πρωτεϊνών (Lin et al., 2008).

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. Πρόσφατες ερευνητικές προσεγγίσεις των Dian-Qiu Lv και συνεργατών (2016) έδειξαν πιθανή συσχέτιση της Virp1 με αυξημένη μεθυλίωση κατά την μόλυνση φυτών *Nicotiana benthamiana* με το ιοειδές PSTVd..

Το σύστημα CRISPR/Cas

Το σύστημα CRISPR/Cas9 παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε βακτήρια και Αρχαία και αποτελεί ένα “ανοσοποιητικού συστήματος μνήμης” για την προστασία των μικροοργανισμών έναντι των και ξένων DNA αλληλουχιών (Barrangou et al., 2007). Αποτέλεσε τη μεγαλύτερη ανακάλυψη στον τομέα της βιοτεχνολογία για το 2015, σύμφωνα με το περιοδικό Science. Πρόκειται για σύστημα που αποτελείται από τακτικώς διακεκομμένες σύντομες παλίνδρομες αλληλουχίες σε σειρά (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) οι οποίες αλληλεπιδρούν με μια ενδονουκλεάση της οικογένειας των Cas πρωτεϊνών (CRISPR associate protein) (Noman et al., 2016).

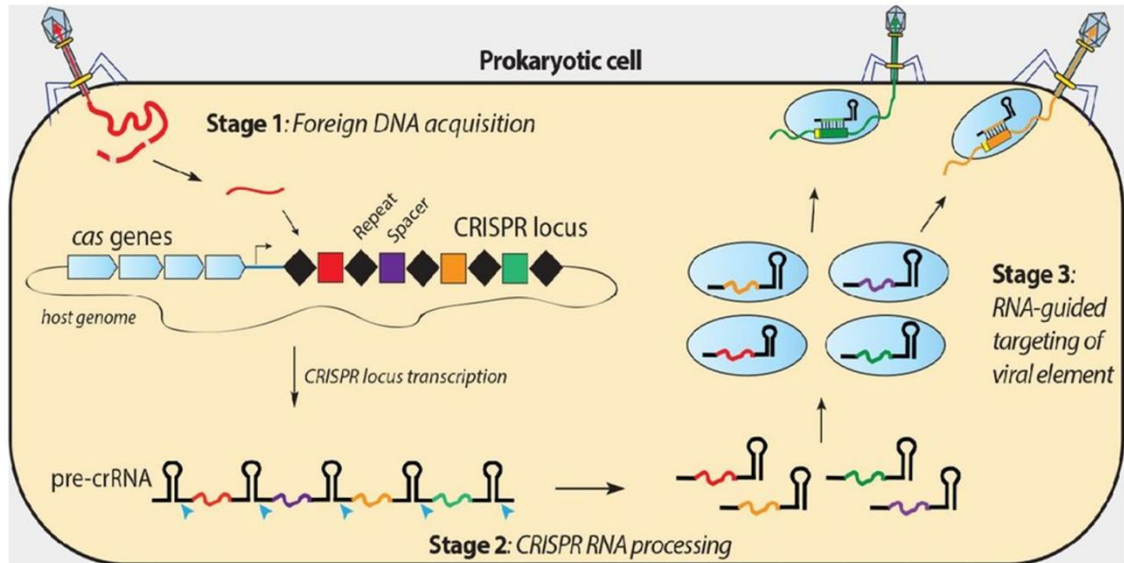
Δομικές περιοχές του γενετικού τόπου του συστήματος CRISPR/Cas

Το CRISPR αποτελεί επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, που είναι είτε συνεχόμενες, είτε διαχωρίζονται από ενδιάμεσες περιοχές DNA. Ο γενετικός τόπος του CRISPR διακρίνεται στις εξής περιοχές:

(i) Οδηγός ακολουθία (leader sequence): Αυτή η περιοχή αποτελείται από 200-350 ζεύγη βάσεων και είναι πλούσια στο δινουκλεοτίδιο AT. Περιλαμβάνει τον υποκινητή, που είναι απαραίτητος για τη μεταγραφή της αλληλουχίας του CRISPR που βρίσκεται καταρροϊκά από την οδηγό σε RNA. Η οδηγός ακολουθία είναι επίσης υπεύθυνη για την εισαγωγή νέων spacers στο γενετικό τόπο του CRISPR, καθώς και για την απενεργοποίηση παλαιότερων spacers. (ii) Συντηρητικές επαναλήψεις (direct repeats) και μη συντηρητικές επαναλήψεις (spacers): Οι συντηρητικές επαναλήψεις αποτελούν αλληλουχίες μήκους 21-47 ζευγών βάσεων και διαχωρίζονται μεταξύ τους από μη συντηρητικές επαναλήψεις παρόμοιου μεταξύ τους μήκους (σχεδόν αποκλειστικά μοναδικές για κάθε άτομο αφού αποτελούν τα τμήματα ξένου DNA και κυρίως ιικού DNA, που αποκόπηκαν και ενσωματώθηκαν στο βακτηριακό γονιδίωμα). (iii) Οικογένεια των γονιδίων Cas (CRISPR associated): Τα γονίδια αυτά βρίσκονται μετά τις συντηρητικές και μη συντηρητικές επαναλήψεις. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτή τη γονιδιακή οικογένεια ευθύνονται κατά κύριο λόγο για τη μεταγραφή των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του CRISPR στο λεγόμενο crRNA. Έπειτα οι Cas πρωτεΐνες μαζί με το crRNA σχηματίζουν ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό οδηγεί το crRNA να συνδεθεί με το εισβάλλον νουκλεϊκό οξύ με βάση τον κανόνα συμπληρωματικότητας και αφού συνδεθεί επάγει την αποικοδόμησή του.

Τρόπος λειτουργίας του συστήματος CRISPR/Cas

Συνοπτικά η λειτουργία του CRISPR/Cas συστήματος μπορεί να περιγραφεί σε τρία στάδια (Εικόνα 4). Το πρώτο στάδιο έχει να κάνει με τη προσαρμοστικότητα του συστήματος CRISPR. Σε αυτό το στάδιο προστίθενται τμήματα από το εξωγενές DNA μεταξύ των παλίνδρομων επαναλήψεων της αλληλουχίας του CRISPR. Στο δεύτερο στάδιο η γονιδιακή περιοχή με τις εν σειρά τακτικώς διακεκομμένες σύντομες παλίνδρομες αλληλουχίες μεταγράφεται σε ένα μεγάλο μόριο RNA, το οποίο υπόκειται σε επεξεργασία από νουκλεάσες για να προκύψουν μικρά crRNAs. Στο τελευταίο στάδιο τα crRNA αλληλεπιδρούν με νουκλεάσες και τις οδηγούν μέσω της συμπληρωματικότητας στο εξωγενές DNA το οποίο καταστρέφεται (Barrangou et al., 2014., Marraffini et al., 2008).



Εικόνα 4. Ο γενικός μηχανισμός δράσης του συστήματος CRISPR/Cas. (1) Ενσωμάτωση των spacers στο γενετικό τόπο του CRISPR. Κατά την πρώτη επαφή του οργανισμού με κάποιο εισβάλλον γενετικό υλικό, οι νέοι spacers εισάγονται κάθε φορά αμέσως μετά την οδηγό ακολουθία (leader) με τη βοήθεια μεταθετών στοιχείων. Στη φάση αυτή είναι απαραίτητη η παρουσία των πρωτεϊνών Cas1 και Cas2. Ακολουθεί μεταγραφή του γενετικού τόπου και δημιουργία των pre-crRNA. (2) Ωρίμανση των pre-crRNA σε crRNA. (3) Σύνδεση crRNA και Cas πρωτεϊνών στο εισβάλλον νουκλεϊκό οξύ και αποικοδόμησή του ([http://rna.berkeley.edu /The Dounda Lab](http://rna.berkeley.edu/The Dounda Lab)).

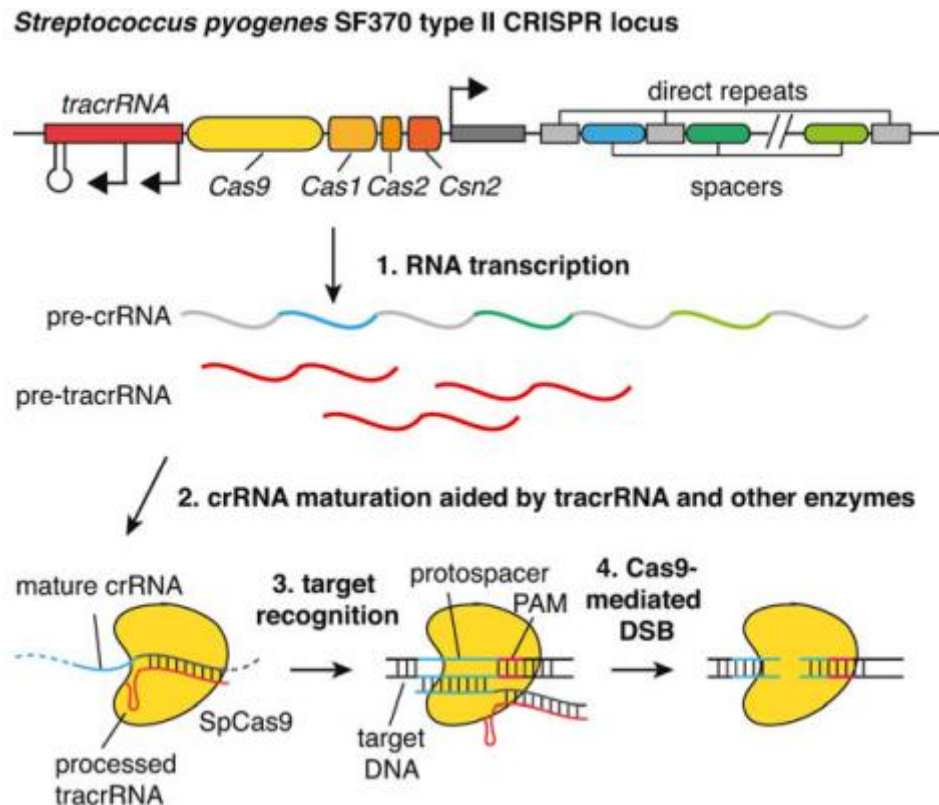
Αναλυτικότερες μελέτες υποδεικνύουν τον διαχωρισμό τριών βασικών τύπων CRISPR/Cas μηχανισμών, λαμβάνοντας υπόψη το γενετικό τους περιεχόμενο αλλά και δομικές και λειτουργικές διαφορές. Βασικό κριτήριο για τη κατηγοριοποίηση αυτή είναι η ποικιλία cas γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες γενετικά και λειτουργικά διαφορετικές μεταξύ τους (Makarova et al., 2011). Τύπος I: Ο τύπος αυτός αποτελείται από τους υποτύπους I-A έως I-F. Χαρακτηρίζεται από την πρωτεΐνη Cas3, η οποία παρουσιάζει τόσο ενεργότητα ελικάσης όσο και ενεργότητα DNAάσης. Τύπος II: Ο τύπος αυτός αποτελείται από τους υποτύπους IIA έως IIC. Χαρακτηρίζεται από την πρωτεΐνη Cas9, η οποία συμμετέχει στη δημιουργία του crRNA και στην καταστροφή του DNA στόχου. Ο τύπος αυτός συναντάται κατά κύριο λόγο στα βακτήρια. Τύπος III: Ο τύπος αυτός αποτελείται από τους υποτύπους III-A και III-B. Χαρακτηρίζεται από την πρωτεΐνη Cas10. Είναι πιο συχνός τύπος στα Αρχαία.

Στη συνέχεια θα εστιάσουμε περισσότερο στο σύστημα CRISPR/Cas Τύπου II.

Σύστημα CRISPR τύπου II

Το CRISPR τύπου II είναι το καλύτερα μελετημένο σύστημα CRISPR. Στα συστήματα αυτού του τύπου βρέθηκε ότι υπάρχουν τουλάχιστον τρία απαραίτητα συστατικά (η Cas9 πρωτεΐνη και δύο μόρια RNA που ονομάζονται crRNA, και tracrRNA) για την ανασύσταση του συστήματος CRISPR νουκλεάσης τύπου II (Deltcheva et al., 2011). Τα tracrRNAs (trans-activating crRNA) είναι trans-κωδικοποιούμενα μετάγραφα και βοηθούν στην ωρίμανση του pre-crRNA. Το tracrRNA περιέχει μια περιοχή 25 ζευγών βάσεων που παρουσιάζει σχεδόν απόλυτη συμπληρωματικότητα με τις συντηρητικές επαναλήψεις του pre-crRNA. Εκτός από το tracrRNA, για την ωρίμανση του pre-crRNA σε crRNA απαιτείται η πρωτεΐνη Cas9 και μια RNAάση III του ξενιστή. Η Cas9 εκτός από την ωρίμανση του pre-crRNA

συμμετέχει στην αναγνώριση και καταστροφή του εισβολέα μαζί με το υβριδικό μόριο crRNA:tracrRNA (δημιουργεί σύμπλοκο μαζί του)(Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της θραύσης του δίκλωνου DNA ως αποτέλεσμα της δράσης του συστήματος CRISPR/Cas9, στο *Streptococcus pyogenes* SF370. Ο γενετικός τόπος του CRISPR/Cas9 περιέχει 4 γονίδια *Cas9*, *Cas1*, *Cas2* και *Csn1*, το *tracrRNA* και μία χαρακτηριστική περιοχή με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (direct repeats), που διακόπτονται από μικρές μη επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (spacers). Κάθε αλληλουχία spacer έχει προκύψει από ξένο γενετικό υλικό (protospacer). Κάθε protospacer σχετίζεται με ένα παρακείμενο μοτίβο PAM (Protospacer Adjacent Motif). Η θράυση του δίκλωνου DNA (double strand break-DSB) γίνεται σε διαδοχικά βήματα: (1)Τα pre-crRNA και tracrRNA μεταγράφονται. (2)Το tracrRNA υβριδοποιείται με τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (direct repeats) του pre-crRNA και ενώνονται με την *Cas9* ως σύμπλοκο, που μεσολαβεί στην ωρίμανση του pre-crRNA σε crRNAs. (3) Το σύμπλοκο crRNA:tracrRNA καθοδηγεί την *Cas9* στο DNA στόχο, ο οποίος αποτελείται από την αλληλουχία protospacer και το PAM. Η σύντηξη γίνεται μέσω σχηματισμού ετεροσυμπλόκου ανάμεσα στην περιοχή του spacer του crRNA και του protospacer που βρίσκεται στο DNA στόχο. (4) Η *Cas9* διαμεσολαβεί για τη θράυση του DNA στόχου μέσα στην αλληλουχία του protospacer (Chromosomal Mutagenesis, 2nd edition, Ch 10, Le Cong and Feng Zhang, 2015)

Το σύστημα CRISPR/Cas9 ως βασικό βιοτεχνολογικό εργαλείο

Το σύστημα CRISPR/Cas τύπου II είναι το σύστημα όπου εμπλέκονται οι λιγότερες πρωτεΐνες και κατ'επέκταση έχει την ελάχιστη πολυπλοκότητα. Η απλότητα του συστήματος αυτού το καθιστά ενδιαφέρουσα προσέγγιση για την δημιουργία στοχευόμενων τροποποιήσεων στο γονιδίωμα διαφόρων οργανισμών.

Το 2013 έγιναν οι πρώτες δημοσιεύσεις που εστίαζαν στη χρήση της *Cas9* νουκλεάσης του συστήματος CRISPR/Cas τύπου II (το οποίο ονομάστηκε CRISPR/Cas9, εφόσον η *Cas9* είναι η μοναδική νουκλεάση που απαιτείται για την λειτουργικότητα του συστήματος αυτού) για τη γενετική τροποποίηση ευκαρυωτικών οργανισμών. Από τότε μέχρι σήμερα έχουν

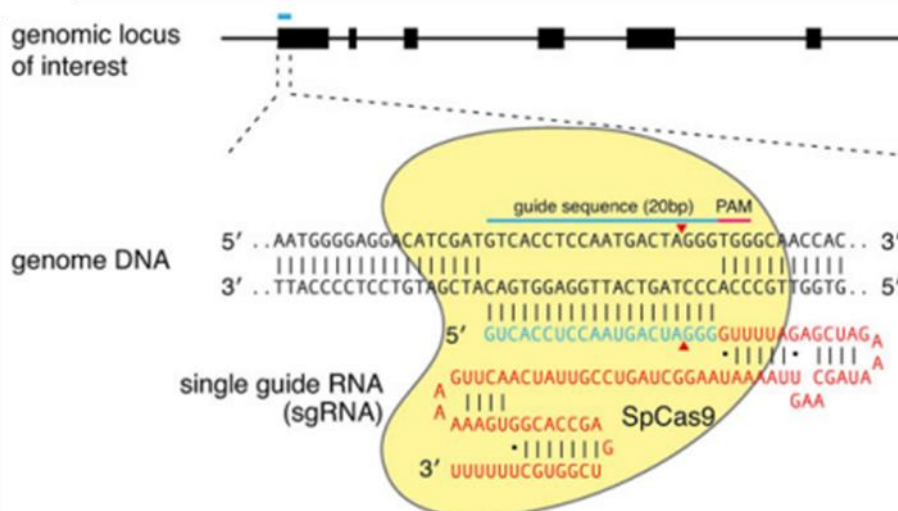
πραγματοποιηθεί πάνω από χίλιες δημοσιευμένες εργασίες με στόχο την βελτιστοποίηση της χρήσης του συστήματος αυτού ως μοριακό εργαλείο (Hsu et al., 2014).

Με τη χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί ένθεση ή διαγραφή νουκλεοτιδίων μέσω της σύνδεσης μη ομόλογων άκρων (NHEJ) και να απομακρυνθούν τα γονίδια που είχαν εισαχθεί για την παραγωγή του sgRNA και της Cas9 με διάσχιση. Ειδικότερα, μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 είναι δυνατόν να στοχευθούν ταυτόχρονα δύο σημεία έτσι ώστε να προκαλέσουν διαγραφή του ενδιάμεσου χρωμοσωμικού τμήματος (πειράματα σε φυτά *N. benthamiana* [Belhaj et al., 2013], *A. thaliana* [Lei et al., 2014], ρυζιού [H. Zhou et al., 2014] και ντομάτας [Brooks et al., 2014a]).

Μόρια RNA-οδηγοί

Στα πλαίσια βιοτεχνολογικών πειραματικών προσεγγίσεων, για την τροποποίηση συγκεκριμένων γενετικών αλληλουχιών κατασκευάστηκαν μόρια RNA - οδηγό (single guide RNAs, sgRNAs) συνδυάζοντας την αλληλουχία των crRNAs και των tracrRNAs (Εικόνα 6). Με αυτό τον τρόπο η στοχευόμενη αλληλουχία μπορεί να επαναπροσδιοριστεί με την αλλαγή 20nt στη περιοχή του sgRNA μορίου που περιέχεται η αλληλουχία του crRNA (Xing et al., 2014). Ως αποτέλεσμα, πραγματοποιείται θραύση των δύο αλυσίδων του μορίου στόχου και ο κυτταρικός μηχανισμός επιδιόρθωσης ενεργοποιείται, μέσω της σύνδεσης μη ομόλογων άκρων (NHEJ). Ο μηχανισμός αυτός είναι όμως επιρρεπής σε λάθη, τα οποία συχνά διασπούν την αλληλουχία του γονιδίου, οδηγώντας στη σίγηση του. Για την επεξεργασία του γονιδίου, είναι δυνατή η προσθήκη τμήματος DNA με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και η ενσωμάτωσή του στο DNA κατά την επιδιόρθωση.

Συνοψίζοντας, τα απαιτούμενα συστατικά για την επιτυχή τροποποίηση συγκεκριμένης γενετικής αλληλουχίας μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 είναι δύο (ένα μόριο sgRNA που θα περιέχει την αλληλουχία – στόχο και η Cas9 νουκλεάση που θα προκαλέσει την γενετική τροποποίηση). Επιπρόσθετα δείχθηκε ότι η αποτελεσματικότητα του υβριδικού sgRNA είναι ίδια, αν όχι καλύτερη από τη χρήση των crRNA και tracrRNA ως χωριστά μόρια (Jinek et al., 2012).



Εικόνα 6. Σχεδιασμός χμαιρικού sgRNA. Η Cas9 νουκλεάση (κίτρινο) προσδένεται στο γενωμικό DNA καθοδηγούμενη από το sgRNA. Το τελευταίο αποτελείται από μία αλληλουχία 20-nt (guide sequence) (με μπλε

χρώμα) και ένα χιμαιρικό RNA ικρίωμα (κόκκινο). Η αλληλουχία του sgRNA υβριδοποιείται με την αλληλουχία στόχο (protospacer) (μπλε χρώμα), που βρίσκεται upstream του απαραίτητου μοτίβου PAM (ροζ χρώμα). Η Cas9 διαμεσολαβεί για τη θραύση της δίκλωνης αλυσίδας στόχου (DSB) περίπου 3 bp upstream του 5' άκρου του PAM (κόκκινα τρίγωνα) (Chromosomal Mutagenesis, 2nd edition, Ch 10, Le Cong and Feng Zhang, 2015)

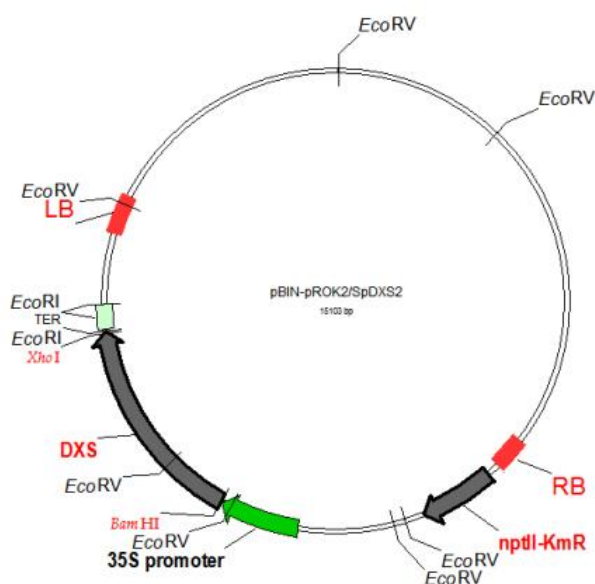
Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η δημιουργία σειρών φυτών *Nicotiana benthamiana* ολικής απώλειας λειτουργίας του γονιδίου που κωδικοποιεί για την *VIRP1* (αφού γίνει διασταύρωση των φυτών με τροποποιημένα φυτά που εκφράζουν την Cas9) -με απώτερο στόχο τη μελέτη της λειτουργίας του γονιδίου, και η δημιουργία διαγονιδιακών σειρών *Nicotiana benthamiana* υπερέκφρασης του ενζύμου DXS_{WT} , με απώτερο στόχο την χρήση των φυτών αυτών ως πλατφόρμες παραγωγής τερπενίων σε μεγάλες ποσότητες.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

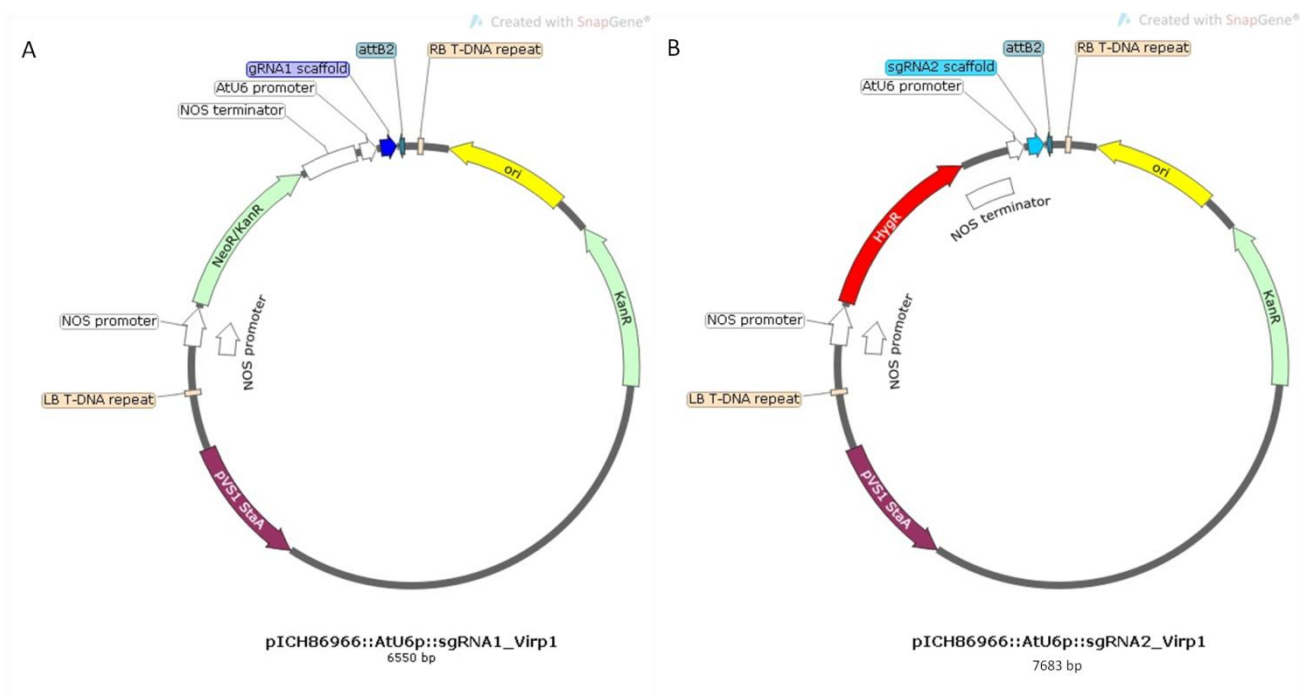
Πλασμιδιακές κατασκευές

Για την δημιουργία των διαγονιδιακών φυτών υπερέκφρασης του αγρίου τύπου ένζυμου *DXS*, χρησιμοποιήθηκαν μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 που έφεραν την κατασκευή με το cDNA του ενζύμου από το φυτό *Cistus Creticus* κλωνοποιημένο σε πλασμιδιακό φορέα pBIN-pROK (Εικόνα 7). Η απομόνωση του αγρίου τύπου γονιδίου του ενζύμου έγινε από το εργαστήριο του Δρ. Α. Μακρή (Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, ΕΚΕΤΑ).



Εικόνα 7. Πλασμιδιακός χάρτης της κατασκευής του *DXS* γονιδίου (αγρίου τύπου) σε φορέα pBIN-pROK2 (πτυχιακή εργασία Πηνελόπης Μουτεσίδη, 2015).

Για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών καταστολής του *Virp1* γονιδίου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα CrispR/Cas το οποίο επιτρέπει την κοπή ή την καταστολή ενός γονιδίου στόχου είτε με την δημιουργία μιας σημειακής μεταλλαγής (όταν χρησιμοποιείται ένα RNA οδηγός ή guide RNA ή sgRNA) ή με την έλλειψη ενός τμήματος του γονιδίου (όταν χρησιμοποιούνται δυο guide RNAs). Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν δύο guide RNAs που σχεδιάστηκαν από το διδακτορικό φοιτητή Ιωάννη Βλατάκη και κλωνοποιήθηκαν από εταιρεία σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς (Εικόνα 8). Οι εν λόγω πλασμιδιακές κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν τόσο ξεχωριστά όσο και σε συνδυασμό για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών καταστολής του *Virp1* γονιδίου.



Εικόνα 8. Πλασμιδιακοί χάρτες των sgRNA 1 (A) και sgRNA 2 (B) σε φορέα pICH86988 με υποκινητή AtU6. Στην κατασκευή B έχει αφαιρεθεί η αλληλουχία που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμικίνη και έχει αντικατασταθεί με την αλληλουχία ανθεκτικότητας στην υγρομικίνη από το μεταπτυχιακό φοιτητή Δημήτρη Μαλιαράκη.

Τα αντιβιοτικά ανθεκτικότητας που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών σε υγρές και στερεές καλλιέργειες σε κάθε περίπτωση φαίνονται στον Πίνακα 1 μαζί με τις συγκεντρώσεις τους.

Πίνακας 1 Οι χρησιμοποιούμενες πλασμιδιακές κατασκευές και το αντίστοιχο αντιβιοτικό ανθεκτικότητας με τις συγκεντρώσεις του

Κατασκευές	Ανθεκτικότητα στα βακτήρια	Ανθεκτικότητα στα φυτά
pICH86988::sgRNA1	Καναμυκίνη	Καναμυκίνη
pICH86988::sgRNA2	Καναμυκίνη	Υγρομυκίνη
sgRNA1 +sgRNA2	Καναμυκίνη	Καναμυκίνη και Υγρομυκίνη
pBIN-pROK::DXS wt	Καναμυκίνη	Καναμυκίνη
	Αντιβιοτικό	Συγκέντρωση (μg/ml)
	Καναμυκίνη	100
	Υγρομυκίνη	50
	Augmentin *	400
	*χρησιμοποιείται ως βακτηριοστατικό	

Συνθήκες ανάπτυξης φυτικών οργανισμών

Τα φυτά (*Nicotiana benthamiana*) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκαν σε θάλαμο κατάλληλων συνθηκών: 16 ώρες φώς/8 ώρες σκοτάδι, θερμοκρασία 24°C και υγρασία 70%.

Χρησιμοποιούμενα βακτηριακά στελέχη

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, με ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και ριφαμπικίνη. Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο Luria-Bertani (LB) (1% Τρυπτόνη, 0.5% Εκχύλισμα ζύμης, 1% Χλωριούχο Νάτριο).

Μετασηματισμός φυτικού ιστού με τη μέθοδο του αγροβακτηρίου

Για την δημιουργία διαγονιδιακών φυτών, χρησιμοποιείται η μέθοδος μετασηματισμού φυλλικών δίσκων μέσω του αγροβακτηρίου. Όλη η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow) και τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα. Αρχικά, κόβονται φύλλα από νεαρά φυτά *Nicotiana benthamiana* και απολυμαίνονται σε διάλυμα χλωρίνης 10% με την προσθήκη 200μl/L Tween 20 για 10 λεπτά. Έπειτα, κόβονται φυλλικοί δίσκοι και επωάζονται σε καλλιέργεια αγροβακτηρίων C58C1 για 20 λεπτά. Η καλλιέργεια που χρησιμοποιείται έχει μεγαλώσει σε LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής για τουλάχιστον 16 ώρες, ώσπου η οπτική της πυκνότητα (OD600) να είναι περίπου 0,6 και επαναιωρείται σε διάλυμα MS με 200 μM ακετοσυρινγκόνη (ACS). Η ακετοσυρινγκόνη είναι ένα φαινολικό συστατικό που παράγεται φυσιολογικά από φυτικούς τραυματισμένους ιστούς και επάγει την έκφραση των *vir* γονιδίων των αγροβακτηρίων και επομένως μπορεί *in vitro* να αυξήσει την απόδοση του μετασηματισμού.

Μετά το πέρας της επώασης, οι δίσκοι στεγνώνουν σε χαρτί Whatman και μεταφέρονται σε τρυβλία Petri με στερεό μέσο MS, τα οποία καλύφθηκαν με αλουμινοχαρτο και τοποθετούνται στο θάλαμο ανάπτυξης για 24 ώρες. Στη συνέχεια, οι φυλλικοί δίσκοι επωάζονται σε υγρό διάλυμα MS για 15 λεπτά και αφού ξεπλένονται από την περίσσεια του αγροβακτηρίου, μεταφέρονται σε τρυβλία Petri με στερεό MS, ορμόνες βλάστησης και τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής. Οι ορμόνες που χρειάζονται για την επαγωγή της βλάστησης είναι η BAP (6-βενζυλ-αμινοπουρίνη, 6-benzylaminopurine) 1μg/ml, που ανήκει

στις κυτοκινίνες, και η NAA (α -ναφθαλινο-οξικό οξύ, *n*-naptalene acetic acid) 0,2 μ g/ml, που ανήκει στις αυξίνες.

