

# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ»

Ανάλυση του ρόλου του SERRATE σε συνθήκες βιοτικής καταπόνησης από το ιοειδές PSTVd σε φυτά Nicotiana benthamiana

Γεμελιάρη Πετρούλα

Επιβλέπων Καθηγητής: Κρίτων Καλαντίδης

Ηράκλειο, 2022

# Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Abstract	2
Ευχαριστίες	3
Εισαγωγή	4
1.1 Ο μηχανισμός της RNA σίγησης	4
1.1.1 Εξωγενές μονοπάτι της RNA σίγησης	5
1.1.2 Ενδογενές μονοπάτι της RNA σίγησης	6
1.1.3 Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των micro RNAs (miRNAs)	6
1.2 Πρωτεΐνες DICER-LIKE	8
1.3 Η πρωτεΐνη SERRATE	8
1.4 Ιική απόκριση στον μηχανισμό της RNA σίγησης	11
1.5 Ιοειδή	11
1.5.1 Το ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (Potato spindle tub viroid, PSTVd)	er 12
1.5.2 Αλληλεπίδραση του PSTVd με το φυτό ξενιστή	13
1.6 Στόχος	15
2. Υλικά και Μέθοδοι	16
2.1 Χειρισμός φυτικού υλικού	16
2.1.1 Συνθήκες ανάπτυξης φυτών	16
2.1.2 Συλλογή φυτικού ιστού	16
2.2 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης	16
2.2.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων	16
2.3 Πλασμίδια	17
2.4 Νουκλεϊκά οξέα	17
2.4.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα	17
2.4.2 Απομόνωση RNA	18
2.4.3 Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη-χλωροφόρμιο	19
2.4.4 Ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων	19
2.5 Αντιδράσεις με ένζυμα περιορισμού	19
2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction)	19
2.7 Καθοδηγούμενη σημειακή μεταλλαξιγένεση (Site directed mutagenesis)	20
2.8 Ηλεκτροφόρηση	21
2.8.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	21
2.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης κάτω από αποδιατακτικές συνθήκε	ς21

2.9 Ανάλυση τύπου Northern (Northern blotting)	22
2.10 Υβριδισμός	22
2.11 Ποσοτικοποίηση GUS από φύλλα φυτού <i>Ν. benthamiana</i>	23
2.12 Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS σε φύλλα το benthamiana	ου φυτού Ν. 24
2.13 Ποσοτικοποίηση GFP	24
2.14 Ανίχνευση GFP	25
2.15 Αγρο-εμποτισμός	25
3. Αποτελέσματα	27
3.1 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE κάτω συνθήκες βιοτικής καταπόνησης	από 27
3.1.1 Παρατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE GFP	Ε μέσω της 28
3.1.2 Παρατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE GUS	Ε μέσω του 28
3.1.2.1 Ποσοτικοποίηση του GUS	29
3.1.2.2 Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS	32
3.2 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγών στη μεταγραφική δραστ του SERRATE	τηριότητα 37
3.2.1 Παρατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE GFP σε υγιή φυτά	Σ μέσω της 41
3.2.2 Παρατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE GUS σε υγιή φυτά	Ε μέσω του 42
3.2.2.1 Ποσοτικοποίηση του GUS σε υγιή φυτά	46
3.2.2.2 Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS σε υγιή	ο φυτά47
3.3 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγών στη μεταγραφική δραστ του SERRATE κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης	τηριότητα 49
3.3.1 Παρατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE GFP κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης	Ε μέσω της 49
3.3.2 Παρατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE GUS κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης	Ε μέσω του 50
3.3.2.1 Ποσοτικοποίηση του GUS κάτω από συνθήκες βιοτικής κατα	απόνησης.51
3.3.2.2 Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS κάτω α βιοτικής καταπόνησης	πό συνθήκες 53
4. Συζήτηση	56
4.1 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE κάτω συνθήκες βιοτικής καταπόνησης	από 57

7
3
3
)
3

# Περίληψη

Η RNA σίγηση εικάζεται ότι αρχικά αποτελούσε έναν μηχανισμό προστασίας, κυρίως αντιιικό, ο οποίος υπήρχε στον τελευταίο κοινό πρόγονο όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών και προσέδιδε προστασία από RNA εισβολείς στο κυτταρόπλασμα. Με την πάροδο των χρόνων και την εξελικτική πίεση που ασκούνταν στους οργανισμούς, ο μηχανισμός αυτός απέκτησε ρυθμιστικό ρόλο για το γονιδίωμα των φυτών. Όσον αφορά την λειτουργία του μηχανισμού, αποτελεί έναν συντηρημένο μηχανισμό στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι φυτικοί οργανισμοί έχουν τρία βασικά μονοπάτια σίγησης και ένα από αυτά είναι το miRNA μονοπάτι. Το miRNA μονοπάτι της σίγησης έχει μελετηθεί περισσότερο όσον αφορά στο ρόλο του ως αναπτυξιακός ρυθμιστής.

Η Dicer Like 1 (DCL1) αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα στο miRNA μονοπάτι σίγησης, αλλά λόγω του κυρίαρχου ρόλου της στην ανάπτυξη και βιωσιμότητα των φυτών, για την μελέτη του μονοπατιού η έρευνα εστιάζεται στην εξίσου σημαντική πρωτεΐνη SERRATE. Η ταυτοποίηση αυτής της πρωτεΐνης έγινε για πρώτη φορά το 1964 ως ένα μετάλλαγμα του φυτού *Arabidopsis thaliana* από τους Rédei και Hirono και αργότερα χαρακτηρίστηκε ως βασικός ρυθμιστής του miRNA μονοπατιού της σίγησης. Σε συνθήκες μειωμένης έκφρασής της, παρατηρείται μειωμένη συσσώρευση τόσο pre-miRNAs όσο και ώριμων δίκλωνων miRNA. Επίσης η πρωτεΐνη SERRATE έχει βρεθεί να εμπλέκεται και σε άλλες διαδικασίες με σημαντικότερη τη διαδικασία του ματίσματος και του εναλλακτικού ματίσματος των γονιδίων.

Έχουν προηγηθεί μελέτες που εστιάζουν στον ενδογενή μηχανισμό της RNA σίγησης με την επίδραση συγκεκριμένων miRNAs στην καταπολέμηση ή την υπεροχή του παθογόνου, με έμφαση κυρίως σε ιικές και βακτηριακές μολύνσεις. Παράλληλα, έχει βρεθεί θετική συσχέτιση της μολυσματικότητας των ιοειδών της οικογένειας *Pospiviroidae* και των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *SERRATE*, σε πειράματα με σειρές φυτών που παρουσιάζουν καταστολή αυτού του γονιδίου.

Στην παρούσα μελέτη γίνεται μια προσπάθεια περαιτέρω κατανόησης του ρόλου του ενδογενούς μονοπατιού της σίγησης στην απόκριση των φυτών σε συνθήκες βιοτικής καταπόνησης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν Nicotiana benthamiana φυτά με δυσλειτουργικό miRNA μονοπάτι, για να μελετηθούν τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου SERRATE σε μολυσμένα και μη, αγρίου τύπου και διαγονιδιακά φυτά. Επιπλέον, στη 5' αμετάφραστη περιοχή του υποκινητή του γονιδίου SERRATE έχουν βρεθεί δύο επιπλέον θέσεις έναρξης της μεταγραφής, ATGs. Στην εργασία αυτή γίνεται μία πρώτη προσπάθεια για τη μελέτη τυχόν επίδρασης αυτών των θέσεων στη μετάφραση του SERRATE παρουσία ή όχι βιοτικής καταπόνησης.

# Abstract

RNA silencing was originally a defense mechanism, mainly antiviral, which was present in the last common ancestor of all eukaryotic organisms and provided protection against RNA invaders in the cytoplasm.

Over the years and the evolutionary pressure that was exerted on organisms, this mechanism acquired a regulatory role for the plant genome. In terms of the operation of the mechanism, it is the most conserved mechanism in eukaryotic organisms till today. Plant organisms have 3 main silencing pathways and one of them is the miRNA pathway. The miRNA silencing pathway has been further studied in terms of its role as a developmental regulator.

Dicer Like 1 (DCL1) is the most important factor in the miRNA silencing pathway, but due to its dominant role in plant growth and viability, for the study of this pathway the research focuses on the equally important protein, SERRATE (SE). This protein was first identified in 1964 as a mutant of the Arabidopsis thaliana plant by Rédei and Hirono and was later identified as a key regulator of the miRNA silencing pathway. Under conditions of reduced expression, a reduced accumulation of both pre-miRNAs and mature double-stranded miRNAs is observed. The SE protein has also been found to be involved in other processes, most importantly the splicing and alternative splicing process of genes.

Previous studies have focused on the endogenous mechanism of RNA silencing with the effect of specific miRNAs on the control or dominance of the pathogen, with an emphasis mainly on viral and bacterial infections. At the same time, a positive correlation has been found between the infectivity of viruses of the Pospiviroidae family and the expression levels of the *SERRATE* gene, in experiments with plant that show repression of this gene.

In this study, an attempt will be made to further understand the role of the endogenous pathway of silence in the response of plants to conditions of biotic stress. *Nicotiana benthamiana* plants with a disfunctional miRNA pathway will be used for this purpose. The transcription levels of the *SERRATE* gene in infected and non-infected plants will be studied. In addition, in the 5 'untranslated region of the *SERRATE* gene promoter there are 2 extra ATGs. Here, we try to study possible effect of these ATGs in SERRATE translation both under or not biotic stress conditions, in wild type and transgenic plant.

# Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του υπεύθυνου του Εργαστηρίου, καθηγητή Κρίτων Καλαντίδη. Επιπλέον, αποτελεί ένα ακόμα σκαλοπάτι στην πορεία της εκπαίδευσής μου και στην πορεία της απόκτησης ειδίκευσης σε ένα κλάδο που αγάπησα με την πρώτη επαφή.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που ήταν στο πλευρό μου, κυρίως τον τελευταίο χρόνο, οι οποίοι με στήριξαν με όποιο τρόπο μπορούσε ο καθένας τους. Καθοριστικής σημασίας ήταν η παρουσία της οικογένειας μου, που με προσωπικές θυσίες, μου έδωσαν τη δυνατότητα να παρακολουθήσω το συγκεκριμένο πρόγραμμα σπουδών και με βοήθησαν να αντιμετωπίσω κάθε δυσκολία που βρέθηκε στον δρόμο μου. Ευχαριστώ, λοιπόν, θερμά όλους αυτούς τους ανθρώπους που πίστεψαν σε μένα όταν ακόμα και εγώ η ίδια αμφισβητούσα τις δυνατότητες μου.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον υπεύθυνο καθηγητή μου Κρίτων Καλαντίδη, ο οποίος με εμπιστεύτηκε και με έκανε μέλος της ομάδας του εργαστηρίου του, καθώς επίσης και για όλες τις πολύτιμες συμβουλές του, τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο. Θέλω επίσης να τον ευχαριστήσω από κοινού με τα άλλα δυο μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, Παναγιώτη Μόσχου και Κυριάκο Κοτζαμπάση, για τη δυνατότητα που μου έδωσαν να συμμετέχω σε αυτό το μεταπτυχιακό πρόγραμμα και επιπλέον, δέχτηκαν να αξιολογήσουν την εργασία μου.

Ευχαριστώ, επίσης, την Νικολέτα Κρυοβρυσανάκη η οποία με πολλή υπομονή και παρόλες τις αναποδιές στάθηκε στο πλευρό μου και με καθοδήγησε σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τον Anthony James ο οποίος αφιέρωσε τον πολύτιμό του χρόνο καθώς επίσης έδειξε μεγάλη κατανόηση και υπομονή στην προσπάθεια μου να ολοκληρώσω το πειραματικό κομμάτι της εργασίας μου, καθώς επίσης εκτιμώ τις συστάσεις που έκανε προκειμένου να έχω ένα όσο το δυνατόν καλύτερο αποτέλεσμα. Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την Ειρήνη Μπαρδάνη, Μάρθα Τσελίκα, Μυρσίνη Φρουδάκη και Νάντια Κατσάρου, οι οποίες ήταν πάντα πρόθυμες να με βοηθήσουν. Επίσης, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, καθώς η καθημερινή τριβή στο εργαστήριο απέκτησε άλλο νόημα και με έκανε να εκτιμήσω το όμορφο αυτό κλίμα που επικρατούσε, καθώς κάθε δυσκολία αντιμετωπιζόταν με χαμόγελο, παρόλο που ήταν μια δύσκολη περίοδος για όλους μας.

Ένα μεγάλο, ξεχωριστό ευχαριστώ στις συμφοιτήτριες μου, Δάφνη Παρασκευοπούλου, Ευαγγελία Καρακώστα, Ζωή Πενθερουδάκη και Μαρία Μολοχίδου, με τις οποίες μοιραστήκαμε τόσο όμορφες στιγμές παρόλη την πίεση του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών.

Τέλος, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον κύριο Στέλιο Μαυράκη, ο οποίος αποτέλεσε ένα σπουδαίο κρίκο στην αλυσίδα της περάτωσης της διπλωματικής εργασίας, καθώς όχι μόνο φρόντισε εκ μέρους μου εκατοντάδες φυτά αλλά μου παρείχε βοήθεια, κάθε φορά που τη ζητούσα, με την ευχάριστη παρέα του καθώς και τα «μικρά μυστικά» όσον αφορά τη μεταχείριση των φυτών.

# Εισαγωγή

# 1.1 Ο μηχανισμός της RNA σίγησης

Η RNA σίγηση αποτελεί ένα μηχανισμό ρύθμισης γονιδίων που βασίζεται στη στόχευση και αποικοδόμηση του RNA. Ο μηχανισμός αυτός συναντάται σε ένα ευρύ φάσμα ευκαρυωτικών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων, των φυτών και των ζώων. Στα φυτά, δραστηριοποιείται ως αντι-ιικός μηχανισμός άμυνας, και πολλοί φυτικοί ιοί κωδικοποιούν πρωτεΐνες για την καταστολή αυτού (Vance & Vaucheret, 2001).

Ο μηχανισμός αυτός, αρχικά, ανακαλύφθηκε σε διαγονιδιακά φυτά όπου και ονομάστηκε συγκαταστολή ή μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση (posttranscriptional gene silencing, PTGS) (Hamilton & Baulcombe, 1999), αφού είχαν προηγηθεί ενδείξεις ύπαρξης μικρών RNA με πιθανό ρυθμιστικό ρόλο σε άλλους οργανισμούς (Lee et al., 1993; Fire et al., 1998) αλλά και στα φυτά (Smith et al., 1994).

Η χρήση της γονιδιακής αποσιώπησης αποτέλεσε ένα σπουδαίο ερευνητικό εργαλείο για την ταυτοποίηση των λειτουργιών των γονιδίων. Πλέον, η γονιδιακή αποσιώπηση προσεγγίζει ζητήματα όπως την προστασία του φυτού σε καταπονήσεις και την μέγιστη απόδοση των μεταβολικών οδών αυτού, στοχεύοντας επιπλέον στην μέγιστη παραγωγικότητα των καλλιεργούμενων εδαφών εν όψη των δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών που συνδέονται με την κλιματική αλλαγή (A. Eamens et al., 2008). Η RNA σίγηση διακρίνεται για το διττό της ρόλο, συμμετέχοντας τόσο στην ανάπτυξη του φυτού όσο και στην άμυνα αυτού έναντι σε παθογόνα.