Ως αντιβιοτικό για την εξάλειψη τυχόν υπολειπόμενων αγροβακτηρίων χρησιμοποιείται το Augmentin 600 mg (δραστική ουσία amoxicillin) σε συγκέντρωση 400 μ g/ml. Ακόμα, χρησιμοποιείται το εκάστοτε αντιβιοτικό επιλογής εφόσον τα αγροβακτήρια έφεραν πλασμίδιο με το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας. Τα τρυβλία κλείνονται με parafilm και τοποθετούνται στον θάλαμο ανάπτυξης ώστε να αρχίσει η δημιουργία κάλλου, ενώ παρακολουθούνται τακτικά για την εμφάνιση μολύνσεων.

Παράλληλα, χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες για τον μετασχηματισμό μη μετασχηματισμένοι φυλλικοί δίσκοι οι οποίοι τοποθετούνται μετά την πρώτη μέρα είτε σε μέσο MS χωρίς αντιβιοτικά (θετικοί μάρτυρες) ή σε μέσο MS με αντιβιοτικά επιλογής (αρνητικοί μάρτυρες).

De novo οργανογένεση

Από τους φυλλικούς δίσκους αναπτύσσονται κάλλοι περίπου 1 μήνα μετά τον μετασχηματισμό των φυλλικών δίσκων. Για την *de novo* οργανογένεση βλαστών, χρειάζεται να περάσουν 1-4 εβδομάδες, όταν τα νεαρά φυτά φτάνουν σε ύψος τα 2-3 εκατοστών, για να αποκοπούν από τον κάλλο και να μεταφερθούν σε κουτιά με θρεπτικό MS ριζοβολίας, το οποίο δεν περιέχει ορμόνες αλλά μόνο το αντιβιοτικό επιλογής. Ως παράγοντας πήξης χρησιμοποιήθηκε το υλικό Phytigel σε συγκέντρωση 1,5-2,5 gr/L. Μετά την ανάπτυξη των ριζών, έγινε μεταφύτευση των νεαρών φυτών αρχικά σε φυλλόχωμα και στη συνέχεια, αφού αναπτύχθηκαν επαρκώς, σε χώμα σύστασης 2 τύρφη : 1 φυλλόχωμα : ½ περλίτη και λίγο λίπασμα.

Ανάλυση διάσχισης (segregation analysis)

Ο όρος «segregation analysis» αντιστοιχεί στην μελέτη υπολογισμού των ενθέσεων ενός διαγονιδίου στο γονιδίωμα του φυτού σύμφωνα με τις μεντελικές αναλογίες κληρονομησης ενός γονιδίου μάρτυρα επιλογής, συνδεδεμένο με το επιθυμητό διαγονίδιο, στις επόμενες γενιές. Οι αναλογίες αυτές εξαρτώνται από τον αριθμό ενθέσεων του διαγονιδίου στην T0 γενιά καθώς όσο περισσότερες είναι οι ενθέσεις, τόσο αυξάνεται η πιθανότητα κληρονομησης ενός γαμέτη που φέρει το διαγονίδιο στα φυτά της T1 γενιάς.

Για την ανάλυση αυτού του τύπου, συλλέγονται σπέρματα (T1 γενιά) από τα φυτά που προέκυψαν από τη διαδικασία την ιστοκαλλιέργειας (T0 γενιά), και ακολουθεί διαδικασία απολύμανσης τους. Η διαδικασία γίνεται σε θάλαμο νηματικής ροής και τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα: Τα σπέρματα τοποθετούνται σε φιαλίδια με διαλύμα χλωρίνης 7% όπου αναδεύονται για 10 λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθούν 5 ξεπλύματα με αποστειρωμένο νερό. Έπειτα, τα σπέρματα φυτεύονται σε πιατάκια με θρεπτικό υπόστρωμα MS και το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Τα πιατάκια κλείνονται με parafilm και τοποθετούνται στο σκοτάδι για 24 ώρες. Ως μάρτυρες χρησιμοποιούνται σπέρματα από φυτά αγρίου τύπου σε θρεπτικό MS με το αντιβιοτικό επιλογής ή χωρίς αντιβιοτικό ως αρνητικοί ή θετικοί μάρτυρες αντίστοιχα.

Τα τρυβλία τοποθετούνται τελικά σε θάλαμο ανάπτυξης για περίπου 4 εβδομάδες μέχρι να υπάρξει ξεκάθαρο αποτέλεσμα στην διαδικασία της επιλογής μέσω του αντιβιοτικού

επιλογής. Τα νεκρά και ζωντανά φυτά καταμετρούνταν και γινόταν αντιστοίχιση του ποσοστού τους σε έναν αριθμό ενθέσεων, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Υπολογιζόμενος αριθμός ενθέσεων ανάλογα με το μετρούμενο ποσοστό νεκρών φυτών

Αριθμός ενθέσεων	Ποσοστό % νεκρών φυτών
1	25%
2	6,25%
3	1,57%

Συχνά χρησιμοποιούμενα διαλύματα Murashige Skoog (MS) θρεπτικό μέσο

Το θρεπτικό μέσο MS χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των φυτών στα διάφορα στάδια της ιστοκαλλιέργειας. Τα μακροστοιχεία, τα μικροστοιχεία και οι βιταμίνες προστίθενται ως έτοιμα μείγματα (PhytoTechnology Laboratories) σε ποσότητες που φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις για την παρασκευή θρεπτικού μέσου MS

	MS (1lt)	MS Ριζοβολίας (Rooting media) (1lt)	MS για σπέρματα (1 lt)
10x μακροστοιχεία	4.23 gr	4.23 gr	4.23 gr
Μικροστοιχεία	0.1 gr	0.1 gr	0.1 gr
Βιταμίνες	0.103 gr	0.103 gr	0.103 gr
Σουκρόζη	30 gr	15 gr	-
NAA (200 μl/lt)	10μl	-	-
BAP (200 μl/lt)	80 μl	-	-
Το pH ορίζεται σε 5.7-5.8 με την προσθήκη σταγόνων διαλύματος KOH 1M			
Άγαρ	7 gr (Agar TC)	2 gr (Phytigel)	7 gr (Agar TC)
Αποστείρωση και προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού			

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μέρος 1^ο

Δημιουργία διαγονιδιακών φυτών

Για την δημιουργία των διαγονιδιακών φυτών, γίνεται μετασχηματισμός φυλλικών δίσκων από φυτά *Nicotiana benthamiana* αγρίου τύπου με αγροβακτηριακά στελέχη LBA4404 (βλ. ενότητα 'Υλικά και Μέθοδοι') τα οποία φέρουν τις πλασμιδιακές κατασκευές που φαίνονται στον Πίνακα 4. Σε όλα τα θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν προστέθηκε εκτός από το αντιβιοτικό επιλογής και το σκεύασμα Augmentin, για την εξάλειψη του αγροβακτηρίου.

Ακολουθεί η διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας. Με τις κατασκευές pBIN-pROK::DXS wt pICH86988::sgRNA1 έγινε από μία προσπάθεια μετασχηματισμού φυλλικών δίσκων. σε αντίθεση με τις υπόλοιπες κατασκευές, έγιναν δύο προσπάθειες, λόγω αδυναμίας ανάπτυξης των κάλλων.

Πίνακας 4. Οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας

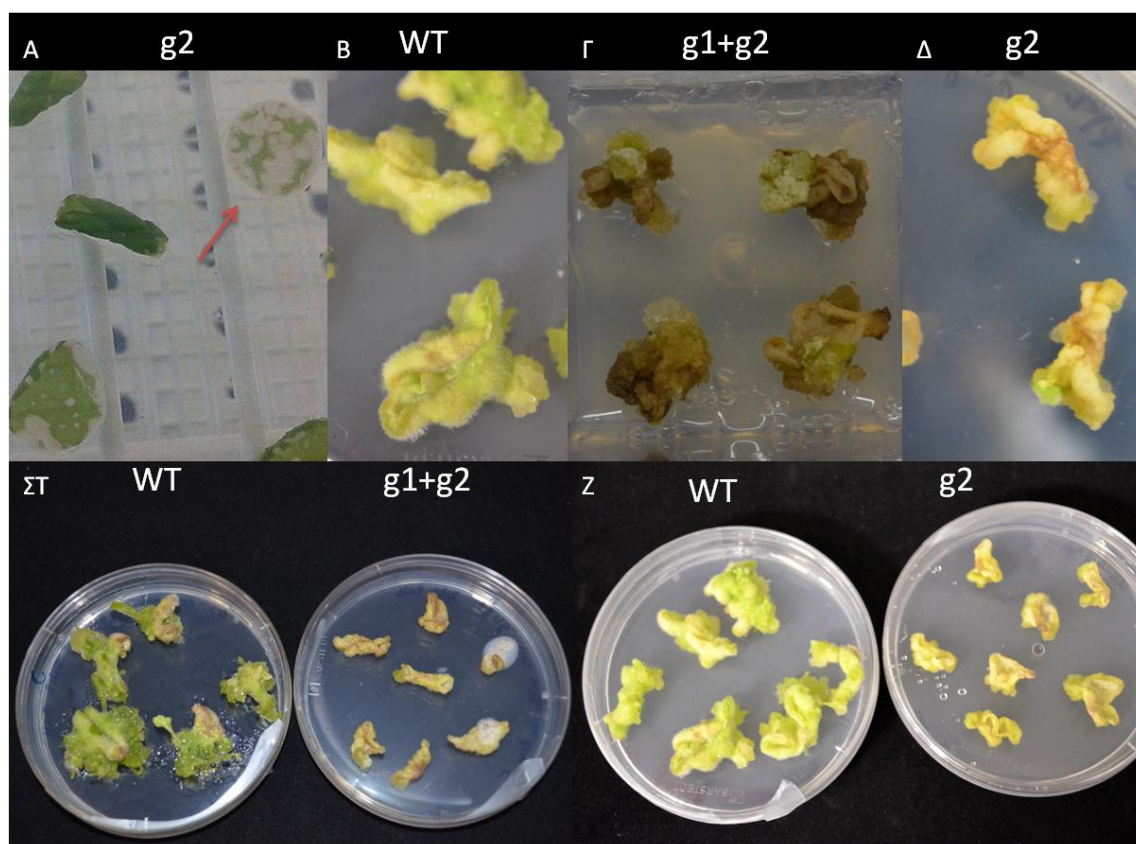
Κατασκευές	Σκοπός	Ανθεκτικότητα στα φυτά	Ονομασία διαγονιδιακών φυτών
pICH86988::sgRNA1	Δημιουργία σειρών ολικής απώλειας λειτουργίας του γονιδίου που κωδικοποιεί για την Virp1 (αφού γίνει διασταύρωση των φυτών με τροποποιημένα φυτά που εκφράζουν την Cas9)	Καναμυκίνη	g1
pICH86988::sgRNA2		Υγρομυκίνη	g2
sgRNA1 +sgRNA2 (μίγμα αγροβακτηρίων που περιέχουν και τις δύο κατασκευές)		Καναμυκίνη και Υγρομυκίνη	g1+g2
pBIN-pROK::DXS wt		Δημιουργία διαγονιδιακών σειρών υπερέκφρασης του ενζύμου DXS _{WT}	Καναμυκίνη

Για την κατασκευή pICH86988::sgRNA2 και το μίγμα sgRNA1 +sgRNA2 ακολουθείται στενή παρακολούθηση των φυτών, λόγω της αδυναμίας ανάπτυξης που εμφάνισαν σε όλα τα στάδια της ιστοκαλλιέργειας, οδηγώντας έτσι σε ιδιαίτερα μειωμένο αριθμό κάλλων που επιβίωσαν και ακόμα λιγότερα φυτά τελικά. Μάλιστα, από τη σειρά g1+g2 δεν προέκυψαν καθόλου σπέρματα από τα φυτά T0 γενιάς. Στις σειρές g1+g2 και g2 παρατηρείται από την αρχή (στις 6 ημέρες) 'λεύκανση' στους φυλλικούς δίσκους (Εικόνα 9), που αρχικά αποδόθηκε σε υψηλή ποσότητα χλωρίνης κατά την αποστείρωση των φύλλων. Κατά τη δεύτερη προσπάθεια μειώθηκε το ποσοστό της χλωρίνης σε 7%, αλλά οι λευκές κηλίδες εμφανίστηκαν και πάλι. Οι δίσκοι με λευκές κηλίδες δεν επιβίωσαν, μειώνοντας έτσι σημαντικά τον αριθμό των κάλλων. Σε επόμενα στάδια και στις δύο σειρές παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αργή ανάπτυξη και πολλοί από τους κάλους δεν οδήγησαν σε ανάπτυξη νεαρών φυτών (Εικόνα 9) εμφανίζοντας χαρακτηριστικό καφέ χρωματισμό. Το σύνολο των φυτών

που παράχθηκαν φαίνεται στον Πίνακα 5 όπου απεικονίζεται και το στάδιο του εκάστοτε φυτού

Πίνακας 5. Οι σειρές διαγονιδιακών φυτών που μεγάλωσαν επιτυχώς στο χώμα. ☑ : συλλέχθηκαν σπόροι, ☼ :σε αναμονή για συλλογή σπόρων, ‡: μέχρι τώρα φαίνεται στείρο, ≈‡: πιθανά στείρο

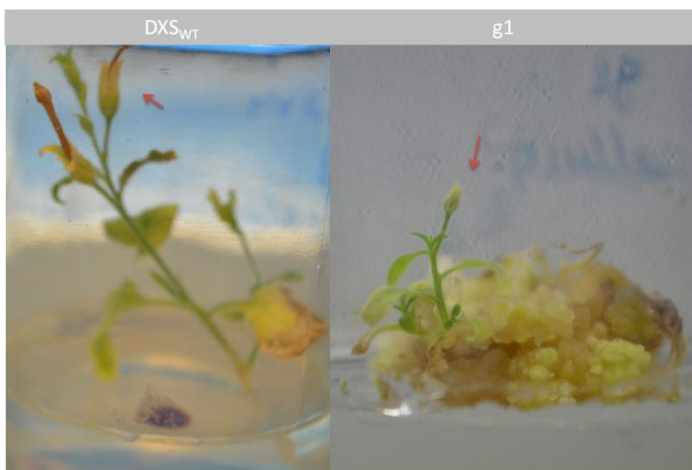
Ονομασία							
DXS	Σχόλιο	g1	Σχόλιο	g2	Σχόλιο	g1 + g2	Σχόλιο
VAS1	☑	5.3b	☑	3.1	☼	2.2	☼ ‡
2.4	☑	CAZ3	☑	1.2	☑	1.1	☑
2.3	☑	2.4	☑	2.3	‡		
5.1	☑	CAZ4	☑	2.1	☼		
5.2	☑	2.3	☑				
6.1a	☑	3.3	☑				
6.2	☑	5.3a	☼				
RED1	☑	4.1	≈‡				
RED2	☑	5.5	☑				
7.9	☑						
COL1	☑						
COL2	☼						
CRE4	☼						
CRE3	☼						
4.1b	‡						
4.1d	‡						



Εικόνα 9. Χαρακτηριστικά αφύσικης ανάπτυξης των σειρών g2 και g1+g2 κατά τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας. (Α) Εμφάνιση λευκών κηλίδων σε φυλλικούς δίσκους 6 ημέρες μετά το μετασηματισμό. (Β), (Γ), (Δ) Το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα που εμφανίζεται στις διαγονιδιακές σειρές, πιο έντονο στο διπλό

μετάλλαγμα. (ΣΤ), (Ζ) Σύγκριση ανάμεσα σε κάλους αγρίου τύπου και μετασχηματισμένους στις δύο σειρές, με εμφανή τα σημάδια καταπόνησης στους μετασχηματισμένους

Ένα ακόμα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό που εμφανίζεται στα φυτά σε μεταγενέστερα στάδια της ιστοκαλλιέργειας είναι η ανάπτυξη άνθους ενώ βρίσκονται μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα, σε κατάλληλα δοχεία ανάπτυξης. Σε κάποια από αυτά μάλιστα ήταν δυνατή η συλλογή σπερμάτων κατευθείαν μέσα από το ειδικό δοχείο ιστοκαλλιέργειας στο οποίο αναπτύσσονταν, χωρίς να χρειαστεί να φυτευτούν στο χώμα (Εικόνα 10) Το παραπάνω



Εικόνα 10. Φυτά σε διαφορετικό στάδιο της ιστοκαλλιέργειας με χαρακτηριστική ανάπτυξη siliques (κόκκινο βέλος)

χαρακτηριστικό παρατηρείται σε φυτά και των τεσσάρων κατασκευών (g1+g2, g2, g1, DXS_{WT}).

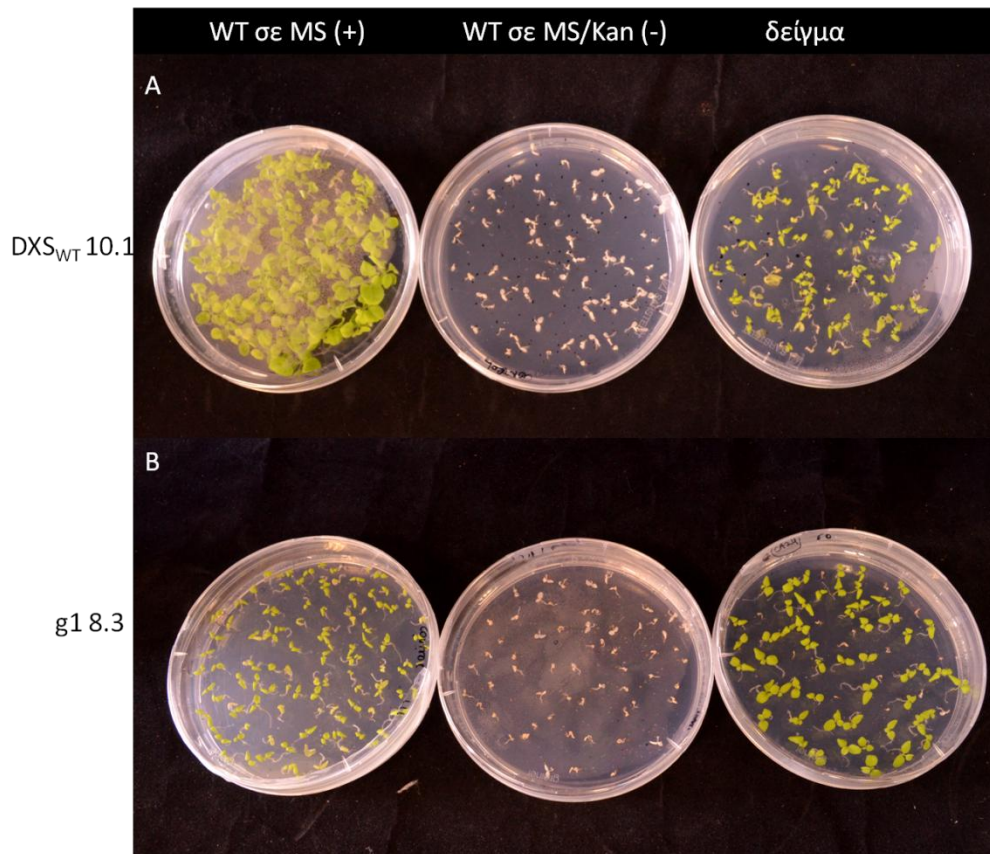
Η απόδοση της διαδικασίας της ιστοκαλλιέργειας δεν ήταν η επιθυμητή για τις κατασκευές g2 και g1+g2. Το κυριότερο πρόβλημα ήταν η αδυναμία

ανάπτυξης των κάλλων ή φυτών στα διάφορα στάδια. Ένας λόγος για αυτό θα μπορούσε να είναι η

παρατήρηση πολλών μεταλλαγών (κατά την αλληλούχηση της κατασκευής) στην κασέτα που προσδίδει ανθεκτικότητα στην υδρομυκίνη στην κατασκευή pICH86988::sgRNA2.

Ανάλυση διάσχισης (segregation analysis)

Για τη δημιουργία των γενετικά τροποποιημένων φυτών *N. benthamiana* χρησιμοποιείται η μέθοδος του γενετικού μετασχηματισμού φυλλικών δίσκων με τη χρήση του αγροβακτηρίου *A. tumefaciens*. Με αυτή τη μέθοδο το διαγονίδιο μπορεί να εντεθεί μια ή παραπάνω φορές στο γονιδίωμα του φυτού (Clemente, 2006). Ωστόσο, οι παραπάνω από μια ενθέσεις αποτελούν πρόβλημα για τη μετέπειτα δημιουργία ομόζυγων σειρών που θα εκφράζουν σταθερά το γονίδιο. Επίσης οι ενθέσεις σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους μπορεί να επάγουν την RNA σίγηση του διαγονιδίου και να μην εκφράζεται (Cerutti, 2003). Για τον υπολογισμό του αριθμού των ενθέσεων διαγονιδιακές σειρές που δημιουργήθηκαν προσδιορίζεται ο διαχωρισμός του εκάστοτε γονιδίου στην T1 γενιά. Μέχρι το πέρας της παρούσας διπλωματικής εργασίας αναλύθηκαν σειρές g1 και DXS_{WT}, καθώς από τις σειρές g1+g2 και g2 δεν παραλήφθηκαν σπέρματα ή καθυστέρησαν αντίστοιχα.



Εικόνα 11. Ανάλυση διάσχισης του διαγονιδίου σε φυτά που προέκυψαν από σπέρματα της T0 γενιάς. Το θρεπτικό μέσο περιέχει καναμυκίνη σε συγκέντρωση 100 mg/l

Η ανάλυση διάσχισης των διαγονιδίων DXS_{WT} και $g1$ έγινε με τη βλάστηση των σπόρων από τα φυτά της T0 γενιάς σε θρεπτικό μέσο με το αντιβιοτικό καναμυκίνη (Εικόνα 11). Ως μάρτυρες χρησιμοποιούνται σπέρματα από φυτά αγρίου τύπου σε θρεπτικό MS με το αντιβιοτικό επιλογής ή χωρίς αντιβιοτικό ως αρνητικοί ή θετικοί μάρτυρες αντίστοιχα. Τα τρυβλία τοποθετούνται τελικά σε θάλαμο ανάπτυξης για περίπου 25 ημέρες μέχρι να υπάρχει ξεκάθαρο αποτέλεσμα στην διαδικασία της επιλογής μέσω του αντιβιοτικού επιλογής. Τα νεκρά και ζωντανά φυτά καταμετρούνταν και γινόταν αντιστοίχιση του ποσοστού τους σε έναν αριθμό ενθέσεων. Τα μετασηματισμένα φυτά είναι ανθεκτικά λόγω του γονιδίου ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη που είναι συντηγμένο με το γονίδιο του ενδιαφέροντος. Αν το διαγονίδιο έχει εντεθεί μια φορά θα πρέπει ο διαχωρισμός του στους απογόνους της T1 γενιάς να ακολουθεί τον 1ο νόμο του Μέντελ σύμφωνα με τον οποίο το $\frac{1}{2}$ των απογόνων είναι ετερόζυγοι, το $\frac{1}{4}$ ομόζυγοι και το $\frac{1}{4}$ δεν έχει το διαγονίδιο. Άρα τα $\frac{3}{4}$ των απογόνων θα πρέπει να επιβιώνουν στην καναμυκίνη (K^R) και το $\frac{1}{4}$ να πεθαίνει (K^S). Η σύγκριση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα βλάστησης σε καναμυκίνη ανά διαγονιδιακή σειρά που πραγματοποιούνται, έγινε με το στατικό κριτήριο χ^2 χρησιμοποιώντας το διαδικτυακό λογισμικό GraphPad Software QuickCalcs (Graphpad, 2016). Η μηδενική υπόθεση (H_0) που θέσαμε είναι ότι οι παρατηρούμενες τιμές των πειραμάτων δεν διαφέρουν από τις αναμενόμενες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του χ^2 ελέγχου η μηδενική υπόθεση δεν απορρίπτεται σε καμία από τις διαγονιδιακές σειρές (p -value > 0.05) (Πίνακας 6). Αυτό σημαίνει ότι το διαγονίδιο είναι πιθανόν να έχει εντεθεί μια φορά σε όλες τις σειρές.

Πίνακας 6. Οι διαγονιδιακές σειρές φυτών που φέρουν μία ένθεση του διαγονιδίου σύμφωνα με τον αριθμό των νεκρών φυτών (αυτών που δεν επιβιώνουν στην καναμυκίνη(K^S)) και τη μέθοδο χ²

Όνομασία	Σειρά	K ^S /Σύνολο	K ^S /100	χ ²	p-value
DXS _{WT}	6.2	17/71	23,9/100	0,053	0,8174
	7.9	21/77	27,3/100	0,213	0,6442
	9.1	22/96	23/100	0,213	0,6442
	9.2	19/84	22,6/100	0,213	0,6442
	10.1	16/81	19,75/100	1,33	0,2482
g1	8.3	18/80	22,5/100	0,480	0,4884
	8.4	16/69	23,2/100	0,213	0,6442

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μέθοδος της ιστοκαλλιέργειας φυτών αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την παραγωγή χρήσιμων δευτερογενών μεταβολιτών. Για την αύξηση της ποσότητας παραγωγής και κατά συνέπεια την εμπορική εκμετάλλευση των προϊόντων, οι ερευνητικές προσεγγίσεις έχουν εστιάσει στην βελτιστοποίηση των συνθηκών της καλλιέργειας. Η πρόσφατη πρόοδος στη μοριακή βιολογία και την ενζυμολογία των φυτικών κυτταροκαλλιιεργειών δείχνουν πως αυτό το σύστημα μπορεί να αποτελέσει πηγή παραγωγής σημαντικών δευτερογενών μεταβολιτών (Zhu et al., 2007).

Η παραγωγή των τερπενοειδών ρυθμίζεται στο κύτταρο και η ποσότητα παραγωγή τους ρυθμίζεται από ρυθμιστικά στάδια (rate limiting steps) από το MEP μονοπάτι. Το ένζυμο DXS καταλύει το πρώτο βήμα του μονοπατιού και έχει αναγνωριστεί ως 'στενωπός' (bottleneck) (Estévez et al., 2001).

Το ένζυμο συνθάση του 1-δεοξυ-D-ξυλουλόζη-5-φωσφορικού οξέος (1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase, DXS) είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο της παραγωγής τερπενοειδών στα πλαστίδια, συμμετέχοντας στη δημιουργία των βασικών δομικών λίθων. Όπως προαναφέρθηκε, η θέση του στο MEP μονοπάτι καθιστά το DXS βασικό στόχο βιοτεχνολογικής μελέτης στη προσπάθεια βελτιστοποίησης της παραγωγής τερπενίων. Σε πολλές μελέτες έχουν επιτευχθεί υψηλότερα επίπεδα παραγωγής τερπενοειδών μέσω της υπερέκφραση του ενζύμου. Επιτυχημένες προσπάθειες για την υπερέκφραση του ενζύμου έχουν γίνει σε σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* με επακόλουθη (Lv et al., 2013). Ωστόσο, τα συστήματα ετερόλογης έκφρασης σε προκαρυώτες (πχ στα βακτήρια *Escherichia coli*) δεν είναι πάντα τα κατάλληλα για την υπερπαραγωγή τερπενοειδών ενώσεων καθώς προκύπτουν προβλήματα κατά την μετα-μεταφραστική τροποποίηση των προϊόντων των διαγονιδίων- ενζύμων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των τερπενοειδών, ενώ δεν υπάρχει πάντα ολόκληρος ο βιοσυνθετικός μηχανισμός, σε αντίθεση με την παραγωγή τερπενοειδών *in planta* (Ikram et al., 2015).

Στο πρώτο κομμάτι της παρούσας εργασίας παράγονται σταθερά μετασηματισμένα μέσω της τεχνικής της ιστοκαλλιέργειας, τα οποία θα παρουσιάζουν αυξημένη μεταβολική σύνθεση τερπενοειδών λόγω της υπερέκφρασης του DXS, βασικού ενζύμου του βιοσυνθετικού μονοπατιού MEP. Στόχος είναι η χρησιμοποίηση των εν λόγω φυτών ως

πλατφόρμες για βελτιστοποίηση της έκφρασης δευτερογενών μεταβολιτών μέσω αγροεμποτισμού. Το γονίδιο για το DXS απομονώθηκε από το φυτό *Cistus creticus* και κλωνοποιήθηκε στο εργαστήριο του Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας ΠΚ Σωτήρη Καμπράνη. Η κλωνοποίηση έγινε σε φορέα υπερέκφρασης υπό τον έλεγχο του υποκινητή CaMV 35S. Στην παρούσα εργασία, το πλασμίδιο με την κατασκευή (pBIN-pROK::DXS) χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηριακών στελεχών *A. tumefaciens* LBA 4404. Τα τροποποιημένα βακτηριακά στελέχη επωάστηκαν με φυλλικούς δίσκους *Nicotiana benthamiana* και ακολούθως οι δίσκοι τοποθετήθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο με αντιβιοτικό επιλογής για το πλασμίδιο και συνθήκες όπου πέρασαν τα διάφορα στάδια ανάπτυξης που παρατηρούνται στην ιστοκαλλιέργεια. Ακολούθησαν αρκετές εβδομάδες παρακολούθησης μέχρι τα νερά πλέον φυτά να τοποθετηθούν στο χώμα και να παράγουν σπέρματα. Τα σπέρματα εμφυτεύθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο και ακολούθησε η ανάλυση διάσχισης, παρέχοντας πληροφορίες για τον υπολογισμό των ενθέσεων του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του εκάστοτε φυτού.

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, τα φυτά παρατηρούνταν τακτικά στα διάφορα στάδια, και φάνηκε να αναπτύσσονται φυσιολογικά. Ωστόσο, παρατηρήθηκε πρόωρη άνθιση και ανάπτυξη σπερμάτων σε κάποια νεαρά φυτά, πριν ακόμα τοποθετηθούν στο χώμα. Τα σπέρματα ήταν λιγότερα από τα κανονικά αλλά δεν εμφάνιζαν φαινοτυπικές διαφορές σε σχέση με τα φυτιολογικά. Η διαφοροποίηση αυτή πιθανά να οφείλεται σε συνθήκες πίεσης που υπήρξαν κατά τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας. Σύμφωνα με τους Onaga και συνεργάτες (Onaga et al., 2014), το πρωτογενές αβιοτικό στρες στους φυτικούς οργανισμούς (συχνότητα και ποσότητα φωτός, ξηρασία, αλατότητα, υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία κ.α.) συνδέεται συχνά με κυτταρικές βλάβες και δευτερογενείς συνθήκες στρες, προκαλώντας μεταξύ άλλων και μεταβολές στα επίπεδα ρυθμιστικών πρωτεϊνών της ανάπτυξης.

Για την εξέλιξη της παραπάνω πειραματικής προσέγγισης, θα ακολουθήσει η εξακρίβωση έλεγχου των μεταγραφικών επιπέδων του διαγονιδίου (με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR) στα διαγονιδιακά φυτά που φέρουν μονό αντίγραφο του ενθέματος. Στην περίπτωση που διαπιστωθεί ότι η T1 γενιά παρουσιάζει χαμηλά μεταγραφικά επίπεδα του διαγονιδίου, είναι σημαντικό να διαπιστωθεί η θέση ένθεσης τού στο γονιδίωμα του φυτού μέσω ανάλυση κατά Southern, καθώς η θέση και ο αριθμός των ενθέσεων θα μπορούσαν να επηρεάζουν το μεταγραφικό ρυθμό του διαγονιδίου. Στη συνέχεια, με προσεγγίσεις γενετικής μηχανικής τα φυτά που παρουσιάζουν τη βέλτιστη έκφραση του ενζύμου θα χρησιμοποιηθούν ως πλατφόρμες υπερέκφρασης τερπενίων σε μία συγκριτική μελέτη ως προς την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος ανάμεσα σε φυτά αγρίου τύπου, φυτά που φέρουν το διαγονίδιο DXS αγρίου τύπου (DXS_{WT}) και σε φυτά που φέρουν το διαγονίδιο με τη σημειακή μεταλλαγή (Εισαγωγή ένδοξη 'Το ένζυμο DXP συνθάση (DXS)').

Στο δεύτερο μέρος της συγκεκριμένης μελέτης ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως, με στόχο τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών ολικής απώλειας λειτουργίας του γονιδίου που κωδικοποιεί για την 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), προσδέεται στο RNA του ιοειδούς PSTVd

και πιθανά διαδραματίζει κάποιον ρόλο κατά τη μόλυνση του φυτού από το ιοειδές (Qiu Lv et al., 2016).

Για τη δημιουργία των φυτών επιλέχθηκε το σύστημα CRISPR/Cas9, ως μέσο στοχευμένης καταστολής της λειτουργίας του γονιδίου. Σχεδιάστηκαν δύο μόρια guide RNAs από το διδακτορικό φοιτητή Ιωάννη Βλατάκη, συντέθηκαν από εταιρεία και κλωνοποιήθηκαν από τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Βίλυ Μιχαλοπούλου σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς. Με την εισαγωγή και των δύο στα φυτικά κύτταρα, θα είναι δυνατή η διαγραφή ενός ολόκληρου τμήματος του επιθυμητού γονιδίου, εξασφαλίζοντας την καταστολή του (Frock et al., 2014). Η χρήση ενός μορίου οδηγού- RNA, οδηγεί σε σημειακές μεταλλάξεις. Συνεπώς δεν είναι απόλυτα σίγουρο πως θα οδηγήσει σε ολική απώλεια λειτουργίας του γονιδίου (Mali et al., 2013).

Στην παρούσα προσέγγιση δοκιμάστηκε η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών που φέρουν το ένα (pICH86988::sgRNA1- φυτά g1), το δεύτερο (pICH86988::sgRNA2- φυτά g2) ή και τα δύο μόρια sgRNA (sgRNA1 +sgRNA2- φυτά g1+g2). Κατά την παρατήρηση των φυτών στα διάφορα στάδια της ιστοκαλλιέργειας, οι φυλλικοί δίσκοι g2 και g1+ g2 παρουσίασαν συμπτώματα έντονης καταπόνησης (χλώρωση των φυλλικών δίσκων, μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας, εμφάνιση καφέ χρώματος στου κάλους, πρόωρη άνθιση, στείρα φυτά), που αρχικά αποδόθηκαν σε εσφαλμένους χειρισμούς. Μετά την επανάληψη της ιστοκαλλιέργειας με βέλτιστες συνθήκες, τα συμπτώματα συνέχισαν να εμφανίζονται. Τελικά κάποια φυτά τοποθετήθηκαν στο χώμα αλλά από τα φυτά g1+g2 μόνο ένα έδωσε σπέρματα. Οι φαινοτυπικές αυτές παρατηρήσεις θα μπορούσαν να αποδοθούν στο αντιβιοτικό υγρομυκίνη, το οποίο τοποθετούνταν στην ιστοκαλλιέργεια ως αντιβιοτικό επιλογής για τα φυτά g2. Παρατηρήθηκε μικρός αριθμός από διαφορετικά νουκλεοτίδια μετά από αλληλούχιση της κασέτας για την ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη, υποδεικνύοντας την πιθανότητα δυσλειτουργίας της εν λόγω πλασμιδιακής περιοχής, με επακόλουθη την μειωμένη ανθεκτικότητα των φυτών στο αντιβιοτικό.

Στη συνέχεια της εργασίας, τα διαγονιδιακά φυτά που ελέγχθηκαν για τη μοναδικότητα του ενθέματος στο γονιδίωμα τους, θα διασταυρωθούν με φυτά που εκφράζουν την πρωτεΐνη Cas9 και θα γίνει αναζήτηση στους απογόνους των φυτών αυτών για σημειακές μεταλλάξεις ή ελλείψεις, που θα δείχνουν τη λειτουργία του συστήματος CRISPR/Cas9. Τα φυτά αυτά θα αυτογονιμοποιηθούν και οι ομόζυγοι απόγονοί τους θα χρησιμοποιηθούν σε πειραματικές προσεγγίσεις συμπληρωματικότητας και μόλυνσης με το ιοειδές για την εξακρίβωση του ρόλου της Virp1.

Μέρος 2^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρήση των φυτών ως πλατφόρμα παραγωγής ενζύμων

Το βακτήριο *Escherichia coli*, είδη μυκήτων και κυτταρικές σειρές από ζώα, έχουν παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί ως ετερόλογα συστήματα έκφρασης για την παραγωγή φαρμακευτικών πρωτεϊνών αλλά και βιομηχανικών ενζύμων. Όμως, αυτά τα συμβατικά συστήματα έκφρασης περιορίζονται συχνά από το υψηλό κόστος, πιθανούς κινδύνους μόλυνσης των προϊόντων, και τη δυσκολία για την αύξηση της παραγωγικότητας. Τα φυτά αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο σύστημα έκφρασης λόγω των ποικίλων πλεονεκτημάτων που προσφέρουν: Χαμηλό κόστος παραγωγής, ευκολία στην αύξηση της παραγωγής σε εμπορικές ποσότητες και μειωμένοι κίνδυνοι μόλυνσης των προϊόντων από ζωικούς ιούς ή τοξίνες (Πίνακας 7). Η ανθρώπινη ινσουλίνη αποτέλεσε την πρώτη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που παράχθηκε (το 1982), εγκρίθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και κυκλοφόρησε στην αγορά. Από τότε, πληθώρα εμπορικών πρωτεϊνών και άλλων φαρμακευτικών σκευασμάτων έχει παραχθεί σε φυτά.

Πίνακας 7. Σύγκριση της παραγωγής πρωτεϊνών στα διάφορα συστήματα. (α) υπολειπόμενες ικές αλληλουχίες, ογκογονίδια, ενδοτοξίνες (b) μεγάλοι και ακριβοί ζυμωτήρες (Singhabahu et al., *Transgenesis and Secondary metabolism*, 2016)

	Transgenic plants	Plant cell cultures	Yeast	Bacteria	Mammalian cell cultures	Transgenic animals
Cost/storage	Cheap/RT	Cheap/-20 °C	Cheap/-20 °C	Cheap/-20 °C	Expensive	Expensive
Contamination risk	No	No	No	Yes	Yes	Yes
Distribution	Easy	Easy	Feasible	Feasible	Difficult	Difficult
Gene size	Not limited	Limited	Unknown	Unknown	Limited	Limited
Glycosylation	“Correct?”	“Correct?”	Incorrect	Absent	“Correct”	“Correct”
Multimeric protein assembly	Yes	No	No	No	No	Yes
Production cost	Low	Low	Medium	Medium	High	High
Product quality	High	High	Medium	Low	High	High
Production scale	Worldwide	Worldwide	Limited	Limited	Limited	Limited
Production vehicle	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Propagation	Easy	Feasible	Easy	Easy	Hard	Feasible
Protein folding accuracy	High?	High?	Medium	Low	High	High
Protein homogeneity	High?	Medium	Medium	Low	Medium	High
Protein yield	High	Very high	High	Medium	Medium-high	High
Public perception of risk	High	High	Medium	Low	Medium	High
Safety	High	High	Unknown	Low	Medium	High
Scale-up costs	Low	Low	High ^b	High ^b	High ^b	High
Therapeutic risk ^a	Unknown	Unknown	Unknown	Yes	Yes	Yes
Time required	Medium	Low	Medium	Low	High	High

Υπάρχουν 4 βασικά συστήματα έκφρασης ξένων πρωτεϊνών που βασίζονται σε φυτικούς οργανισμούς: Τα διαγονιδιακά φυτά, τα φυτά που φέρουν μετασηματισμένους χλωροπλάστες, η παροδική έκφραση σε φυτά και οι κυτταροκαλλιέργεια. Κάθε σύστημα έχει τα δικά του χαρακτηριστικά και πλεονεκτήματα. Στη συνέχεια θα αναλυθεί περισσότερο το σύστημα της παροδικής έκφρασης.

Το σύστημα της παροδικής έκφρασης παρέχει το σημαντικό πλεονέκτημα της ταχύτατης παραγωγής των πρωτεϊνών. Είναι δηλαδή δυνατή η παραγωγή σημαντικών ποσών μίας πρωτεΐνης σε χρονικό διάστημα ημερών ή εβδομάδων, κάτι μη εφικτό με το σύστημα των σταθερά μετασχηματισμένων φυτών. Ο χρόνος αποτελεί ιδιαίτερα κρίσιμο στοιχείο σε περιπτώσεις όπως η πανδημία της γρίπης A/H1N1 το 2009, που ήταν απαραίτητη η άμεση παραγωγή εμβολίου σε μεγάλες ποσότητες (Tremblay et al. 2011). Το δεύτερο πολύ σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της κατηγορίας είναι η απλότητα και η ευκολία του συστήματος, καθώς δεν χρειάζεται ακριβό εξοπλισμό, δεν βασίζεται σε ενσωμάτωση ξένων γονιδίων στο γονιδίωμα του φυτού, οπότε η έκφραση δεν επηρεάζεται από φαινόμενα θέσης (Sheludko et al., 2008).

Έχουν αναπτυχθεί τουλάχιστον δύο διαφορετικές προσεγγίσεις για την παροδική έκφραση: Ο αγροεμποτισμός του φυτικού ιστού με μετασχηματισμένα στελέχη *Agrobacterium tumefaciens* και η μόλυνση με τροποποιημένους ιικούς φορείς. Κατά τον αγροεμποτισμό, τα βακτήρια φέρουν το T-DNA με ενσωματωμένο το προς έκφραση γονίδιο και εισέρχονται στον ιστό με μηχανική πίεση. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται με επιτυχία για την παραγωγή βιο φαρμακευτικών ουσιών (Pogue et al. 2010). Από την άλλη πλευρά, η μέθοδος της ιικής μόλυνσης στηρίζεται στη χρήση φυτικών ιών σαν φορείς για την είσοδο ξένων γονιδίων στα φυτά. Το βασικό πλεονέκτημα σε αυτή την περίπτωση είναι τα γρήγορα και υψηλά επίπεδα παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, αφού οι ιικοί φορείς είναι ικανοί να μολύνουν συστημικά όλα τα κύτταρα του φυτού μετά τον εμβολιασμό, δημιουργώντας πολλά μετάγραφα του γονιδίου Fischer and Emans 2000). Οι ιοί *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Potato Virus X* (PVX) έχουν συμβάλει στην παραγωγή φαρμακευτικών πρωτεϊνών και αντισωμάτων (Canizares et al. 2005; Lico et al. 2008; Regnard et al. 2010). Μειονεκτήματα αυτής της προσέγγισης αποτελούν η πιθανή διασπορά των ιικών φορέων στο περιβάλλον και ο περιορισμός στο μέγεθος της ένθεσης που θα χρησιμοποιηθεί (Yusibov et al. 1997). Για την υπέρβαση των παραπάνω δυσκολιών, η Icon Genetics (Halle, Germany) ανέπτυξε ένα σύστημα 'αποικοδομημένων' ιικών φορέων που βασίζεται στον TMV, γνωστό ως magniCON. Το σύστημα αυτό συνδυάζει τα πλεονεκτήματα του Αγροβακτηρίου με την ταχύτητα και το ποσοστό έκφρασης των ιικών φορέων (Gils et al. 2005). Επίσης, οι ιικοί φορείς στερούνται CP πρωτεϊνών (coat proteins) και έτσι είναι αδύνατη η εξάπλωσή τους στο περιβάλλον. Η αποτελεσματικότητα του συστήματος είναι μεγάλη, καθώς οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης 100 φορές (πχ παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων ποσότητας 0.5 g of mAb / kg βιομάζας φύλλων [Giritch et al. (2006)]).

Στη συγκεκριμένη εργασία επιλέγεται η έκφραση ενός εμπορικού ενζύμου που ανήκει στην κατηγορία των γλυκοαμιδασών. Ακολουθεί περαιτέρω ανάλυση.

Το αντικείμενο της γλυκοβιολογίας

Η γλυκοβιολογία αποτελεί έναν ανερχόμενο πεδίο έρευνας που σχετίζεται με τη δομή, τη βιοσύνθεση και τη βιολογία των γλυκανών και των πρωτεϊνών που τις αναγνωρίζουν. Γενικά είναι αποδεκτή η χρήση του όρου γλυκάνες, για την αναφορά στα σάκχαρα που μετέχουν στις γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια. Οι ρίζες της γλυκοβιολογίας βρίσκονται στον

τομέα της χημείας και βιοχημείας των υδατανθράκων. Η χημεία και ο μεταβολισμός των υδατανθράκων αποτέλεσαν εξέχοντα ερευνητικά θέματα το πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα. Αρχικά, οι υδατάνθρακες θεωρούνταν πηγές ενέργειας και δομικά στοιχεία, χωρίς άλλο βιολογικό ρόλο. Ακόμα, κατά την αρχική φάση της 'μοριακής επανάστασης' του 1970, η μελέτη των γλυκανών καθυστέρησε, σε σχέση με τις υπόλοιπες τάξεις μορίων. Αυτό συνέβη, λόγω της δομικής τους πολυπλοκότητας, της μεγάλης δυσκολίας στην αναγνώριση των αλληλουχιών τους, και το γεγονός ότι η βιοσύνθεσή τους δεν μπορεί να προβλεφθεί απευθείας από το DNA. Με την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών έγινε δυνατή η περαιτέρω μελέτη της μοριακής και κυτταρικής βιολογίας των γλυκανών, αλλά και της ένωσής τους με πρωτεΐνες και λιπίδια (Varki and Sharon, Essentials of Glycobiology. 3rd edition, 2017).

Στη συνέχεια, θα εστιάσουμε περισσότερο στις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών και υδατανθράκων, των επονομαζόμενων πρωτεογλυκανών.

Οι πρωτεογλυκάνες

Οι βασικές δομικές μονάδες των πρωτεογλυκανών είναι οι μονοσακχαρίτες

Οι μονοσακχαρίτες είναι υδατάνθρακες που δεν μπορούν να υδρολυθούν σε απλούστερα τμήματα. Διακρίνονται σε τριόζες (γλυκερόλη), τετρόζες (θρεόζη, ερυθρόζη), πεντόζες (ριβόζη, βασικά στοιχεία των νουκλεϊκών οξέων), εξόζες (περισσότεροι υδατάνθρακες με χαρακτηριστική την D-γλυκόζη), ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων του άνθρακα που περιέχουν. Οι μονοσακχαρίτες αντιδρούν μεταξύ τους σε μία αντίδραση ανάμεσα σε ημιακετάλες και αλκοόλες, που οδηγεί στην απόσπαση ενός μορίου νερού, σχηματίζοντας έτσι το γλυκοζιτικό δεσμό. Ανάλογα με το ισομερές που μετέχει σε μία τέτοια αντίδραση ο δεσμός που σχηματίζεται ονομάζεται α- ή β-. Η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ των μονοσακχαριτών, έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό δισακχαριτών ή ολιγοσακχαριτών αρχικά. Ενώ η ένωση που σχηματίζεται με τη συμμετοχή περισσότερων από 10 μονάδων μονοσακχαριτών αποτελεί ένα πολυσακχαρίτη. Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να ενωθούν μεταξύ τους με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, ανάλογα με τη θέση του επόμενου μονοσακχαρίτη.

Ο γλυκοσύνδεσμος (glycosonjugate) είναι μία ένωση στην οποία ένας ή περισσότεροι μονοσακχαρίτες ή μονάδες ολιγοσακχαριτών (the glycane) είναι ομοιοπολικά προσδεδεμένα σε μη υδατανθρακικό τμήμα (the aglycone) (Varki et al., 2017). Οι γλυκάνες μπορεί να αποτελέσουν μεγάλο μέρος του γλυκοσυνδέσμου.

Τα κύρια συστατικά του σακχαρικού τμήματος των πρωτεογλυκανών είναι οι εξόζες, οι οποίες αποτελούνται από έξι άτομα άνθρακα τέσσερα εκ των οποίων είναι ασύμμετρα (4 διαφορετικοί υποκαταστάτες). Παρά τη μεγάλη δυνατότητα επιλογών μόνο λίγες από τις πιθανές εξόζες συναντώνται στους γλυκοσυνδέσμους. Τέτοια παραδείγματα χαρακτηριστικών εξοζών φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 1.)

Πίνακας 1. Παραδείγματα κοινών μονοσακχαριτών σε κύτταρα Σπονδυλωτών με τις συντομογραφίες τους (Βοργιάς και Μπυλλάρη, 2003)

Πιθανές εξόζες που συναντώνται στους γλυκοσυνδέσμους
μαννόζη (Man)
γαλακτόζη (Gal)
N-ακετυλογλυκοζαμίνη (GlcNAc)
N-ακετυλογαλακτοζαμίνη (GalNAc)
γλυκουρονικό οξύ (GlcA)
Ξυλόζη (Xyl)
φουκόζη (Fuc)
σιαλικό οξύ (N-ακετυλονευραμινικό οξύ) NeuAc

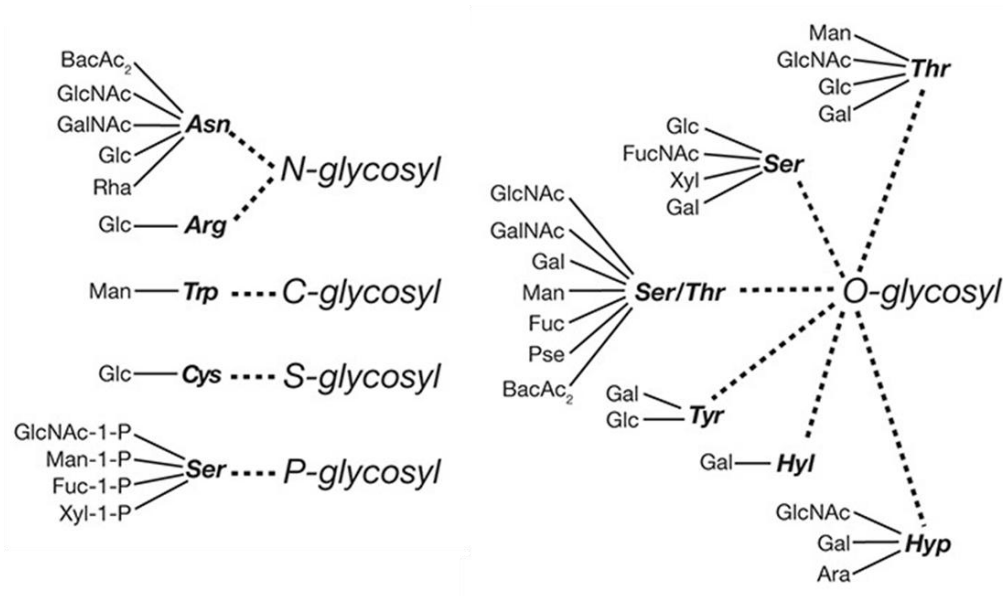
Οι βασικές κατηγορίες των γλυκανών

Οι βασικές κατηγορίες των γλυκανών ορίζονται με βάση τη φύση του δεσμού με τον οποίο ενώνεται ο υδατάνθρακας στην πρωτεΐνη ή το λιπίδιο. Η σύνδεση μεταξύ πρωτεΐνης και σακχάρου γίνεται μέσω ενός ατόμου αζώτου (N-σύνδεση) ή μέσω ενός ατόμου οξυγόνου (O-σύνδεση). Στη φύση έχουν εντοπιστεί και κάποιες άλλες κατηγορίες, ελάχιστα μελετημένες (Εικόνα 12).

Στην πρώτη περίπτωση, μια N- γλυκάνη [N-glycan (N-linked oligosaccharide, N-[Asn]-linked oligosaccharide)] είναι μία αλυσίδα υδατάνθρακα ομοιοπολικά προσδεδεμένη σε ένα κατάλοιπο Ασπαραγίνης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που συνήθως περιλαμβάνει κατάλοιπα GlcNAc στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και την πεπτιδική αλληλουχία Asn-X-Ser/Thr.

Στην πρώτη περίπτωση, μια N- γλυκάνη [N-glycan (N-linked oligosaccharide, N-[Asn]-linked oligosaccharide)] είναι μία αλυσίδα υδατάνθρακα ομοιοπολικά προσδεδεμένη σε ένα κατάλοιπο Ασπαραγίνης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που συνήθως περιλαμβάνει κατάλοιπα GlcNAc στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και την πεπτιδική αλληλουχία Asn-X-Ser/Thr.

Στη δεύτερη περίπτωση, μία O- γλυκάνη [O-glycan (O-linked oligosaccharide)] συνήθως ενώνεται με το πολυπεπτίδιο μέσω GalNAc, σε μία ομάδα καταλοίπων σερίνης ή θρεονίνης. Έχουν βρεθεί διάφοροι τύποι O- γλυκανών όπως οι μουκίνες (μεγάλες γλυκοπρωτεΐνες που φέρουν πολλές O- γλυκάνες), η γλυκόζη, η μαννόζη κ.α.



Εικόνα 12. Κατηγορίες σύνδεσης ανάμεσα σε γλυκάνες και πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί στη φύση. (Hyl) hydroxylysine; (Hyp) hydroxyproline; (C-term) carboxy-terminal amino acid residue. (Spiro et al., 2002)

Η χρησιμότητα των γλυκανών

Μία τόσο ποικίλη κατηγορία μορίων είναι λογικό να επιτελεί εξίσου ποικίλους ρόλους, κάποιες φορές κρίσιμους για την ανάπτυξη, την αύξηση ή την επιβίωση των οργανισμών. Οι γενικότερες κατηγορίες στις οποίες συμμετέχουν είναι: (i) δομικές και ρυθμιστικές λειτουργίες, (ii) ειδική αναγνώριση των γλυκανών από εξειδικευμένες πρωτεΐνες πρόσδεσης (λεκτίνες και GAG binding proteins). Ακόμα, πολλά φυσικά βιοενεργά μόρια αποτελούν γλυκοσυνδέσμους και οι προσδεδεμένες γλυκάνες μπορεί να επηρεάσουν δραματικά την βιοσύνθεση, τη σταθερότητα και τη δράση αυτών των μορίων στους οργανισμούς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η γλυκοζαμινογλυκάνη ηπαρίνη και τα παράγωγά της, που αποτελούν ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα (Sarrazin et al., 2011). Για τους παραπάνω λόγους, η γλυκοβιολογία και η χημεία των υδατανθράκων έχουν αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία στη σύγχρονη βιοτεχνολογία. Η εξασφάλιση πατέντας για ένα γλυκοπρωτεϊνικό φάρμακο, η αποδοχή του από τον παγκόσμιο οργανισμό φαρμάκων (FDA) αλλά και η παραγωγή του, περιλαμβάνουν την γνώση της δομής των γλυκανών που περιέχει. Επιπλέον, η κατηγορία των γλυκοπρωτεϊνών, που περιλαμβάνει μονοκλωνικά αντισώματα, ένζυμα και ορμόνες, αποτελεί αυτή τη στιγμή το κυριότερο προϊόν της βιομηχανίας της βιοτεχνολογίας, με πωλήσεις δεκάδων δισεκατομμυρίων δολαρίων κάθε χρόνο (Varki A. et al., Essentials of Glycobiology, 3rd edition, 2017).

Γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών

Η προσθήκη σακχάρων σε πρωτεΐνες αποτελεί μία από τις πιο σύνθετες και ποικιλόμορφες κατηγορίες συν και μετα- μεταφραστικών τροποποιήσεων για μία πρωτεΐνη. Για μεγάλο χρονικό διάστημα, η επιστημονική κοινότητα ήταν πεπεισμένη πως η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών συνέβαινε μόνο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αλλά αυτό καταρρίφθηκε με την ανακάλυψη της ύπαρξής της σε βακτήρια και Αρχαία (Abu-Qarn et al., 2008a). Υπάρχουν πέντε βασικές κατηγορίες ομοιοπολικών γλυκοζιτικών δεσμών όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα (*N*-glycosidic bonds, *O*-glycosidic bonds, *C*-mannosyl bonds, phosphoglycosyl bonds and theglycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors) (Spiro, 2002). Έχει διατυπωθεί η υπόθεση πως περίπου το μισό πρωτέωμα ενός ευκαρυωτικού οργανισμού είναι γλυκοζυλιωμένο, και το 90% αυτών των γλυκοπρωτεϊνών ανήκουν στην κατηγορία των *N*- γλυκοζυλιωμένων (Arweiler et al., 1999).

Η γλυκοζυλίωση αποτελεί έναν απαραίτητο μηχανισμό για πολλές βιολογικές διεργασίες. Οι περισσότεροι οργανισμοί παράγουν και ένζυμα τα οποία που μπορούν να απομακρύνουν ολόκληρους υδρογονάνθρακες από τις γλυκοπρωτεΐνες, μια διαδικασία που φαίνεται με όλο και περισσότερα δεδομένα πως είναι βιολογικά σημαντική. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τα ένζυμα που καταλύουν την θραύση ολόκληρων γλυκανών από τις γλυκοπρωτεΐνες.

Από- γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών (protein de glycosilation)

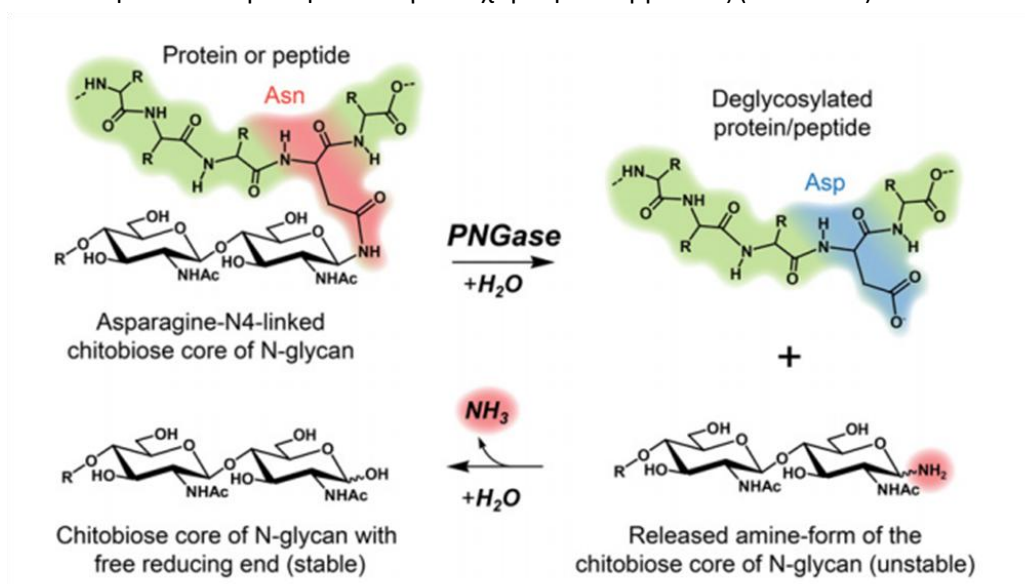
Ο όρος proximal glycanases (PROXlases) προτάθηκε το 1994 από την ερευνητική ομάδα των Suzuki και συνεργατών (Suzuki et al., 1994b). Χρησιμοποιήθηκε για την περιγραφή των ενζύμων που καταλύουν την αφαίρεση ολόκληρων ολιγοσακχαρικών αλυσίδων από γλυκοσυνδέσμους για το σχηματισμό ελεύθερων γλυκανών. Οι PROXlases καταλύουν τη

θραύση του δεσμού ανάμεσα σε μονοσακχαρίτες και την κεντρική πρωτεΐνη ή της ένωσης ανάμεσα σε δύο σάκχαρα, με συνέπεια την απελευθέρωση μόνο ή ολιγοσακχαριτών. Αυτά τα ένζυμα έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω της χρησιμότητάς τους στην έρευνα των γλυκοσυνδέσμων, αφού η ενζυμική απομάκρυνση των γλυκανών γίνεται υπό ήπιες συνθήκες και τα προϊόντα της αντίδρασης παραμένουν ανέπαφα για περαιτέρω χρήση. Σε αντίθεση, η χημική *N*-απογλυκοζυλίωση ή υδραζινόλυση (hydrazinolysis) (Takasaki *et al.*, 1982) είναι μη ειδική, γίνεται υπό τραχύτερες συνθήκες αντίδρασης και δεν οδηγεί πάντα σε προϊόντα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω αναλύσεις. Παρά το ενδιαφέρον για τα προαναφερθέντα ένζυμα ως εργαλεία για δομικές και λειτουργικές μελέτες, έχουν γίνει ελάχιστες έρευνες για το βιολογικό τους ρόλο στους οργανισμούς. Οι PROXlases διακρίνονται σε 5 ομάδες: (i) Peptide:*N*-glycanase (PNGase) (ii) Peptide:*O*-glycanase (POGase), (iii) Cytoplasmic β -*N*-acetylglucosaminidase (*O*-GlcNAcase), (iv) Endo-*N*-glycanase (ENGase), (v) Endoglycoceramidase (EGCase).

Στη συνέχεια θα αναλυθεί περισσότερο η κατηγορία των Peptide:*N*-glycanase (PNGase)

Peptide:*N*-Glycanases (PNGases)

Οι PNGases (EC 3.5.1.52; systematic name: *N*-linked-glycopeptide- (*N*-acetyl- β -D-glucosaminyl)-L-asparagine amidohydrolase; recommended name: Peptide-*N*4-(*N*-acetyl- β -D-glucosaminyl)asparagine amidase; synonyms: PNGase; Glycopeptidase, Glycoamidase, *N*-Glycanase) καταλύουν την απελευθέρωση *N*- γλυκανών από γλυκοπρωτεΐνες και γλυκοπεπτίδια. Καταλύουν τη θραύση του αμιδικού δεσμού ανάμεσα στην *N*-acetyl- β -D-γλυκοζαμίνη και την παρακείμενη ασπαραγινική πλευρική αλυσίδα του πολυπεπτιδίου, οδηγώντας στην μετατροπή του καταλοίπου ασπαραγίνης σε ασπαραγινικό οξύ και την επακόλουθη απελευθέρωση του ολιγοσακχαρίτη και αμμωνίας (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Διαγραμματική απεικόνιση της δράσης της PNGase F σε μια γλυκοπρωτεΐνη. Η αντίδραση οδηγεί στην απελευθέρωση αμμωνίας, του ολιγοσακχαρίτη και του πολυπεπτιδίου που περιέχει το ασπαραγικό οξύ. (Wang *et al.*, 2014)

Η αντίδραση αποτελείται στην πραγματικότητα από δύο βήματα. Το πρώτο βήμα είναι η υδρόλυση του αμιδικού δεσμού και η δημιουργία του ενδιάμεσου προϊόντος 1-αμινο-*N*-

ακετυλο γλυκοζαμίνη και το πολυπεπτίδιο με το ασπαρτικό οξύ. Το δεύτερο βήμα είναι η μη ενζυμική διάσπαση της 1-αμινο-N-ακετυλο γλυκοζαμίνης σε N-ακετυλ γλυκοζαμινο-ολιγοσακχαρίτη και αμμωνία.