Η RNA σίγηση, στα φυτά, διακρίνεται σε 3 μονοπάτια (Εικόνα 1.1), με βάση το είδος της ρύθμισης, τους επαγωγείς και τους τελεστές της. Τα μονοπάτια αυτά είναι τα εξής:

1)Το μονοπάτι των micro RNA (miRNA)

2)Το μονοπάτι των μετα-μεταγραφικών μικρών παρεμβαλόμενων RNA (small interfering RNA, siRNA)

3)Το μονοπάτι των μεταγραφικών siRNA ή μονοπάτι της RNA-κατευθυνόμενης DNA μεθυλίωσης

Τα πρώτα 2 μονοπάτια αφορούν ρύθμιση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (PTGS), ενώ το τρίτο μονοπάτι σε μεταγραφικό επίπεδο (transcriptional gene silencing, TGS).



Εικόνα 1.1. Ο μηχανισμός της αντιικής RNA σίγησης στα φυτά. α | Στον πυρήνα, οι ιοί και τα ιικά παθογόνα που ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του ζενιστή υποβάλλονται σε μεταγραφική σίγαση γονιδίων (TGS). Σε όλες τις περιπτώσεις, το δίκλωνο RNA αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη DCL3, και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ιικών siRNAs. Αυτά, στη συνέχεια, αλληλεπιδρούν με τις αντίστοιχες περιοχές του ιικού DNA εντός του γονιδιώματος του *ζενιστή, μεθυλιώνοντας την περιοχή αυτή (επιγενετική τροποποίηση), η οποία έχει ως αποτ*έλεσμα τη σίγηση της γονιδιακής έκφρασης. b | Στο κυτταρόπλασμα, η σιγηση ζεκινά μέσω της διαδικασίας της γονιδιακής σίγησης που προκαλείται από ιούς (virus-induced gene silencing, VIGS). Η πρωτεΐνη DCL2 αλληλεπιδρά, δυνητικά, με τη DCL1 για να προωθήσει την πυρηνική της εξαγωγή και να διευκολύνει την επεξεργασία ατελών βρόχων που βρίσκονται σε ιικά RNA και σε γονιδιώματα ιοειδών. Τα προκύπτοντα ιικά μικρά παρεμβατικά RNAs ζετυλίγονται από μια RNA ελικάση εξαρτώμενη από ATP (ATP-dependent RNA helicase) και κατόπιν ενσωματώνεται στο RISC. Το RISC στη συνέχεια κατευθύνεται στο αντίστοιχο ιικό mRNA, το οποίο αποικοδομείται. c | Το πρωταρχικό σήμα μπορεί να ενισχυθεί στο δευτερεύον μονοπάτι VIGS. Τα ιογενή μικρά RNAs που παράγονται σε πρωτογενή VIGS μετατρέπονται σε δικλωνα RNA. Αυτά τα δίκλωνα RNAs στη συνέχεια επεξεργάζονται και οδηγούν σε αποικοδόμηση του αντίστοιχου ιικού mRNA. d | Το miRNA μονοπάτι μπορεί επίσης να συμμετάσχει στα VIGS. Σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, τα ιικά dsRNA μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία στον πυρήνα από την πρωτεΐνη DCL1 και στη συνέχεια εξέρχονται στο κυτταρόπλασμα, όπου και εισέρχονται στο μονοπάτι της αντιικής RNA σίγησης. Η πρωτεΐνη HASTY είναι το ομόλογο της εξπορτίνης 5 στο φυτό Arabidopsis thaliana. Πηγή: Voinnet, 2005.

#### 1.1.1 Εξωγενές μονοπάτι της RNA σίγησης

Σημαντικό ρόλο του μηχανισμού της RNA σίγησης στα φυτά αποτελεί η άμυνα ενάντιας στους ιούς και τα ιοειδή, αλλά και σε άλλα ξένα γενετικά στοιχεία. Αυτοί οι εισβολείς, ενεργοποιούν το εξωγενές μονοπάτι της RNA σίγησης. Δίκλωνα ή μερικώς δίκλωνα μόρια RNA προερχόμενα από εισβολείς μέσα στο φυτό, αναγνωρίζονται και κατακερματίζονται με αποτέλεσμα την παραγωγή siRNAs. Σε περίπτωση όπου το γονιδίωμα του ιού είναι μονόκλωνο RNA, μετατρέπεται σε δίκλωνο με τη βοήθεια των RNA εξαρτώμενων RNA πολυμερασών (RNA dependent RNA polymerase -RdRp). Τα siRNAs που παράγονται, στοχεύουν τα ιικά γονίδια επάγοντας τη σίγηση αυτών, είτε μέσω PTGS (RNA-ιοί) είτε και μέσω TGS (DNA-ιοί) (Pumplin & Voinnet, 2013).

Οι πρωτεΐνες DCL4 και DCL2 αποτελούν τις βασικές αντι-ιικές πρωτεΐνες του μηχανισμού με εξειδικευμένη δράση. Σε περίπτωση απουσίας λειτουργικής πρωτεΐνης DCL4, η πρωτεΐνη DCL2 μπορεί και αναπληρώνει τη δράση της, ενώ σε περίπτωση απουσίας και των δυο αυτών πρωτεϊνών, τα φυτά παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία σε ικές μολύνσεις (Deleris et al., 2006). Όσον αφορά το ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (PSTVd), η άμυνα των φυτών βασίζεται στη συνδυαστική δράση των DCL2 και DCL3 πρωτεϊνών (Katsarou et al., 2016). Οι πρωτεΐνες DCL είναι επίσης σημαντικές για τη «φόρτωση» των siRNAs στο σύμπλοκο RISC, αποτρέποντας την ελεύθερη διάχυση αυτών στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, σημαντικές πρωτεΐνες στην αντιική άμυνα των φυτών, είναι οι AGO1 και AGO2, ενώ σε μικρότερο βαθμό φαίνεται να εμπλέκονται και οι AGO4, AGO5, AGO7 και AGO10 (Meister, 2013).

# 1.1.2 Ενδογενές μονοπάτι της RNA σίγησης

## 1.1.3 Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των micro RNAs (miRNAs)

Τα microRNAs (miRNAs) είναι θεμελιώδη, ειδικά ρυθμιστικά στοιχεία, τα οποία βρίσκονται μέσα σε αλληλουχίες ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων και αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη οικογένεια μικρών RNA (smallRNA, sRNA) που λειτουργούν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης (Stepien et al., 2017). Έχουν μήκος 19-24 νουκλεοτίδια και λαμβάνουν μέρος στην ενδογενή γονιδιακή αποσιώπηση τόσο σε μεταγραφικό όσο και μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Voinnet, 2009).

Το πρώτο miRNA που ανακαλύφθηκε ήταν το lin-4 στο *C. elegans* (Lee et al., 1993) και μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί εκατοντάδες miRNAs σε φυτά και ζώα συμπεριλαμβανομένων αρκετών εκατοντάδων μοναδικών miRNA στο φυτό-μοντέλο Arabidopsis (Millar & Waterhouse, 2005).

Η πρώτη αναφορά στο ενδογενές μονοπάτι βιοσύνθεσης των miRNA των φυτών έγινε από τους Reinhart et al. (Reinhart et al., 2002). Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των miRNAs ξεκινά με τη μεταγραφή των ενδογενών μικρών RNA γονιδίων (micro RNA genes, MIR genes) από την RNA πολυμεράση ΙΙ. Η μεταγραφή αυτών των γονιδίων παράγει πρωτογενή μετάγραφα (pri-miRNAs) που περιέχουν μια δομή καλύμματος στο 5' άκρο και μια πολύ-A-ουρά στα 3' άκρο, τροποποιήσεις που αποτελούν μοναδικά χαρακτηριστικά όλων των πρωτογενών μεταγραφών που συντίθενται από τη RNA πολυμεράση ΙΙ (Stepien et al., 2017).

Επιπλέον, τα γονίδια αυτά, δεν κωδικοποιούν για κάποια πρωτεΐνη. Τα φυτικά primiRNAs επεξεργάζονται εξ' ολοκλήρου στον πυρήνα των κυττάρων, και αυτή η επεξεργασία πραγματοποιείται μέσα σε δυο στάδια, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.2**. Στο πρώτο στάδιο, τα pri-mRNAs παράγουν δομές βρόχου λόγω της συμπληρωματικότητας, ενώ κατά το δεύτερο στάδιο, τα πρώιμα μικρά RNAs (premature micro RNAs, pre-miRNAs) επεξεργάζονται περαιτέρω σε miRNA/miRNA\* δίκλωνα μόρια (Stepien et al., 2017).

Η πρωτεΐνη DICER LIKE 1 (DCL1), είναι αυτή που ευθύνεται για τις αποκοπές των δίκλωνων μορίων, τόσο pri-miRNA όσο και pre-miRNA. Η DCL1 δρα σε σύμπλοκο με την HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1), μια πρωτεΐνη που προσδένεται σε δίκλωνο RNA, και την SERRATE, μια πρωτεΐνη που περιέχει μια χαρακτηριστική zinc-finger

περιοχή. Αποτέλεσμα αυτού του συμπλόκου, που φαίνεται να είναι ο πυρήνας του μηχανισμού της βιοσύνθεσης των miRNA, είναι το κόψιμο του άκρου που περιέχει την καλύπτρα και την πολύ-A ουρά. Το pre-miRNA που σχηματίζεται επεξεργάζεται ξανά από το ίδιο σύμπλοκο και δημιουργείται το ώριμο δίκλωνο miRNA, το οποίο στη συνέχεια μεθυλιώνεται από τη μεθυλοτρανσφεράση HUA ENHANCER 1 (HEN1). Η μεθυλίωση αυτή είναι απαραίτητη προκειμένου το δίκλωνο miRNA να είναι προστατευμένο από τη δράση των εξωνουκλεασών, αφού ακολουθεί η έξοδος του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, μέσω ενός μονοπατιού που ελέγχεται από την εξπορτίνη HASTY. Μετά την έξοδο του miRNA από τον πυρήνα, αναλαμβάνει, το σύμπλοκο AGO1-RISC (ARGONAUTE 1, πρωτεΐνη με ικανότητα ματίσματος και RNA-induced silencing complex, RISC), και τελικά μόνο η μια αλυσίδα του miRNA/miRNA\* χρησιμοποιείται για την αποδόμηση ή την παρεμπόδιση της μετάφρασης ενός ομόλογου αγγελιοφόρου RNA-στόχου (messenger RNA, mRNA), με απώτερο σκοπό την αναπτυξιακή ρύθμιση (**Εικόνα 3.2**) (Voinnet, 2009) (Stepien et al., 2017).



Εικόνα 1.2. Μετα-μεταγραφικός συντονισμός της συρρίκνωσης και της βιογένεσης miRNA στα φυτά. Η διάσπαση του δίκλωνου miRNA/miRNA\* (miRNA\* =συμπληρωματικό) από τα πρόδρομα pri-miRNA, γίνεται σε δύο φάσεις. Αρχικά, η ενδονουκλεάση DCL1 παράγει τα pre-miRNAs και στη συνέχεια ακολουθεί η μεθυλίωση στο τερματικό άκρο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσα στον πυρήνα. Έπειτα, με τη βοήθεια της πρωτεΐνης HASTY, τα pre-miRNA εξέρχονται από τον πυρήνα και μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα. Οι κόκκινες και μπλε γραμμές αντιπροσωπεύουν τα μόρια miRNA και miRNA\*, αντίστοιχα. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση των βημάτων της βιογένεσης. Πηγή: Stepien et al., 2017.

Τα miRNA εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα αναπτυξιακών διαδικασιών, καθώς επίσης και σε μηχανισμούς απόκρισης των φυτών σε συνθήκες βιοτικής ή/και αβιοτικής καταπόνησης, μέσω της καταστολής της μετάφρασης ή της καταστροφής του RNA-

στόχου (Jones-Rhoades et al., 2006) (Palatnik et al., 2003). Πιστεύεται ότι και τα δύο βήματα της βιογένεσης των miRNA πραγματοποιούνται μέσα σε εξαιρετικά εξειδικευμένες πυρηνικές εστίες, οι οποίες ονομάζονται D-bodies (Dicing bodies), με τις πρωτεΐνες DCL1 και HYL1 να βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά σε D-σωμάτια (Stepien et al., 2017).

# 1.2 Πρωτεΐνες DICER-LIKE

Οι πρωτεΐνες DICER-LIKE είναι ενδονουκλεάσες τύπου RNA-III και διαδραματίζουν το σημαντικότερο ρόλο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των miRNAs, όπου δρουν πάνω στα δίκλωνα μόρια RNA (dsRNA) τεμαχίζοντας τα σε RNA μικρού μεγέθους (small RNA, sRNA). Το κόψιμο αυτό, αφήνει στο 3' άκρο δυο προεξέχοντα νουκλεοτίδια και μια υδροξυλομάδα και μια φωσφορική ομάδα στο 5' άκρο. Στην υπάργουσα βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι υπάρχουν τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν για τις DICER-LIKE πρωτεΐνες στα φυτικά είδη Arabidopsis thaliana και Nicotiana benthamiana (Nakasugi et al., 2013) ενώ στο ρύζι (Oryza sativa) οκτώ γονίδια (Kapoor et al., 2008). Έτσι, όπως αναφέρθηκε, η DCL1 αποτελεί κύριο παράγοντα στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης των miRNAs μεγέθους 21 νουκλεοτιδίων, ενώ οι DCL2 και DCL4 αποτελούν παράγοντες κυρίως του αντι-ιικού μονοπατιού της σίγησης. Η DCL2 συγκεκριμένα, παράγει siRNAs μήκους 22 νουκλεοτιδίων και σχετίζεται με την άμυνα των φυτών έναντι ιών (Qin et al., 2017). Η DCL3 αποτελεί κύριο ρυθμιστή του μονοπατιού της DNA μεθυλίωσης και παράγει siRNAs 24 νουκλεοτιδίων (Matzke et al., 2009). Τέλος, η DCL4 παράγει siRNAs μεγέθους 21 νουκλεοτιδίων και εμπλέκεται στην άμυνα των φυτών έναντι ιών και ιοειδών (Bouché et al., 2006). Τέλος, είναι γνωστό ότι ισχυρή καταστολή της DCL1 προκαλεί θνησιμότητα σε εμβρυικό στάδιο (Bozorov et al., 2012).

# 1.3 Η πρωτεΐνη SERRATE

Η πρωτεΐνη SERRATE (SE), η οποία, όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 1.2, αποτελεί τον δεύτερο πιο σημαντικό παράγοντα του μονοπατιού της βιοσύνθεσης των miRNAs. Η ταυτοποίηση του γονιδίου SERRATE έγινε για πρώτη φορά το 1964 ως ένα μετάλλαγμα του φυτού Arabidopsis thaliana από τους Rédei και Hirono αργότερα χαρακτηρίστηκε ως βασικός ρυθμιστής του miRNA μονοπατιού της σίγησης. Η πρωτεΐνη SERRATE αποτελείται από 720 αμινοξέα και κοντά στο καρβοξυ-τελικό της άκρο διαθέτει έναν δακτύλιο ψευδαργύρου C2H2 (zinc-finger), ενώ στο αμινο-τελικό της άκρο, απαραίτητες αλληλουχίες για την πυρηνική της στόχευση. Η περιοχή του δακτυλίου ψευδαργύρου της SERRATE εκτός από χαρακτηριστική για την πρωτεΐνη, είναι και ζωτικής σημασίας για τις αλληλεπιδράσεις της με τη DCL1 και για την αλληλεπίδραση με τη δεύτερη περιοχή πρόσδεσης του δίκλωνου RNA (double stranded RNA-binding domain, dsRBD) της HYL1 (Stepien et al., 2017). Η πρωτεΐνη SERRATE βρίσκεται μέσα σε πυρηνικά σωμάτια, τα D-bodies. Επιπλέον, σημαντικό για τη δέσμευση με τα pri-miRNA είναι το N-τερματικό θραύσμα της SERRATE (Dong et al., 2008).

Σε συνθήκες μειωμένης έκφρασης της SERRATE, παρατηρείται μειωμένη συσσώρευση τόσο pre-miRNAs όσο και ώριμων miRNA, γεγονός που αποδεικνύει τη συμμετοχή της και στα δύο στάδια του μηχανισμού βιοσύνθεσης των miRNAs, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.3. Επίσης, η πρωτεΐνη SERRATE έχει βρεθεί να εμπλέκεται και σε άλλες διαδικασίες, όπως, για παράδειγμα, τη συμμετοχή της στη

μεταγραφή γονιδίων χωρίς ή με μικρό αριθμό ιντρονίων (Speth et al., 2018) και τη ρύθμιση των μεταθετών στοιχείων (Ma et al., 2018) με σημαντικότερη τη διαδικασία του ματίσματος και του εναλλακτικού ματίσματος των γονιδίων (Stepien et al., 2017).



Cleavage or translational inhibition

**Εικόνα 1.3.** Η συμμετοχή του SE στο μονοπάτι της βιογένεσης των miRNAs, τόσο στο στάδιο επεξεργασίας των primiRNAs όσο και των pre-miRNAs, για το σχηματισμό του σύμπλοκο miRNA/miRNA. Πηγή: Khraiwesh et al., 2012.

Το όνομα του γονιδίου SERRATE οφείλεται στην χαρακτηριστική οδοντωτή μορφή των φύλλων (serration) που παρατηρείται σε συνθήκες μειωμένης έκφρασης στο A.thaliana (Εικόνα 1.5). Επιπλέον, με τη μειωμένη έκφραση της SERRATE παρατηρούνται κι άλλες ανωμαλίες όπως διαφορές ως προς τον αριθμό των φύλλων και τη μορφολογία των ανθέων (Grigg et al., 2005) (Prigge & Ry Wagner, 2001). Σε φυτά A.thaliana με κατεσταλμένο το γονίδιο SERRATE, παρατηρήθηκε ένα μεγάλο εύρος φαινοτύπου όπου κυμαινόταν από αντίστοιχο με τα αγρίου τύπου φυτά έως και θνησιγόνος σε εμβρυικό στάδιο. Ο ρόλος του SERRATE ως ρυθμιστικός παράγοντας της ανάπτυξης φανερώθηκε με τις παρατηρήσεις στο χρόνο μετάβασης από τη βλαστική στην ανθική φάση με τη διαμόρφωση των φύλλων, ενώ στα φυτά με καταστολή του γονιδίου SERRATE υπήρξαν διαφορές ως προς τη διάρκεια της μετάβασης μεταξύ των δύο φάσεων, με την εμφάνιση των ενήλικων φύλλων να πραγματοποιείται 3 μέρες νωρίτερα από αυτών του αγρίου τύπου. Επιπλέον, τα μεταλλάγματα se εμφάνισαν ποικίλα μήκη μεσογονάτιων διαστημάτων καθώς επίσης τα άνθη τους παρουσίασαν μεγαλύτερο αριθμό πετάλων και σεπάλων, ενώ ο αριθμός των στημόνων ήταν μικρότερος. Ανάλογα με τα επίπεδα καταστολής του SERRATE, τα μεταλλάγματα με μεγαλύτερη καταστολή εμφανίζουν σοβαρές ελλείψεις ως προς την ανάπτυξη των φύλλων καθώς αυτό σχετίζεται με την έκφραση διάφορων

μεταγραφικών παραγόντων, όπως του μεταγραφικού παράγοντα PHABULOSA (PHB), και κατ' επέκταση σε μειωμένα επίπεδα miRNAs (Prigge & Ry Wagner, 2001).



**Εικόνα 1.4.** Απεικόνιση των φαινιοτυπικών ανωμαλιών που παρατηρούνται σε φυτά Arabidopsis thaliana με καταστολή του γονιδίου SERRATE, οι οποίες οδήγησαν στην ονομασία αυτού. Α| Στα φυτά με καταστολή του SERRATE παρατηρούνται λιγότερα φύλλα στις ροζέτες, ενώ όλα έχουν οδοντωτή μορφή. Β| Αριστερά απεικονίζεται ένα φυτό Arabidopsis thaliana αγρίου τύπου και δεζιά ένα φυτό Arabidopsis thaliana με καταστολή του γονιδίου SERRATE. C| Διαφορές στις ταζιανθίες των αγρίου τύπου Arabidopsis thaliana και του μεταλλαγμένου ως προς το SERRATE, με το βέλος να δείχνει ένα μη φυσιολογικό σύμπλεγμα λουλουδιών στην ταζιανθία του φυτού με καταστολή του SERRATE. Πηγή: Prigge & Wagner, 2001.

Η SERRATE ως μέλος των zinc-finger πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την δραστηριότητά της σε μονοπάτια γονιδιακής ρύθμισης, φαίνεται να αποτελεί παράγοντα που σχετίζεται με την άμυνα των φυτών έναντι σε βιοτικούς παράγοντες. Έχουν προηγηθεί μελέτες που συσχετίζουν την SERRATE με την άμυνα των φυτών έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas Syringae* και του μύκητα *Botrytis cinerea* (Voisin et al., 2009). Επιπλέον, σε αδημοσίευτες μελέτες του εργαστηρίου, έχει δειχθεί ότι σε διαγονιδιακά *N. benthamiana* φυτά, με κατεσταλμένο μονοπάτι της RNA σίγησης, ο τίτλος του ιού Cucumber mosaic virus (CMV), 21 ημέρες μετά από μηχανική μολύνση, μειώνεται συγκριτικά με τα αγρίου τύπου φυτά. Οι μελέτες αυτές κατευθύνουν την έρευνα της επίδρασης των βιοτικών καταπονήσεων από τη σκοπιά ενός ρυθμιστικού παράγοντα των RNA διαδικασιών.

Το ομόλογο γονίδιο των ζωικών οργανισμών (ARS2) ταυτοποιήθηκε αρχικά στο κινέζικο χάμστερ, ως παράγοντας που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στο αρσενικό. Ακολούθησε η ταυτοποίησή του και σε άλλους οργανισμούς, και συγκεκριμένα, φαίνεται ότι στον άνθρωπο σχετίζεται επίσης με την ανθεκτικότητα στο αρσενικό όπως ακριβώς συμβαίνει και με το κινέζικο χάμστερ (Rossman & Wang, 1999).

# 1.4 Ιική απόκριση στον μηχανισμό της RNA σίγησης

Ορισμένοι ιοί έχουν την ικανότητα να κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες αντιδρούν με τον μηχανισμό της RNA σίγησης. Αυτοί οι ιοί, διαθέτουν στο γονιδίωμά τους (RNA ή DNA) ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF) το οποίο κωδικοποιεί πρωτεΐνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες τόσο για τη μετακίνηση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο, όσο και για την παρεμπόδιση της διασυστημικής μετάδοσης του σήματος της μετα-μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης (Voinnet et al., 2000) (Vance & Vaucheret, 2001). Οι πρωτεΐνες καταστολής του μηχανισμού της σίγησης φαίνεται να έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα στις διάφορες ιικές ομάδες λόγω της διαφορετικής δομής τους όπου δεν υπάρχουν κοινά μοτίβα αλληλουχιών (Baulcombe, 2004). Επομένως, γίνεται αντιληπτή η πολυπλοκότητα του μηχανισμού της RNA σίγησης όταν τα φυτά βρίσκονται κάτω από διαφορετικά είδη βιοτικής καταπόνησης.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και ιών διέπονται από την παρουσία ή απουσία παραγόντων που κωδικοποιούνται τόσο από τον ξενιστή όσο και τον παθογόνο, με αποτέλεσμα είτε συμβατές είτε ασυμβίβαστες αντιδράσεις, επίσης γνωστές ως ευαισθησία ή αντοχή, αντίστοιχα.

#### 1.5 Ιοειδή

Εκτός από τους ιούς, τα φυτά απειλούνται και από μικρότερες μορφές ζωής, τα ιοειδή. Τα ιοειδή αποτελούν τη μικρότερη και απλούστερη κατηγορία μορίων RNA. Είναι μονόκλωνα, κυκλικού σχήματος RNA μόρια με μέγεθος 250-400 νουκλεοτίδια. Σε αντίθεση με τους ιούς, δε κωδικοποιούν για καμία πρωτεΐνη και ευθύνονται για πολλές παθογονικές καταστάσεις των φυτών, προκαλώντας μάλιστα, συχνά, συμπτώματα. Έχουν ικανότητα αυτόνομης αναπαραγωγής και εξάπλωσης στο φυτό-ξενιστή, γρησιμοποιώντας τόσο τις πρωτεΐνες όσο και τα λειτουργικά μοτίβα που κωδικοποιούνται στο RNA αυτού. Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να επάγουν τον μηχανισμό της RNA σίγησης, ενώ παράλληλα αποτελούν και στόχο αυτού (Tabler & Tsagris, 2004). Ιστορικά, η πρώτη αναφορά στα ιοειδή γίνεται το 1967, με το πρώτο ιοειδές να είναι το ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (Potato spindle tuber viroid, PSTVd) (Diener, 1971). Τα ιοειδή αποτελούνται συνολικά από 32 είδη, τα οποία προσαυξάνονται συνεχώς και ταξινομούνται σε 2 οικογένειες, την Pospoviroidae και την Avsunviroidae (Di Serio et al., 2014). Η οικογένεια Pospiviroidae περιλαμβάνει 5 γένη, με ένα από αυτά να είναι το γένος Pospiviroid. Όπως αναφέρθηκε, τα ιοειδή δεν κωδικοποιούν για κάποια πρωτεΐνη και για αυτόν ακριβώς τον λόγο, η δευτεροταγής τους δομή είναι εξαιρετικής σημασίας όσον αφορά την αλληλεπίδρασή τους με τους παράγοντες του εκάστοτε ξενιστή και κατ' επέκταση την εξασφάλιση της επιβίωσής τους. Η αλληλουχία και κατ' επέκταση η δευτεροταγής δομή των ιοειδών διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη μολυσματικότητά του, μιας και αλλαγή ακόμα και σε μια βάση μπορεί να προκαλέσει την μετατροπή μιας μη μολυσματικής παραλλαγής σε μολυσματική (Wassenegger et al., 1996).

Το γονιδίωμα των ιοειδών που ανήκουν στην οικογένεια Pospiviroidae χαρακτηρίζεται από 5 δομικές επικράτειες. Την αριστερή τερματική επικράτεια, την περιοχή παθογένειας, την κεντρική επικράτεια, την μεταβλητή επικράτεια και την δεξιά τερματική επικράτεια (Keese & Symons, 1985). Τα μέλη της οικογένειας αυτής πολλαπλασιάζονται με τον μηχανισμό του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου μέσα στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου (ξενιστή) και χαρακτηρίζονται από την παρουσία της κεντρικής συντηρημένης επικράτειας και την απουσία δραστικότητας σφυροκέφαλου ενζύμου. Αντίθετα, τα μέλη της οικογένειας Avsunviroidae πολλαπλασιάζονται με τον μηχανισμό του συμμετρικού κυλιόμενου κύκλου αντιγραφής. Τα ιοειδή της οικογένειας Avsunviroidae χαρακτηρίζονται από την απουσία της κεντρικής συντηρημένης περιοχής και την παρουσία της δραστικότητας σφυροκέφαλου ενζύμου, ενώ ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται στους χλωροπλάστες των κυττάρων, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.3**.



**Εικόνα 1.5.** Πολλαπλασιασμός των ιοειδών. Αριστερά απεικονίζεται η διαδικασία της αναπαραγωγής μέσω του μηχανισμού του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου του ιοειδούς των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (Potato spindle tuber viroid, PSTVd), ενώ αριστερά απεικονίζεται η διαδικασία της αναπαραγωγής μέσω του μηχανισμού του συμμετρικού κυλιόμενου κύκλου του ιοειδούς Avocado sunblotch viroid (ASBVd). Πηγή: Ding et al., 2007.

1.5.1 Το ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (Potato spindle tuber viroid, PSTVd)

Το Potato spindle tuber viroid (PSTVd) αποτελεί τυπικό μέλος της οικογένειας Pospoviroidae. Αποτελείται από μια αλληλουχία 341-364 νουκλεοτιδίων, η οποία οργανώνεται σε μια ραβδόμορφη δευτεροταγή δομή με 5 διακριτές επικράτειες, όπως όλα τα ιοειδή της οικογένειας Pospoviroidae. Το γονιδίωμα του PSTVd περιλαμβάνει 27 RNA μοτίβα βρόχου (αριθμημένα από την αριστερή προς τη δεξιά τερματική περιοχή) τα οποία πλαισιώνονται από μικρές διπλές έλικες. Έχει δειχθεί ότι οι βρόχοι 1-4 και 13-15 είναι κρίσιμοι για την αντιγραφή (Jiang et al., 2018). Για να επιτευχθεί η αναπαραγωγή του ιοειδούς, θα πρέπει να εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου του ξενιστή, όπου και χρησιμοποιεί την DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση II (DNAdependent RNA polymerase II) (Dissanayaka Mudiyanselage et al., 2018).

Η διαδικασία αναπαραγωγής μέσω του μηχανισμού του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου περιλαμβάνει την μεταγραφή του μολυσματικού κυκλικού, θετικής (+) πολικότητας RNA σε επαναλαμβανόμενα ολιγομερή, αρνητικής (-) πολικότητας τμήματα. Τα ενδιάμεσα μόρια χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο για τη σύνθεση ολιγομερών αλυσίδων, οι οποίες στη συνέχεια, μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει κατάλληλη επεξεργασία, κοπή και κυκλοποίηση, δίνουν τα νέα κυκλικά μόρια RNA. Τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό είναι η RNA πολυμεράση. Ο πολλαπλασιασμός του PSTVd καταλύεται από την πυρηνική RNA πολυμεράση II (Schindler & Mühlbach, 1992), η κοπή του δίκλωνου RNA πραγματοποιείται από τις RNάσες τύπου III (Gas et al., 2007), ενώ η κυκλοποίηση επιτυγχάνεται από την πυρηνική DNA λιγάση I (Nohales et al., 2012).