Το πρώτο ένζυμο της κατηγορίας PNGase που περιγράφηκε ήταν η PNGase A. Το ένζυμο ανακαλύφθηκε σε αμύγδαλα από την ομάδα των Takahashi και συνεργατών (Takahashi, 1977). Ακολούθησε η ανακάλυψη παρόμοιων πρωτεϊνών σε άλλα φυτά και σπόρους (Berger *et al.*, 1995; Plummer *et al.*, 1987). Μια PNGase ανακαλύφθηκε το 1991 στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Diepold *et al.*, 2007). Το 1992 οι Lhernould και συνεργάτες ανακάλυψαν το πρώτο ένζυμο σε μύκητες, σε κυτταροκαλλιέργεια του φυτού *Silene alba*, ακολουθούμενοι από την ανακάλυψη της PNGase At στον *Aspergillus tubingensis* (Ftouhi-Paquin *et al.*, 1997) και μίας κυτταροπλασματικής PNGase στον *Saccharomyces cerevisiae* (Suzuki *et al.*, 1998). Το 2008 μία κυτταροπλασματική PNGase ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε στον μύκητα *Schizosaccharomyces pombe* (Xin *et al.*, 2008). Η πρώτη PNGase σε βακτήρια ανακαλύφθηκε στο Gram- αρνητικό βακτήριο *Flavobacterium meningosepticum* (Plummer *et al.*, 1984). Αυτό το ένζυμο ονομάστηκε PNGase F και είναι η καλύτερα χαρακτηρισμένη PNGase, ευρέως χρησιμοποιούμενη στις αναλύσεις των N-γλυκανών. Πρόσφατα, χαρακτηρίστηκε μία νέα PNGase από το βακτήριο *Terriglobus roseus* (Wang *et al.*, 2014). εν λόγω ένζυμο δρα σε ιδιαίτερα χαμηλές τιμές pH (2,6) και ονομάστηκε PNGase H+. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την PNGase H+ κλωνοποιήθηκε, και το ένζυμο παράχθηκε με επιτυχία σε *Escherichia coli*. Οι γνωστότερες PNGases φαίνονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Κατανομή των γνωστότερων ενζύμων PNGase

Domain	Source	Name	Reference
Bacteria	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	PNGase F	(Plummer <i>et al.</i> , 1984)
	<i>Terriglobus roseus</i>	PNGase H+	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
Fungi	<i>Silene alba</i> (White champignon)	PNGase Se	(Lhernould <i>et al.</i> , 1992)
	<i>Aspergillus tubingensis</i>	PNGase At	(Ftouhi-Paquin <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	yPng1p	(Suzuki <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SpPNGase	(Xin <i>et al.</i> , 2008)
Plants	<i>Prunus amygdalus</i> (sweet almond)	PNGase A	(Takahashi, 1977)
	<i>Canavalia ensiformis</i> (Jack bean)	PNGase J	(Sugiyama <i>et al.</i> , 1983)
	<i>Pisum sativum</i> (Split pea)	PNGase P	(Plummer <i>et al.</i> , 1987)
	<i>Raphanus sativus</i> (Radish)	PNGase R	(Berger <i>et al.</i> , 1995)
	<i>Glycine max</i> (Soybean)	PNGase GM	(Kimura & Ohno, 1998)
	<i>Oryza sativa</i> (Rice)	PNGase Os	(Chang <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATPNG1	(Diepold <i>et al.</i> , 2007)
Animals	<i>Oryzias latipes</i> (Medaka fish)	PNGase M	(Seko <i>et al.</i> , 1991)
	Mouse (L-929 fibroblasts)	PNGase L-929	(Suzuki <i>et al.</i> , 1994c)
	various mammalian cell cultures	--	(Suzuki <i>et al.</i> , 1993b)
	various mouse organs	mPNGase	(Kitajima <i>et al.</i> , 1995)
	Hen oviduct	PNGase HO	(Suzuki <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	CePNG-1	(Kato <i>et al.</i> , 2007; Suzuki <i>et al.</i> , 2007)

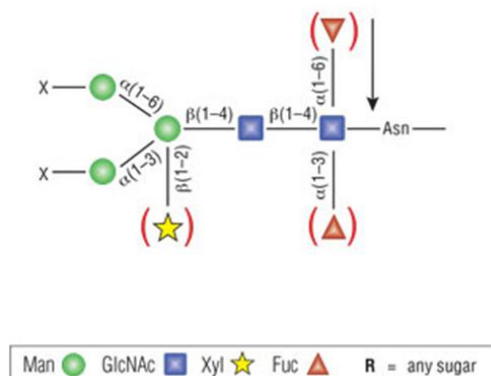
Είναι εντυπωσιακό το ότι όλες οι PNGases που αναφέρονται στον Πίνακα 8 καταλύουν την ίδια αντίδραση, την υδρόλυση του δεσμού ανάμεσα στο πολυπεπτίδιο και την προσδεδεμένη γλυκάνη (β-aspartylglucosaminylamine bond), αλλά ωστόσο διαφέρουν

σημαντικά στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων από τα οποία κωδικοποιούνται, στην πρωτοταγή αμινοξική δομή τους, την τεταρτοταγή δομή, τον υποκυτταρικό εντοπισμό, το μοριακό βάρος, το βέλτιστο pH δράσης, την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και τη βιολογική λειτουργία.

Μία ακόμα κατηγοριοποίηση των PNGase γίνεται με βάση το βέλτιστο pH δράσης τους, που συνήθως συνάδει και με το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο δρουν. Κατηγοριοποιούνται σε κυτοσολικές που δρουν σε ουδέτερο pH και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (cPNGase-neutral) και σε αυτές που δρουν σε όξινο pH (aPNGase-acidic) (Maeda et al., 2014). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν ένζυμα που εντοπίζονται στη ζύμη (Suzuki et al., 2000), σε νηματώδεις (Kato et al., 2002), και σε θηλαστικά (Suzuki et al., 2002). Είναι ευρέως αποδεκτό πως τα εν λόγω ένζυμα βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και συμμετέχουν στην απελευθέρωση N- γλυκανών (high-mannose type) από κακώς διπλωμένες πρωτεΐνες που συναντώνται στο ΕΔ. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα ένζυμα που συναντώνται σε φυτικούς οργανισμούς (PNGase A- Takahashi 1977) και δρουν σε όξινο pH. Το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο δρουν δεν έχει εξακριβωθεί, αλλά έχει διατυπωθεί η υπόθεση πως πιθανά διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην απελευθέρωση N- γλυκανών από γλυκοπεπτίδια που έχουν δημιουργηθεί μετά από πρωτεόλυση γλυκοπρωτεϊνών, σε όξινα περιβάλλοντα όπως το χυμοτόπιο ή ο εξωκυττάριος χώρος (Maeda et al., 2014).

PNGases A

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, το ένζυμο PNGase A από τον οργανισμό *P. amygdalus* (sweet almond) ήταν το πρώτο ένζυμο αυτής της κατηγορίας που περιγράφηκε (Takahashi et al., 1977). Αρχικές μελέτες το περιέγραψαν σαν μία πρωτεΐνη 66.8 kDa, η οποία φαινόταν να γλυκοζυλιώνεται. Ακόμα, εμφάνιζε δευτεροταγή δομή με 80% α -έλικες (Taga et al., 1984). Αργότερα, το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης δείχθηκε να είναι 79.5 kDa με HPLC και το βέλτιστο περιβάλλον δράσης του ενζύμου είναι όξινο (pH 4.5) (Plummer et al., 1987). Νέα στοιχεία έδειξαν πως η PNGase A είναι στην πραγματικότητα ένα ετεροδιμερές, αποτελούμενο από μία μεγάλη υπομονάδα 54.2 kDa και μία μικρότερη 21.2 kDa όπως φάνηκε με ηλεκτροφόρηση ακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και με περισσότερη ακρίβεια, με τη χρήση by MALDI-TOF-MS (Altmann et al., 1998). Η ίδια μελέτη έδειξε πως η πρωτεΐνη αποτελεί η ίδια μία N- γλυκοπρωτεΐνη με 9 (\pm 1) mol N-glycan/mol πρωτεΐνης, και πως αυτές οι γλυκάνες είναι τοποθετημένες και στις δύο υπομονάδες. Η PNGase A φαίνεται να δρα σε όλους τους τύπους N-γλυκανών: high-mannose, complex and hybrid. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις για την ικανότητα του ενζύμου να επιδρά σε γλυκοπρωτεΐνες, με τους Tarentino (Tarentino & Plummer, 1982) και Taga και συνεργάτες (Taga et al., 1984) να υποστηρίζουν πως η PNGaseA επιδρά σε αποικοδομημένες γλυκοπρωτεΐνες, ενώ οι Altmann et al. (1995) δεν εντόπισαν ενεργότητα του ενζύμου στις γλυκοπρωτεΐνες, ακόμα και όταν αυτές αποικοδομήθηκαν. Σε αντίθεση με την PNGase F, η PNGase A έχει φανεί να επιδρά σε υποστρώματα που περιέχουν ένα κατάλοιπο α -1,3-φουκόζης στο παρακαείμενο μόριο N- ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc), χαρακτηριστικό των γλυκοπρωτεϊνών που συναντώνται σε έντομα και φυτά (Εικόνα 14) (Fan & Lee, 1997; Faye et al., 1989).



Εικόνα 14. Η PNGaseA καταλύει την υδρόλυση αλυσίδων N- γλυκανών από γλυκοπρωτεΐνες/πεπτίδια ανεξάρτητα από την ύπαρξη (κόκκινη παρένθεση) ξυλόζης ή φουκόζης (<https://www.neb.com>)

Βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις για την παραγωγή της PNGaseA

Λόγω του έντονου εμπορικού ενδιαφέροντος για τα ένζυμα PNGase έχουν καταγραφεί διάφορες βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις με στόχο την παραγωγή των ενζύμων μέσω ετερόλογης έκφρασης σε μεγάλες ποσότητες που θα είναι αξιοποιήσιμες εμπορικά. Το 1998, εκφράστηκε η PNGase At από τον *Aspergillus tubigenensis* σε κύτταρα εντόμων που μολύνθηκαν με Βακιλοϊό (Paguin et al., 1998). Η ανασυνδυασμένη PNGase At απομονώθηκε και καθαρίστηκε σε ποσότητες 9.5 mg ανά λίτρο θρεπτικού μέσου κυττάρων. Το μοριακό της βάρος ήταν 78 kDa, σε αντίθεση με το MB της ενδογενούς πρωτεΐνης του *Aspergillus* που χαρακτηρίζεται από δύο υπομονάδες, 43 kDa. Το 2010 εκφράστηκε το cDNA για το γονίδιο της PNGase Le από τη ντομάτα (*Lycopersicon esculentum*) στο μύκητα *Pichia pastoris* και χαρακτηρίστηκε έτσι το ένζυμο aPNGase Le, με μοριακό βάρος 65.8 kDa και 57.9% ομοιότητα με την αλληλουχία της πρωτεΐνης PNGase A και βέλτιστο pH δράσης 4.5 (όξινο) (Hossain et al., 2010). Η δράση του μοιάζει με αυτή της PNGase A. Το 2014 κλωνοποιήθηκε από το βακτήριο *Terriglobus roseus* DSM 18391 το ένζυμο PNGase H+ και εκφράστηκε σε κύτταρα *E. coli* (Wang et al., 2014). Το εν λόγω ένζυμο φαίνεται να δρα σε εξαιρετικά χαμηλό pH (2,6) και συνδυάζει ιδιότητες της PNGase A και PNGase. Το 2015 χαρακτηρίστηκε η PNGase YI, ένα PNGase A-όμοιο ένζυμο, στο μύκητα *Yarrowia lipolytica* (Kalyani et al., 2015). Το αντίστοιχο γονίδιο κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε στο *Pichia pastoris*. Το ένζυμο απομονώθηκε και οι ιδιότητες του είναι παρόμοιες με αυτές της PNGase A, ενώ δρα σε pH 5 (όξινο). Την ίδια χρονιά, παράχθηκε ενεργή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη PNGase F από το βακτήριο *Elizabethkingia meningoseptica* (παλαιότερα γνωστό ως *Flavobacterium meningosepticum*) με τη χρήση του συστήματος BEVS (baculovirus expression vector system) σε κύτταρα ή λάρβες μεταξοσκώληκα (Masuda et al., 2015). Το ένζυμο παράχθηκε με επιτυχία σε μεγάλες ποσότητες (2.1 mg/20 λάρβες). Τέλος, η εταιρεία New England Biolabs έχει καταφέρει να παράγει και να διαθέσει εμπορικά την PNGase F (από το βακτήριο *Elizabethkingia meningoseptica*) σε βακτήρια *E. coli* (Chen M., New England Biolabs, unpublished) και πολύ πρόσφατα την πρωτεΐνη PNGase A από το φυτό *Oryza sativa* στο μύκητα *Pichia pastoris* (Guthrie, E. New England Biolabs, Inc.. Unpublished observation).

Η πρωτεΐνη hRI

Ένας από τους πιο σημαντικούς φυσικούς αναστολείς των RNασών A, με ειδικότητα πρόσδεσης κυρίως στην αγγειογενίνη, είναι ο ανθρώπινος αναστολέας ριβονουκλεασών του πλακούντα (PRI-placental ribonuclease inhibitor). Ο αναστολέας αποτελεί μια πρωτεΐνη 50kDa, η οποία προστατεύει το κυτταροπλασματικό RNA από τυχόν παγκρεατικές ριβονουκλεάσες. Προσδέεται ισχυρά στην RNάση A και στην αγγειογενίνη με τιμή K_i $4,4 \times 10^{-14}$ και $6,7 \times 10^{-14}$, αντίστοιχα (Klink et al., 2001). Ωστόσο, σαν μόριο, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην οξείδωση. Κατ' επέκταση απαιτεί αναγωγικό περιβάλλον και αυτό τον καθιστά πρακτικά δύσκολο στο χειρισμό.

Η εμπορική αξία του εν λόγω ενζύμου έγκειται στη χρήση του σε πειραματικές προσεγγίσεις σαν προληπτικό μέτρο κατά τη διάρκεια ενζυμικών μεταχειρίσεων του RNA.

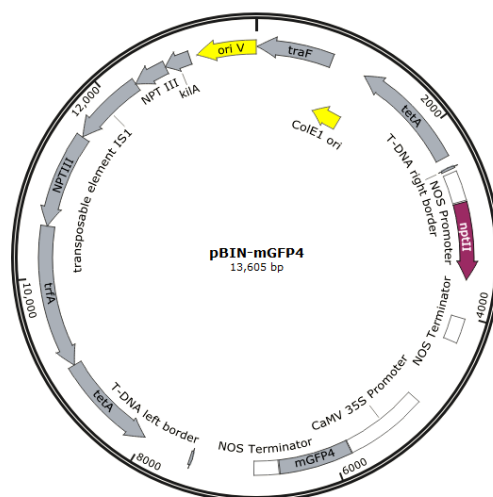
Στόχος της εργασίας

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης PNGaseA και της RNH σε φυτά *Nicotiana benthamiana*, μέσω παροδικού μετασχηματισμού. Οι εν λόγω πρωτεΐνες αποτελούν βιοτεχνολογικά εργαλεία, με εμπορική σημασία και η παραγωγή τους θα πρέπει να γίνεται σε μεγάλες ποσότητες, με στόχο τον καθαρισμό της, την επιβεβαίωση της λειτουργίας της και τελικά την πιθανή εμπορική εκμετάλλευσή της. Η προσέγγιση συνοψίζεται στην απομόνωση του γονιδίου της PNGaseA από αμύγδαλα και την κλωνοποίηση του σε κατάλληλους φορείς, με στόχο την παραγωγή του σε φυτά, κάτι που δεν έχει αναφερθεί ξανά στην ισχύουσα βιβλιογραφία για ένζυμα της συγκεκριμένης κατηγορίας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πλασμιδιακές κατασκευές

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pBIN::mGFP4 ο οποίος κατασκευάστηκε στο εργαστήριο. Ο ανασυνδυασμένος φορέας χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της πρωτεΐνης GFP ως μάρτυρα στα πειράματα αγροεμποτισμού (Εικόνα 15) που αναλύονται στην ενότητα 'Αποτελέσματα'. Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά στις διαδικασίες κλωνοποίησης είναι η καναμυκίνη (100 µg/ml), ριφαμπικίνη (100 µg/ml), στρεπτομυκίνη (100 µg/ml).



Εικόνα 15. Ο ανασυνδυασμένος φορέας pBIN::mGFP4. Το πλασμίδιο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη

Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία είναι φυτά *Nicotiana benthamiana* αγρίου τύπου, διπλά μεταλλάγματα DCL2/4.16 τα οποία κατασκευάστηκαν από τη διδακτορικό Ελένη Νταντάμη (Dadami et al., 2013) και μεταλλάγματα p19. Τα φυτά DCL2/4.16 φέρουν 3-4 ενθέσεις και εμφανίζουν ταυτόχρονη καταστολή για τα ενδογενή μεταγράφα των DCL2 (23 φορές) και DCL4 (5 φορές). Τα p19 μεταλλάγματα παρήχθησαν από τους Silhavy και συνεργάτες (Silhavy et al., 2002) και εκφράζουν την πρωτεΐνη p19 του ιού Artichoke mottled crinkle virus (AMCV). Η πρωτεΐνη p19 αποτελεί καταστολέα της σίγησης.

Τα σπέρματα των φυτών τοποθετούνται σε εδαφικό υπόστρωμα (χούμος) και διατηρούνται σε θάλαμο ανάπτυξης σταθερής θερμοκρασίας 25°C, 100% υγρασίας και φωτοπερίοδο 16h ημέρα/8h νύχτα, όπου παραμένουν για 10 ημέρες μετά τη φύτευση. Κατόπιν μεταφυτεύονται σε εδαφικό μέσο χούμο, τύρφη και περλίτη (4:2:1) και διατηρούνται σε περιβάλλον θερμοκηπίου για περίπου 30-40 ημέρες. Στη συνέχεια, τα φυτά αγροεμποτίζονται και τοποθετούνται σε θάλαμο σταθερών συνθηκών (23°C, φωτοπερίοδο 16h ημέρα/8h νύχτα) για τρεις με τέσσερις ημέρες μέχρι τη συλλογή του φυτικού υλικού για περαιτέρω επεξεργασία. Οι συνθήκες επιλέχθηκαν με βάση τα αποτελέσματα της μεταπτυχιακής εργασίας του Βασίλη Σκαλτσογιάννη (2017)(ref) (Βελτίωση του συστήματος παροδικής έκφρασης γονιδίων μέσω Αγροβακτηρίου σε φυτά *Nicotiana benthamiana*)

Καλλιέργειες βακτηρίων

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι *Escherichia coli* DH10b και *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ριφαμικίνη). Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύσσονται σε υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο Luria-Bertani (LB) (1% Τρυπτόνη, 0.5% Εκχύλισμα ζύμης, 1% Χλωριούχο Νάτριο, 1.5% άγαρ για το στερεό θρεπτικό) μαζί με το κατάλληλο αντιβιοτικό ανθεκτικότητας. Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν υπό ανάδευση στους 28° C για τα στελέχη *A. tumefaciens* και στους 37° C για τα *E.coli*.

Παρασκευή δεκτικών κυττάρων E.coli DH10b

Τα δεκτικά βακτήρια παρασκευάζονται με τη μέθοδο του χλωριούχου ρουβιδίου. Από τρυβλίο όπου έχουν αναπτυχθεί κύτταρα *E. coli*, μεταφέρεται μία αποικία σε αποστειρωμένο γυάλινο σωλήνα με 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB και η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί για 16 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση. 2ml από την προκαλλιέργεια μεταφέρονται σε 200ml LB και επώάζονται στους 37°C υπό ανάδευση έως ότου η οπτική απορρόφηση (OD) στα 600nm να είναι περίπου 0,6 χωρίς να ξεπεράσει αυτή την τιμή. Έπειτα, η κωνική φιάλη με την καλλιέργεια τοποθετείται απευθείας στον πάγο, όπου και παραμένει για 15 λεπτά, ώστε τα βακτήρια να σταματήσουν τον πολλαπλασιασμό. Σε τακτά χρονικά διαστήματα, η κωνική αναδεύεται. Η καλλιέργεια μοιράζεται σε 4 σωλήνες falcon των 50 ml, οι οποίοι φυγοκεντρώνονται στις 2500rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα ανά 50ml καλλιέργειας επαναδιαλύεται σε 15ml κρύου διαλύματος TfbI pH 5,8 (30mM Οξικό κάλιο, 100mM Χλωριούχο ρουβίδιο, 50mM Χλωριούχο μαγνήσιο, 10mM Χλωριούχο ασβέστιο, 15% Γλυκερόλη και ρύθμιση pH με οξικό οξύ 0,1M) και τα βακτήρια επώάζονται στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 10 λεπτά στους 4°C και επαναιώρηση των βακτηρίων σε 2ml κρύου διαλύματος TfbII pH 6,5 (10mM MOPS, 10mM Χλωριούχο ρουβίδιο, 75mM Χλωριούχο ασβέστιο, 15% Γλυκερόλη και ρύθμιση pH με υδροξείδιο του καλίου 0,1M) για κάθε σωλήνα. Τα κύτταρα μοιράζονται σε κρύα σωληνάκια erpendorf ανά 100μl, παγώνονται απευθείας σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80°C.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (mini preparation)

Οι αποικίες που έχουν μεγαλώσει στα τρυβλία συλλέγονται και αναπτύσσονται εκ νέου σε τουλάχιστον 3ml υγρού θρεπτικού μέσου LB, παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών, ώστε να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται στη δεύτερη έκδοση του βιβλίου Molecular Cloning: A Laboratory Manual των Sambrook, Fritsch και Maniatis (ref). Συνοπτικά, φυγοκεντρήθηκαν 1-3ml βακτηριακής καλλιέργειας και διαλύθηκαν εκ νέου σε 100μl Solution I (50mM Γλυκόζη, 25mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8) με έντονη ανάδευση. Προστέθηκαν 200μl Solution II (0,2N NaOH, 1% SDS) που παρασκευάζεται πάντα φρέσκο και 150μl Solution III (3M Οξικό κάλιο και ρύθμιση pH στο 5,5 με οξικό οξύ), με ήπια ανακίνηση μετά από κάθε διάλυμα. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε, αναμίχθηκε με ίσο όγκο φαινόλη: χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1, φυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες για 3 λεπτά και μεταφέρθηκε ξανά η υδατική φάση. Προστέθηκε διπλάσιος όγκος αιθανόλης και έγινε ανάδευση, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 20 λεπτά στους 4 °C ώστε να κατακρημνιστούν τα νουκλεϊκά οξέα. Στο ίζημα προστίθεται 70% αιθανόλη και

αφού στεγνώσει καλά, επαναδιαλύεται σε 30μl dH²O. Στην περίπτωση όπου τα δείγματα αυτά στάλθηκαν για αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση το NucleoSpin® Plasmid kit της MachereyNagel και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες που το συνοδεύουν.

Πέψη DNA με περιοριστικά ενδονουκλεάσες

Η πέψη μορίων DNA με περιοριστικά ένζυμα γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες που συνοδεύουν το εκάστοτε ένζυμο (MINOTECH biotechnology και New England Biolabs). Στις περισσότερες αντιδράσεις προστέθηκε 1μg DNA και 1 unit ενζύμου στα 50μl του συνολικού όγκου της αντίδρασης και επωάστηκαν για 1 ώρα στους 37 °C. Η ανάλυση του προϊόντος της αντίδρασης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης. Η απομόνωση του DNA από το πηκτή έγινε κόβοντας την επιθυμητή ζώνη και καθαρίζοντας τα μόρια DNA με τη χρήση του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG), όποτε αυτό χρειάστηκε. Η έκλυση των μορίων DNA έγινε με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό.

Αντίδραση Klenow

Η αντίδραση Klenow πραγματοποιείται στην παρούσα εργασία κατά την κλωνοποίηση τμημάτων σε φορείς. Αξιοποιήθηκε η δράση της ως 3' → 5' εξωνουκλεάση για τη συμπλήρωση (fill in) άκρων του εκάστοτε πλασμιδιακού φορέα που είχαν προηγουμένως υποστεί πέψη. Ο στόχος είναι η δημιουργία blunt άκρων, για την περαιτέρω συνέχεια της κλωνοποίησης. Η αντίδραση έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (NEB® DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment).

Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης, 0,8-2% αγαρόζη διαλύεται με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων σε κατάλληλο όγκο 0,5X TBE (0,11 M Tris, 90 mM βορικό οξύ, 2.5 mM EDTA pH 8). Στη συνέχεια προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,01% (w/v) και το μίγμα τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο για τη δημιουργία του πηκτώματος. Μετά τη φόρτωση στον δειγμάτων στο πηκτή ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε διάλυμα 0,5X TBE με εφαρμογή ρεύματος 5V/cm της απόστασης των ηλεκτροδίων της συσκευής). Τα νουκλεϊκά οξέα φωτογραφίζονται κάτω από UV ακτινοβολία. Για την ταυτοποίηση του μεγέθους των παρατηρούμενων ζωνών χρησιμοποιούνται οι παρακάτω ευρέως χρησιμοποιούμενοι μοριακοί δείκτες: λ-PstI, λ-StyI 1Kb.

Αντίδραση λιγάσης

Η αντίδραση της λιγάσης (T4 DNA Ligase- Minotech) έγινε σε όγκο 10 μl με τελική συγκέντρωση ενζύμου 2 U/μl και ATP 1 mM για 16 ώρες στους 4 °C. Η ποσότητα του φορέα που προστέθηκε ήταν 50 ng και η αναλογία φορέα: ενθέματος 3: 1. Για αρνητικό έλεγχο πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση χωρίς την προσθήκη ενθέματος.

Αντίδραση LR κλωνάσης (Invitrogen)

Η αντίδραση LR χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία κατά τη διαδικασία κλωνοποίησης τμημάτων DNA σε συγκεκριμένους πλασμιδιακούς φορείς που ανήκουν στην κατηγορία Gateway. Συγκεκριμένα, σε αποστειρωμένο φιαλίδιο προστίθενται 50-150 ng από το πλασμίδιο δότη (entry clone-pENTR3C), 150 ng από το πλασμίδιο δέκτη του τμήματος (destination vector-pB2GW7) και διάλυμα TE pH 8 μέχρι τα 8 μl. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 2 μl από το ένζυμο, ακολουθεί μηχανική ανάδευση, φυγοκέντρηση και

επώαση στους 25 °C για 2 ώρες. Για τον τερματισμό της αντίδρασης προστίθεται 1 μl Proteinase K και τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το μίγμα χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και τελικά επιλογή των ανθεκτικών κυττάρων που μεγαλώνουν σε θρεπτικό με αντιβιοτικό επιλογής.

Μετασχηματισμός βακτηρίων

Escherichia coli DH10b

3-5μl από την αντίδραση λιγάσης ή την αντίδραση ανασυνδυασμού προστίθενται σε 100μl δεκτικών κυττάρων και αναδεύονται ελαφρά. Ακολουθεί επώαση 30 λεπτών στον πάγο, θερμικό σοκ στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα ώστε να εισαχθεί το πλασμίδιο στα κύτταρα, επώαση 2 λεπτών στον πάγο και προσθήκη 900μl θρεπτικού μέσου LB. Το μίγμα επωάζεται για 1 ώρα στους 37 °C με συνεχή ανάδευση για επαναφορά των κυττάρων. 100μl από τα βακτήρια επιστρώνονται σε τρυβλίο Πετρί με LB θρεπτικό μέσο και το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων και επωάζονται για 16 ώρες στους 37 °C.

Agrobacterium tumefaciens C58C1

5μg πλασμιδίου προστίθενται σε 100μl δεκτικών κυττάρων και αναδεύονται ελαφρά. Το μίγμα βυθίζεται απευθείας σε υγρό άζωτο για 1 λεπτό και επωάζεται για 30 λεπτά στους 37 °C (θερμικό σοκ). Ύστερα προστίθενται 900μl LB θρεπτικού και τα κύτταρα επωάζονται για 2-4h στους 28 °C. 200μl από τα αγροβακτήρια επιστρώνονται σε τρυβλίο Πετρί με LB θρεπτικό μέσο και τα κατάλληλα αντιβιοτικά (ριφαμπυκίνη 100μg/ml για τα αγροβακτήρια και το αντιβιοτικό επιλογής για το πλασμίδιο) και επωάζονται 1-2 μέρες στους 28 °C.

Αγροεμποτισμός (Schöb et al. 1997)

Αγροβακτήρια επωάστηκαν για 16 ώρες σε υγρό θρεπτικό μέσο LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Την επόμενη μέρα και εφόσον είχαν αναπτυχθεί ικανοποιητικά, φυγοκεντρήθηκαν στις 2700rpm για 10 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε αντίστοιχη ποσότητα MMA (1x MS υγρό θρεπτικό μέσο, 10mM 2-μορφολινο-αιθανικό σουλφονικό οξύ, 200μM ακετοσυριγκόννη). Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 28 °C και ξανά φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες. Τα αγροβακτήρια πλύθηκαν 3 φορές με 10mM χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂) ίσης ποσότητας με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις και τελικά επαναδιαλύθηκαν στο ίδιο διάλυμα και αραιώθηκαν έως ότου η οπτική απορρόφηση (OD₆₀₀) είναι 0,5. Στη συνέχεια έγινε ο εμποτισμός σε φυτά με σύριγγα ινσουλίνης (1ml).

Στην παρούσα εργασία αγροεμποτίστηκαν φυτά που βρίσκονταν στο στάδιο των 19 περίπου φύλλων (αγρίου τύπου) και ο αγροεμποτισμός έγινε στα φύλλα 10 έως 12 κατά προσέγγιση και ανάλογα με την ποιότητα των φύλλων.

Παρατήρηση των φυτών

Για την παρατήρηση των φύλλων που είχαν GFP χρησιμοποιείται το σύστημα Blak-Ray® B-100AP/R με 100 W UV λαμπτήρα (UVP). Τα φύλλα φωτογραφήθηκαν με φωτογραφική μηχανή NIKON DS100 (lense : DXAF-SNIKKOR 18-55 mm).

Απομόνωση ολικού RNA

Trizol

Κατά την εν λόγω μέθοδο, ο ιστός (φύλλα) λιοτριβείται παρουσία υγρού αζώτου. Στη συνέχεια προστίθεται Trizol με αναλογία 10:1 (trizol:ιστός) (συνήθως χρησιμοποιούνται 100 mg ιστού). Ακολουθεί μηχανική ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά σε 13000 rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο όπου προστίθενται 200μl χλωροφόρμιο, γίνεται ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου 10 λεπτά. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση σε 13000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο όπου προστίθενται 500 μl ισοπροπανόλης και 250 μl διάλυμα υψηλής αλατότητας (1.2 M χλωριούχο νάτριο και 0,8 M κιτρικό νάτριο). Μετά από μηχανική ανάδευση τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρώνται σε 13000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και μετά την προσθήκη 500 μl 70% αιθανόλης (4°C) ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει (65°C για 2 με 3 λεπτά) και τελικά επαναιωρείται σε 42 μl αποστειρωμένο νερό.

Απομόνωση ολικού RNA από καρπό αμυγδάλου

Το πρωτόκολλο για την απομόνωση ολικού RNA από ολόκληρα αμύγδαλα αποτελεί τροποποιημένη εκδοχή από το άρθρο 'Molecular cloning and biochemical characterization of a lipoxygenase in almond (*Prunus amygdalus var. dulcis*) seed' (Mita et al., 2001).

Τα αμύγδαλα λιοτριβούνται παρουσία υγρού αζώτου. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα απομόνωσης (0.1 M Tris-HCl pH 8/0.01 M EDTA/ 0.1 M LiCl/ 1% SDS) προθερμασμένο στους 80°C σε αναλογία 10:1 (διάλυμα απομόνωσης:ιστός) (συνήθως χρησιμοποιούνται 100 mg ιστού: 1 ml διαλύματος). Τα δείγματα επωάζονται στους 80 °C για 10 λεπτά και ακολουθεί μηχανική ανάδευση. Προστίθενται 500 μl φαινόλη (προθερμασμένη στους 80°C) και 500μl χλωροφόρμιο :ισοαμυλική αλκοόλη (24:1). Ακολουθούν 2 λεπτά μηχανικής ανάδευσης και φυγοκέντρηση σε 13000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο και επωάζεται για 24 ώρες στους 4°C με έναν όγκο 4M LiCl. Την επόμενη μέρα τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 30 λεπτά σε 13000 rpm στους 4°C. Το ίζημα επαναιωρείται σε 300 μl αποστειρωμένο νερό και προστίθενται 720 μl αιθανόλη 100% και 80 μl διάλυμα οξικού νατρίου 3M pH 5,2. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20 °C για 30 με 50 λεπτά, ενώ ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα επαναιωρείται σε 200 μl νερό και προστίθενται 400 μl αιθανόλη 100% και 100 μl διάλυμα χλωριούχου νατρίου 5M, ενώ φυγοκεντρώνται στη συνέχεια σε 13000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C. Η επαναιώρηση του ιζήματος σε νερό, η προσθήκη αιθανόλης και χλωριούχου νατρίου καθώς και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνονται. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στους 65 °C για περίπου 4 λεπτά και επαναιωρείται σε 20 μl αποστειρωμένο νερό.

Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων

Η συγκέντρωση των απομονωμένων DNA ή RNA δειγμάτων μετρήθηκε σε φωτόμετρο (NanoDrop 1000 Spectrophotometer)

Μεταχείριση των δειγμάτων ολικού RNA με DNase (ROCHE)

Για την περαιτέρω επεξεργασία των δειγμάτων ολικού RNA ακολουθεί επεξεργασία των δειγμάτων με το ένζυμο DNase που στοχεύει στην αποικοδόμηση τυχόν DNA από τα δείγματα. Αρχικά δημιουργείται ένα μίγμα αντιδραστηρίων όπως φαίνεται στο Πίνακα 9. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 40 λεπτά και ακολουθεί καθαρισμός των δειγμάτων με πρωτόκολλο φαινόλης- χλωροφορμίου.

Πίνακας 9. Συστατικά μίγματος για μεταχείριση με DNase

Συστατικά	Τελική ποσότητα
Ολικό RNA	10-50 µg
10x incubation buffer	5 µl
DNase I recombinant , RNase free	2.5-10 units
Νερό	Μέχρι τα 50 µl

Καθαρισμός δειγμάτων ολικού RNA με φαινόλη- χλωροφόρμιο

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο και ο όγκος αυξάνεται στα 400 µl με αποστειρωμένο νερό. Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης, γίνεται μηχανική ανάδευση και φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο και ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη (24:1), μηχανική ανάδευση και φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο και προστίθενται 1/10 του όγκου οξικό νάτριο 3M pH 5 και δύο όγκοι παγωμένη αιθανόλη 100%. Τα δείγματα επωάζονται στους -80 °C για 30 λεπτά. Εν συνεχεία, φυγοκεντρούνται σε 12000 rpm για 30 λεπτά στους 4 °C. Προστίθενται 750 µl 70% αιθανόλης, γίνεται ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση στη μέση ταχύτητα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στους 65 °C για περίπου 5 λεπτά και επαναιωρείται σε 22 µl αποστειρωμένο νερό

Ανάλυση ολικού RNA σε αποδιατακτικό πηκτή αγαρόζης 1,2%

Για την επιβεβαίωση της καλής ποιότητας του απομονωμένου RNA και της απουσίας αποικοδομημένων δειγμάτων που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω, γίνεται ανάλυση των δειγμάτων ολικού RNA ,μετά τον καθαρισμό τους από την DNase, σε αποδιατακτικό πηκτή αγαρόζης.

1 µg ολικού RNA αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πηκτή 1.2% αγαρόζης (1.2% αγαρόζη, 1xMOPS, 12,3M φορμαλδεΰδη και 1:15 βρωμιούχο αιθίδιο) με ηλεκτροφόρηση στα 100V για περίπου 45 λεπτά. Στα δείγματα RNA προστίθεται κατάλληλη ποσότητα χρωστικής (loading dye, τελική συγκέντρωση 1x) και πριν φορτωθούν, βράζουν για 5 λεπτά και επωάζονται για 2-3 λεπτά στον πάγο. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης σε διάλυμα

MOPS/φορμαλδεΐδης (1x MOPS, 12,3M φορμαλδεΐδη), το πηκτή φωτογραφίζεται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

Αντίστροφη μεταγραφή (cDNA synthesis Minotech)

Κατά τη δημιουργία συμπληρωματικού DNA, το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί σαν μήτρα το RNA για τη σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA. Αρχικά προστίθενται σε ένα φιαλίδιο 50μM Oligo dT 20 ή random primers ή ο αντίστροφος εκκινητής του γονιδίου (τελική συγκέντρωση 2.5 μM), ολικό RNA (1-3 μg), 10 mM dNTPs (τελική συγκέντρωση 0.5 mM) και αποστειρωμένο νερό μέχρι τα 13 μl. Στη συνέχεια το μίγμα θερμαίνεται στους 65 °C για 5 λεπτά και επώαζεται στον πάγο για 2 λεπτά. Γίνεται προσθήκη του διαλύματος σύνθεσης (5x first strand buffer) (τελική συγκέντρωση 1X), 0.1 M DTT (τελική συγκέντρωση 0.005 M), 1μl αναστολέα RNAsών (RNaseOUT recombinant RNase Inhibitor 40 U/ μl) (τελική συγκέντρωση 2U/μl) και του ενζύμου Superscript III RT (200U/ μl) (τελική συγκέντρωση 1U/μl). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ρυθμίζεται στα 20μL. Το πρόγραμμα για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης ήταν 60 λεπτά στους 50 °C και ακολούθως 15 λεπτά στους 70 °C. Μετά το πέρας αυτής έγινε προσθήκη 1 μl RNase H (Invitrogen) και επώαση της αντίδρασης για 20 λεπτά στους 37 °C.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Ημιποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (semi-q RT PCR)

Η Reverse Transcription PCR (RT-PCR) αποτελεί μία εξαιρετικά χρήσιμη και ευαίσθητη μέθοδο που χρησιμοποιείται σε μοριακές μελέτες για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του mRNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτική σύγκριση της έκφρασης Η μέθοδος αναλύεται σε δύο βήματα. Στο πρώτο βήμα το ολικό RNA του φυτού επεξεργάζεται με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση και μετατρέπεται σε cDNA (περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα). Στο δεύτερο βήμα το cDNA χρησιμοποιείται ως μήτρα για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό και απομόνωση του επιθυμητού τμήματος με PCR με τη βοήθεια του ενζύμου Taq πολυμεράση (Minotech). Το παραγόμενο cDNA χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για ενίσχυση και ημιποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων *PNGaseA* (εκκινητές PNGaseFq/PNGaseR- Tm 54 °C) και *hRI* (εκκινητές RNaseIF/RNaseIR- Tm 57 °C) σε διαφορετικές σειρές φυτών *Nicotiana benthamiana*. Όλα τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν προηγουμένως με τη βοήθεια ανάλογων αντιδράσεων PCR για το σταθερό μεταγραφικό έκφρασης γονίδιο (housekeeping-συστατικό γονίδιο) της *PP2A* (εκκινητές PP2AF1/PP2AR1- Tm 60°C). Στον 20°, 25°, 30° και 35° κύκλο λαμβάνεται δείγμα 5 μl από κάθε δείγμα. Ως αρνητικό δείγμα χρησιμοποιείται νερό. Ακολουθεί ενδεικτικό πρωτόκολλο για την PCR στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Τα συστατικά και το πρόγραμμα της αντίδρασης semi q RT-PCR με Taq πολυμεράση

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση	Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
10x Taq polymerase ρυθμιστικό (+ Mg ²⁺)	1X	Αρχική αποδιάταξη	94	5 min	1

10 mM dNTPs	0.2 mM	Θερμικός κυκλοποιητής →	Αποδιάταξη	94	20 sec	35
10 μM F primer	0.2 μM		Αναδιάταξη (Tm πίνακα 2.)	*	15 sec	
10 μM R primer	0.2 μM		Επιμήκυνση	72	** min	
Μήτρα DNA	X μl		Τελική επιμήκυνση	72	5 min	1
Taq DNA polymerase (5U/ μl)	1U/50 μl		Αναμονή	15		
ddH ₂ O	Μέχρι τα 25 μL					

* η θερμοκρασία αναδιάταξης ποικίλλει κάθε φορά ανάλογα με το ζευγάρι εκκινητών που χρησιμοποιείται (Πίνακας 2.)

** Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται κάθε φορά από τον αριθμό βάσεων του αναμενόμενου προϊόντος και ορίζεται ως 1 min/1000 bp

Τα προϊόντα των PCR αναλύονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης (TBE 0.5x, αγαρόζη και 1:15 βρωμιούχο αιθίδιο), η πυκνότητα του οποίου ποικίλλει ανάλογα με το μέγεθος του προϊόντος και διευκρινίζεται σε κάθε φωτογραφία που παρουσιάζεται στη συγκεκριμένη εργασία. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα TBE 0.5x.

Πολυμεράση υψηλής πιστότητας (High fidelity polymerase -Kapa)

Για την ενίσχυση του γονιδίου *PNGaseA* χρησιμοποιώντας ως μήτρα το cDNA που απομονώθηκε από σπέρματα του φυτού *Prunus amygdalus var. dulcis*, χρησιμοποιήθηκε πολυμεράση υψηλής πιστότητας (High fidelity polymerase), με πιθανότητα λάθους 100x μικρότερη από την κοινή Taq πολυμεράση, και οι αντίστοιχοι εκκινητές (ζεύγος 1 – Πίνακας 12). Τα αντιδραστήρια που προστέθηκαν στα δείγματα, καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον Πίνακα 11.

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν χωρίς θέσεις κοπής περιοριστικών ενζύμων, με συνέπεια να ακολουθήσει η ενζυμική αντίδραση προσθήκης νουκλεοτιδίων αδενίνης στο 3' άκρο του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (A- tailing). Με αυτό τον τρόπο, το ενισχυμένο γονίδιο χρησιμοποιήθηκε για κλωνοποίηση σε κατάλληλο φορέα με ελεύθερα άκρα θυμίνης (TA cloning).

Πίνακας 11. Τα συστατικά και το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR με KAPA HiFi DNA πολυμεράση για την ενίσχυση του γονιδίου *PNGaseA*

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση	Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
5X KAPA HiFi Buffer	1X	Αρχική αποδιάταξη	95	5 min	1
10 mM dNTPs	0.3 mM	Αποδιάταξη	98	20 sec	35

		Θερμικός κυκλοποιητής→					
10 μM PNGaseF	0.3 μM		Αναδιάταξη	65	15 sec		
10 μM PNGaseR	0.3 μM		Επιμήκυνση	72	1 min		
Υπόστρωμα DNA	85ng/25μl		Τελική επιμήκυνση	72	5 min	1	
1 U/μL KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase	0.5 U						
ddH ₂ O	Μέχρι τα 25 μL						

Πίνακας 12. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Ζεύγη εκκινη τών	Ονομασία εκκινητών	Αλληλουχία 5'→3'	Tm (°C)	Προϊόν (bp)	Χρησιμότητα
1	PNGaseF	CAAAAGCTCAACCACCAGTCA	65	1849	Ενίσχυση του γονιδίου <i>PNGaseA</i> από cDNA του φυτού <i>Prunus</i> <i>amygdalus</i> var. <i>dulcis</i>
	PNGaseR	TCATGTAAATCGGAGACCAGCA			
2	PNGaseFq	GGAGCACTCAGCAAGTCTACA	54	200	Ενίσχυση τμήματος των αντίστοιχων γονιδίων (<i>PNGaseA</i> , <i>PP2A</i> , <i>hRI</i> , <i>L23</i>) για την ποσοτικοποίηση της έκφρασής τους (qPCR & semiq RT- PCR)
	PNGaseR	TCATGTAAATCGGAGACCAGCA			
3	PP2AF1	GACCCTGATGTTGATGTTGCT	60	123	
	PP2AR1	GAGGGATTTGAAGAGAGATTC			
4	RNaseIF	TGGTATGGCAGAACTGTGTCG	57	200	
	RNaseIR	GCAGGGTTTCACACAGCAGAC			

Απομόνωση πρωτεϊνών

Η απομόνωση ολικών πρωτεϊνών γίνεται από φύλλα *Nicotiana benthamiana* τα οποία είχαν υποβληθεί στη διαδικασία του αγροεμποτισμού. Τα φύλλα συλλέχθηκαν μετά από 3 με 4 ημέρες από τον αγροεμποτισμό, λιοτριβούνται παρουσία υγρού αζώτου και διατηρούνται στους -80 °C για περαιτέρω χρήση.

Για την απομόνωση πρωτεϊνών αρχικά ζυγίζονται 200 mg ιστού σε φιαλίδια και προστίθενται 500 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (100 mM Tris-HCl pH 8/ 200 mM NaCl/1 mM EDTA pH 8/ 3 mM MgCl₂/ 10% γλυκερόλη/ 1 mM DTT*/ 10 μg/μl PMSF*/παρεμποδιστές πρωτεασών 1/100*/ 1 μl/ml Tween-20*). Τα συστατικά με τον

αστερίσκο (*) προστίθενται λίγο πριν τη χρήση του διαλύματος. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 13.000 rpm για 30 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο περιέχει το σύνολο των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται για περαιτέρω ανάλυση με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Ακόμα, δοκιμάστηκε η χρήση υπερήχων για καλύτερη λύση των κυττάρων, τοποθετώντας τα δείγματα με το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης σε μηχανήμα ομογενοποίησης με υπερήχους (Branson Ultrasonics Sonifier 250). Το κάθε δείγμα εκτέθηκε στους υπερήχους για 30 δευτερόλεπτα, 6 φορές.

Πρωτόκολλο μείωσης της RuBisCO

Για την ελάττωση της ποσότητας της RuBisCO στα προς ανάλυση δείγματα πρωτεϊνών, δοκιμάστηκε το πρωτόκολλο των Kim et al., 2013 : 'Depletion of abundant plant RuBisCO protein using the protamine sulfate precipitation method'. Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Protamine sulfate salt from salmon Grade X, amorphous powder από τη Sigma, το οποίο διαλύεται σε 6M HCl (25 mg/ml).

Αρχικά ζυγίζεται 1 gr φύλλων που έχουν προηγουμένως λιοτριβηθεί σε υγρό άζωτο. Η σκόνη ομογενοποιείται με 10 ml παγωμένο διάλυμα απομόνωσης (500 mM Tris-HCl /pH 8.3, 2% v/v NP-40, 20 mM w/v MgCl₂). Μετά από φυγοκέντρηση στα 12000 g για 10 λεπτά στους 4°C, προστίθεται στο υπερκείμενο συγκέντρωση θειικής προταμίνης 0,12% (από αρχικό διάλυμα 1% σε νερό). Τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά και φυγοκεντρούνται στα 12000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και αναμιγνύεται με 4 όγκους 12.5% τριχλωροοξικό οξύ / ακετόνη (trichloroacetic acid /acetone) και στη συνέχεια για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών τα δείγματα τοποθετούνται στους -20°C για 1 ώρα. Ταυτόχρονα, το ίζημα από το προηγούμενο βήμα, το οποίο περιέχει τη RuBisCO, επαναιωρείται σε 10 ml παγωμένο διάλυμα απομόνωσης, αναδεύεται μηχανικά και αναμιγνύεται με 3 όγκους 12.5% τριχλωροοξικό οξύ / ακετόνη (trichloroacetic acid /acetone) και στη συνέχεια για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών τα δείγματα τοποθετούνται στους -20°C για 1 ώρα. Τελικά, όλα τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 12000 g για 5 λεπτά στους 4°C και ξεπλένονται 3 φορές με 5 ml 80% v/v ακετόνη σε αποσταγμένο νερό. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C σε 80% v/v ακετόνη για περαιτέρω χρήση.

Πρίν από την ανάλυση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS PAGE ηλεκτροφόρηση) γίνεται φυγοκέντρηση στα 15000 g για 10 λεπτά στους 4°C για την απομάκρυνση της ακετόνης. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και επαναιωρείται σε νερό.

Χρωματογραφία συγγένειας

Για την απομόνωση του ενζύμου hRI χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χρωματογραφίας συγγένειας με υπόστρωμα σεφαρόζης, ενεργοποιημένο με βρωμιούχο κυάνιο. Χρησιμοποιήθηκαν αρχικά 3 gr σεφαρόζη σε σκόνη και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες ενεργοποίηση του υποστρώματος που δίνονται από την εταιρεία (GE Healthcare- CNBr-activated Sepharose™ 4B). Ως προσδέτης προστέθηκε το υπόστρωμα του ενζύμου, RNaseA (4 mg/ml). Στη συνέχεια, 2 ml από το ενεργοποιημένο υπόστρωμα τοποθετούνται σε φιαλίδια και εξισορροπούνται με διάλυμα απομόνωσης πρωτεϊνών (ενότητα 'Απομόνωση

πρωτεϊνών') με 5 λεπτά ανάδευση που ακολουθείται από φυγοκέντρηση στα 12000 rpm για 2 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, τα δείγματα που έχουν προκύψει από απομόνωση πρωτεϊνών, αποτελούν το load, δηλαδή το αρχικό δείγμα συνολικών πρωτεϊνών και προστίθενται στα φιαλίδια με το υπόστρωμα, αφού προηγουμένως έχει κρατηθεί ένα μέρος για περαιτέρω χρήση. Τα δείγματα αναδεύονται για 1 ώρα στους 4° C, φυγοκεντρώνται στα 12000 rpm για 5 λεπτά στους 4° C και το υπερκείμενο τοποθετείται σε νέα φιαλίδια, αποτελώντας το void, δηλαδή τις πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στο υπόστρωμα. Έπειτα, το υπόστρωμα ξεπλένεται με διάλυμα απομόνωσης πρωτεϊνών ίσου όγκου με το υπερκείμενο, ακολουθεί ανάδευση για 5 λεπτά στους 4° C και φυγοκέντρηση στα 12000 rpm για 10 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο αποτελεί το wash, δηλαδή πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στο υπόστρωμα και φυλάσσεται για περαιτέρω χρήση. Τέλος, προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος έκλουσης (0,1 M οξικό νάτριο pH 5, 3M χλωριούχο νάτριο, 10 mM DTT, 1 mM EDTA). Τα δείγματα αναδεύονται και φυγοκεντρώνται στα 12000 rpm για 10 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο αποτελεί το elution, δηλαδή την προς απομόνωση πρωτεΐνη. Τα δείγματα φυλάσσονται στους 4° C για περαιτέρω επεξεργασία.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS PAGE)

Για την ανάλυση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η τεχνική της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Τα πρωτεϊνικά δείγματα αναμειχθηκαν με 5x SDS loading buffer (τελικός όγκος 30 μl), αποδιατάχθηκαν με βρασμό για 5 λεπτά και μεταφέρθηκαν στον πάγο για 3 λεπτά. Τα αποδιαταγμένα πρωτεϊνικά δείγματα φορτώθηκαν σε 12% πηκτή πολυακρυλαμίδης (Πίνακας 13) και ηλεκτροφορήθηκαν στα 80-120 V (80 V όσο τα δείγματα ήταν στο πηκτή επιστοιβάσης (stacking gel) και 100-120 V στο πηκτή διαχωρισμού (separating gel)) σε 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Το διάλυμα της χρωστικής (6x SDS loading buffer) περιέχει 0,0625 mM Tris pH 6,8, 2% w/v SDS, 20% v/v γλυκερόλης και 0,1% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης. Πριν την χρήση προστίθενται 100 mM DTT. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) περιέχει 25 mM Tris pH 6,8, 192 mM γλυκίνης και 0.1% w/v SDS.

Χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue R-250 και αποχρωματισμός για καλύτερη ευκρίνεια των ζωνών. Το διάλυμα χρώσης (Staining solution) περιέχει 0.1% w/v Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% v/v μεθανόλης και 10% v/v παγόμορφου οξικού οξέος (glacial acetic acid). Το διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) περιέχει 40% μεθανόλης και 10% παγόμορφου οξικού οξέος. Με τη χρήση της Coomassie Brilliant Blue μπορεί να ανιχνευθεί 0,1 - 1 μg πρωτεΐνης ανά ζώνη (Smith, 1984).

Χρώση με νιτρικό άργυρο

Η χρώση με νιτρικό άργυρο είναι 100 φορές πιο ευαίσθητη από αυτή με Coomassie Brilliant Blue R-250 και μπορεί να οδηγήσει στην ανίχνευση 2 - 10 ng πρωτεΐνης ανά ζώνη (Giulian et. al., 1983). Όλες οι κατεργασίες της πηκτής γίνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και από κάθε διάλυμα χρησιμοποιήθηκε όγκος 200 ml σε κάθε μεταχείριση. Αρχικά γίνεται

μονιμοποίηση των πρωτεϊνών με 50% μεθανόλη / 5% οξικό οξύ για 20 λεπτά υπό ανάδευση. Ακολουθεί εμβάπτιση της πηκτής σε 50% μεθανόλη υπό ανάδευση για 10 λεπτά και ξέπλυμα με αποσταγμένο νερό για άλλα 10 λεπτά. Η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0,02% θειοθειικού νατρίου (sodium thiosulfate) για 1 λεπτό και στη συνέχεια ξεπλένεται με αποσταγμένο νερό για 2 λεπτά, προτού γίνει χρώση με 0,1 % διάλυμα νιτρικού αργύρου, για 20 λεπτά στους 4° C υπό ανάδευση. Ακολουθούν δύο ξεπλύματα με νερό για 2 λεπτά και εμφάνιση με διάλυμα που περιέχει 0,04% φορμαλδεΰδη και 2% ανθρακικό νάτριο, υπό ανάδευση μέχρι την εμφάνιση κίτρινου χρώματος στο διάλυμα. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 5% οξικού οξέος, για 5 λεπτά, υπό ανάδευση. Η πηκτή φυλάσσεται σε 1% οξικό οξύ στους 4° C.

Πίνακας 13. Συγκεντρώσεις των συστατικών κατά την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 12% (1.5 mm)

	πηκτή διαχωρισμού 12 % -Τελικές συγκεντρώσεις	πηκτή επιστοίβασης 5% - Τελικές συγκεντρώσεις
30%	w/v	12% w/v
πολυακρυλαμίδη(29:1,ακρυλαμίδη:bis- ακρυλαμίδη)		5% w/v
1.5 M Tris	(pH 8.8) 375 mM	(pH 6.8) 125 mM
SDS 0.4 % w/v	0,1% w/v	0,1% w/v
10% w/v υπερθειικό αμμώνιο (APS)	0,1% w/v	0,1% w/v
TEMED	0,01% v/v	0,01% v/v
ddH₂O	Μέχρι τα 10 ml	Μέχρι τα 5 ml

Ανάλυση κατά Western

Για την περαιτέρω ανάλυση των πρωτεϊνών και συγκεκριμένα την ανίχνευση των πρωτεϊνών GFP και PNGaseA-FLAG, χρησιμοποιείται ανάλυση τύπου Western. Η σύσταση των διαλυμάτων που αναφέρονται στη συνέχεια περιγράφεται στον Πίνακα 14. Μετά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών στην πηκτή πολυακρυλαμίδης, η πηκτή ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και εξισορροπείται για 10 λεπτά στο διάλυμα αποτύπωσης. Στη συνέχεια τοποθετούνται κατά σειρά πάνω στη συσκευή Semi Dry Mini Unit (Thermo Fisher) κατά σειρά: τέσσερα χαρτιά Whatman διαβρεγμένα με το διάλυμα αποτύπωσης, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, τέσσερα χαρτιά Whatman διαβρεγμένα με το διάλυμα αποτύπωσης, το καπάκι της συσκευής και βάρος. Για τη μεταφορά εφαρμόζονται 2,4 mA/cm² πηκτής για μία ώρα. Για την επιβεβαίωση της μεταφοράς η μεμβράνη μετά από μία πλύση με απιονισμένο νερό, επωάζεται για μερικά λεπτά σε διάλυμα χρωστικής Ponceau.

Για τον υβριδισμό της μεμβράνης με το αντίσωμα, η μεμβράνη αρχικά τοποθετείται σε διάλυμα προϋβριδισμού για τουλάχιστον μία ώρα υπό ανάδευση και ακολούθως πλένεται για 15 λεπτά με διάλυμα πλύσης. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται σε στο διάλυμα που περιέχει το πρωτογενές αντίσωμα για μία ώρα υπό ανάδευση. Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα πλύσης. Ακολουθεί επώαση για άλλη μία ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα και άλλες τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα πλύσης.

Για την εμφάνιση του σήματος των προς ανίχνευση πρωτεϊνών, προστίθεται το διάλυμα πλύσης ECL (Pierce) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδική κασέτα με φιλμ ακτίνων X και ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ σε σκοτεινό θάλαμο με το εμφανιστικό Curix 60.

Πίνακας 14. Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western

Διαλύματα	Σύσταση
Αποτύπωσης	25 mM Tris, 150 mM glycine, 20% v/v μεθανόλη
Ponceau	0.2% w/v Ponceau, 3% v/v οξικό οξύ
1X TBS	0,15 M χλωριούχο νάτριο, 20 mM Tris pH 7.6
Προϋβριδισμού	5% σκόνη γάλακτος (Regilait) σε 1X TBS
Αντισώματος	1% σκόνη γάλακτος (Regilait) σε 1X TBS και κατάλληλη συγκέντρωση αντισώματος *
Πλύσης	1X TBS, 0.1% Tween 20

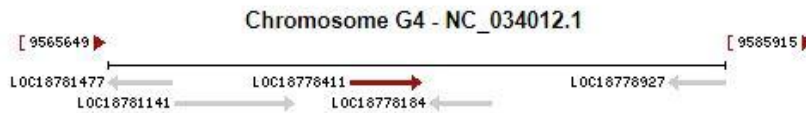
*Το αντίσωμα α- GFP και α-FLAG(Sigma) χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1:1000 και 1:10.000 αντίστοιχα, ενώ τα α-rabbit και α-mouse χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1:5000 και τα δύο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Απομόνωση του γονιδίου PNGaseA από το φυτό *Prunus amygdalus var. dulcis*

Για την επίτευξη του σκοπού της εργασίας, δηλαδή την υπερέκφραση της πρωτεΐνης PNGaseA σε φυτά *Nicotiana benthamiana* και την απομόνωση της από αυτά, το πρώτο βήμα είναι η απομόνωση του γονιδίου από το φυτό της αμυγδαλιάς (*Prunus amygdalus var. dulcis*). Για το εν λόγω γονίδιο δεν υπάρχει καταχώρηση στη βάση δεδομένων NCBI, οπότε για το σχεδιασμό εκκινητών χρησιμοποιήθηκε η καταχώρηση για το CDS (το τμήμα του γονιδίου που περιέχει μόνο εξώνια) του ίδιου γονιδίου από το πολύ συγγενικό φυτικό είδος *Prunus persica* (>XM_007211319.1 *Prunus persica* hypothetical protein (PRUPE_ppa003073mg) mRNA, complete cds) (1849 bp). Για το σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Primer3 του NCBI. Το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4

του γονιδιώματος του φυτού (Εικόνα 16). Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο πως η καταχώρηση στο NCBI ανανεώθηκε μετά από μερικούς μήνες και προστέθηκαν 256 νουκλεοτίδια στο τέλος του mRNA και 177 νουκλεοτίδια στην αρχή (>XM_007211319.2 PREDICTED: *Prunus persica* peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase A (LOC18778411), mRNA) (2282 bp) (Εικόνα 17).



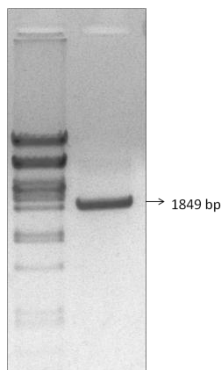
Εικόνα 16. Το χρωμόσωμα 4 του γονιδιώματος του φυτού *Prunus persica*. Με βέλη απεικονίζονται καταχωρήσεις γονιδίων στο NCBI. Με κόκκινο χρώμα φαίνεται το γονίδιο *PNGaseA*.

AGCCAGTAACAACGCAACAATAACTTCAACAGAATTTCAAATCAAAAAAGTGGACATTTTATGAATAAATAAAAAATTACATA
 GTTAAAATCACCATTGTTTTCCACTCCTAGACACCTAATAAAACAGAAAAATACCACCAAACCAAGGCATCTAAAACAAAGTA
 AACCAACAAAGCAAAAAGCTCAACCACCAAGTCAAGTCACTCAATGCGCTCTCTGTTGCCCTCTTCTCCTCCTACTCCTCCACCAA
 CCTCTGTTTTCCACAGCCAATGTCCACAAGCTCAACCTCCTCCGATCCGAGCTTCTCTCCGAACCCACACCTCTACATGACACC
 CCACCAACTGTATTTTTGAAGTAACCAACCATTGAAGTACAAAAACCAAGCCGTGTTCCAGCTCATTCTCCAGCATGA
 CTTTGCCTACACATATGGCCAAGCTCCAGTCTTTGCAAACACCCCTCCTCCCATGCCCCATCTCAAACCTTCTCCACAATT
 GTCCTGAATGGAAAGCTACCTGCAGAGGAAGGCAATTTGACCGCATTTTCGGGGTTTGGCTTGGTGGGGTTGAGATTCTCA
 GGAGCTGCACAGCAGAACCAAGGCCTAATGGGATTGTTTGGACTGTCGAGAAGGACATCACAAGGTAATTAATCACTGCTTA
 AGAGTAATCAAACACTTGCTGTTTATCTTGGCAATTTGATAGATAAAACCTACACTGGGATTTATCATGTGAATAAAGCATT
 CGTTTTTACCCTGCTGAAGAGAAATTGAATCTTTTGAACAAAAGTTGGATAATTTGGCATCTGGGTACCATTTCTTGGGCTGA
 TTTGATTTTACCATTTCGAGAAATCTGCCTTTGAATGATGGGTTGTGGTTTGAAGTTCAGAATTCAAATGATACGGAGTTGA
 AGGAGTTCAAGATTCACAAAATGCTTATAGGGCTGTGTTGGAGGTGATGTTTCATTCATGAGAATGATGAATTTGGTAT
 TCAAATCTTCTAATGAGTACATAGCTGCAAACAACCTTAGCGGTACACCTGGAAATGGGCCTTTTAGGGAGGTTGTGGTCA
 GTCTAGATGGTGAGATTGTTGGTGCAGTCTGGCCTTTACAGTGATTTTCACTGGAGGGATCAATCCTCTTTTGTGGAGACCC
 ATTACTGCAATTGGCTCATTCCGACTTATGATATCGAAATACACCATTTTAGGGAAGATATTAGATGGGAAGAG
 CCACAAGTTTGGGTTAATGTTACAAATGCCTTAAATGTTTGGTACGTTGATGCAAATTTGCATCTTTGGTTGGACAAACAGA
 GCACAAAAACTGAAGGAAAGCTTCTGAACATAGTAGCTTGGCCCTGTTGTTCCCTGGTTTCAAGGTTTAAAT
 GGCACATTTTGCAGGACAAGCAGGGCCGTGTCATCAACTGGATGGGTGAAGTCTTCTATGGGAATATCACAACCCGTT
 CAATTCAAGACTTCTATTACAGTAATCAATGGTCTGGGAAAAGATGGTAATATGCAGATAGTCAACCAGAAGATCATTTTC
 AATGACTCAGTTCATATTAACCTGCCATCCTCCTATGTTCACTCACTGACATCACACAAAACATTTCCACTTTATTTGTACACTG
 ACTTCTTAGGACAAGGAAATGGAACCTTATTTATTGATTACAAATGTGGACTTGGGATTTATTGAGAAGAAGTCTGGTTTGGG
 ATTCTCGAACAGCTCTCTCAGAAATCTGCAGAGTCTGAGGGCAATATGGTTGTGAAAAACAATTTGGTTGTGAGTGGATTG
 GGGAGCACTCAGCAAGTCTACAGATATGATGGTGGTAAATTTCTGTTACTTCAGAAATATAAGCAGCTCAAACACACAATAC
 TCTATGACAAGGTGGGGAGCAAATGCAACAAAAAATCGTTGTCTAAATTTGGATTTGTCTTAAGCAGACTGTGGCCTTTTGGT
 GCTCGAATGAATTTGCTGGTCTCCGATTTACATGGAACAATGAGGAAAGTCTAGCTCATCCACATTCGTGCATCTTCTGT
 TTGGTGGTACCTCAAATAAATGTGATTCTGTACTCAATTTCAATTTGTGGGGATTCTTCTGGATTGTAGTTGAGGTATCTGCA
 CCCAAAGTGATTCTGGTTTTACTTGGATTGGAATGATTTCTAAAAAGCGGATCAGGTCAGCTTGTGCTATGTCAGTATAATC
 AAAGTTTATGCAGGAAATTATAACCATTAATTTAGAATCTAA

Εικόνα 17. Το mRNA που προκύπτει από τη μεταγραφή του γονιδίου *PNGaseA* (καταχώρηση του NCBI: >XM_007211319.2 PREDICTED: *Prunus persica* peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase A (LOC18778411). Με πράσινο και κόκκινο χρώμα υποδεικνύονται τα κωδικόνια έναρξης και λήξης της μετάφρασης αντίστοιχα, ενώ με λαδί και ροζ χρώμα οι εκκινήτες που σχεδιάστηκαν για την απομόνωση του CDS.