Το PSTVd συνδέεται με σοβαρές ασθένειες σε φυτά της οικογένειας Solanaceae με μεγάλη οικονομική σημασία όπως είναι η πατάτα (Solanum tuberosum),η τομάτα (Solanum lycopersicum) και η πιπερία (Capsicum annuum) αλλά και σε άλλα φυτά, επίσης οικονομικής σημασίας, όπως το αμπέλι (Vitis vinifera). Επιπλέον, η παθογένεια του PSTVd συνδέεται και με άλλα καλλιεργούμενα φυτά όπως για παράδειγμα με το αβοκάντο (Persea americana) και τη γλυκοπατάτα (Ipomoea batatas) (Mackie et al., 2016).

Τα τελευταία χρόνια καταγράφονται ολοένα και περισσότερα καλλωπιστικά φυτά τα οποία μολύνονται από το συγκεκριμένο ιοειδές, χωρίς όμως αυτά να εκδηλώνουν συμπτώματα. Ωστόσο, τα φυτά αυτά συμμετέχουν στη διάδοση του ιοειδούς σε άλλα είδη, και συγκεκριμένα στην τομάτα (Verhoeven et al., 2010).

Όπως προαναφέρθηκε, η αλληλουχία καθώς και η δευτεροταγής δομή του PSTVd καθορίζει το βαθμό της παθογένειας. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν, με πρωταγωνιστικό ρόλο την θερμοκρασία. Επομένως τα συμπτώματα της μόλυνσης μπορεί να κυμαίνονται από ήπια έως σοβαρά. Σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, τα συμπτώματα είναι εντονότερα και αυτά παρουσιάζονται στα φυτά ως νανισμός, με μικρότερα μεσογονάτια διαστήματα, με ζαρωμένα φύλλα, και σε ακραίες περιπτώσεις, ακόμα και με νέκρωση του κεντρικού νεύρου, του μίσχου ή και του βλαστού (Owens, 2007). Μέχρι σήμερα, ξενιστές του PSTVd, όπως και όλων των ιοειδών, έχουν αναφερθεί μόνο φυτικά είδη.

#### 1.5.2 Αλληλεπίδραση του PSTVd με το φυτό ξενιστή

Το πώς ένα ιοειδές που δεν κωδικοποιεί για καμία πρωτεΐνη, καταφέρνει και μολύνει ένα τόσο μεγάλο εύρος ξενιστών, είναι κάτι που έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και πολλές είναι οι εργασίες που ασχολήθηκαν με αυτό το ζήτημα. Το PSTVd μετά την είσοδό του στο φυτό, μεταφέρεται στον πυρήνα, πιθανώς μέσω την αλληλεπίδρασης του "RY μοτίβου", το οποίο βρίσκεται στη δεξιά τερματική επικράτεια του ιοειδούς, με το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης Virp1, η οποία έχει δυνατότητα πρόσδεσης στο συγκεκριμένο σημείο του RNA (Martinez de Alba 2003; Maniataki et al., 2003). Φαίνεται ότι η κεντρική περιοχή του ιοειδούς διαδραματίζει

επίσης ρόλο στην πυρηνική μεταφορά (Abraitiene et al., 2008). Έπειτα, μέσω των πλασμοδεσμάτων, γίνεται η μόλυνση των γειτονικών κυττάρων και ιστών.

Τα φυτά, σε αντίθεση με τα ζώα, δε διαθέτουν αντισώματα ή ειδικά κύτταρα που εμπλέκονται στην άμυνα έναντι διαφόρων παθογόνων. Ωστόσο, έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές προκειμένου να προσαρμοστούν στο περιβάλλον τους, κυρίως μέσω του μεγάλου φάσματος των υποδοχέων που διαθέτουν εντός αλλά και στην κυτταρική τους επιφάνεια. Οι πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη και άμυνα των φυτών διακρίνονται σε 2 μεγάλες ομάδες. Την περιοχή πλούσια σε λευκίνη που προσδένεται σε νουκλεοτίδια (nucleotide-binding site leucine-rich repeat, NBS-LRR) και τους υποδοχείς κινάσης σερίνης-θρεονίνης (receptor serine threonine kinases, RSTK) (Afzal et al., 2008), οι οποίοι είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες με απώτερο στόχο την αποτελεσματική αντοχή στη μόλυνση και την αναπτυξιακή ρύθμιση (Morillo & Tax, 2006).

Σε μια in silico μελέτη, προκειμένου να ανιχνευτούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ιοειδούς PSTVd με τον υποδοχέα κινάσης θρεονίνης-σερίνης, μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντίσταση στη μόλυνση στα φυτά, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μοριακής βιολογίας και διαπιστώθηκε ότι η μόλυνση με το ιοειδές PSTVd επηρεάζει αρνητικά τουλάχιστον 3 τέτοιους υποδοχείς. Επιπλέον, η μόλυνση βρέθηκε να επηρεάζει 3 άλλα γονίδια, γνωστά για την εμπλοκή τους στην συνολική ανάπτυξη των φυτών της τομάτας (Adkar-Purushothama & Perreault, 2018).

Δεδομένου ότι τα ιοειδή δεν κωδικοποιούν για καμία πρωτεΐνη, βασίζονται αποκλειστικά σε διαθέσιμους πόρους ή/και μηχανισμούς του ξενιστή για τη μολυσματικότητα τους. Ένας από τους μηχανισμούς που έχουν προταθεί ότι χρησιμοποιούν τα ιοειδή είναι η RNA σίγηση, ειδικά λόγω των συγκεκριμένων δομών δίκλωνης αλυσίδας RNA (double stranded RNA, dsRNA). Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, η RNA σίγηση είναι μια επιγενετική διαδικασία που ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση σε μεταγραφικό ή/και μετα-μεταγραφικό επίπεδο και είναι ένας από τους κύριους μηχανισμούς άμυνας του φυτού έναντι των ιών. Το PSTVd επάγει τον μηχανισμό της RNA σίγησης, ενώ παράλληλα αποφεύγει το κόψιμό του από αυτόν, πιθανώς λόγω της δευτερογενούς δομής του (Itaya et al., 2007), χωρίς ωστόσο να έχει εξακριβωθεί ο μηχανισμός αποφυγής της κοπής του.

Οι Navarro et al. (2012) πρότειναν ότι τα συμπτώματα της μόλυνσης θα μπορούσαν να παραχθούν με μικρά RNAs που προέρχονται από ιοειδή (viroid-derived small RNAs, vd-sRNAs) τα οποία προκύπτουν από τον αμυντικό μηχανισμό του ξενιστή που στοχεύει αλληλουχίες DNA ή συγκεκριμένα mRNA του ξενιστή, για μεταγραφική ή μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση, αντίστοιχα (Navarro et al., 2012).

Σε μια άλλη μελέτη, προτάθηκε ότι τα μικρά RNA που προέρχονται από το PSTVd θα μπορούσε να κατευθύνει τη σίγηση του RNA ενός στοχευμένου γονιδίου του ξενιστή, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη των συμπτωμάτων. Για τον έλεγχο της υπόθεσης, χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες του PSTVd ως τεχνητά microRNAs (artificial microRNAs, amiRNAs) σε φυτά *Nicotiana tabacum* και *Nicotiana benthamiana*, δείχνοντας ότι ένα amiRNA, το amiR46, το οποίο αντιστοιχεί σε αλληλουχίες εντός της περιοχής ρύθμισης της μολυσματικότητας (virulence modulating region, VMR) του PSTVd, επάγει μη φυσιολογικούς φαινοτύπους τόσο στα φυτά Nicotiana tabacum όσο και στα Nicotiana benthamiana, που μοιάζουν με αυτά που εμφανίζονται στα μολυσμένα από PSTVd φυτά. Λαμβάνοντας υπόψιν τόσο τους φαινοτύπους όσο και τις μοριακές αναλύσεις, προτείνεται η υπόθεση ότι η ανάπτυξη των συμπτωμάτων, μετά την μόλυνση από το ιοειδές PSTVd στα φυτά N. tabacum και N. benthamiana, προκύπτουν από κατευθυνόμενο sRNA της γονιδιακής σίγησης του γονιδίου του ξενιστή (sRNA-directed RNA silencing of the host gene) (A. L. Eamens et al., 2014).

Η παντελής έλλειψη πρωτεϊνών καταστολής της σίγησης σε συνδυασμό με τη μερικώς δίκλωνη φύση του γονιδιώματός τους, οδήγησε στην θεωρία ότι αποτελούν καλούς στόχους για την αντίσταση στην RNA σίγηση. Η θεωρία αυτή επιβεβαιώθηκε με την εύρεση των vd-sRNAs, τα οποία υπήρχαν άφθονα σε μολυσμένα φυτά.

# 1.6 Στόχος

Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, η καταστολή του SERRATE χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο, αρχικά για να δημιουργηθούν φυτά με δυσλειτουργικό miRNA μονοπάτι με απώτερο στόχο να μελετηθεί η συσχέτιση του μονοπατιού με την απόκριση φυτών N. benthamiana σε συνθήκες βιοτικής καταπόνησης από ιοειδή.

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στη μελέτη της έκφραση της πρωτεΐνης SERRATE, με απώτερο σκοπό την κατανόηση του μονοπατιού της βιοσύνθεσης των miRNAs κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης προερχόμενες από το ιοειδές PSTVd. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων, τα οποία εστιάζουν στην παροδική έκφραση του SERRATE σε φύλλα του φυτού N. benthamiana αγρίου τύπου καθώς και N. benthamiana 5.1.3.3 T3 (NbSE5.1i) (με καταστολή της έκφρασης του SERRATE), τόσο σε υγιή όσο και σε μολυσμένα φυτά.

Παράλληλα, λόγω της ύπαρξης των επιπλέον θέσεων ATGs στον υποκινητή του γονιδίου SERRATE στα φυτά N. tabacum και του εναλλακτικού ματίσματος, θεωρήθηκε απαραίτητη η διαλεύκανση του ρόλου τους στην έκφραση του, τόσο σε αγρίου τύπου συνθήκες όσο και κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης.

# 2. Υλικά και Μέθοδοι

## 2.1 Χειρισμός φυτικού υλικού

### 2.1.1 Συνθήκες ανάπτυξης φυτών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου (wt, wild type) Nicotiana benthamiana, καθώς και φυτά με δυλειτουργικό miRNA μονοπάτι της σίγησης Nicotiana benthamiana 5.1.3.3 T3 (NbSE5.1i) (Kryovrysanaki et al., 2019). Τα φυτά αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο του Πανεπιστημίου Κρήτης με συνθήκες ανάπτυξης 16/8 h φως/σκοτάδι, θερμοκρασία  $25 \pm 1$  °C και υγρασία 75% σε θάλαμο σταθερών συνθηκών.

#### 2.1.2 Συλλογή φυτικού ιστού

Από τη συλλογή στο θερμοκήπιο έως και τη μεταφορά του φυτικού ιστού, που χρησιμοποιήθηκε για λειοτρίβηση, στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών Ι, του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, έγινε συντήρηση των δειγμάτων σε φορητό μεταλλικό δοχείο που περιείχε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια, τα δείγματα αυτά αποθηκεύτηκαν στους -80 °C και επεξεργάστηκαν καταλλήλως, για τους σκοπούς των πειραμάτων.

## 2.2 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης

Τα βακτήρια Escherihia coli, στέλεχος DH10b αναπτύσσονται στους 37 °C, υπό συνεχή ανάδευση, 16 ώρες, σε υγρό θρεπτικό μέσο LB που περιέχει καναμυκίνη 50µg/ml. Τα αγροβακτήρια, στελέχους C58C1καθώς και τα αντίστοιχα στελέχους GV, αναπτύσσονται στους 28 °C, υπό συνεχή ανάδευση για 16 ώρες, σε υγρό θρεπτικό μέσο LB που περιέχει καναμυκίνη 50µg/ml και ριφαμπικίνη 100µg/ml. Το LB (Luria Bertani, NaCl, Tryptone, Yeast Extract και dH<sub>2</sub>O) είναι ένα, πλούσιο σε θρεπτικά, μέσο που χρησιμοποιείται συνήθως για την καλλιέργεια βακτηρίων στο εργαστήριο.

Είδος	Στέλεχος	Μέσο ανάπτυξης	Συνθήκες
			επώασης
Escherichia coli	DH10b	LB, kan <sub>50</sub>	37 °C
			(150-200rpm)
	C58C1		
Agrobacterium	GV	LB, kan <sub>50</sub> , rif <sub>100</sub>	28 °C
			(150-200rpm)

Πίνακας 1. Παρατίθενται τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν.

# 2.2.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων

## Μετασχηματισμός βακτηρίων Escherichia coli

Σε 100 μl δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*, στελέχους DH10b, τα οποία έχουν ξεπαγώσει πάνω στον πάγο, προστίθεται το πλασμιδιακό DNA, και το μίγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος για 1:15' στους 42 °C, και προσθήκη θρεπτικού μέσου LB μέχρι τελικό όγκο 1 ml και επώαση στους 37 °C για 1 ώρα, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 3000rpm για 3 λεπτά και απομακρύνονται τα 2/3 του υπερκειμένου. Διαλύεται η πελλέττα των κυττάρων με τη χρήση της πιπέτας και γίνεται επίστρωση του διαλύματος σε τριβλίο με θρεπτικό μέσο LB που περιέχει αντιβιοτικό επιλογής την καναμυκίνη (50µg/ml). Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες, με τη χρήση φλόγιστρου. Ακολουθεί επώαση του τριβλίου για 12-16 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C.

Οι αποικίες που σχηματίζονται στο τριβλίο μεταφέρονται για υγρή καλλιέργεια και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA τους για έλεγχο της ένθεσης που φέρουν. Ακολουθεί η αλληλούχηση του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA και η επιβεβαίωση της επιθυμητής ένθεσης. Σε περίπτωση που είναι επιθυμητή η παροδική έκφραση (με τη διαδικασία του αγροεμποτισμού) του κομματιού που περιέχει το πλασμίδιο, ακολουθεί ο μετασχηματισμός αγροβακτηρίων.

#### Μετασχηματισμός βακτηρίων Agrobacterium tumefaciens

Σε 100 μl δεκτικών βακτηρίων Agrobacterium tumefaciens στελέχους C58C1, τα οποία έχουν ξεπαγώσει στον πάγο, προστίθεται το πλασμιδιακό DNA, και εμβαπτίζονται αμέσως σε υγρό άζωτο. Το διάλυμα επωάζεται στους 37 °C για 15 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται θρεπτικό μέσο LB μέχρι τελικό όγκο 1ml. Ακολουθεί επώαση στους 28 °C, για 2 ώρες υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 3000rpm για 3 λεπτά και απομακρύνονται τα 2/3 του υπερκειμένου. Διαλύεται η πελλέττα των κυττάρων με τη χρήση της πιπέτας και γίνεται επίστρωση του διαλύματος σε τριβλίο με θρεπτικό μέσο LB που περιέχει αντιβιοτικά επιλογής την καναμυκίνη (50μg/ml) και τη ριφαμπικίνη (100μg/ml). Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται υπό στείρες σε θερμοκρασία 28 °C.

## 2.3 Πλασμίδια

Για τα πειράματα έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν τα κατασκευασμένα πλασμίδια pICH86966/GG-SE:GUS, το οποίο κατασκευάστηκε με goden gate και που παρείχε το εργαστήριο όπου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, pICH86966/GG-SE-241-242AT>CG:GUS, το οποίο κατασκευάστηκε με τη μέθοδο της καθοδηγούμενης σημειακής μεταλλαξιγένεσης (βλέπε παρακάτω) και pICH86988/GUS-cMyc (ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του κ. Σαρρή).