Με τη χρήση βιοπληροφορικού προγράμματος (BLAST) έγινε αναζήτηση στη βάση δεδομένων για όμοια γονίδια σε άλλους οργανισμούς, και βρέθηκαν ομοιότητες μόνο σε άλλους φυτικούς οργανισμούς (*Prunus avium*, *Malus domestica*, *Pyrus bretshneideri*, *Fragaria vesca* κ.α). Βρέθηκαν και όμοια γονίδια (με χαμηλό ποσοστό ομοιότητας) σε είδη *Nicotiana* (*Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana tabacum*). Σημειώνεται πως όλα τα

εντοπιζόμενα γονίδια είναι δομές που έχουν προκύψει από βιοπληροφορική ανάλυση (predicted) και δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές πληροφορίες για αυτά.



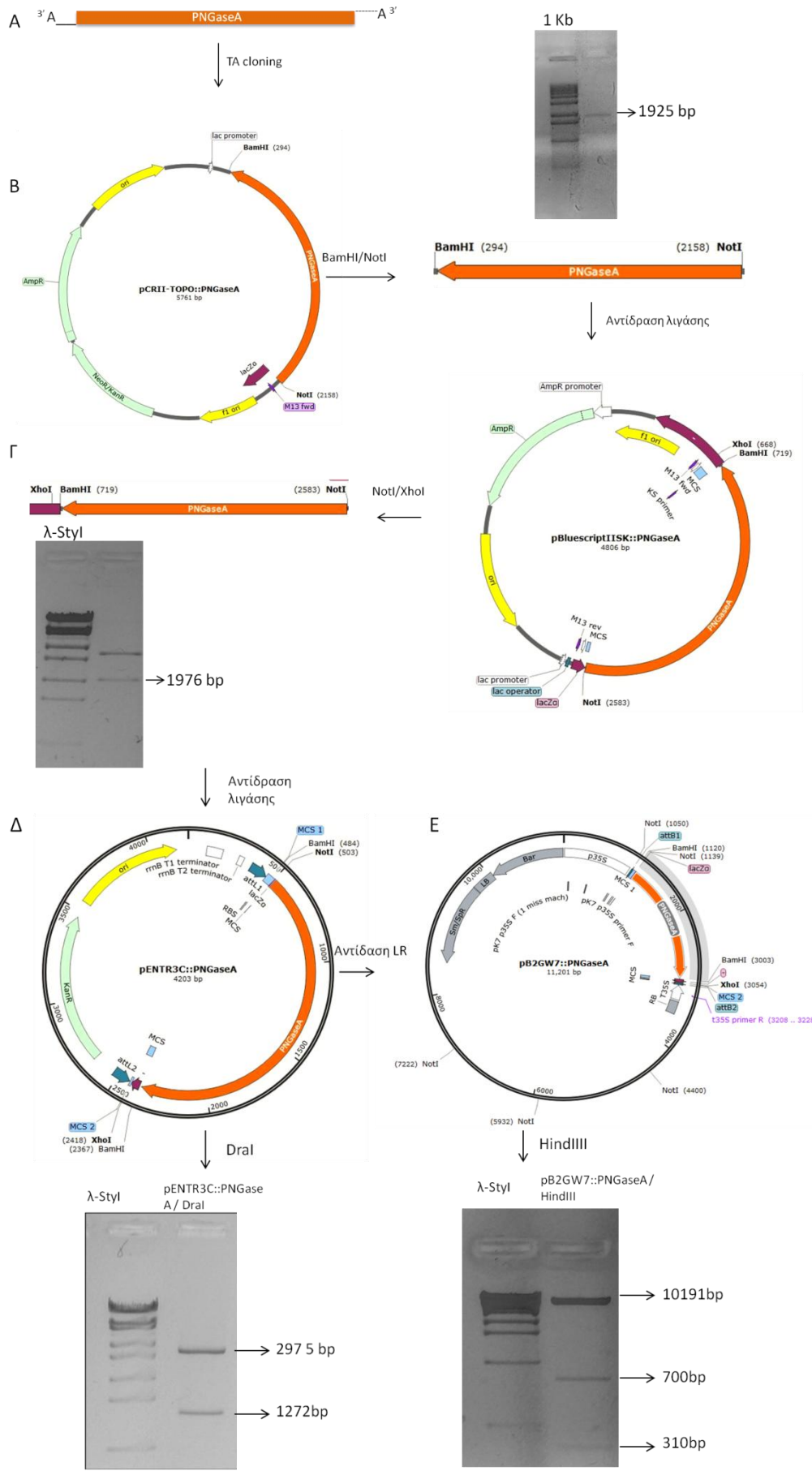
Εικόνα 18. Ανάλυση του CDS του γονιδίου που κωδικοποιεί για την PNGaseA σε πηκτή αγαρόζης 1,2%

Μετά από απομόνωση ολικού RNA από αμύγδαλα, ακολουθείται η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και η επιθυμητή αλληλουχία ενισχύεται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, με τους αντίστοιχους εκκινητές και πολυμεράση υψηλής πιστότητας. Το προϊόν της αντίδρασης αναλύεται σε πηκτή αγαρόζης 1,2% (Εικόνα 18)

Η παρατηρούμενη ζώνη αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος και απομονώνεται από την πηκτή αγαρόζης για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια σε κλωνοποιήσεις, με απώτερο σκοπό να κλωνοποιηθεί στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα που θα χρησιμοποιηθεί στον αγροεμποτισμό των φυτών.

Κλωνοποίηση του γονιδίου PNGaseA σε πλασμιδιακούς φορείς

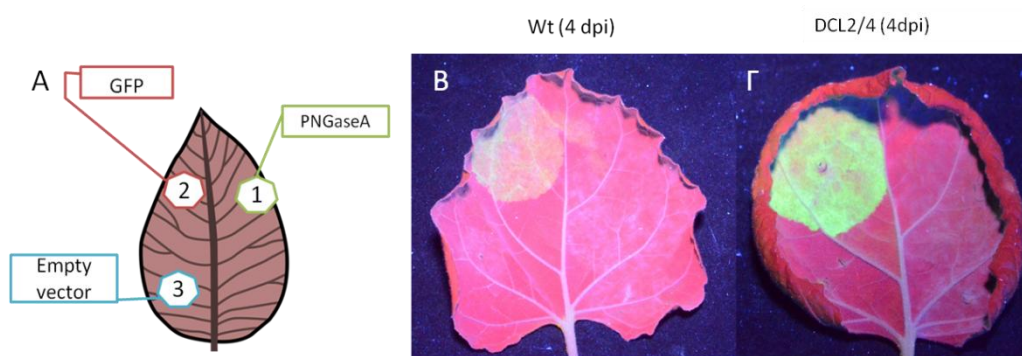
Μετά την ενίσχυση του cDNA για το γονίδιο, λόγω απουσίας περιοριστικών θέσεων κοπής στους εκκινητές, προστέθηκαν μόρια αδενίνης στα άκρα του τμήματος DNA, με την διαδικασία του A-tailing. Με αυτό τον τρόπο, το τμήμα DNA κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO που έχει ελεύθερα άκρα θυμίνης, συμπληρωματικά με τα άκρα του εν λόγω τμήματος. Ακολούθησε αντίδραση κλωνοποίησης TA. Στη συνέχεια, το CDS του γονιδίου *PdPNGaseA* κλωνοποιείται σε μία σειρά από πλασμιδιακούς φορείς με στόχο την τελική του ένθεση στον δυαδικό φορέα pB2GW7, ο οποίος και θα χρησιμοποιηθεί για τον αγροεμποτισμό, με μετασχηματισμένα βακτηριακά στελέχη *A. tumefaciens* C58C1. Σε κάθε βήμα των κλωνοποιήσεων, δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* DH10b μετασχηματίζονται με τα πλασμίδια. Στο ενισχυμένο τμήμα (1849 bp) προστέθηκαν A άκρα και ακολούθησε διαδικασία TA κλωνοποίησης σε πλασμίδιο pCRII-TOPO. Μετά από πέψη με BamHI/NotI το γονίδιο κλωνοποιείται στο φορέα pBluescriptSKII. Στη συνέχεια, το τμήμα απομονώνεται με NotI/XhoI και κλωνοποιείται στον φορέα pENTR3C. Έπειτα, με αντίδραση LR κλωνοποιείται στον τελικό φορέα pB2GW7. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στην Εικόνα 19)



Εικόνα 19. Διαδικασία κλωνοποίησης του γονιδίου *PNGaseA*. Σε κάθε βήμα που περιγράφεται, τα πλασμίδια εισέρχονται σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα (μετασηματισμός) και μετά από πολλαπλασιασμό τους και απομόνωση του πλασμιδίου γίνονται δοκιμαστικές πέψεις για την επιβεβαίωση του σωστού ενθέματος. (Α) Στο ενισχυμένο τμήμα (1849 bp) προστέθηκαν Α άκρα και ακολούθησε διαδικασία TA κλωνοποίησης σε πλασμίδιο pCRII-TOPO (Β). Σε όλους τους κλώνους που απομονώνονται, το γονίδιο ελέγχεται με πέψεις για τη φορά και διαπιστώνεται πως σε κανέναν δεν έχει την επιθυμητή. Συνεπώς, απομονώνεται, μετά από πέψη με BamHI/NotI (1925 bp), από πηκτή αгарόζης 1% και με αντίδραση λιγάσης κλωνοποιείται στο φορέα pBluescriptSKII (Γ) ο οποίος προηγουμένως έχει υποστεί πέψη με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα. Στη συνέχεια, το τμήμα απομονώνεται με NotI/XhoI (1976 bp, πηκτή 1%) και με αντίδραση λιγάσης κλωνοποιείται στον φορέα pENTR3C (Δ). Εκεί ελέγχεται με δοκιμαστικές πέψεις η ένθεση (DraI - 1272/2975 bp- πηκτή 1%) και στη συνέχεια με αντίδραση LR κλωνοποιείται στον τελικό φορέα pB2GW7 (Ε). Εκεί και πάλι ελέγχεται με δοκιμαστική πέψη (HindIII- 10191/700/310 bp, πηκτή 1.5%). Με πορτοκαλί βέλος απεικονίζεται το γονίδιο που κωδικοποιεί για την *PNGaseA*, και το βέλος υποδηλώνει το τέλος του τυ.

Αγροεμποτισμός σε φύλλα *Nicotiana benthamiana*

Τα φυτά που ανήκουν στο γένος *Nicotiana* έχουν χρησιμοποιηθεί σαν ξενιστές για την ετερόλογη παραγωγή πληθώρας φαρμακευτικά- σχετιζόμενων πρωτεϊνών, με προσεγγίσεις πυρηνικού, χλωροπλαστικού και παροδικού μετασηματισμού (J.M. van Herpen et al., 2010). Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία δοκιμάζεται ο παροδικός μετασηματισμός (με τη μέθοδο του αγροεμποτισμού) σε φύλλα *Nicotiana benthamiana*. Χρησιμοποιούνται στελέχη αγροβακτηρίου C58C1 που φέρουν το πλασμίδιο για την υπερέκφραση της *PNGaseA* (pB2GW7). Με αυτό τον τρόπο, το γονίδιο Pd*PNGaseA* εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή *CaMV* 35S. Ως μάρτυρες χρησιμοποιούνται οι κατασκευές pBIN::GFP (έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης- θετικός μάρτυρας) και pB2GW7 (ο πλασμιδιακός φορέας χωρίς το ένθεμα- αρνητικός μάρτυρας) (Εικόνα 20Α). Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αγρίου τύπου και διπλά μεταλλάγματα DCL 2/4. Τα διπλά μεταλλάγματα χρησιμοποιούνται λόγω της καταστολής των DCL2 και DCL4, βασικών συντελεστών του μηχανισμού PTGS, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου (Azhakanandam et al., 2007) Μετά από 4 ημέρες από τον αγροεμποτισμό, τα φύλλα παρατηρήθηκαν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 20Β και Γ) και απομονώθηκε ιστός από την κάθε μεταχείριση.



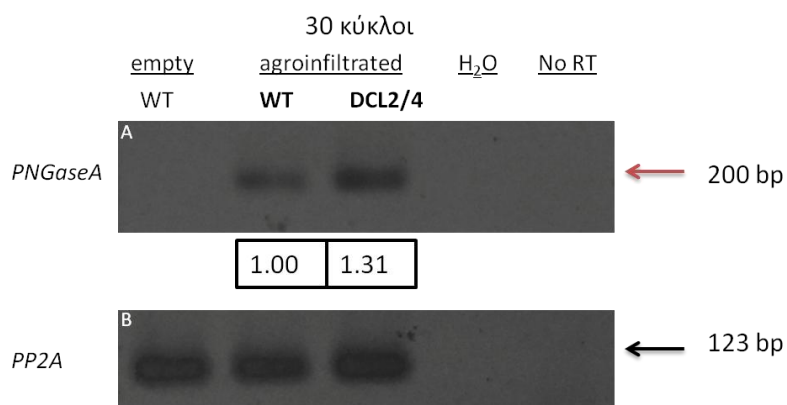
Εικόνα 20. Φύλλα *N. benthamiana* 4 ημέρες μετά τον αγροεμποτισμό με βακτήρια (*A. tumefaciens* C58C1) μετασηματισμένα με τις κατασκευές pB2GW7::PNGaseA (*PNGaseA*), pB2GW7 (empty) και pBIN::GFP (GFP) παρατηρούμενα υπό υπεριώδη ακτινοβολία. (Α): Σχηματική απεικόνιση των μεταχειρίσεων σε κάθε φύλλο. (Β) και (Γ): Φαίνεται το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα που προκύπτει από την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP)- θετικός μάρτυρας κατά τον αγροεμποτισμό. Στην Εικόνα Γ το χρώμα είναι πιο έντονο λόγω της καταστολής της σίγησης στο διπλό μετάλλαγμα, με συνέπεια τη μεγαλύτερη συσσώρευση παραγόμενης πρωτεΐνης

Επιβεβαίωση της λειτουργίας του γονιδίου *PNGaseA* (με semiq RT PCR)

Για την επιβεβαίωση της λειτουργίας του μελετώμενου γονιδίου στον αγροεμποτισμένο φυτικό ιστό που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ημιποσοτικής RT (reverse transcriptase) PCR. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής αποσκοπεί στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, δεδομένου ότι επιτρέπει την ταχεία ανάλυση του αγγελιαφόρου RNA (mRNA).

Αρχικά απομονώνονται ολικά νουκλεϊκά οξέα από τα φύλλα των φυτών με τη μέθοδο Trizol και ακολουθεί επίδραση με DNase. Το ολικό RNA χρησιμοποιείται ως μήτρα για την παραγωγή μονόκλωνου cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης. Το παραγόμενο cDNA χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για ενίσχυση και ημιποσοτική εκτίμηση της έκφρασης του γονιδίου *PNGaseA* (εκκινητές της PCR: *PNGaseFq/PNGaseR* Πίνακας 2.). Όλα τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν προηγουμένως με τη βοήθεια ανάλογων αντιδράσεων PCR για το σταθερής μεταγραφικής έκφρασης γονίδιο (housekeeping) *PP2A*. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δείγμα νερού, δείγμα ολικού RNA και δείγμα από ιστό φυτού αγρίου τύπου στο οποίο είχε γίνει αγροεμποτισμός με πλασμιδιακό φορέα που δεν περιέχει ένθεμα.

Από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (Εικόνα 21) σε πήκτωμα αγαρόζης 2% μπορεί να παρατηρηθεί, μετά από 30 κύκλους αντίδρασης, η παρουσία mRNA, στις δύο σειρές φυτών, αγρίου τύπου και DCL2/4.16, ενώ φαίνεται και μία διαφοροποίηση στην ποσότητα των μεταγράφων, με τα φυτά DCL2/4.16 να εμφανίζουν μεγαλύτερη ποσότητα. Η ποσοτικοποίηση των ζωνών έγινε με το πρόγραμμα Quantity One.



Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της ημιποσοτικής RT PCR από αγροεμποτισμένο ιστού φύλλων *N.benthamiana* με τις κατασκευές *pB2GW7::PNGaseA* (agroinfiltrated) και *pB2GW7* (empty). (A) Τα δείγματα για το γονίδιο *PNGaseA* στις διάφορες μεταχειρίσεις. (B) Κανονικοποίηση των ίδιων δειγμάτων με το housekeeping γονίδιο *PP2A*. empty WT: ιστός από φυτά αγρίου τύπου αγροεμποτισμένος με *pB2GW7* χωρίς την ένθεση. No RT: δείγμα RNA από αγροεμποτισμένα με την κατασκευή φυτά αγρίου τύπου. Οι αριθμοί υποδηλώνουν την εκτιμητέα ποσότητα των μεταγράφων (πρόγραμμα Quantity One)

Διαδικασίες ανίχνευσης της πρωτεΐνης *PNGaseA*

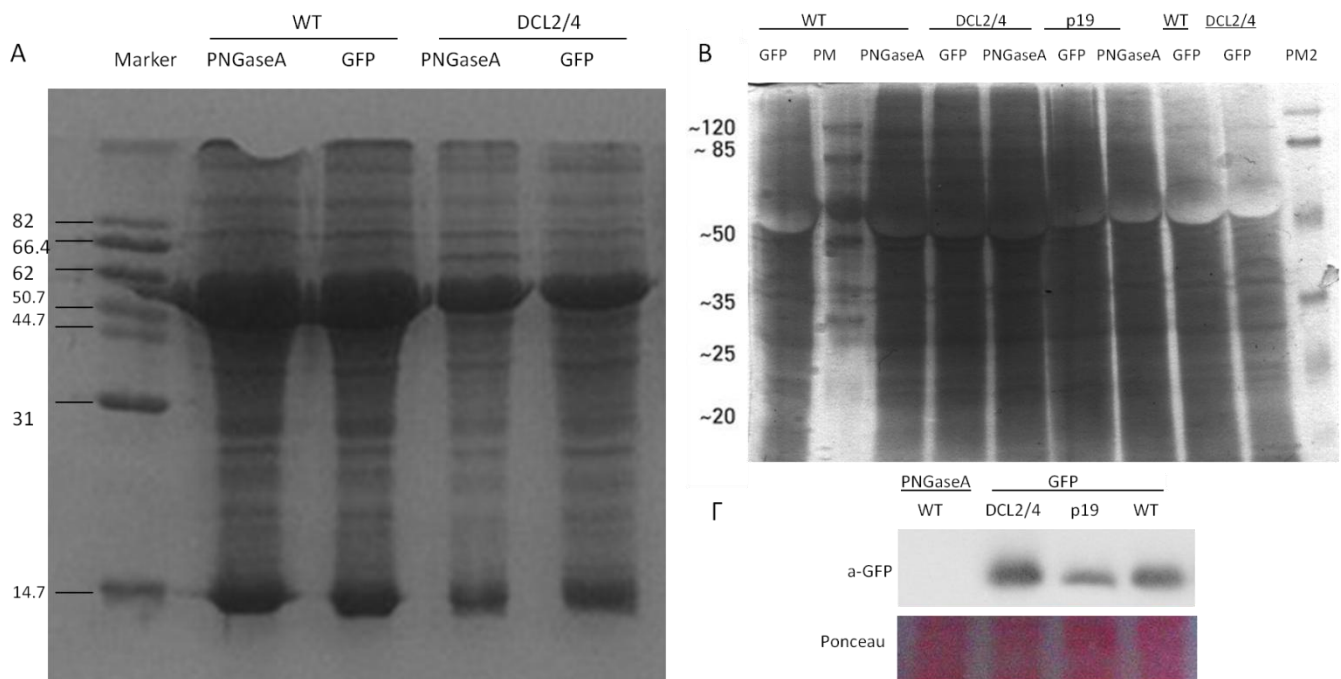
Η πρωτεΐνη απομονώθηκε από αμύγδαλα (Altman et al., 1998) με μεθόδους χρωματογραφίας FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) και δείχθηκε η ύπαρξη ενός ετεροδιμερούς μορίου, αποτελούμενο από δύο υπομονάδες, 55 και 27 kDa. Κατά τη βιοπληροφορική ανάλυση, προκύπτει πως το CDS που απομονώθηκε και ενισχύθηκε από

αμύγδαλα στην παρούσα εργασία είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση και των δύο υπομονάδων. Αυτό διαπιστώθηκε με την υποβολή της αλληλουχίας CDS (από το *Prunus persica*- XM_007211319.1) προς μετάφραση στο πρόγραμμα ExPASy. Η πρωτεΐνη που προκύπτει φέρει τις δύο χαρακτηριστικές αμινοξικές αλληλουχίες που αναφέρονται στην παραπάνω δημοσιευμένη εργασία, και αντιστοιχούν στα αμινοτελικά άκρα της μεγάλης και της μικρής υπομονάδας (Εικόνα 22). Από την καταχώρηση της πρωτεΐνης στη βάση δεδομένων UniProt (P81898 (PNAA_PRUDU)) φαίνεται πως η μία υπομονάδα (χαρακτηρίζεται ως light chain) ξεκινά από το πρώτο μέχρι άγνωστο αριθμο αμινοξέος, ενώ η δεύτερη υπομονάδα (χαρακτηρίζεται ως heavy chain) ξεκινά από το αμινοξύ 165 έως το 571, ενώ το συνολικό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι 64.48 kDa, διαφορετικό από το συνολικό άθροισμα των δύο υπομονάδων, υποδεικνύοντας πιθανή αλληλοεπικάλυψη. Ακόμα, σύμφωνα με το πρόγραμμα BaCello (Balanced Subcellular Localization Predictor), η μελετώμενη πρωτεΐνη εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου.

```
MASLLPLFFLLLLHQPLFSTANVHKLNLLRSELLSEPTPLHDTPTTVFFEVTKPIENVPKTKPCSQILIQHDFAY
TYGQAPVFNANYTPPSHCPSQTFSTIVLEWKATCRGRQFDRIFGVWLGVEILRSCTAEP RPNGIVWTV EK
DITRYYSLLKSNQTLAVYLG NLDKTYTGIYHVNI SIRFYPAEEKLSFEQKLDN LASGYHSWADLILPISRNL
PLNDGLWFEVQNSNDELKEFKIPQNA YRAVLEVYVSFHENDEFWYSNLPNEYIAANNLSGTPGNGPFR
EVVNSLDGEIVGAVWPFTVIFTGGINPLLRPITAIGSF DLPTYDIEITPFLGKILDGKSHKFGFNVTNALNV
WYVDANLHLWLDKQSTKTEGK LSEHSSLPLVVSLVSDFKLNGTFLTRTSRAVSSTGWVKSSYGNITTRSI
QDFYYSNSMVLGKDG NMQIVNQKIIFNDSVHINLPSSYVHSLTSHKTFPLYLYTDFLGQNGTYLLITNVD
LGFIEKKSGLGFSNSSLRNLQSAEGNMVVKNLNV SGLGSTQQVYRYDGGKFCYFRNISSSNYTYLTDKVG
SKCNKKSLSNLD FVLSRLWPF GARMNFAGLRFT
```

Εικόνα 22. Η αλληλουχία της πρωτεΐνης PNGaseA που προέκυψε από τη μετάφραση του καταχωρημένου CDS του *Prunus persica*. Με μπλέ χρώμα φαίνεται το αμινοτελικό άκρο της μικρής υπομονάδας, ενώ με κίτρινο χρώμα φαίνεται το αμινοτελικό άκρο της μεγάλης υπομονάδας. Με κόκκινο χρώμα τονίζεται το αμινοξύ θρεονίνη (T) που στην εργασία των Altman και συνεργατών (1998) φαίνεται να είναι φαινυλαλανίνη (F). Το αμινοξύ θρεονίνη εντοπίζεται στην ίδια θέση και στην καταχώρηση για την πρωτεΐνη PNGaseA από το φυτό *Prunus dulcis* στο NCBI (gi|56405352)

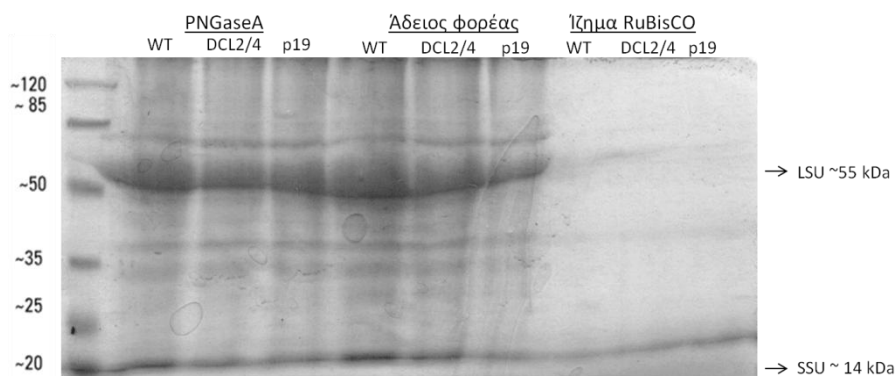
Για την επιβεβαίωση της παραγωγής ή μη της πρωτεΐνης στην παρούσα εργασία, αρχικά απομονώνονται οι ολικές πρωτεΐνες από τον αγροεμποτισμένο ιστό και στη συνέχεια αναλύονται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% (SDS-PAGE). Δοκιμάστηκε χρώση του πηκτώματος τόσο με Coomassie Brilliant Blue R-250 (Εικόνα 23A) όσο και με νιτρικό άργυρο (Εικόνα 23B). Και στις δύο περιπτώσεις δεν εντοπίζονται διαφορές ανάμεσα στα δείγματα που να υποδεικνύουν υπερέκφραση της PNGaseA, αλλά δεν εντοπίζεται ούτε η πρωτεΐνη GFP (27 kDa) που αποτελεί το θετικό μάρτυρα της διαδικασίας και ο φθορισμός που δημιουργεί είναι ορατός με γυμνό οφθαλμό. Για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης της GFP έγινε ανάλυση τύπου western με χρήση του πολυκλωνικού ορού α-GFP (Εικόνα 23Γ), κατά την οποία ανιχνεύθηκε η πρωτεΐνη. Στην παραπάνω πειραματική προσέγγιση χρησιμοποιήθηκαν και φυτά p19, διπλά μεταλλάγματα DCL2/4 και φυτά αγρίου τύπου.



Εικόνα 23. Διαδικασίες για την ανίχνευση της πρωτεΐνης PNGaseA. (A) Ηλεκτροφόρηση και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250 (σε πηκτή ακρυλαμίδης 12%) του συνόλου των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από αγροεμποτισμένο ιστό με *pB2GW7::PNGaseA* και *pBIN::GFP* (GFP), από φυτά WT και DCL2/4 (τα δείγματα από τα p19 μεταλλάγματα δεν χρησιμοποιήθηκαν λόγω πειραματικού σφάλματος). (B) (A) Ηλεκτροφόρηση και χρώση με νιτρικό άργυρο (σε πηκτή ακρυλαμίδης 12%) του συνόλου των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από αγροεμποτισμένο ιστό με *pB2GW7::PNGaseA* και *pBIN::GFP* (GFP), από φυτά WT και DCL2/4 και p19. Οι αναμενόμενες ζώνες (55 και 27 kDa για την PNGaseA και 27 kDa για την GFP) δεν παρατηρούνται. (Γ) Ανάλυση τύπου western εκχυλίσματος ολικών πρωτεϊνών από αγροεμποτισμένο ιστό με *pB2GW7::PNGaseA* (αρνητικός μάρτυρας) και *pBIN::GFP* (GFP) σε φυτά WT και DCL2/4 και p19. Οι πρωτεΐνες αναλύονται σε αποδιατακτική πηκτή SDS-PAGE 12% και μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επωάζονται με το αντίσωμα a-GFP

Σε μία περαιτέρω προσπάθεια για την ανίχνευση της πρωτεΐνης, χρησιμοποιείται μεθοδολογία για την μείωση της πρωτεΐνης RuBisCO, που αποτελεί την πιο άφθονη πρωτεΐνη του φύλλου (30-60% ανάλογα το φυτικό είδος) (Kim et al., 2013). Λόγω της αφθονίας της εμποδίζει τις πρωτεομικές μελέτες, καθώς η μεγάλη και μικρή υπομονάδα της εμποδίζουν την ανίχνευση πρωτεϊνικών ζωνών. Ρυθμιστικές πρωτεΐνες και άλλες που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια εντοπίζονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (περίπου 100 μόρια ανά κύτταρο). Επομένως, αυτές οι πρωτεΐνες είναι δύσκολο να εντοπιστούν με πρωτεομικές προσεγγίσεις, ακόμα και με πρόσβαση στα πιο πρόσφατα φασματομέτρα μάζας. Η RuBisCO εμποδίζει την απορρόφηση των παραπάνω πρωτεϊνών σε IPG λωρίδες, με επακόλουθη την μειωμένη ανίχνευση και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών σε 2D αναλύσεις και φασματομετρία μάζας (MS) (Gupta et al., 2015).

Στην παρούσα εργασία δοκιμάζεται το πρωτόκολλο μείωση της RuBisCO (Kim et al., 2013). Μετά την απομόνωση των πρωτεϊνών από αγροεμποτισμένο ιστό, τα δείγματα επωάζονται με διάλυμα θειικής προταμίνης 0,12% και ακολουθεί ο διαχωρισμός των ολικών πρωτεϊνών από τη RuBisCO. Μετά το πέρας της διαδικασίας, τα δείγματα από αγροεμποτισμένο ιστό με την κατασκευή *pB2GW7::PNGaseA* και *pB2GW7* (άδειος φορέας- αρνητικός μάρτυρας) αναλύονται σε πηκτή ακρυλαμίδης 12%, ενώ το ίζημα από κάθε δείγμα που περιέχει την RuBisCO αναλύεται ως θετικός μάρτυρας (Εικόνα 24). Φαίνεται από την απουσία της RuBisCO στους θετικούς μάρτυρες πως το πρωτόκολλο δεν εφαρμόστηκε με επιτυχία.

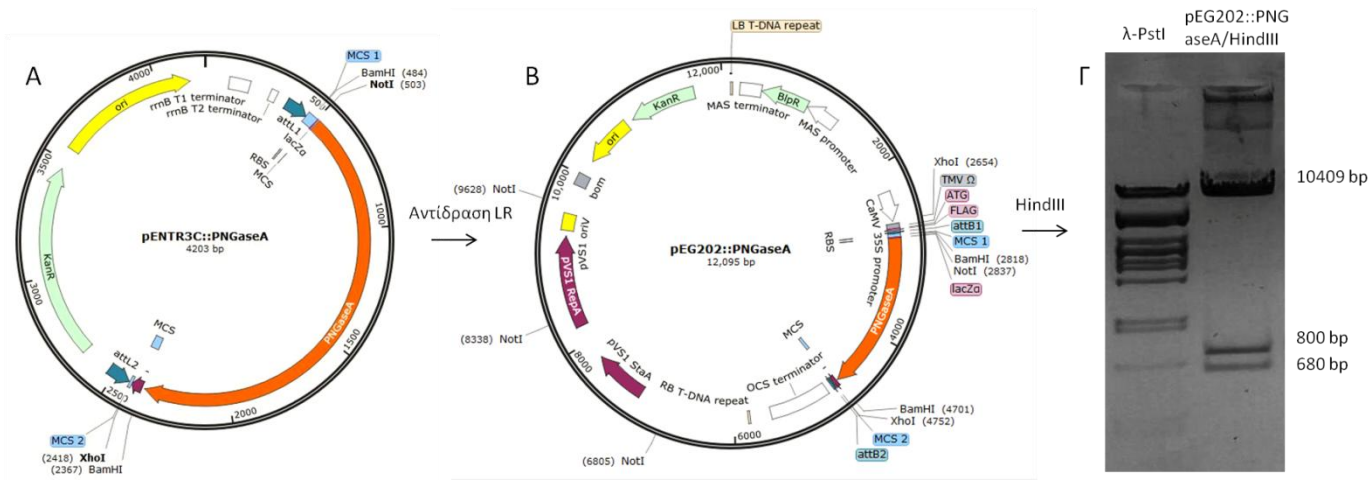


Εικόνα 24. Ανάλυση ολικών πρωτεϊνών σε πηκτή ακρυλαμίδης 12% και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250. Τα δείγματα αποτελούνται από εκχύλισμα ολικών πρωτεϊνών απομονωμένο από αγροεμπτισμένο ιστό με τις κατασκευές *pB2GW7::PNGaseA* (*PNGaseA*) και *pB2GW7*(άδειος φορέας). Στις τρεις τελευταίες διαδρομές φαίνεται ο θετικός μάρτυρας, το ίζημα που περιέχει την *RuBisCO*, στο οποίο όμως δεν εντοπίζονται μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης. Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις είναι *N.benthamiana* αγρίου τύπου, διπλά μεταλλάγματα *DCL2/4* και *p19*

Σήμανση της *PNGaseA* με επίτοπο FLAG

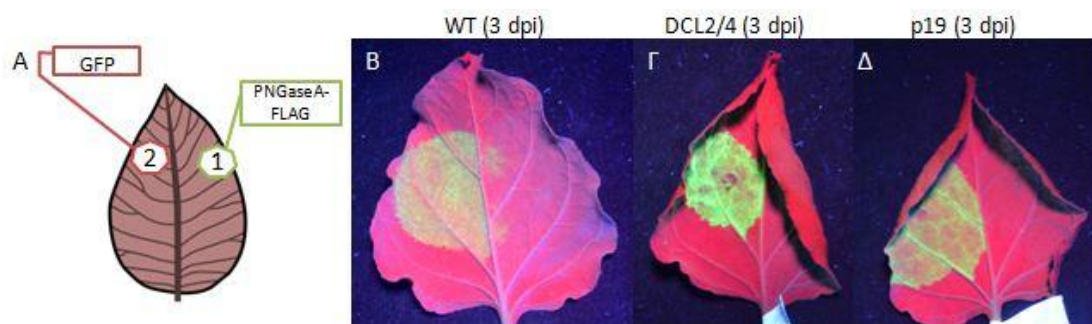
Ο επίτοπος FLAG αποτελεί ένα μικρό υδρόφιλο πεπτιδίδιο αποτελούμενο από 8 αμινοξέα και ενώνεται με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που μελετάται. Λόγω της υδόφιλης φύσης του είναι πιο πιθανό να εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, κάνοντας έτσι την αποκοπή του από κατάλληλα ένζυμα και την ανίχνευση από αντισώματα πιο εύκολη. Ακόμα, λόγω του μικρού μεγέθους του είναι λιγότερο πιθανό να αλληλεπιδρά με άλλους επιτόπους, πρωτεϊνικές περιοχές ή να αλλάζει τη λειτουργία, έκκριση ή μεταφορά της πρωτεΐνης με την οποία έχει συντηχθεί.

Στην παρούσα εργασία, μετά από τις προσεγγίσεις που αναφέρονται στην παραπάνω ενότητα, δοκιμάζεται ο μετασχηματισμός του πλασμιδίου *pEarlyGate 202* με το *PNGaseA*. Το πλασμίδιο *pEarlyGate 202* ανήκει στην κατηγορία των Gateway® φορέων μετασχηματισμού, είναι συμβατός για χρήση σε μετασχηματισμό φυτικού ιστού και φέρει τον επίτοπο FLAG, οδηγώντας στη σύντηξη του με το αμινοτελικό άκρο της προς έκφραση πρωτεΐνης, η οποία εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή *CaMV 35S*. Ο μετασχηματισμός του πλασμιδίου *pEarlyGate 202* (πλασμίδιο δέκτης) έγινε με αντίδραση LR και το πλασμίδιο δότη *pENTR3C::PNGaseA*. Στη συνέχεια το μετασχηματισμένο πλασμίδιο δέκτης ελέγχεται με πέψεις (Εικόνα 25).



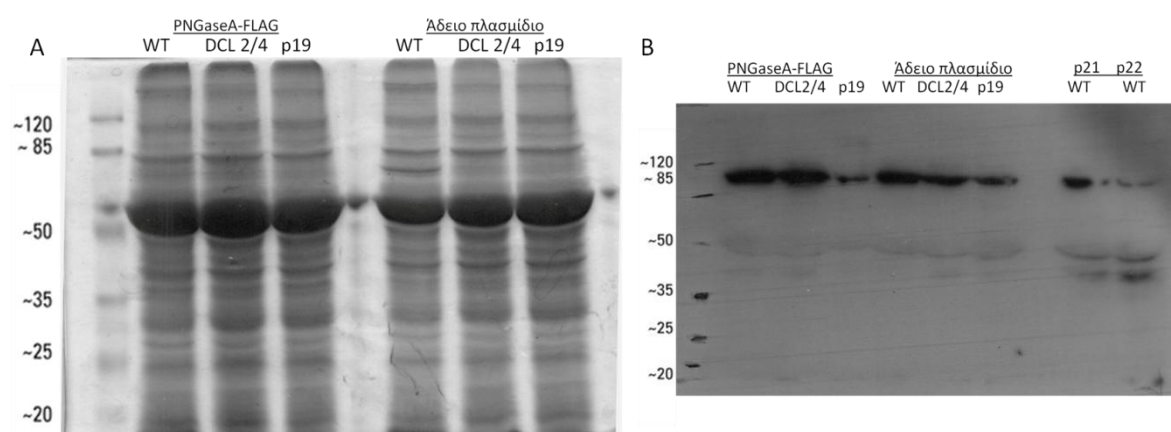
Εικόνα 25. Κλωνοποίηση του *PdPNGaseA* στο πλασμίδιο *pEarlyGate 202* με το. (Α) Το πλασμίδιο δότης *pENTR3C::PNGaseA* μετά από αντίδραση LR, οδηγεί σε μετασχηματισμό του *pEG202* (Β). (Γ) Το πλασμίδιο *pEG202::PNGaseA* ελέγχεται με πέψη για την ύπαρξη της ένθεσης, δίνοντας πράγματι τις αναμενόμενες ζώνες (10409 bp/800 bp/680 bp) μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

Μετά την επιτυχή δημιουργία του πλασμιδίου *pEG202::PNGaseA*, ο πλασμιδιακός φορέας χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων *A.tumefaciens* C58C1, τα οποία εν συνεχεία χρησιμοποιούνται για τον παροδικό μετασχηματισμό φύλλων φυτών *N. benthamiana* αγρίου τύπου, διπλά μεταλλάγματα DCL 2/4 και p19. Για τον αγροεμπότισμό χρησιμοποιήθηκαν οι κατασκευές *pEG202::PNGaseA*, *pEG202* (άδειο πλασμίδιο- αρνητικός μάρτυρας) και *pBIN::GFP* (θετικός μάρτυρας). Σημειώνεται πως ο αγροεμπότισμός με τον αρνητικό μάρτυρα έγινε σε ξεχωριστό φύλλο. Στη συνέχεια, μετά από 3 ημέρες, ο ιστός παρατηρείται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 26), λιωτριβείται παρουσία υγρού αζώτου και απομονώνονται οι ολικές πρωτεΐνες.



Εικόνα 26. Φύλλα *N. benthamiana* 3 ημέρες μετά τον αγροεμπότισμό με βακτήρια (*A.tumefaciens* C58C1) μετασχηματισμένα με τις κατασκευές *pEG202::PNGaseA* (*PNGaseA-FLAG*), *pB2GW7* (άδειο πλασμίδιο) και *pBIN::GFP* (*GFP*) παρατηρούμενα υπό υπεριώδη ακτινοβολία. (Α): Σχηματική απεικόνιση των μεταχειρίσεων σε κάθε φύλλο. Σημειώνεται πως ο αγροεμπότισμός με το άδειο πλασμίδιο έγινε σε ξεχωριστό φύλλο, που δεν φαίνεται στο σχήμα. (Β), (Γ),(Δ): Φαίνεται το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα που προκύπτει από την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (*GFP*)- θετικός μάρτυρας κατά τον αγροεμπότισμό. Στην Εικόνα Γ το χρώμα είναι πιο έντονο λόγω της καταστολής της σίγησης στο διπλό μετάλλαγμα, με συνέπεια τη μεγαλύτερη συσσώρευση παραγόμενης πρωτεΐνης.

Μετά την απομόνωση των πρωτεϊνών, ακολουθεί ανάλυσή τους σε πηκτή ακρυλαμίδης 12% και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250 , με στόχο την πιθανή ανίχνευση της ζώνης της παραγόμενης πρωτεΐνης (Εικόνα 27Α). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα, δεν παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στα δείγματα της πρωτεΐνης και τον αρνητικό μάρτυρα (άδειο πλασμίδιο). Ταυτόχρονα, έγινε ανάλυση τύπου Western με στόχο την εξακρίβωση της παραγωγής πρωτεΐνης, με τη χρήση του αντισώματος α-FLAG (Εικόνα 27Β), αλλά παρατηρήθηκε μη ειδικό σήμα σε όλα τα δείγματα. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δύο πλασμιδιακές κατασκευές (pEG202::p21 και pEG202::p22) από το εργαστήριο (μεταδιδακτορική φοιτήτρια Νάντια Κατσαρού) με αναμενόμενο μοριακό βάρος περίπου 25 kDa.

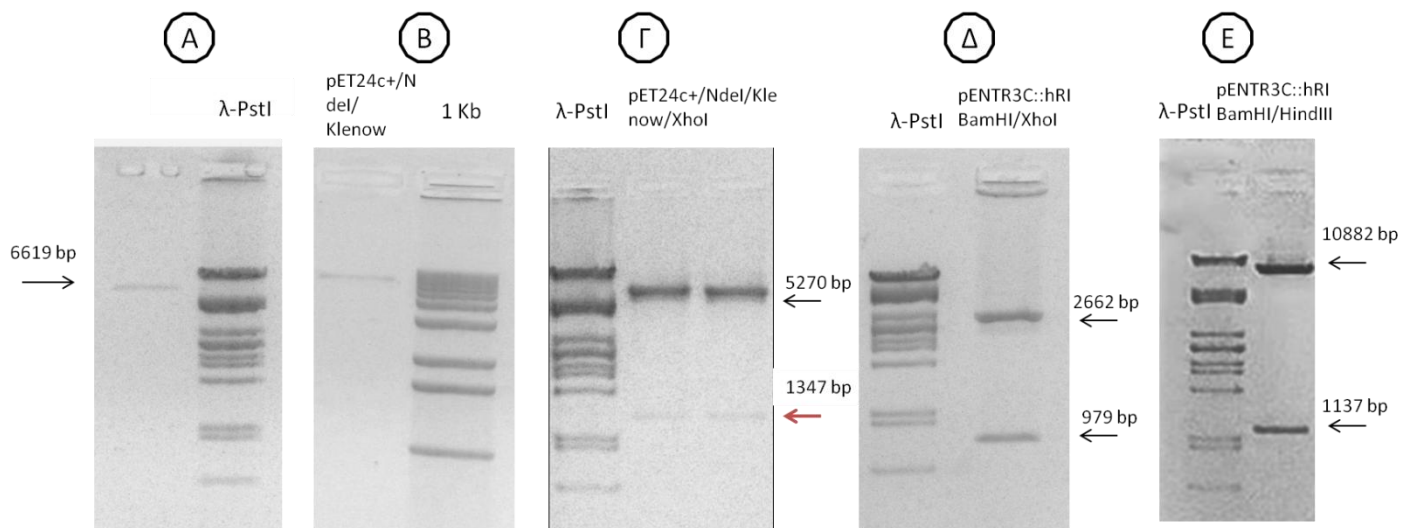
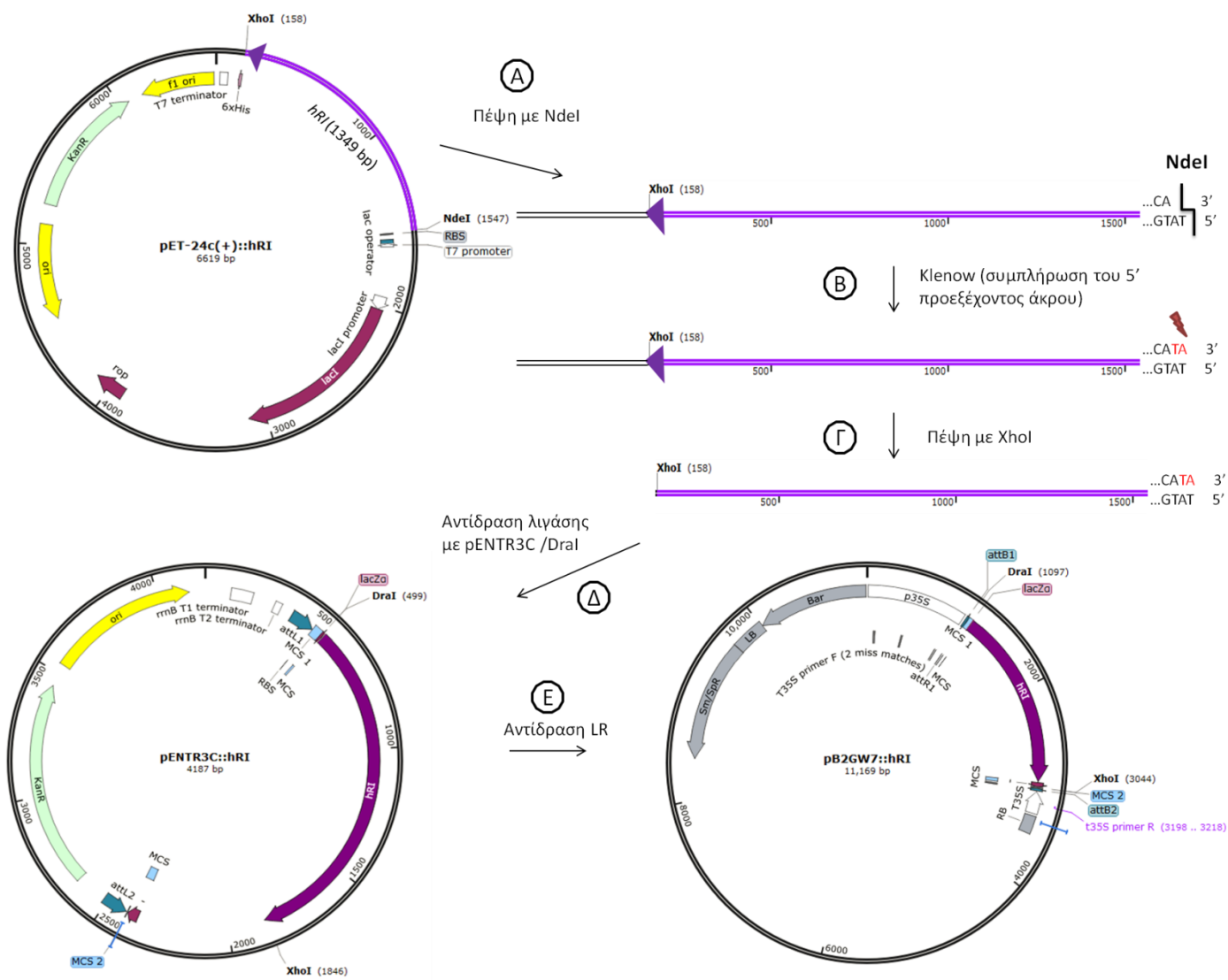


Εικόνα 27. Πρωτεΐνες από ολικά εκχυλίσματα ιστού (*N. benthamiana*) αγροεμποτισμένου με pEG202::PNGaseA, pEG202(άδειο πλασμίδιο) pEG202::p21 και pEG202::p22 (θετικοί μάρτυρες) αναλύονται σε πηκτή 12% SDS-PAGE. (Α)Στη συνέχεια, υποβάλλονται σε χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250. (Β) πηκτή 12% μεταφέρεται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επωάζεται με τον ορό α-FLAG.Τελικά εμφανίζεται μη ειδικό σήμα

Κλωνοποίηση του γονιδίου *hRI*

Παράλληλα με τις προαναφερθείσες πειραματικές προσεγγίσεις, δοκιμάζεται και η υπερέκφραση μίας πρωτεΐνης (human RNase Inhibitor-hRI) με εμπορική σημασία. Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την έκφρασή της σχεδιάστηκε από τον Δρ Δ. Κουτσιούλη στο ΙΤΕ (Ινστιτούτο Έρευνας και Τεχνολογίας) και συντέθηκε χημικά. Το CDS δόθηκε στο εργαστήριο μας κλωνοποιημένο σε πλασμιδιακό φορέα pET24c+, που όμως δεν είναι κατάλληλος για μετασχηματισμό φυτών. Συνεπώς ακολουθείται διαδικασία κλωνοποίησης με τελικό στόχο το φορέα pB2GW7 (Εικόνα 28), ο οποίος και θα χρησιμοποιηθεί για τον αγροεμποτισμό, με μετασχηματισμένα βακτηριακά στελέχη *A. tumefaciens* C58C1. Η διαδικασία μεταξύ του αρχικού φορέα και του ενδιάμεσου pENTR3C γίνεται λόγω αδυναμίας εύρεσης των ίδιων περιοριστικών ενζύμων για την κλωνοποίηση του τμήματος από τον ένα φορέα στον επόμενο. Σε κάθε βήμα των κλωνοποιήσεων, δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* DH10b μετασχηματίζονται με τα πλασμίδια, τα οποία μετά από πολλαπλασιασμό των κυττάρων απομονώνονται για τη συνέχεια της διαδικασίας.

Επίσης, σε κάθε βήμα της διαδικασίας η ορθότητα της κάθε κατασκευής ελέγχεται με πέψεις με περιοριστικά ένζυμα και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης, που παρατηρείται κάτω από UV (Εικόνα 28).

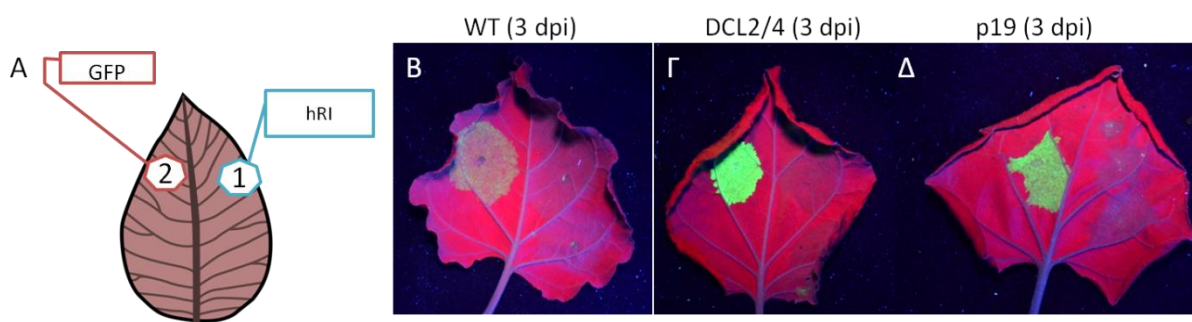


Εικόνα 28. Διαδικασία κλωνοποίησης του γονιδίου hRI. (Α)Γίνεται πέψη του πλασμιδίου pET24c+::hRI με το περιοριστικό ένζυμο NdeI- στην αρχή του γονιδίου. (Β)Το πλασμίδιο γίνεται γραμμικό και συμμετέχει σε αντίδραση Kleenow, για την προσθήκη συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων στο 5' προεξέχον άκρο, δημιουργώντας blunt άκρα. Με αυτό τον τρόπο, το είναι δυνατόν να εισέλθει στο πλασμίδιο pENTR3C που θα έχει υποστεί πέψη με το ένζυμο DraI, το οποίο μετά την πέψη αφήνει blunt άκρα. (Γ) Ακολουθεί πέψη με XhoI και το ένθεμα απομονώνεται για να οδηγηθεί σε (Δ) αντίδραση λιγάσης με το πλασμίδιο pENTR3C. (Ε) Τελικά με αντίδραση LR το ένθεμα εισέρχεται στον τελικό πλασμιδιακό φορέα pB2GW7. Κάτω από τη διαγραμματική απεικόνιση φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων από τα διαφορετικά στάδια των κλωνοποιήσεων (Α-Δ) σε πηκτική αгарόζης 0,7%, μετά από παρατήρηση κάτω από UV ακτινοβολία

Στη συνέχεια, η διαδικασία που ακολουθείται για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης είναι ίδια με αυτή της PNGaseA.

Αγροεμποτισμός σε φύλλα *Nicotiana benthamiana*

Δοκιμάζεται ο παροδικός μετασχηματισμός (με τη μέθοδο του αγροεμποτισμού) σε φύλλα *Nicotiana benthamiana*. Χρησιμοποιούνται στελέχη αγροβακτηρίου C58C1 που φέρουν το πλασμίδιο για την υπερέκφραση της hRI (pB2GW7::hRI). Με αυτό τον τρόπο, το γονίδιο hRI εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή CaMV 35S. Ως μάρτυρες χρησιμοποιούνται οι κατασκευές pBIN::GFP (έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης- θετικός μάρτυρας) και pB2GW7 (ο πλασμιδιακός φορέας χωρίς το ένθεμα- αρνητικός μάρτυρας) (Εικόνα 29Α). Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αγρίου τύπου, διπλά μεταλλάγματα DCL 2/4 και p19. Μετά από 3 ημέρες από τον αγροεμποτισμό, τα φύλλα παρατηρήθηκαν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 29B , Γ,Δ) και απομονώθηκε ιστός από την κάθε μεταχείριση.



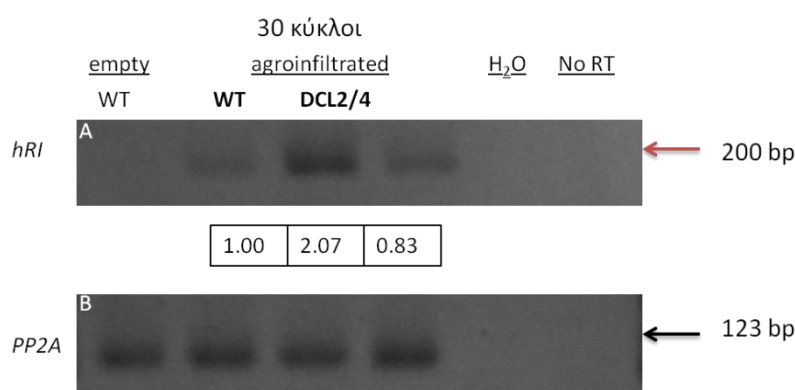
Εικόνα 29. Φύλλα *N. benthamiana* 3 ημέρες μετά τον αγροεμποτισμό με βακτήρια (*A.tumefaciens* C58C1) μετασχηματισμένα με τις κατασκευές pB2GW7::hRI , pB2GW7 (άδειο πλασμίδιο) και pBIN::GFP (GFP) παρατηρούμενα υπό υπεριώδη ακτινοβολία. (Α): Σχηματική απεικόνιση των μεταχειρίσεων σε κάθε φύλλο. Σημειώνεται πως ο αγροεμποτισμός με το άδειο πλασμίδιο έγινε σε ξεχωριστό φύλλο, που δεν φαίνεται στο σχήμα. (Β), (Γ),(Δ): Φαίνεται το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα που προκύπτει από την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP)- θετικός μάρτυρας κατά τον αγροεμποτισμό.

Επιβεβαίωση της λειτουργίας του γονιδίου hRI (με semiq RT PCR)

Για την επιβεβαίωση της λειτουργίας του μελετώμενου γονιδίου στον αγροεμποτισμένο φυτικό ιστό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ημιποσοτικής RT (reverse transcriptase) PCR. Αρχικά απομονώνονται ολικά νουκλεϊκά οξέα από τα φύλλα των φυτών με τη μέθοδο Trizol και ακολουθεί επίδραση με DNase. Το ολικό RNA χρησιμοποιείται ως μήτρα για την παραγωγή μονόκλωνου cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης. Το παραγόμενο cDNA χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για ενίσχυση και ημιποσοτική εκτίμηση της έκφρασης του γονιδίου PNGaseA (εκκινητές της PCR: RNaseF/RNaseR Πίνακας 2.). Όλα τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν προηγουμένως με τη βοήθεια ανάλογων αντιδράσεων PCR

για το σταθερής μεταγραφικής έκφρασης γονίδιο (housekeeping) *PP2A*. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δείγμα νερού, δείγμα ολικού RNA και δείγμα από ιστό φυτού αγρίου τύπου στο οποίο είχε γίνει αγροεμποτισμός με πλασμιδιακό φορέα που δεν περιέχει ένθεμα.

Από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (Εικόνα 30) σε πήκτωμα αγαρόζης 2% μπορεί να παρατηρηθεί, μετά από 30 κύκλους αντίδρασης, η παρουσία mRNA, στις τρεις σειρές φυτών, αγρίου τύπου, DCL2/4.16 και p19, ενώ φαίνεται και μία διαφοροποίηση στην ποσότητα των μεταγράφων, με τα φυτά DCL2/4.16 να εμφανίζουν μεγαλύτερη ποσότητα. Η ποσοτικοποίηση των ζωνών έγινε με το πρόγραμμα Quantity One.



Εικόνα 30. Ηλεκτροφόρηση (σε πήκτη αγαρόζης 2%) των δειγμάτων της ημιοσοτικής RT PCR από αγροεμποτισμένο ιστού φύλλων *N.benthamiana* με τις κατασκευές *pB2GW7::hRI* (agroinfiltrated) και *pB2GW7* (empty). (A) Τα δείγματα για το γονίδιο *hRI* στις διάφορες μεταχειρίσεις. (B) Κανονικοποίηση των ίδιων δειγμάτων με το housekeeping γονίδιο *PP2A*. empty WT: ιστός από φυτά αγρίου τύπου αγροεμποτισμένος με *pB2GW7* χωρίς την ένθεση. No RT: δείγμα RNA από αγροεμποτισμένα με την κατασκευή φυτά αγρίου τύπου. Οι αριθμοί υποδηλώνουν την εκτιμητέα ποσότητα των μεταγράφων (πρόγραμμα Quantity One)

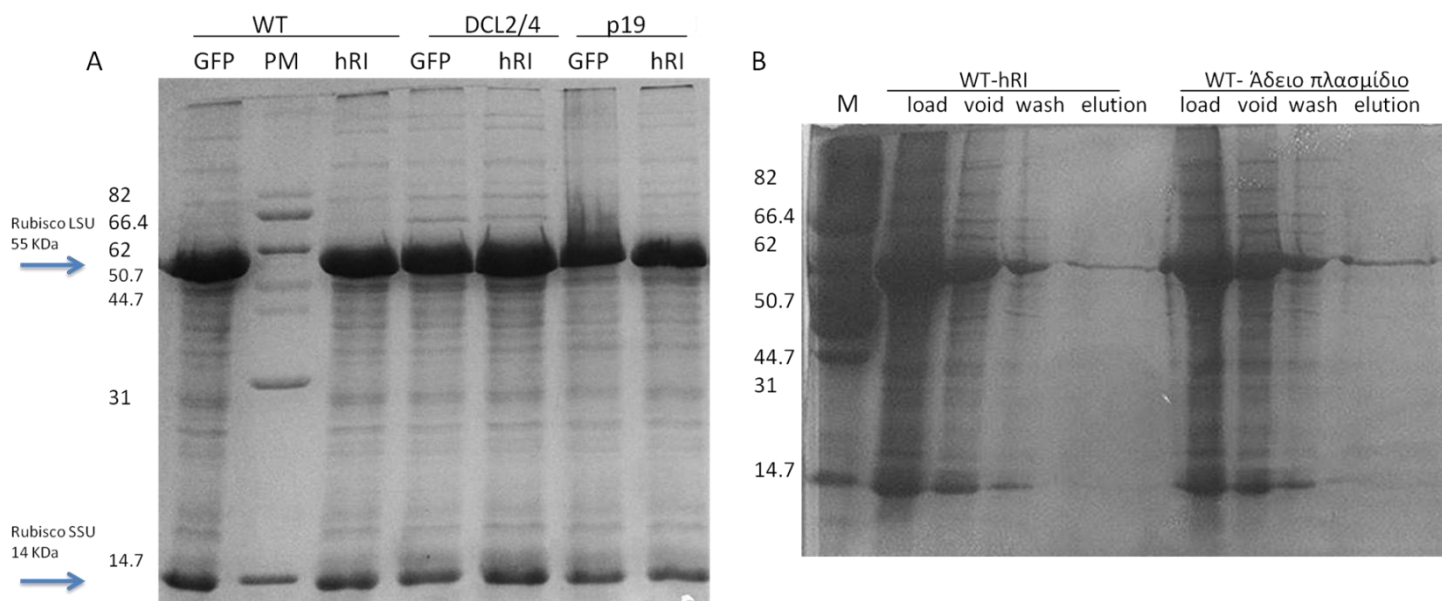
Διαδικασίες ανίχνευσης της πρωτεΐνης hRI

Η πρωτεΐνη hRI έχει αναμενόμενο μοριακό βάρος 35,741 kDa, όπως υπολογίζεται βιοπληροφορικά με τη χρήση του προγράμματος ExPaSy.

Για την επιβεβαίωση της παραγωγής ή μη της πρωτεΐνης, αρχικά απομονώνονται οι ολικές πρωτεΐνες από τον αγροεμποτισμένο ιστό και στη συνέχεια αναλύονται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% (SDS-PAGE). Δοκιμάζεται χρώση του πηκτώματος με Coomassie Brilliant Blue R-250 (Εικόνα 31A). Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά ανάμεσα στα δείγματα και το θετικό μάρτυρα (GFP). Και στις δύο περιπτώσεις δεν εντοπίζονται διαφορές ανάμεσα στα δείγματα που να υποδεικνύουν υπερέκφραση της hRI, αλλά δεν εντοπίζεται ούτε η πρωτεΐνη GFP (27 kDa) που αποτελεί το θετικό μάρτυρα της διαδικασίας και ο φθορισμός που δημιουργεί είναι ορατός με γυμνό οφθαλμό.

Στη συνέχεια, σε μια προσπάθεια ειδικής πρόσδεσης και πιθανά απομόνωσης της πρωτεΐνης ακολουθεί χρωματογραφία συγγένειας, με υπόστρωμα σεφαρόζης, ενεργοποιημένο με βρωμιούχο κυάνιο. Ως προσδέτης προστέθηκε το υπόστρωμα του ενζύμου, RNaseA (4 mg/ml). Στη συνέχεια, 2 ml από το ενεργοποιημένο υπόστρωμα τοποθετούνται σε φιαλίδια και εξισορροπούνται με διάλυμα απομόνωσης πρωτεϊνών και

ακολουθεί η διαδικασία της χρωματογραφίας. Το υπερκείμενο από τα διάφορα βήματα της χρωματογραφίας αναλύεται σε πηκτή ακρυλαμίδης 12% (Εικόνα 31B). Σε όλες τις αναλύσεις δεν φαίνεται κάποια ζώνη που να υποδεικνύει την παραγωγή πρωτεΐνης σε ανιχνεύσιμες τουλάχιστον ποσότητες. Στην Εικόνα παρουσιάζεται ενδεικτικά η ανάλυση των δειγμάτων για τα φυτά αγρίου τύπου. Το ίδιο επαναλήφθηκε και για τα DCL2/4 και p19, με τα ίδια αποτελέσματα.