## 2.4 Νουκλεϊκά οξέα

#### 2.4.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα

Για τη διαδικασία της απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Sambrook 1987.

Πιο αναλυτικά, μεταφέρεται 1,5 ml καλλιέργειας βακτηρίων από γυάλινους σωλήνες σε Eppendorf και φυγοκεντρείται στις 3000rpm για 3 λεπτά. Ακολουθεί η αφαίρεση του υπερκειμένου και προστίθενται 100 μl παγωμένου διαλύματος ALSI για επαναδιάλυση της πελλέττας των κυττάρων. Προστίθενται 200 μl φρέσκου διαλύματος ALSII και γίνεται ελαφριά ανάμιξη ακολουθούμενη από επώαση στον πάγκο για 4 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 150 μl παγωμένου διαλύματος ALSIII, το οποίο αναμιγνύεται με το διάλυμα του σωληναρίου και επωάζεται στον πάγο για 5 λεπτά. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις μέγιστες στροφές για 5 λεπτά και γίνεται η μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf προσεκτικά, με τη χρήση της πιπέτας. Επιπλέον, γίνεται προσθήκη 1ml παγωμένης αιθανόλης 100% και μετά την ανάμιξη του διαλύματος ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις μέγιστες στροφές για 5 λεπτά. Ακολουθεί αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη 70% παγωμένης αιθανόλης, ανάμιξη του διαλύματος, φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις μέγιστες στροφές και αφαίρεση υπερκειμένου. Η πελλέττα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο dH<sub>2</sub>O.

Στην περίπτωση που η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA γίνεται από βακτήρια κατά gram θετικά, μαζί με την προσθήκη διαλύματος ALSI προστίθονται και 4 μl λυσοζύμης.

Η λυσοζύμη είναι μια υδρολάση γλυκοσιδίου η οποία καταλύει την υδρόλυση του 1,4β-δεσμού μεταξύ του N-ακετυλομουραμικού οξέος και του κατάλοιπου N-ακέτυλο-Dγλυκοσαμίνης στην πεπτιδογλυκάνη. Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί το κύριο συστατικό στο κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά gram βακτηρίων. Η υδρόλυση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την λύση του βακτηριακού τοιχώματος και συνεπώς τη λύση του βακτηρίου.

**Πίνακας 2**. Παρατίθενται τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

ALSI	50mM γλυκόζη, 25mM Tris-HCl, pH 8.0,10mM EDTA, pH 8.0
ALSII	0.2N NaOH, 1% SDS
ALSIII	3M CH3COOK, 5M CH3COOH

## 2.4.2 Απομόνωση RNA

Η μέθοδος απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν με τη χρήση Trizol (phenol 38%, guanidine thiocyanate 0,8 M, ammonium thiocyanate 0,4 M, sodium acetate 0.1 M pH=5.0, glycerol 5%) και αποτελεί προσαρμογή του πρωτοκόλλου των (Chomczynski and Sacchi, 2006). Φυτικός ιστός ομογενοποιείται παρουσία υγρού αζώτου. Σε σωληνάριο (eppendorf) που φέρει κατάλληλη ποσότητα ιστού προστίθεται Trizol σε αναλογία 1:10 (ιστός: Trizol). Πραγματοποιείται έντονη ανάμιξη με vortex και επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στις 8000rpm και συλλογή του υπερκειμένου σε νέο eppendorf. Προστίθενται 0,2 όγκοι γλωροφόρμιου και αφού τα δείγματα αναμειχθούν έντονα με vortex, επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Έπειτα από 10 λεπτά φυγοκέντρησης στις 12000rpm, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο και πραγματοποιείται η κατακρήμνιση του RNA με την προσθήκη 0,25 όγκων ισοπροπανόλης και 0,25 όγκων αλάτων (0.8M Sodium citrate, 1.2 NaCl), επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12000rpm. Ακολουθεί καθαρισμός του ιζήματος με την προσθήκη 0,5 όγκων παγωμένης αιθανόλης, 70% v/v, ελαφριά ανάμειξη και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12000rpm. Τέλος, αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, αφήνεται το ίζημα να στεγνώσει από την αιθανόλη (65 °C για 2-3 λεπτά), και επαναδιαλύεται σε αποστειρωμένο νερό (50μl για 100mg ιστού) και υπολογίζεται η συγκέντρωση του RNA έπειτα από μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο (ND-1000, nanodrop Thermo Fisher Scientific). Για την ποιοτική ανάλυσή του, ηλεκτροφορείται μικρή ποσότητα σε πηκτή αγαρόζης.

#### 2.4.3 Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη-χλωροφόρμιο

Ισος όγκος νουκλεϊκών οξέων αναμιγνύεται με ίσο όγκο μείγματος ουδέτερης φαινόλης/ χλωροφορμίου (1:1) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο φιαλίδιο eppendorf και αναμιγνύεται με ίσο όγκο μείγματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:1) και φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για 5min. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο φιαλίδιο και ακολουθεί κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με προσθήκη 1/10 του όγκου οξικού νατρίου 3 M pH=5.2 και 0.8 όγκους ισοπροπανόλης. Πραγματοποιείται επώαση 20 λεπτών στους -20 °C και φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 30 λεπτά. Ακολουθεί ξέπλυμα των αλάτων με αιθανόλη 70% v/v και φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 5 λεπτά. Αφαιρείται το υπερκείμενο, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται στην κατάλληλη ποσότητα dH<sub>2</sub>O.

#### 2.4.4 Ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων

Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων γίνεται με τη χρήση του NanoDrop™ 2000c της Thermo Scientific. Ο όγκος δείγματος που απαιτείται για τη μέτρηση είναι πολύ μικρός και συνήθως χρησιμοποιούνται 2μl δείγματος. Το σύστημα αυτό βασίζεται στην εξίσωση των BeerLambert. Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων μετράται στα 260nm, δηλαδή, το μήκος κύματος στο οποίο απορροφούν φως οι πρωτεΐνες. Επιπλέον, το NanoDrop™ 2000c καταγράφει 2 λόγους σε κάθε μέτρηση. Ο λόγος 260/280 πρέπει να είναι μεταξύ των τιμών 1.80-2.20 και δείχνει την καθαρότητα του δείγματος (ως προς την επιμόλυνση από πρωτεΐνες και φαινόλες) και ο λόγος 260/230 πρέπει να είναι κοντά στην τιμή 2.00, δείχνει την καθαρότητα του δείγματος (από λιπίδια, υδατάνθρακες κ.α).

#### 2.5 Αντιδράσεις με ένζυμα περιορισμού

Χρησιμοποιείται η κατάλληλη ποσότητα DNA (5-10 μg), η οποία πέπτεται με τη χρήση κατάλληλων ενζύμων περιορισμού και διαλυμάτων σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στα πρωτόκολλα των κατασκευαστών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα και διαλύματα των εταιριών Minotech και New England Biolabs (NEB).

2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) Οι συνθήκες που γρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα.

Step	Temperature	Duration	Cycles
	(°C)		
Initial	95	3 min	1
denaturation			
Denaturation	98	20	
		SERRATEC	18
Annealing	65	30	
_		SERRATEC	
Extension	72	8 min	
<b>Final extension</b>	72	12 min	1

Χρησιμοποιήθηκε το KIT της Kapa Hifi PCR για την ενίσχυση του επιθυμητού πλασμιδίου, που περιέχει τη μεταλλαγή στην πρώτη θέση ATG στον υποκινητή του γονιδίου SERRATE.

Η PCR βασίζεται στην φυσική διαδικασία αντιγραφής DNA των οργανισμών και για την πραγματοποίηση της απαιτούνται:

- Αλληλουχία DNA που να περιλαμβάνει την αλληλουχία στόχο
- ✓ Νουκλεοτίδια (dNTPs)
- Ειδικοί ολιγοκουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers)
- ✓ ΚΑΡΑ ΗΙΓΙ DNΑ πολυμεράση
- ✓ Buffer

Κάθε ζεύγος εκκινητών χαρακτηρίζεται από ένα εύρος θερμοκρασιών στο οποίο μπορεί να προσδεθεί στη συμπληρωματική του ακολουθία η οποία υπάρχει στο DNA. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με βάση τις οδηγίες που περιέχονται στο εγχειρίδιο του KIT της KAPA Hifi PCR.

Μέρος της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v, το οποίο περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr, Ethidium bromide) με τελική συγκέντρωση 0,5 μg mL<sup>-1</sup>, ενώ παράλληλα ηλεκτροφορήθηκε μάρτυρας μοριακού μεγέθους λ-PstI.

Αφού επιβεβαιώθηκε το σωστό αποτέλεσμα της αντίδρασης, έγινε καθαρισμός του προϊόντος της PCR με το NucleoSpin Gel and PCR Clean-up MACHEREY-NAGEL KIT ακολουθώντας τις οδηγίες του εγχειριδίου. Μετά τον καθαρισμό, ακολούθησε πέψη του δείγματος με το ένζυμο περιορισμού DpnI το οποίο καταστρέφει την αρχική μεθυλιωμένη μήτρα που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση της PCR. Μετά την πέψη, ακολούθησε και πάλι καθαρισμός του δείγματος με το ίδιο clean up KIT. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης με το ένζυμο Τ4 DNA ligaSERRATE. Η αντίδραση αυτή επιτυγχάνει την ένωση δύο θραυσμάτων νουκλεϊκών οξέων για τη δημιουργία μορίων ανασυνδυασμένου DNA, μέσω της δράσης ενός ενζύμου.

2.7 Καθοδηγούμενη σημειακή μεταλλαξιγένεση (Site directed mutagenesis)

Οι σημειακές μεταλλαγές στον υποκινητή του γονιδίου SERRATE πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της PCR με τη χρήση ειδικών ζευγών εκκινητών οι οποίοι παρατίθονται στον Πίνακα 1. Ακολούθησε μια σειρά διαδικασιών που περιλαμβάνει:

- Ηλεκτροφόρηση μέρους της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης
- Καθαρισμό του προϊόντος της αντίδρασης με NucleoSpin Gel and PCR Clean-up MACHEREY-NAGEL, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή
- Πέψη με το ένζυμο περιορισμού DpnI
- Καθαρισμό με το ίδιο ΚΙΤ
- Ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης
- Αντίδραση ενοποίησης με το ένζυμο Τ4 DNA λιγάση
- Μετασχηματισμό βακτηρίων Ε. coli, στέλεχος DH10b
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια Ε. coli, στέλεχος DH10b
- Μετασχηματισμό βακτηρίων A. tumefaciens, στέλεχος C58C1
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια A. tumefaciens, στέλεχος C58C1
   και μετασχηματισμό βακτηρίων E. coli,( στ. DH10b) & απομόνωση πλασμιδιακού

DNA από αυτά για την επιβεβαίωση της παρουσίας της μεταλλαγής στα αγροβατήρια.

- Αντίδραση με RNase A (10mg/ml) και καθαρισμό με φαινόλη-χλωροφόρμιο
- Αλληλούχηση του απομονωμένου DNA και επιβεβαίωση της μεταλλαγής

## 2.8 Ηλεκτροφόρηση

#### 2.8.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η αγαρόζη, η οποία είναι ένας πολυσακχαρίτης-παράγωγο του άγαρ, διαλύεται σε κατάλληλο όγκο 1Χ TAE (0,11M Tris, 90mM, 2.5mM EDTA, pH 8.0) σε φούρνο μικροκυμάτων. Ανάλογα με τα κομμάτια DNA που αναμένεται να φανούν στο πήκτωμα αγαρόζης, η συγκέντωσή της κυμαίνεται από 0,7-1,6% w/v. Στη συνέχεια, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (0,01% w/v), ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο, το οποίο συνδέεται μη ειδικά μεταξύ των βάσεων του DNA με συχνότητα 1 μόριου βρωμιούχο αιθιδίου ανα 4-5 νουκλεοτίδια (Waring, 1965), το οποίο και ευθύνεται για την οπτικοποίηση των ζωνώσεων του DNA ή RNA πάνω στο πήκτωμα, καθώς όταν εκτεθεί σε υπεριώδες φως, φθορίζει δίνοντας ένα χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα, Το πήκτωμα αφήνεται να στεραιοποιηθεί και πριν φορτωθούν τα δείγματα στα πηγαδάκια του, προστίθεται η επιθυμητή ποσότητα χρωστικής (Orange G 6X (12gr sucrose, 6% orange G), και ξεκινά η ηλεκτροφόρηση σε διάλυμα 1Χ TAE, παρουσία συνεχούς τάσης 80-100V, ανάλογα την εκάστοτε περίπτωση διαχωρισμού τμημάτων DNA.

Η γλυκερόλη, η οποία προστίθεται στα δείγματα, «βαραίνει» το DNA ώστε να κάτσει ομοιόμορφα μέσα στα πηγαδάκια. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης παρέχει τα ιόντα που απαιτούνται για την δημιουργία αγωγιμότητας, και για αυτό το λόγο, κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης η πηκτή είναι βυθισμένη μέσα σε αυτό.

Η εκτίμηση των μεγεθών των ζωνών που προκύπτουν μετά την ηλεκτροφόρηση γίνεται με τη χρήση δεικτών μεγέθους που διαφέρουν ανα περίπτωση, οι οποίοι ηλεκτροφορούνται δίπλα στα δείγματα. Οι δείκτες αυτοί έχουν καθορισμένες ζωνώσεις γνωστού μοριακού βάρους. Οι συνήθεις μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι ο λ DNA/PstI και

Long Range DNA οι ζωνώσεις των οποίων παρατίθενται στην Εικόνα 6.1 του Παραρτήματος. Αφού πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

#### 2.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες

Για κάθε δείγμα, γίνεται προσθήκη αποδιατακτικού διαλύματος χρωστικής, τελικής συγκέντρωσης 1X (RNA loading buffer: 50% γλυκερόλη, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA και 0,4% μπλε βρωμοφαινόλη), σε ποσότητα κατάλληλη για την ποσότητα του ολικού RNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μl. Αφού γίνει η προετοιμασία των δειγμάτων, επωάζονται για 5 λεπτά στους 100 °C, τοποθετούνται στον πάγο για 2-3 λεπτά και στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης. Η πηκτή αγαρόζης έχει συγκέντρωση 1% και περιέχει 1X MOPS (MOPS 0.2 M, pH 7.0, 20 mM Sodium Acetate, 10 mM EDTA, pH 8.0), 1,8% φορμαλδεΰδη και 7 μg βρωμιούχο αιθίδιο (ανά

100 ml πηκτώματος). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100V, μέσα σε αποδιατακτικό διάλυμα 1X MOPS και 1,8% φορμαλδεΰδη. Αφού πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

#### 2.9 Ανάλυση τύπου Northern (Northern blotting)

Μετά την ηλεκτροφόρηση κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, το πήκτωμα αγαρόζης ξεπλένεται με αποστειρωμένο νερό για 10 λεπτά, δύο φορές, και με διάλυμα 10X SSC υπό συνεχή ανάδευση, για 15 λεπτά.

Ακολουθεί η τοποθέτηση του πηκτώματος αγαρόζης σε συσκευή η οποία δημιουργεί γέφυρα (capillary transfer) από χαρτί Whatman, κατάλληλη για τη μεταφορά των μορίων RNA, λόγω του τριχοειδούς φαινομένου, σε μεμβράνη (νάιλον) (Nytran-N, 0.2-0.45μΜ) όπου και προσκολλάται. Μέσα στη συσκευή υπάρχει κατάλληλη ποσότητα διαλύματος 10X SSC. Η πηκτή τοποθετείται ανάποδα (up side down) στη γέφυρα μεταφοράς και από πάνω της διαδοχικά μια μεμβράνη υβριδοποίησης και 3 απορροφητικά χαρτιά Whatman, με προσογή ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων/κενών, τα οποία προηγουμένως έχουν διαβραχεί με 2X SSC. Τέλος, προστίθεται στρώμα από γαρτί κουζίνας και κάποιο επιπρόσθετο βάρος (500gr) για τη δημιουργία ευνοϊκών συνθηκών για τριχοειδή μεταφορά του RNA από την πηκτή στη μεμβράνη. Η διαδικασία μεταφοράς πραγματοποιείται για 16-20 ώρες. Μετά τη μεταφορά των μορίων RNA, η μεμβράνη απομακρύνεται από την πηκτή και τοποθετείται σε απορροφητικό χαρτί μέχρι να στεγνώσει. Για την μονιμοποίηση του μεταφερόμενου RNA πάνω στην μεμβράνη (RNA cross-linking), τοποθετείται σε συσκευή με UV ακτινοβολία (Stratalinker, Stratagene, USA) συνολικής ενέργειας 1200 μJ cm<sup>-2</sup>. Τέλος η μεμβράνη βάφεται με τη χρωστική κυανούν ή μπλε του μεθυλενίου (0.3M CH<sub>3</sub>COONa Ph 5.0, 0.03% methylene blue, Vt 100ml), προκειμένου να εκτιμηθεί η απόδοση της μεταφοράς. Η μεμβράνη διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να χρησιμοποιηθεί για τη σήμανση με επισημασμένο ανιχνευτή.

## 2.10 Υβριδισμός

Αρχικά, η μεμβράνη διαβρέχεται με 2X SSC και τοποθετείται σε κύλινδρο υβριδισμού, προστίθεται διάλυμα προ-υβριδισμού, 5-10ml ανάλογα με το μέγεθος του κυλίνδρου, και επωάζεται για τουλάχιστον 1hr στην κατάλληλη θερμοκρασία, στη συγκεκριμένη περίπτωση 65°C (η θερμοκρασία διαφέρει ανάλογα με τον ανιχνευτή), υπό συνεχή και ήπια ανάδευση. Ακολούθως, προστίθεται ο ανιχνευτής και επωάζεται για τουλάχιστον 16hrs στην ίδια θερμοκρασία, και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο υβριδισμός. Μετά, τις 16hrs ακολουθούν πλυσίματα, αρχικά με την προσθήκη ίσου όγκου Διαλύματος 2X SSC για 5 λεπτά, στη συνέχεια, με προσθήκη, δυο φορές, Διαλύματος Ι για 30 λεπτά, και Διαλύματος ΙΙ για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, η μεμβράνη διαβρέχεται με διάλυμα 2X SSC και ακολουθεί η εξισορρόπησή της με Διάλυμα Πλύσης, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί η προσθήκη Διαλύματος αποκλεισμού 3%, για 30 λεπτά και η προσθήκη αντισώματος σε Διάλυμα αποκλεισμού 1%. Οι πλύσεις συνεχίζονται με Διάλυμα Πλύσης, 2 φορές, για 15 λεπτά, και αφού ακολουθήσει η εξισορρόπηση με προσθήκη Διαλύματος Ανίχνευσης, για 10 λεπτά, η μεμβράνη μεταφέρεται πάνω σε διαφάνεια και προστίθεται CDP-star το οποίο απλώνεται ομοιόμορφα πάνω στη μεμβράνη και είναι αυτό που θα εμφανίσει τις ζωνώσεις. Μετά από λίγα λεπτά, πραγματοποιείται η εμφάνιση στο Sapphire Biomolecular Imager (Azure biosystems).

Πίνακας 3. Παρατίθενται τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προ- και υβριδισμό.

Διάλυμα προ-υβριδισμού	5X SSC, 1% SDS, 1X Denhardt's, 0,25 mg/ml t-RNA και 50%
	φορμαμίδη
Διάλυμα Ι	2XSSC, 0.2% SDS
Διάλυμα ΙΙ	0,2X SSC, 0,2% SDS
Διάλυμα Πλύσης	Μαλεϊκό οξύ 1Χ, 0,3% v/v Tween20
Διάλυμα Αποκλεισμού 3Χ	3% γάλα σε 1Χ Μαλεικό οξύ
Διάλυμα Αποκλεισμού 1Χ	1% γάλα σε 1Χ Μαλεικό οξύ
Διάλυμα Ανίχνευσης	0,1M Tris/Cl, pH 9.5, 0,1M NaCl

## 2.11 Ποσοτικοποίηση GUS από φύλλα φυτού Ν. benthamiana

Ένα σύστημα επιλογής που χρησιμοποιείται ευρέως στα φυτά περιλαμβάνει ένα γονίδιο, το uidA, του βακτηρίου *Escherichia coli*, το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο β-γλυκουρονιδάση (GUS). Ένα από τα πλεονεκτήματα της χρήσης του GUS είναι ότι είναι ικανό να ανέχεται συντήξεις μεγάλων αμινο-τερματικών αλληλουχιών χωρίς απώλεια της ενζυματικής δραστηριότητας. Το GUS είναι ικανό να υδρολύει καταλυτικά τις β-O-glycosidic συνδέσεις μιας μεγάλης κατηγορίας γλυκουρονιδίων και αυτή η ευελιξία υποστρώματος έχει χρησιμοποιηθεί είτε για ποιοτικές είτε ποσοτικές αξιολογήσεις μοτίβων γονιδιακής έκφρασης (Jefferson, 1989).

Η ποσοτικοποίηση της δραστικότητας του GUS πραγματοποιείται με τη χρήση του φθορογόνου υποστρώματος 4-MUG (4-μεθυλομβελυλομερυλο-β-D-γλυκουρονίδιο), το οποίο υδρολύει το GUS και δίνει το προϊόν 4-MU (4-MU, 7-hydroxy-4-methyl coumarin) μετά από μια συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία (Jefferson, 1989).

Για την ποσοτικοποίηση του GUS, γίνεται συλλογή τριών φυλλικών δίσκων, σε eppendorf tubes (τα οποία περιέχουν μεταλλική μπίλια), από την κάθε περιοχή του φύλλου που αγροεμποτίστηκε και λειοτρίβιση αυτών με χρήση του μηχανήματος tissue lyzer, παρουσία υγρού αζώτου. Στη συνέχεια, προστίθεται 1ml διαλύματος εκχύλισης πρωτεΐνης (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1mM, SDS 0,01%, TWEEN20 0,05%, DTT 1mM). Τα Eppendorf tubes τοποθετούνται στον περιστροφικό αναδευτήρα, στο 1/3 της ταχύτητας των περιστροφών, στους 4°C για 45 λεπτά. Ακολουθεί η φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις μέγιστες στροφές για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου και η τοποθέτησή τους στον πάγο. Προστίθενται ανά τριπλέτα, 12μl αραιωμένου δείγματος 1:5, σε δύο 96well-plates. Παράλληλα, τοποθετούνται τα standards (4-MU) τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης (Παράρτημα, Εικόνα 6.2). Το ένα 96 well-plate αντιστοιχεί στις μετρήσεις στο χρόνο μηδέν και το άλλο στις μετρήσεις μετά το πέρας των 30 λεπτών. Αμέσως μετά, προστίθενται 125  $\mu$ l stop buffer (0,2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) στο 96well-plate του χρόνου μηδέν. Στη συνέχεια, προστίθενται 12 μl 2mM MUG σε όλα τα πηγαδάκια και από τα δύο 96well plates, ξεκινώντας πρώτα από αυτό των 30 λεπτών και μετά του χρόνου μηδέν. Τα 96-well plates καλύπτονται και επωάζονται στους 37 °C για 30 λεπτά. Μετά την επώαση, προστίθενται 125 μl 2mM MUG στο 96 well-plate του χρόνου 30 λεπτών. Τέλος, αφού τα 96well-plates επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά, γίνεται η μέτρηση φθορισμού (emission 460nm, exatation 355nm) στο φασματοφωτόμετρο Spectra Max M2 plate reader. Σε ένα τρίτο 96-well plate προστίθενται 10μl από κάθε δείγμα, αραιωμένο 1:3, ανα τριπλέτα, και 200μl διαλύματος Bradford, όπου επίσης τοποθετούνται τα standards (αραιώσεις BSA) για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης (Παράρτημα, Εικόνα 6.3). Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο, στα 595nm.

# 2.12 Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS σε φύλλα του φυτού *N. benthamiana*

Ο ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS ή αλλιώς η οπτικοποίησή του, μπορεί να γίνει σε επίπεδο κυττάρων, ιστού ή οργάνου, μέσω μιας πειραματικής σειράς όπου χρησιμοποιώντας ειδικά αντιδραστήρια, υπό συνθήκες κενού, στα σημεία έκφρασης του γονιδίου που είναι συντηγμένο με το uidA παίρνουν μπλέ χρώμα (Jefferson, 1989).

Ο ιστός συλλέγεται σε 50ml-falcon tubes και προστίθενται 10ml ιστοχημικού διαλύματος [1mM X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide), 1mM potassium ferrocyanide, 1mM potassium ferricyanide, 1mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 50mM phosphate buffer pH 7)]. Γίνεται διήθηση υπό κενό και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 12-14 ώρες στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, το ιστοχημικό διάλυμα αντικαθίσταται από το ιστοχημικό διάλυμα σταθεροποίησης (4%formaldehyde, 50mM phosphate buffer pH 7), και ο ιστός επωάζεται στους 4 °C για 12 ώρες. Τέλος, το ιστοχημικό διάλυμα σταθεροποίησης αντικαθίσταται με 70% αιθανόλη μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό των φύλλων.

## 2.13 Ποσοτικοποίηση GFP

Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescence Protein, GFP), η οποία συναντάται σε ένα είδος μέδουσας, αποτελεί ένα σύστημα επιλογής που χρησιμοποιείται ως οπτικός δείκτης στα φυτά. Η πρωτεΐνη αυτή απορροφά μπλε και εκπέμπει πράσινο φως. Επιπλέον, η GFP χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης της ενεργότητας ενός υποκινητή στα κύτταρα. Μπορεί, επίσης, να προσκολληθεί στα άκρα άλλων πρωτεϊνών διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο τον εντοπισμό και τον προσδιορισμό της θέσης τους μέσα στο κύτταρο (Chalfie et al., 1994).

Οι μετρήσεις GFP έγιναν όπως περιγράφουν οι Vogler et al., με μερικές τροποποιήσεις (Vogler et al., 2008). Οι φυλλικοί δίσκοι λειοτριβούνται με τη βοήθεια μιας μεταλλικής μπίλιας και τη χρήση του TissueLyzer II (Qiagen). Στη συνέχεια, προστίθεται ένα ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (62.5mM Tris -HCl pH 6.8, 1% SDS, 20% glycerol) και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις μέγιστες στροφές, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C. Ακολουθεί η μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρά Eppendorf tubes και προστέθηκε ίσος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης χωρίς SDS. Σε 96-well plate προστίθενται 50 μl δείγματος σε κάθε πηγαδάκι (3 τεχνικές επαναλήψεις) και γίνεται η μέτρηση φθορισμού με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου (excitation 485nm, emission 520nm). Επιπλέον, στο ίδιο μηχάνημα, γίνεται μέτρηση των επιπέδων των

πρωτεϊνών (A280nm), και οι μετρήσεις αυτές χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών μετρώνται με τη χρήση του Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) και οι μετρήσεις αυτές χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση (Katsarou et al., 2019).

## 2.14 Ανίχνευση GFP

Για την ανίχνευση της έκφρασης της GFP μετά τον αγροεμποτισμό, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Blak-Ray® B-100AP/R με 100 W UV λαμπτήρα (UVP), ενώ για τις φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκε φωτογραφική μηχανή Canon EOS 350D.

# 2.15 Αγρο-εμποτισμός

Ο παροδικός μετασχηματισμός επιτυγχάνεται με τη μέθοδο του αγρο-εμποτισμού (Agroinfiltration). Η μέθοδος αυτή, βασίζεται στην διείσδυση μετασχηματισμένων βακτηρίων Agrobacterium tumefaciens, τα οποία φέρουν έναν κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Η διείσδυση επιτυγχάνεται είτε με τη χρήση σύριγγας (1ml) στο υπέργειο τμήμα του φυτού, συνήθως τα φύλλα, και με αργές και σταθερές κινήσεις, τα αγροβακτήρια εισέρχονται μέσα στο φυτικό κύτταρο, ή με τη χρήση κενού η οποία χρησιμοποιείται συνήθως για τον εμποτισμό φυτικού ιστού μεγαλύτερης μάζας και πραγματοποιείται με τη χρήση θαλάμου αρνητικής ατμοσφαιρικής πίεσης (Chen et al., 2014).

Η μόλυνση των φυτών καθώς και οι ενθέσεις των πρωτεϊνών έγιναν με τη μέθοδο του αγροεμποτισμού. Τα αγροβακτήρια επωάζονται για 16 ώρες σε υγρό θρεπτικό μέσο LB που περιέχει αντιβιοτικά καναμυκίνη 50µg/ml και ριφαμπικίνη 100 µg/ml, στους 28°C υπό ανάδευση, και αφού έχει εμφανιστεί το βακτηριακό νέφος φυγοκεντρούνται στις 2800rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια, γίνεται η απομάκρυνση του υπερκειμένου και η επαναδιάλυση της πελλέττας των βακτηρίων σε MMA (1X MS υγρό θρεπτικό μέσο, 10mM 2-μορφολινο-αιθανικό σουλφονικό οξύ, 200μM ακετοσυριγκόνη) ίσου όγκου με αυτόν της επώασης, και επανατοποθέτηση των βακτηρίων στους 28°C υπο ανάδευση για 1 ώρα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση ίδιων συνθηκών και πλύση με 10mM MgCl2 στον μισό όγκο από αυτόν της επώασης. Το πλύσιμο επαναλαμβάνεται και μετά την φυγοκέντρηση επαναδιαλύεται η πελλέττα των βακτηρίων σε 10mM MgCl<sub>2</sub>, με τελική οπτική πυκνότητα στα 600 nm, ίση με 0,5. Τέλος, δημιουργώντας, με τη χρήση μιας βελόνας, μια οπή στην κάτω πλευρά του φύλλου και με τη χρήση σύριγγας ινσουλίνης (5ml) γίνεται ο αγρο-εμποτισμός. Για την επιτυχία αυτής της διαδικασίας, τα φυτά θα πρέπει να είναι απότιστα την ίδια μέρα και το πότισμά τους να πραγματοποιείται μετά τον αγρο-εμποτισμό.