Εικόνα 31. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης 12% και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250 (A) ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών από αγροεμποτισμένο ιστό φυτών *N.benthamiana* (WT, DCL2/4, p19) με pB2GW7::hRI (hRI) και pBIN::GFP (GFP) (θετικός μάρτυρας) και (B) υπερκειμένου από τα διαφορετικά στάδια χρωματογραφίας συγγένειας από δείγμα ολικών πρωτεϊνών αγροεμποτισμένου ιστού φυτών *N.benthamiana* αγρίου τύπου με pB2GW7::hRI (hRI) και pB2GW7 (άδειο πλασμίδιο). Load: ολικές πρωτεΐνες Void: πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στο υπόστρωμα Wash: υπόλοιπες πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στο υπόστρωμα Elution: η προς απομόνωση πρωτεΐνη

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα φυτά διαθέτουν έναν πολύ αποτελεσματικό μηχανισμό σύνθεσης πρωτεϊνών και με τη χρήση συστημάτων έκφρασης γονιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων πρωτεϊνών (Makhzoum et al., 2014). Τα φυτικά συστήματα έκφρασης έχουν την προοπτική να γίνουν εναλλακτικά συστήματα παραγωγής ακόμα και για φαρμακευτικές πρωτεΐνες, λόγω της μη μόλυνσης τους από παθογόνα των θηλαστικών. Ακόμα, οι δυνατότητες αύξησης της παραγωγής σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος παραγωγής και την εύκολη αποθήκευση των προϊόντων είναι κάποια μόνο από τα πλεονεκτήματα του εν λόγω συστήματος. Η όλο και αυξανόμενη ζήτηση για φαρμακευτικές πρωτεΐνες και ένζυμα έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη του συστήματος παραγωγής σε φυτά.

Στην παρούσα εργασία επιλέγεται η χρήση του συστήματος παροδική έκφρασης σε φυτά *Nicotiana benthamiana* για την έκφραση δύο πρωτεϊνών: της PNGaseA και hRI. Το σύστημα

παροδικής έκφρασης επιλέχθηκε διότι παρέχει το σημαντικό πλεονέκτημα της ταχύτατης παραγωγής των πρωτεϊνών. Είναι δηλαδή δυνατή η παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων μίας πρωτεΐνης σε χρονικό διάστημα ημερών ή εβδομάδων, κάτι μη εφικτό με το σύστημα των σταθερά μετασχηματισμένων φυτών. Στη συγκεκριμένη εργασία, για να ελαχιστοποιηθεί ένας βασικός παράγοντας της μειωμένης παραγωγής πρωτεϊνών, ο μηχανισμός της RNA σίγησης (Desai et al., 2010), χρησιμοποιήθηκαν φυτά DCL 2/4 και p19, τα οποία εμφανίζουν μειωμένη δράση του μηχανισμού σίγησης.

Για την υπερέκφραση επιλέχθηκαν δύο πρωτεΐνες εμπορικής σημασίας, η PNGaseA και η RNH. Η PNGaseA επιλέχθηκε λόγω του έντονου ενδιαφέροντος της βιοτεχνολογικής εταιρείας New England Biolabs για την παραγωγή και πώλησή του. Τελικά η εταιρεία πριν μερικούς μήνες κατάφερε να κλωνοποιήσει μία ομόλογη πρωτεΐνη από το ρύζι (*Oryza sativa*) και να την παράγει στο ετερόλογο σύστημα του *Pichia pastoris*. Η εν λόγω πρωτεΐνη εμφανίζει σημαντική ομοιότητα με την αλληλουχία από το φυτό *Prunus persica* (52%) η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την απομόνωση της PNGaseA από αμύγδαλα. Σε αντίθεση, τα δύο γονίδια δεν φαίνεται να έχουν σημαντική ομοιότητα (29%), κάτι που είναι αναμενόμενο, λόγω της εξελικτικής απόστασης των δύο ειδών.

Μετά την απομόνωση και κλωνοποίηση της PNGaseA, ακολούθησε η ανίχνευση ύπαρξης μεταγράφων της πρωτεΐνης. Τα μετάγραφα εντοπίστηκαν στον αγροεμποτισμένο ιστό και το επόμενο βήμα ήταν ο εντοπισμός της πρωτεΐνης. Δοκιμάστηκε απομόνωση της πρωτεΐνης με πρωτόκολλο λύσης των κυττάρων και μία πρώτη ανάλυση του συνόλου των πρωτεϊνών με SDS-PAGE σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Οι αναμενόμενες ζώνες (55 και 27 kDa) δεν παρατηρούνται, αλλά ούτε η ζώνη του θετικού μάρτυρα (GFP), παρά το ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη ήταν ορατή με γυμνό οφθαλμό λόγω του έντονου σήματος φθορισμού που παρήγαγε. Ωστόσο, μετά από ανάλυση κατά Western, με ειδικό αντίσωμα για την GFP, η πρωτεΐνη φάνηκε να εντοπίζεται. Μία εξήγηση για την απουσία ζωνών στο πήκτωμα ακρυλαμίδης θα μπορούσε να είναι η μειωμένη ποσότητα παραγωγής των πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την μεγάλη πυκνότητα ζωνών- πρωτεϊνών που παρατηρείται στα φυτικά κύτταρα. Επιπλέον, κοντά στην αναμενόμενο ύψος που θα βρισκόταν η μία υπομονάδα (55 kDa) εντοπίζεται και η μεγάλη υπομάδα της RuBisCo (55 kDa). Για την αποσαφήνιση του παραπάνω, δοκιμάστηκε μεθοδολογία για την μείωση της πρωτεΐνης RuBisCO, που αποτελεί την πιο άφθονη πρωτεΐνη του φύλλου (30-60% ανάλογα το φυτικό είδος) (Kim et al., 2013). Λόγω της αφθονίας της εμποδίζει τις πρωτεομικές μελέτες, καθώς η μεγάλη και μικρή υπομονάδα της εμποδίζουν την ανίχνευση πρωτεϊνικών ζωνών. Το πρωτόκολλο που δοκιμάστηκε δεν φάνηκε να λειτουργεί, και αυτό έγινε αντιληπτό από την απουσία της πρωτεΐνης RuBisCO από τα δείγματα- μάρτυρες που περιείχαν το ίζημα και υποθετικά και την RuBisCO. Στη συνέχεια δοκιμάστηκε η σύντηξη της πρωτεΐνης PNGaseA με επίτοπο FLAG και ακλούθησε ανάλυση κατά Western με αντίσωμα ειδικό για τον επίτοπο. Λόγω όμως έντονου μη ειδικού σήματος δεν ήταν δυνατόν να γίνει εξαγωγή συμπερασμάτων από το συγκεκριμένο πείραμα.

Μία πιθανή εξήγηση για την αδυναμία εντοπισμού της πρωτεΐνης θα μπορούσε να είναι η ιδιαίτερα μικρή παραγόμενη ποσότητα. Οι χρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν έχουν όριο ανίχνευσης των πρωτεϊνών στο πήκτωμα ακρυλαμίδης: Με τη χρήση της Coomassie Brilliant Blue μπορεί να ανιχνευθεί 0,1 - 1 μg πρωτεΐνης ανά ζώνη (Smith, 1984) ενώ η

χρώση με νιτρικό άργυρο μπορεί να οδηγήσει στην ανίχνευση 2 - 10 ng πρωτεΐνης ανά ζώνη (Giulian et. al., 1983). Κατά την ανάλυση των ολικών πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης αναλύθηκαν περίπου 40 μl ολικών πρωτεϊνών, τα οποία με βάση τις μετρήσεις στο φωτόμετρο, φαίνεται να περιέχουν συνολικά περίπου 400 μg ολικών πρωτεϊνών, από το οποίο το 80% περίπου καταλαμβάνει η RuBisCo. Ακόμα, η μη εξειδικευμένη πρόσδεση για την απομόνωση της πρωτεΐνης μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα, συνεπώς προτείνεται η διενέργεια χρωματογραφίας συγγένειας με το υπόστρωμα του ενζύμου καθώς και η επανάληψη της ανάλυσης κατά Western, ίσως αυτή τη φορά με βελτιστοποίηση των συνθηκών επώασης των αντισωμάτων. Μία εναλλακτική προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η χρήση του συστήματος φορέων magniCON®, ένα σύστημα το οποίο βασίζεται σε ικούς φορείς, και έχει βελτιωθεί τόσο ώστε να επιτρέπει την παραγωγή 25–75 g αντισωμάτων ανά θερμοκήπιο μέσα σε δύο εβδομάδες (Pogue et al. 2010) .

Παράλληλα, με την ίδια προσέγγιση έγινε επιβεβαίωση της μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου *hRI*. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της παραγωγής πρωτεΐνης, μετά τον αγροεμποτισμό σε φύλλα *Nicotiana benthamiana*, διενεργήθηκε χρωματογραφία συγγένειας με το υπόστρωμα του ενζύμου (RNaseA), κατά την οποία όμως δεν εντοπίστηκε ένζυμο. Στη συνέχεια δοκιμάστηκε η κλωνοποίηση του ενζύμου σε πλασμιακό φορέα με επίτοπο FLAG, χωρίς όμως επιτυχία της κλωνοποίησης. Μετά από μία σειρά μη επιτυχημένων προσπαθειών έκφρασης του συγκεκριμένου ενζύμου (το οποίο συντέθηκε χημικά) σε κύτταρα *E.coli* από το εργαστήριο του Δρ Δ. Κουτσιούλη, διατυπώνεται η υπόθεση της κυτταροτοξικότητας του συγκεκριμένου ενζύμου. Ακόμα, λόγω του σχεδιασμού του εν λόγω γονιδίου για έκφραση σε βακτηριακά κύτταρα και όχι σε φυτικά εγείρεται και το δυνητικό εμπόδιο της επιλεκτικής χρήσης κωδικονίων (codon usage) (Webster et al., 2017).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aldana-Villarruel, D. S., Cristóbal Noé Aguilar-González, Juan Carlos Contreras-Esquivel, & Nevárez-Moorillón, G. V. (2011). Taiz, L. and Zeiger, E. (2006) Plant Physiology, Fourth Edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 764 pages. *Tecnociencia*, 5(2), 76–82.
- Apweiler, R., Hermjakob, H., & Sharon, N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1473(1), 4–8. [http://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00165-8](http://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00165-8)
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., ... Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709–1712. <http://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.011>
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., & Nekrasov, V. (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, 9(1), 39. <http://doi.org/10.1186/1746-4811-9-39>
- Berger, J. L., Lee, B. H., & Lacroix, C. (1995). Identification of new enzyme activities of several strains of *Thermus* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(1-2), 81–87. <http://doi.org/10.1007/BF00164484>
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., & Van Eck, J. (2014). Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation Using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System. *PLANT PHYSIOLOGY*, 166(3), 1292–1297. <http://doi.org/10.1104/pp.114.247577>
- Brückner, K., & Tissier, A. (2013). High-level diterpene production by transient expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods*, 9(1), 46. <http://doi.org/10.1186/1746-4811-9-46>
- Cañizares, M. C., Lomonosoff, G. P., & Nicholson, L. (2005). Development of cowpea mosaic virus-based vectors for the production of vaccines in plants. *Expert Review of Vaccines*, 4, 687–697. <http://doi.org/10.1586/14760584.4.5.687>
- Carroll, A., & Somerville, C. (2009). Cellulosic biofuels. *Annu Rev Plant Biol*, 60, 165–182. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092125>
- Cerutti, H. (2003). RNA interference: Traveling in the cell and gaining functions? *Trends in Genetics*. [http://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)00010-0](http://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)00010-0)
- Clemente, T. (2006). *Nicotiana* (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*). *Agrobacterium Protocols*, 343(2), 143–154. <http://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:143>
- Cordoba, E., Salmi, M., & León, P. (2009). Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 60, pp. 2933–2943). <http://doi.org/10.1093/jxb/erp190>
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., ... Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607. <http://doi.org/10.1038/nature09886>
- Desai, P. N., Shrivastava, N., & Padh, H. (2010). Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances*. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.005>
- Diepold, A., Li, G., Lennarz, W. J., Nürnberger, T., & Brunner, F. (2007). The Arabidopsis AtPNG1 gene encodes a peptide: N-glycanase. *Plant Journal*, 52(1), 94–104. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03215.x>

- Duwadi, K., Chen, L., Menassa, R., & Dhaubhadel, S. (2015). Identification, characterization and down-regulation of cysteine protease genes in tobacco for use in recombinant protein production. *PLoS ONE*, *10*(7). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0130556>
- Emanuelli, F., Battilana, J., Costantini, L., Le Cunff, L., Boursiquot, J.-M., This, P., & Grando, M. S. (2010). A candidate gene association study on muscat flavor in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology*, *10*(1), 241. <http://doi.org/10.1186/1471-2229-10-241>
- Estévez, J. M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., & León, P. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase, a Limiting Enzyme for Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(25), 22901–22909. <http://doi.org/10.1074/jbc.M100854200>
- Fan, H., Wu, Q., Wang, X., Wu, L., Cai, Y., & Lin, Y. (2016). Molecular cloning and expression of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase and 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in *Dendrobium officinale*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *125*(2), 381–385. <http://doi.org/10.1007/s11240-016-0945-1>
- Fan, J. Q., & Lee, Y. C. (1997). Detailed studies on substrate structure requirements of glycoamidases A and F. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(43), 27058–27064. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.43.27058>
- Faye, L., Johnson, K. D., Sturm, A., & Chrispeels, M. J. (1989). tein substrates [32]. Therefore, PNGase A was incubated for Structure, biosynthesis and function of asparagine-linked glycans 24 h at 37 C under native conditions (citrate phosphate pH 5.0) on plant glycoproteins. *Physiol. Plant*, *75*, 309314.
- Flores, R., Hernández, C., Alba, A. E. M. de, Daròs, J.-A., & Serio, F. Di. (2005). Viroids and Viroid-Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, *43*(1), 117–139. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140243>
- Flores, R., Hernández, C., Alba, A. E. M. de, Daròs, J.-A., & Serio, F. Di. (2005). Viroids and Viroid-Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, *43*(1), 117–139. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140243>
- Frock, R. L., Hu, J., Meyers, R. M., Ho, Y.-J., Kii, E., & Alt, F. W. (2014). Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nature Biotechnology*, *33*(2), 179–186. <http://doi.org/10.1038/nbt.3101>
- Ftouhi Paquin, N., Tarentino, A. L., & Plummer, T. H. (1998). Overexpression of PNGase at from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expres. Purif.*, *14*(2), 302–8. <http://doi.org/10.1006/prep.1998.0966>
- Ftouhi-Paquin, N., Hauer, C. R., Stack, R. F., Tarentino, a L., & Plummer, T. H. (1997). Molecular cloning, primary structure, and properties of a new glycoamidase from the fungus *Aspergillus tubigensis*. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(36), 22960–5. <http://doi.org/10.1074/JBC.272.36.22960>
- Fukami-Kobayashi, K., Tomoda, S., & Go, M. (1993). Evolutionary clustering and functional similarity of RNA-binding proteins. *FEBS Letters*, *335*(2), 289–293. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80749-K](http://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80749-K)
- Geoffrey Onaga, & Kerstin Wydra. (2016). Advances in Plant Tolerance to Abiotic Stresses. *Plant Genomics*. <http://doi.org/10.5772/60746>
- Gils, M., Kandzia, R., Marillonnet, S., Klimyuk, V., & Gleba, Y. (2005). High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnology Journal*, *3*(6), 613–620. <http://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00154.x>
- Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., van Eldik, G., Botterman, J., Klimyuk, V., & Gleba, Y. (2006). Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(40), 14701–14706. <http://doi.org/10.1073/pnas.0606631103>

- Gómez, G., & Pallás, V. (2001). Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *14*(7), 910–913. <http://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.7.910>
- Gong, Y. F., Liao, Z. H., Guo, B. H., Sun, X. F., & Tang, K. X. (2006). Molecular cloning and expression profile analysis of Ginkgo biloba DXS gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Planta Medica*, *72*(4), 329–335. <http://doi.org/10.1055/s-2005-916234>
- Gupta, R., Wang, Y., Agrawal, G. K., Rakwal, R., Jo, I. H., Bang, K. H., & Kim, S. T. (2015). Time to dig deep into the plant proteome: a hunt for low-abundance proteins. *Frontiers in Plant Science*, *6*(January), 1–3. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00022>
- Ho, T. T., Zhou, N., Huang, J., Koirala, P., Xu, M., Fung, R., ... Mo, Y. Y. (2015). Targeting non-coding RNAs with the CRISPR/Cas9 system in human cell lines. *Nucleic Acids Research*, *43*(3), e17. <http://doi.org/10.1093/nar/gku1198>
- Hofsteenge, J., Vincentini, a, & Stone, S. R. (1991). Purification and characterization of truncated ribonuclease inhibitor. *The Biochemical Journal*, *275* (Pt 2, 541–3. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1150084&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hossain, M. A., Nakano, R., Nakamura, K., & Kimura, Y. (2010). Molecular identification and characterization of an acidic peptide:N-glycanase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *Journal of Biochemistry*, *147*(2), 157–165. <http://doi.org/10.1093/jb/mvp157>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, *157*(6), 1262–1278. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Ikram, N. K. B. K., Zhan, X., Pan, X.-W., King, B. C., & Simonsen, H. T. (2015). Stable heterologous expression of biologically active terpenoids in green plant cells. *Frontiers in Plant Science*, *6*. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00129>
- Jadaun, J. S., Sangwan, N. S., Narnoliya, L. K., Singh, N., Bansal, S., Mishra, B., & Sangwan, R. S. (2017). Over-expression of DXS gene enhances terpenoidal secondary metabolite accumulation in rose-scented geranium and *Withania somnifera*: active involvement of plastid isoprenogenic pathway in their biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, *159*(4), 381–400. <http://doi.org/10.1111/ppl.12507>
- Jeanmougin, F., Wurtz, J. M., Le Douarin, B., Chambon, P., & Losson, R. (1997). The bromodomain revisited. *Trends in biochemical sciences*, *22*(5), 151-153.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, *337*(6096), 816–821. <http://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kalantidis, K., Denti, M. a, Tzortzakaki, S., Marinou, E., Tabler, M., & Tsagris, M. (2007). Virp1 is a host protein with a major role in Potato spindle tuber viroid infection in Nicotiana plants. *Journal of Virology*, *81*(23), 12872–12880. <http://doi.org/10.1128/JVI.00974-07>
- Kalyani, D., Tiwari, M. K., Li, J., Kim, S. C., Kalia, V. C., Kang, Y. C., & Lee, J. K. (2015). A highly efficient recombinant laccase from the yeast *Yarrowia lipolytica* and its application in the hydrolysis of biomass. *PLoS ONE*, *10*(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0120156>
- Kato, T., Kitamura, K., Maeda, M., Kimura, Y., Katayama, T., Ashida, H., & Yamamoto, K. (2007). Free oligosaccharides in the cytosol of *Caenorhabditis elegans* are generated through endoplasmic reticulum-Golgi trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(30), 22080–22088. <http://doi.org/10.1074/jbc.M700805200>

- Kenan, D. J., Query, C. C., & Keene, J. D. (1991). RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends in Biochemical Sciences*, 16(C), 214–220. [http://doi.org/10.1016/0968-0004\(91\)90088-D](http://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90088-D)
- Khemvong, S., & Suvachittanont, W. (2005). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase from oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Plant Science*, 169(3), 571–578. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.05.001>
- Kim, Y. J., Lee, H. M., Wang, Y., Wu, J., Kim, S. G., Kang, K. Y., ... Kim, S. T. (2013). Depletion of abundant plant RuBisCO protein using the protamine sulfate precipitation method. *Proteomics*, 13(14), 2176–2179. <http://doi.org/10.1002/pmic.201200555>
- Klink, T. a, Vicentini, a M., Hofsteenge, J., & Raines, R. T. (2001). High-level soluble production and characterization of porcine ribonuclease inhibitor. *Protein Expression and Purification*, 22(2), 174–179. <http://doi.org/10.1006/prep.2001.1422>
- Lei, Y., Lu, L., Liu, H. Y., Li, S., Xing, F., & Chen, L. L. (2014). CRISPR-P: A web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Molecular Plant*. <http://doi.org/10.1093/mp/ssu044>
- Lichtenthaler, H. K. (1999). THE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE PATHWAY OF ISOPRENOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 47–65. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.47>
- Lico, C., Chen, Q., & Santi, L. (2008). Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *Journal of Cellular Physiology*. <http://doi.org/10.1002/jcp.21423>
- Lin, Y.-J., Umehara, T., Inoue, M., Saito, K., Kigawa, T., Jang, M.-K., ... Güntert, P. (2008). Solution structure of the extraterminal domain of the bromodomain-containing protein BRD4. *Protein Science*, 17(12), 2174–2179. <http://doi.org/10.1110/ps.037580.108>
- Lv, D.-Q., Liu, S.-W., Zhao, J.-H., Zhou, B.-J., Wang, S.-P., Guo, H.-S., & Fang, Y.-Y. (2016). Replication of a pathogenic non-coding RNA increases DNA methylation in plants associated with a bromodomain-containing viroid-binding protein. *Scientific Reports*, 6(1), 35751. <http://doi.org/10.1038/srep35751>
- Lv, X., Xu, H., & Yu, H. (2013). Significantly enhanced production of isoprene by ordered coexpression of genes *dxs*, *dxr*, and *idi* in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2357–2365. <http://doi.org/10.1007/s00253-012-4485-2>
- Maeda, M., & Kimura, Y. (2014). Structural features of free N-glycans occurring in plants and functional features of de-N-glycosylation enzymes, ENGase, and PNGase: the presence of unusual plant complex type N-glycans. *Frontiers in Plant Science*, 5(September), 429. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00429>
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., ... Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467–477. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2577>
- Makhzoum, A., Benyammi, R., Moustafa, K., & Trémouillaux-Guiller, J. (2014). Recent advances on host plants and expression cassettes' structure and function in plant molecular pharming. *BioDrugs*. <http://doi.org/10.1007/s40259-013-0062-1>
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., ... Church, G. M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology*, 31(9), 833–838. <http://doi.org/10.1038/nbt.2675>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., ... Elledge, S. J. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 823–6. <http://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2008). CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA. *Science*, 322(5909), 1843–1845. <http://doi.org/10.1126/science.1165771>

- Martin, V. J. J., Pitera, D. J., Withers, S. T., Newman, J. D., & Keasling, J. D. (2003). Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature Biotechnology*, *21*(7), 796–802. <http://doi.org/10.1038/nbt833>
- Martínez de Alba, A. E., Sägesser, R., Tabler, M., & Tsagris, M. (2003). A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA in vitro and in vivo. *Journal of Virology*, *77*(17), 9685–9694. <http://doi.org/10.1128/JVI.77.17.9685>
- Masuda, A., Xu, J., Mitsudome, T., Nagata, Y., Morokuma, D., Mon, H., ... Lee, J. M. (2015). Mass Production of an Active Peptide-N-Glycosidase F Using Silkworm-Baculovirus Expression System. *Molecular Biotechnology*, *57*(8), 735–745. <http://doi.org/10.1007/s12033-015-9866-1>
- Munoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I., Ros, R., & Segura, J. (2006). Up-Regulation of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase Enhances Production of Essential Oils in Transgenic Spike Lavender. *PLANT PHYSIOLOGY*, *142*(3), 890–900. <http://doi.org/10.1104/pp.106.086355>
- Noman, A., Aqeel, M., & He, S. (2016). CRISPR-Cas9: Tool for Qualitative and Quantitative Plant Genome Editing. *Frontiers in Plant Science*, *7*. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.01740>
- Ntranos, A., & Casaccia, P. (2016). Bromodomains: Translating the words of lysine acetylation into myelin injury and repair. *Neuroscience Letters*. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.10.015>
- Ohto, C., Muramatsu, M., Obata, S., Sakuradani, E., & Shimizu, S. (2009). Overexpression of the gene encoding HMG-CoA reductase in *Saccharomyces cerevisiae* for production of prenol alcohols. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *82*(5), 837–845. <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1807-5>
- Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.019>
- Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.019>
- Paddon, C. J., Westfall, P. J., Pitera, D. J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., ... Newman, J. D. (2013). High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, *496*(7446), 528–532. <http://doi.org/10.1038/nature12051>
- Philippe, R. N., De Mey, M., Anderson, J., & Ajikumar, P. K. (2014). Biotechnological production of natural zero-calorie sweeteners. *Current Opinion in Biotechnology*. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.004>
- Plummer, T. H., Phelan, A. W., & Tarentino, A. L. (1987). Detection and quantification of peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidases. *Eur. J. Biochem.*, *163*(1), 167–73. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb10751.x>
- Pogue, G. P., Vojdani, F., Palmer, K. E., Hiatt, E., Hume, S., Phelps, J., ... Bratcher, B. (2010). Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. *Plant Biotechnology Journal*. <http://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00495.x>
- Ragauskas, A. J. (2006). The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science*, *311*(5760), 484–489. <http://doi.org/10.1126/science.1114736>
- Regnard, G. L., Halley-Stott, R. P., Tanzer, F. L., Hitzeroth, I. I., & Rybicki, E. P. (2010). High level protein expression in plants through the use of a novel autonomously replicating geminivirus shuttle vector. *Plant Biotechnology Journal*, *8*(1), 38–46. <http://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00462.x>
- Saggu, G. S., Pala, Z. R., Garg, S., & Saxena, V. (2016). New insight into isoprenoids biosynthesis process and future prospects for drug designing in plasmodium. *Frontiers in Microbiology*, *7*(SEP), 1–14. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01421>

- Salinas, P. A., Miller, M. J. C., Lin, M. X., Savickas, P. J., & Thomas, J. J. (2012). Mass spectrometry-based characterization of acidic glycans on protein therapeutics. *International Journal of Mass Spectrometry*, 312, 122–134. <http://doi.org/10.1016/j.ijms.2011.06.017>
- Sarrazin, S., Lamanna, W. C., & Esko, J. D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), 1–33. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a004952>
- Sheludko, Y. V. (2008). Agrobacterium-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants. *Recent Patents on Biotechnology*, 2(3), 198–208. <http://doi.org/10.2174/1872208080786241033>
- Spiro, R. G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12(4), 43R–56R. <http://doi.org/10.1093/glycob/12.4.43R>
- SUZUKI, T. (2002). Cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions. *The FASEB Journal*, 16(7), 635–641. <http://doi.org/10.1096/fj.01-0889rev>
- Suzuki, T., Kitajima, K., Inoue, S., & Inoue, Y. (1994). Occurrence and biological roles of “proximal glycanases” in animal cells. *Glycobiology*. <http://doi.org/10.1093/glycob/4.6.777>
- Suzuki, T., Park, H., Kitajima, K., & Lennarz, W. J. (1998). Peptides glycosylated in the endoplasmic reticulum of yeast are subsequently deglycosylated by a soluble peptide: N-glycanase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 21526–21530. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21526>
- Syntichaki, P., Topalidou, I., & Thireos, G. (2000). The Gcn5 bromodomain co-ordinates nucleosome remodelling. *Nature*, 404(6776), 414–417. <http://doi.org/10.1038/35006136>
- Taga, E. M., Waheed, A., & Van Etten, R. L. (1984). Structural and Chemical Characterization of a Homogeneous Peptide N-Glycosidase from Almond. *Biochemistry*, 23(5), 815–822. <http://doi.org/10.1021/bi00300a006>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Secondary Metabolites and Plant Defense. *Plant Physiology*, 284–308.
- Takahashi, N. (1977). Demonstration of a new amidase acting on glycopeptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 76(4), 1194–1201. [http://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)90982-2](http://doi.org/10.1016/0006-291X(77)90982-2)
- Takasaki, S., Mizuochi, T., & Kobata, A. (1982). Hydrazinolysis of Asparagine-Linked Sugar Chains to Produce Free Oligosaccharides. *Methods in Enzymology*, 83(C), 263–268. [http://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)83019-X](http://doi.org/10.1016/0076-6879(82)83019-X)
- Tarentino, a L., Gómez, C. M., & Plummer, T. H. (1985). Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry*, 24(17), 4665–71. <http://doi.org/10.4052/tigg.5.163>
- Tremblay, D., Allard, V., Doyon, J. F., Bellehumeur, C., Spearman, J. G., Harel, J., & Gagnon, C. A. (2011). Emergence of a new swine H3N2 and pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus reassortant in two Canadian animal populations, mink and swine. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4386–4390. <http://doi.org/10.1128/JCM.05676-11>
- Tsagris, E. M., Martínez de Alba, A. E., Gozmanova, M., & Kalantidis, K. (2008). Viroids. *Cellular Microbiology*, 10(11), 2168–2179. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01231.x>
- Vaccaro, M., Malafrente, N., Alfieri, M., De Tommasi, N., & Leone, A. (2014). Enhanced biosynthesis of bioactive abietane diterpenes by overexpressing AtDXS or AtDXR genes in *Salvia sclarea* hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 119(1), 65–77. <http://doi.org/10.1007/s11240-014-0514-4>
- Varki A, Cummings RD, E. J. (2009). Glycosylation changes in cancer, Essentials of Glycobiology. *Essentials of Glycobiology*.

- Vranová, E., Coman, D., & Gruissem, W. (2013). Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 665–700. <http://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120116>
- Shondra M. Pruettt-Miller, Chromosomal Mutagenesis , Methods in Molecular Biology (2015)
- Wang, T., Cai, Z. P., Gu, X. Q., Ma, H. Y., Du, Y. M., Huang, K., ... Liu, L. (2014). Discovery and characterization of a novel extremely acidic bacterial N-glycanase with combined advantages of PNGase F and A. *Bioscience Reports*, 34(6), 673–684. <http://doi.org/10.1042/BSR20140148>
- Wang, X., Liu, W., Xin, C., Zheng, Y., Cheng, Y., Sun, S., ... Yuan, J. S. (2016). Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(50), 14225–14230. <http://doi.org/10.1073/pnas.1613340113>
- Webster, G. R., Teh, A. Y. H., & Ma, J. K. C. (2017). Synthetic gene design???The rationale for codon optimization and implications for molecular pharming in plants. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(3), 492–502. <http://doi.org/10.1002/bit.26183>
- Wright, L. P., Rohwer, J. M., Ghirardo, A., Hammerbacher, A., Ortiz-Alcaide, M., Raguschke, B., ... Phillips, M. A. (2014). Deoxyxylulose 5-Phosphate Synthase Controls Flux through the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 165(4), 1488–1504. <http://doi.org/10.1104/pp.114.245191>
- Wu, S., & Chappell, J. (2008). Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Current Opinion in Biotechnology*. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.007>
- Xin, F., Wang, S., Song, L., Liang, Q., & Qi, Q. (2008). Molecular identification and characterization of peptide: N-glycanase from Schizosaccharomyces pombe. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(4), 907–912. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.017>
- Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., ... Chen, Q.-J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, 14(1), 327. <http://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>
- Yang, K., Monafared, R. S., Wang, H., Lundgren, A., & Brodelius, P. E. (2015). The activity of the artemisinin aldehyde $\Delta 11(13)$ reductase promoter is important for artemisinin yield in different chemotypes of *Artemisia annua* L. *Plant Molecular Biology*, 88(4-5), 325–340. <http://doi.org/10.1007/s11103-015-0284-3>
- Yusibov, V., Modelska, A., Steplewski, K., Agadjanyan, M., Weiner, D., Hooper, D. C., & Koprowski, H. (1997). Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(11), 5784–5788. <http://doi.org/10.1073/pnas.94.11.5784>
- Zeng, L., & Zhou, M. M. (2002). Bromodomain: An acetyl-lysine binding domain. *FEBS Letters*. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03309-9](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03309-9)
- Zhang, L., Jiang, H., Yao, J., Wang, Y., Fang, C., Yang, P., & Lu, H. (2014). Highly specific enrichment of N-linked glycopeptides based on hydrazide functionalized soluble nanoparticles. *Chemical Communications*, 50(8), 1027–1029. <http://doi.org/10.1039/C3CC47347C>
- Zhou, H., Liu, B., Weeks, D. P., Spalding, M. H., & Yang, B. (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Research*, 42(17), 10903–10914. <http://doi.org/10.1093/nar/gku806>
- Zhu, F., & Lin, Y. (2006). Marinamide, a novel alkaloid and its methyl ester produced by the application of mixed fermentation technique to two mangrove endophytic fungi from the South China Sea. *Chinese Science Bulletin*, 51(12), 1426–1430. <http://doi.org/10.1007/s11434-006-1426-4>