Η μόλυνση των φυτών καθώς και οι ενθέσεις των πρωτεϊνών έγιναν με τη μέθοδο του αγροεμποτισμού όπως περιγράφεται από τους Koscianska et al. (2005). Για τις μολύνσεις με το ιοειδές PSTVd, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος GV3101 του Agrobacterium tumefaciens που φέρει διμερές του PSTVd (PSTVdNB AJ634596) (ευγενική προσφορά από τους δρ. De Alba και Flores, Ινστιτούτο Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας Φυτών – IMBCP) (Kalantidis et al., 2007).

Η χρήση της GFP γίνεται ως μάρτυρας της επιτυχίας του αγροεμποτισμού. Φυτά στα οποία η έκφραση της GFP δεν ήταν αρκετή ώστε να χαρακτηριστεί επιτυχημένη η τεχνική του αγροεμποτισμού, δεν χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.

Τα μετασχηματισμένα αγροβακτήρια με το πλασμίδιο που φέρει τον υποκινητή CaMV 35S συντηγμένο με το GUS, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας της έκφρασης του GUS.

# 3. Αποτελέσματα

# 3.1 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης

Θέλοντας να αποκτήσουμε μία πληρέστερη εικόνα γύρω από την πιθανή αλληλεπίδραση του SERRATE με βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης, προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου ανέλυσαν τόσο τα επίπεδα της μόλυνσης σε αγρίου τύπου όσο και σε φυτά καταστολής του SERRATE (NbSEi), συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου SERRATE. Ήδη από τα παραπάνω πειράματα μολυσματικότητας είχαμε οδηγηθεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της μόλυνσης και των επιπέδων του SERRATE, καθώς παρατηρήθηκε ότι σε φυτά με πολύ χαμηλή έκφραση του SERRATE, τα επίπεδα του PSTVd ήταν πολύ χαμηλά ενώ υπήρχαν και φυτά που δε μολύνθηκαν καθόλου. Παράλληλα, σύγκριση υγιών και μολυσμείωνεται αύξηση των επιπέδων της SERRATE μετά από τη μόλυνση. Η αύξηση αυτή, σημειώθηκε και σε επίπεδο μεταγράφων στα NbSEi, αλλά όχι στα αγρίου τύπου φυτά. Φαίνεται συνεπώς ότι για να επιτευχθεί ικανοποιητική εγκατάσταση του ιοειδούς, πρέπει να έχει εξασφαλιστεί ικανοποιητικό ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης SERRATE.

Στην προσπάθεια να κατανοηθεί περαιτέρω η σχέση μεταξύ του SERRATE και του ιοειδούς, είχαν προηγηθεί προκαταρκτικά πειράματα για να μελετηθούν τα επίπεδα του SERRATE πριν και μετά τη μόλυνση σε επίπεδο μεταγράφων αλλά και σε επίπεδο πρωτεϊνών. Ως προς την κατεύθυνση αυτή, σχεδιάστηκε η παρούσα μελέτη ώστε να διαλευκανθεί η σχέση μεταξύ του ιοειδούς PSTVd και του γονιδίου SERRATE.

Για να απαντηθούν τα ερωτήματα εάν υπάρχει διαφορά στην έκφραση του SERRATE μεταξύ των υγιών φυτών N. benthamiana αγρίου τύπου και των αντίστοιχων μολυσμένων φυτών, καθώς και εάν υπάρχει διαφορά στην έκφραση του SERRATE μεταξύ των υγιών φυτών κατεσταλμένων ως προς την έκφραση του SERRATE N. benthamiana φυτών και των αντίστοιχων μολυσμένων, ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων η οποία παρατίθεται παρακάτω. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν 20 φυτά Ν. benthamiana αγρίου τύπου και 20 φυτά SEi, τα μισά από τα οποία, στο στάδιο των 4 φύλλων, αγρο-εμποτίστηκαν με το ιοειδές PSTVd ενώ τα υπόλοιπα με το διάλυμα αγρο-εμποτισμού, χωρίς αυτό να περιέγει βακτήρια, ώστε να δημιουργηθεί η ίδια κατάσταση καταπόνησης τόσο στα μολυσμένα όσο και στα υγιή φυτά και των δυο γονοτύπων. Αργότερα, όταν τα φυτά βρίσκονταν στο στάδιο των 6-8 φύλλων, αγροεμποτίστηκαν με το πλασμίδιο pICH86966/GG-SE:GFP, το οποίο φέρει τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE συντηγμένο με την GFP. Παράλληλα, τα φυτά αγροεμποτίστηκαν με το πλασμίδιο pBin:GFP το οποίο αποτέλεσε τον θετικό μάρτυρα, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα αγρο-εμποτισμού χωρίς να φέρει κανένα βακτήριο. Όσον αφορά τον αγρο-εμποτισμό με τις πλασμιδιακές κατασκευές, πραγματοποιήθηκε 2 εβδομάδες μετά τη μόλυνση, διότι αυτό το διάστημα θεωρείται αρκετό ώστε να μεταφερθεί διασυστημικά το ιοειδές σε όλο το φυτό. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές.

3.1.1 Παρατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE μέσω της GFP Τα μετασχηματισμένα αγροβακτήρια που φέρουν τον υποκινητή (αγρίου τύπου) του SERRATE ενσωματώθηκαν στα φυτά στο στάδιο των 6-8 φύλλων με τη μέθοδο του αγρο-εμποτισμού, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.1**. Τρεις ημέρες μετά τον αγροεμποτισμό, συλλέχθηκαν τομές από τις αγρο-εμποτισμένες περιοχές των φύλλων. Κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία, παρατηρήθηκαν φθορίζοντες πυρήνες, λόγω του πυρηνικού εντοπισμού του SERRATE (**Εικόνα 3.2**). Λόγω του έντονου διάχυτου φθορισμού, η οπτικοποίηση της έκφρασης του SERRATE καθώς και η συλλογή αντιπροσωπευτικών εικόνων δεν ήταν εφικτή.



**Εικόνα 3.1.** Απεικόνιση των σημείων εμποτισμού της κάθε κατασκευής, στην κάτω πλευρά των φύλλων του φυτού. Όπου PC= pBin:GFP-ο θετικός μάρτυρας (GFP), NC= μόνο το διάλυμα του αγρο-εμποτισμού χωρίς βακτήρια, και pICH86966 GG-SE:GFP= η κατασκευή που φέρει τον αγρίου τύπου υποκινητή του γονιδίου SERRATE.



**Εικόνα 3.2.** Απεικόνιση της έκφρασης της GFP η οποία είναι συντηγμένη με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE στο μικροσκόπιο φθορισμού (A,B) σε σχέση με την έκφραση της GFP αγρίου τύπου(Γ). Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τους πυρήνες. Ο ιστός είναι από φυτό N. benthamiana.

Παράλληλα, έγινε μια προσπάθεια ποσοτικοποίησης της GFP, με εκχύλιση της GFP (όπως αναφέρεται στα Υλικά και Μέθοδοι), με απώτερο σκοπό τον προσδιορισμό της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE, αλλά οι μετρήσεις απορρόφησης και φθορισμού στο φασματοφωτόμετρο δεν οδήγησαν σε στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα.

# 3.1.2 Παρατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE μέσω του GUS

Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα οπτικοποίησης και ποσοτικοποίησης του γονιδίου SERRATE χρειάστηκε να πραγματοποιηθεί μια σειρά νέων πειραμάτων με τη χρήση

του γονιδίου uidA, το οποίο παράγει GUS (β-glucuronidase), συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE.

Χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος αριθμός φυτών που περιγράφηκε στα πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκε η GFP ως γονίδιο αναφοράς, και οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε προηγουμένως. Δυο εβδομάδες μετά τη μόλυνση, διάστημα κατά το οποίο είναι αρκετό για τη μεταφορά του ιοειδούς, διασυστημικά, σε όλο το φυτό, τα φυτά αγρο-εμποτίστηκαν με το πλασμίδιο pICH86966/GG-SE:GUS. Αυτό το πλασμίδιο περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου *SERRATE* συντηγμένο με το GUS. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο που φέρει το GUS καθοδηγούμενο από τον ισχυρό υποκινητή CaMV35S, GUS:myc ενώ ως αρνητικός μάρτυρας το διάλυμα του αγρο-εμποτισμού.

Η μόλυνση των φυτών επιβεβαιώθηκε μέσω της διαδικασίας του υβριδισμού με τον μη-ραδιενεργό ανιχνευτή, DIG (όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι) και πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση των μεμβρανών δείχνοντας την παρουσία ή όχι του ιοειδούς PSTVd.

Αυτή η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές.

## 3.1.2.1 Ποσοτικοποίηση του GUS

Για να διαπιστωθεί η καλύτερη δυνατή έκφραση του GUS πραγματοποιήθηκαν δοκιμές συλλογής ιστού για ιστοχημικό εντοπισμό της δραστικότητας του GUS 3 ημέρες μετά και 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Η οπτικοποίηση της έκφρασης του GUS έδειξε ότι η καλύτερη δυνατή έκφραση είναι 6 ημέρες μετά τον αγο-εμποτισμό, όπως **3.3** και στην Εικόνα 3.4.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση του GUS με κατάλληλο χειρισμό του ιστού που συλλέχθηκε 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό των πλασμιδίων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Συλλέχθηκε ένας φυλλικός δίσκος από κάθε φύλλο το οποίο είχε αγρο-εμποτιστεί με την κάθε κατασκευή, δηλαδή 2-3 φυλλικοί δίσκοι από κάθε φυτό. Κάθε κατασκευή αποτελούσε διαφορετικό δείγμα του ίδιου φυτού και η συλλογή έγινε για κάθε γονότυπο ξεχωριστά και για τις δυο συνθήκες παρουσία ή όχι βιοτικής καταπόνησης. Συγκεκριμένα, έγινε εκχύλιση της πρωτεΐνης η οποία στη συνέχεια μετρήθηκε με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου σε δύο χρονικές στιγμές, 0 και 30 λεπτά μετά την προσθήκη του MUG (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι).

Σε αυτή τη φάση μεσολάβησαν κάποια πειράματα ελέγχου όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές αραιώσεις των δειγμάτων ώστε να διαπιστωθεί η κατάλληλη αραίωση και να εδραιωθεί το τελικό πρωτόκολλο, καθώς το φασματοφωτόμετρο θα πρέπει να δίνει τιμές που αντιστοιχούν στο εύρος των πρότυπων καμπυλών. Αφού το πρωτόκολλο διαμορφώθηκε στην τελική του μορφή ως προς την ποσότητα του ιστού που συλλέγεται και την αραίωση, ακολούθησε η ανάλυση των δειγμάτων από το σύνολο των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν.

Ακολούθησε η πειραματική διαδικασία όπως προαναφέρθηκε μέχρι το στάδιο του αγρο-εμποτισμού με τα πλασμίδια που φέρουν τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE και στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η συλλογή ιστού από τα μισά φυτά 3 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό και από τα υπόλοιπα φυτά 6 ημέρες μετά. Με κατάλληλους χειρισμούς του ιστού για τον ιστοχημικό εντοπισμό της δραστικότητας του GUS (βλέπε

Ενότητα 2.12) παρατηρήθηκε ότι ο θετικός μάρτυρας έχει εντονότερο μπλε χρώμα λόγω της υψηλότερης έκφρασης του GUS. Επιπλέον, η μεταγραφή του SERRATE αγρίου τύπου όσο και η μεταγραφή του SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή, έχει λιγότερη ένταση στις 3 ημέρες σε σχέση με τις 6 ημέρες (Εικόνα 3.3 και Εικόνα 3.4). Επιπλέον, το έντονο μπλε χρώμα του θετικού μάρτυρα φανερώνει και τον ισχυρό υποκινητή που διαθέτει το συγκεκριμένο πλασμίδιο. Στην Εικόνα 3.4, οι μπλε κουκκίδες στον αρνητικό μάρτυρα μπορεί να είναι τυχαίες πιθανόν λόγω τεχνικών θεμάτων που μπορεί να αφορούν την ποιότητα του φύλλου σε συνδυασμό με τη συγκέντρωση των διαλυμάτων, καθώς φαίνεται ότι διαφέρουν από τις μπλε κουκκίδες οι οποίες φανερώνουν τη δραστηριότητα του GUS. Στην Εικόνα 3.3 παρατηρείται επιπλέον ο αγρο-εμποτισμός με ένα άλλο πλασμίδιο, το GG-SE-241-242AT>GC:GUS, το οποίο θα αναλυθεί περαιτέρω στην πορεία των αποτελεσμάτων, αλλά παρατίθεται σε αυτό το σημείο καθώς λόγω έλλειψης χρόνου, οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν παράλληλα στα φυτά.



**Εικόνα 3.3.** Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS 3 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό. Οι σημάνσεις δείχνουν με ποια κατασκευή αγρο-εμποτίστηκε η κάθε περιοχή. PC=positive control, NC=negative control, GG-SE:GUS=η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE αγρίου τύπου και GG-SE-241-242AT>GC:GUS=η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE αγόλο του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 στον υποκινητή αυτού. Ο ιστός είναι φύλλο του φυτού N. benthamiana αγρίου τύπου.



**Εικόνα 3.4.** Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό. PC=positive control, pICH86966/GG-SE:GUS =η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE αγρίου τύπου και NC=negative control. Ο ιστός είναι φύλλο του φυτού N. benthamiana αγρίου τύπου

Αφού διαπιστώθηκε ότι η έκτη ημέρα μετά τον αγρο-εμποτισμό δίνει την καλύτερη δυνατή έκφραση του GUS, στα πειράματα που ακολούθησαν, ο ιστός συλλεγόταν κάθε φορά 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό.

Οι τιμές που έδωσε το φασματοφωτόμετρο για την ποσοτικοποίηση του GUS, συλλέχθηκαν και απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

Αρχικά, έγινε μια σύγκριση των υπο μελέτη σειρών χωρίς βιοτική καταπόνηση, και δε φάνηκε να υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές των επιπέδων της μεταγραφής του γονιδίου SERRATE στα φυτά SEi σε σύγκριση με την μεταγραφή του στα αγρίου τύπου φυτά, ούτε μεμονωμένα σε κάθε πείραμα αλλά ούτε στο σύνολο αυτών (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5. Ποσοτικοποίηση της δραστικότητας του GUS η οποία απεικονίζει τα επίπεδα της μεταγραφής του SERRATE. Εδώ παρουσιάζεται η μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE στα υγιή φυτά SEi συγκρινόμενη με την μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE στα υγιή φυτά αγρίου τύπου. Η αρίθμηση αφορά τη σειρά των διαδοχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Η δραστικότητα του GUS στα αγρίου τύπου φυτά ορίστηκε ως μονάδα. Στα διαγράμματα φαίνεται το τυπικό σφάλμα.

Συγκεκριμένα, μετά από 3 επαναλήψεις της ίδιας πειραματικής διαδικασίας, φαίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου SERRATE δε διαφέρει μεταξύ των υγιών και μολυσμένων φυτών αγρίου τύπου, τόσο μεμονωμένα σε κάθε πείραμα όσο και συγκεντρωτικά των τριών πειραμάτων. Αντίθετα, στην περίπτωση των SEi φυτών, φαίνεται πως η μεταγραφή του γονιδίου SERRATE μειώνεται κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης σε σχέση με την μεταγραφή του σε αγρίου τύπου συνθήκες, με στατιστική σημαντικότητα στο σύνολο των τριών πειραμάτων, αλλά όχι στα μεμονωμένα **3.6**).



Εικόνα 3.6. Ποσοτικοποίηση της δραστικότητας του GUS η οποία απεικονίζει τα επίπεδα της μεταγραφής του SERRATE σε υγιή και μολυσμένα φυτά, αγρίου τύπου και SEi. Η αρίθμηση αφορά τη σειρά των διαδοχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Α Απεικόνιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE στα μολυσμένα φυτά αγρίου τύπου συγκρινόμενα με τα μη μολυσμένα. Β Απεικόνιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE στα μολυσμένα συτά, αγρίου τώπου και SEi. Το σειρά των διαδοχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Α Απεικόνιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE στα μολυσμένα φυτά αγρίου τύπου συγκρινόμενα με τα μη μολυσμένα. Β Απεικόνιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE στα μολυσμένα. Στα διαγράμματα φαίνεται το τυπικό σφάλμα.

#### 3.1.2.2 Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS

Παράλληλα με τη συλλογή ιστού για την ποσοτικοποίηση του GUS, γίνεται και η συλλογή ιστού για την οπτικοποίηση της δραστικότητας του GUS. Με τη χρήση κατάλληλων διαλυμάτων και ακολουθώντας μια διαδικασία που αναφέρεται στην Ενότητα 2.12, γίνεται ο αποχρωματισμός των φύλλων ο οποίος καθιστά δυνατή την οπτικοποίηση του GUS ως μπλε κουκκίδες, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο τη δραστικότητα του GUS και συνεπώς και τη μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4.

Ο αγρο-εμποτισμός δεν είχε την ίδια επιτυχία ούτε μεταξύ των διαφορετικών φυτών αλλά ούτε μεταξύ των διαφορετικών φύλλων του ίδιου φυτού (Εικόνα 3.4). Επιπλέον, τα διαγράμματα των διαδοχικών πειραμάτων δεν είχαν πάντα την ίδια τάση (Εικόνα 3.5, Εικόνα 3.6). Συνδυάζοντας, λοιπόν, τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης καθώς και του ιστοχημικού εντοπισμού του GUS, παρατηρήθηκε ότι η πειραματική διαδικασία δεν ήταν δυνατόν να οδηγήσει σε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

Συνεπώς, η πειραματική διαδικασία έχρηζε την προσθήκη περαιτέρω ενδιάμεσων βημάτων ώστε να διεξαχθούν σωστά συμπεράσματα. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε η GFP ως μάρτυρας της επιτυχίας του αγρο-εμποτισμού. Συγκεκριμένα, σε μια περιοχή του φύλλου το οποίο αγρο-εμποτιζόταν με τα αγροβακτήρια που έφεραν τα κατασκευασμένα πλασμίδια, αγρο-εμποτιζόταν και με pBin:GFP και 3 ημέρες αργότερα, τα φυτά παρατηρούνταν κάτω από λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η έκφραση της GFP δήλωνε ότι ο αγρο-εμποτισμός είχε διεξαχθεί με επιτυχία, συνεπώς το ίδιο και οι άλλες κατασκευές πάνω στο ίδιο φύλλο. Με τον τρόπο αυτό επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση μόνο φύλλα στα οποία η ένταση της GFP ήταν ισχυρή. Στην **Εικόνα 3.7** παρουσιάζονται χαρακτηριστικές και τυχαίες φωτογραφίες, 3 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό με όλες τις πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη την πειραματική διαδικασία, με την GFP να φθορίζει ως ένδειξη της αποτελεσματικότητας του αγρο-εμποτισμού. Κάθε αγροεμποτισμένη περιοχή που φθορίζει έχει διαμετρικά της την αντίστοιχη αγροεμποτισμένη περιοχή της κάθε πλασμιδιακής κατασκευής, ακολουθώντας και πάλι το μοτιβιο της **Εικόνας 3.1**.

Αυτή η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε 4 φορές, αλλά μόνο οι 3 επαναλήψεις παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία.



**Εικόνα 3.7.** Χαρακτηριστικές φωτογραφίες από φυτά N. benthamiana αγρίου τύπου και N. benthamiana SEi 3 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό με όλες τις κατασκευές πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες, κάτω από λάμπα υπεριώδους φωτισμού

Για να μελετηθεί η έκφραση του γονιδίου SERRATE υπό συνθήκες βιοτικής καταπόνησης πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις φυτών N. benthamina αγρίου τύπου και N. benthamina SEi, με το ιοειδές PSTVd, όπως έχει ήδη περιγραφεί. Μετά το πέρας των 2 εβδομάδων, φυτά ίδιας ηλικίας, τόσο μολυσμένα όσο και υγιή χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική έκφραση του SERRATE, με τη μέθοδο του αγρο-εμποτισμού και τη

χρήση του πλασμιδίου pICH86966/GG-SE:GUS. Η μόλυνση των φυτών επιβεβαιώθηκε μέσω της διαδικασίας του υβριδισμού με τον μη-ραδιενεργό ανιχνευτή, DIG (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.10) δείχνοντας την παρουσία ή όχι του ιοειδούς PSTVd, όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες. Στις Εικόνες 3.8-3.10 φαίνονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση northern.



**Εικόνα 3.8. Πείραμα 1.** Ανάλυση κατά northern 2 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με το ιοειδές PSTVd. Διακρίνεται η ζώνη του PSTVd. Η (-) PSTVd αλληλουχία χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής και ως μάρτυρας ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκε το 25s rRNA έπειτα από χρώση με τη χρωστική methylene blue.



**Εικόνα 3.9. Πείραμα 3.** Ανάλυση κατά northern 2 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με το ιοειδές PSTVd. Διακρίνεται η ζώνη του PSTVd. Η (-) PSTVd αλληλουχία χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής και ως μάρτυρας ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκε το 25s rRNA έπειτα από χρώση με τη χρωστική methylene blue.



**Εικόνα 3.10. Πείραμα 4.** Ανάλυση κατά northern 2 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με το ιοειδές PSTVd. Διακρίνεται η ζώνη του PSTVd. Η (-) PSTVd αλληλουχία χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής και ως μάρτυρας ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκε το 25s rRNA έπειτα από χρώση με τη χρωστική methylene blue.

Για την εκτίμηση της δραστηριότητας της μεταγραφής του SERRATE έγινε συλλογή ιστού 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό και μετά από κατάλληλο χειρισμό για την απομόνωση και ποσοτικοποίηση του GUS συλλέχθηκαν τα αποτελέσματα των μετρήσεων που έδωσε το φασματοφωτόμετρο.

Στην Εικόνα 3.11Α φαίνεται ότι η μεταγραφή του γονιδίου SERRATE στα μολυσμένα φυτά αγρίου τύπου δε διαφέρει από αυτήν στα υγιή φυτά, ούτε στα μεμονωμένα πειράματα αλλά ούτε και στο σύνολο αυτών. Αντίθετα, στην Εικόνα 3.11Β φαίνεται ότι η μεταγραφή του γονιδίου SERRATE μειώνεται στα μολυσμένα SEi φυτά σε σχέση με τα υγιή SEi φυτά, στο σύνολο των τριών πειραμάτων, χωρίς όμως να συμβαίνει το



**Εικόνα 3.11.** Ποσοτικοποίηση της δραστικότητας του GUS η οποία απεικονίζει τα επίπεδα της μεταγραφής του SERRATE. Η αρίθμηση αφορά τη σειρά των διαδοχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Η δραστικότητα του GUS στα υγιή φυτά ορίστηκε ως μονάδα. Α Απεικονίζεται η μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE στα μολυσμένα φυτά αγρίου τύπου συγκρινόμενη με την έκφραση του SERRATE στα μη μολυσμένα φυτά αγρίου τύπου συγκρινόμτητα του SERRATE στα μολυσμένα φυτά SEI συγκρινόμενη με την έκφραση του SERRATE στα μολυσμένα φυτά SEI συγκρινόμενη με την έκφραση του SERRATE στα μολυσμένα φυτά SEI συγκρινόμενη με την έκφραση του SERRATE στα μολυσμένα φυτά SEI συγκρινόμενη με την έκφραση του SERRATE στα μολυσμένα φυτά SEI συγκρινόμενη με την έκφραση του SERRATE στα μολυσμένα φυτά SEI.

Επιπλέον, 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό έγινε συλλογή ιστού και για τον ιστοχημικό εντοπισμό της δραστηριότητας του GUS, ο οποίος φαίνεται στις παρακάτω εικόνες. Η ένταση του μπλε χρώματος (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι για το που οφείλεται αυτό) αποδίδει την δραστικότητα του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE, συνεπώς ανταποκρίνεται και στη δραστηριότητα του υποκινητή του γονιδίου.



**Εικόνα 3. 12. Πείραμα 3**. Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό. PC=positive control, NC=negative control και GG-SE:GUS=η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE αγρίου τύπου. Με κόκκινο σημαίνεται ο ιστός ο οποίος προέρχεται από μολυσμένα φυτά, με το ιοειδές PSTVd.



Εικόνα 3.13. Πείραμα 4. Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό. PC=positive control, NC=negative control και GG-SE:GUS=η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE αγρίου τύπου. Με κόκκινο σημαίνεται ο ιστός ο οποίος προέρχεται από μολυσμένα φυτά, με το ιοειδές PSTVd.

# 3.2 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγών στη μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE

Ένας από τους στόχους της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του υποκινητή του γονιδίου SERRATE. Πιο συγκεκριμένα, έπειτα από βιοπληροφορική ανάλυση και σύγκριση του υποκινητή του SERRATE από διαφορετικά φυτά, βρέθηκε ότι στο φυτό N. tabacum υπάρχουν 2 επιπλέον θέσεις έναρξης της μεταγραφής (ATGs), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.14. Γνωρίζουμε ήδη ότι σε πολλά γονίδια υπάρχουν ORFs, τα οποία ρυθμίζουν τη μεταγραφή. Αυτά τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης είναι εξαιρετικά άφθονα στο γονιδίωμα των αγγειόσπερμων. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι τα ORFs αποτελούν κοινά στοιχεία ελέγχου, τα οποία επηρεάζουν τη γονιδιακή

έκφραση (Von Arnim et al., 2014). Επιπλέον, τα mRNAs των φυτών περιέχουν μη μεταφραστικές περιοχές (untranslated regions, UTRs) οι οποίες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη δημιουργία πολλαπλών παραλλαγών mRNAs του ίδιου γονιδίου. Ιδιαίτερα, οι 5' αμετάφραστες περιοχές (5' UTRs) είναι ικανές να ρυθμίσουν την αποτελεσματικότητα μετάφρασης, παράγοντας διαφορετικές παραλλαγές mRNA. Αυτή η ικανότητα στοχεύει σε διαφορετικούς τρόπους ρύθμισης τόσο της αύξησης και ανάπτυξης των φυτών, όσο και στον μηχανισμό άμυνας αυτών σε διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης που καλούνται να ανταπεξέλθουν σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους (Holly A. Swartz, Jessica C. Levenson, 2012). Συνεπώς, στην παρούσα εργασία, θελήσαμε, επιπλέον, να διαλευκάνουμε εάν και κατά πόσο αυτές οι επιπλέον θέσεις έναρξης της μεταγραφής διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη μεταγραφή του γονιδίου *SERRATE*, τόσο σε συνθήκες απουσίας όσο και παρουσίας βιοτικής καταπόνησης.



Εικόνα 3.14. Η αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου SERRATE του φυτού Ν. tabacum. Με κόκκινο σημαίνονται οι 2 επιπλέον θέσεις ATGs, οι οποίες βρίσκονται στην 5' αμετάφραστη περιοχή.

Για να απαντηθεί το ερώτημα εάν αυτές οι επιπλέον θέσεις ATGs που βρίσκονται στον υποκινητή του γονιδίου SERRATE διαδραματίζουν κάποιον ρόλο στην έκφραση του γονιδίου τόσο σε φυτά αγρίου τύπου όσο και SEi, πραγματοποιήθηκε η κατασκευή νέου πλασμιδίου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ενός της μεταλλαξιγένεσης σημείου, μέσω της οποίας έγινε η ενσωμάτωση της μεταλλαγής στις θέσεις -241-242 του ATG του υποκινητή του γονιδίου, από -ATG- σε -GCG-, μετατρέποντας δηλαδή τη μετάφραση της τριπλέτας από το αμινοξύ μεθειονίνη σε αλανίνη. Για την ενσωμάτωση και ενίσχυση των πλασμιδίων μέσω της PCR γρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το πλασμίδιο pICH86966/GG-SE:GFP, το οποίο διαθέτει το εργαστήριο, και τα ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών, GG-SE-241-242AT>GC:GFP Forward & GG-SE-241-242AT>GC:GFP Reverse για τον υποκινητή του γονιδίου που φέρει την μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 (όπως αναφέρεται στα Υλικά και Μέθοδοι) όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.15.



**Εικόνα 3.15.** Απεικόνιση πλασμίδιου pICH86966/GG-SE-241-242AT>GC:GFP. Το σύμβολο απεικονίζει τη σημειακή μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 του υποκινητή του γονιδίου SERRATE. Επιπλέον, φαίνονται τα ένζυμα περιορισμού τα οποία αναγνωρίζουν και κόβουν στο τμήμα της ένθεσης κάνοντας εφικτή την επιβεβαίωση της ένθεσης μέσα στο πλασμίδιο.

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε παράλληλα με ένα μάρτυρα ο οποίος δίνει γνωστού μεγέθους ζωνώσεις, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.16.



**Εικόνα 3.16.** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% μετά από PCR για τη μεταλλαζιγένεση σημείου, και την ενίσχυση αυτής. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pICH86966-GG-SE:GFP. Ο μάρτυρας που ηλεκτροφορήθηκε ήταν ο DNA phage λ/PstI. Το πλασμίδιο pICH86966 GG-SE-241-242AT>GC:GFP αναμένεται να έχει μέγεθος 8.914 bp.

Ακολούθησαν οι διαγνωστικές πέψεις περιορισμού ώστε να επιβεβαιωθεί η ένθεση του πλασμιδίου που φέρει την επιθυμητή μεταλλαγή. Για την επιβεβαίωση της μεταλλαγής GG-SE-241-242AT>GC:GFP πραγματοποιήθηκαν μονές πέψεις επιβεβαίωσης με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και HindIII. Πέψεις με το ένζυμο EcoRI στο μετασχηματισμένο πλασμίδιο pICH86966 δίνουν 2 ζωνώσεις μεγέθους 7501 και 1413 ζευγών βάσεων. Το ένζυμο HindIII, αντίστοιχα, δίνει 3 ζώνες μεγέθους 4829, 3982 και 103 ζευγών βάσεων.

Λόγω τεχνικών προβλημάτων δεν είναι δυνατή η παράθεση φωτογραφίας του πηκτώματος, ωστόσο φανερώθηκαν αχνές ζωνώσεις των μεγεθών που αναμένονταν. Στη συνέχεια, έγινε καθαρισμός του απομονωμένου πλασμιδίου και ακολούθησε η αλληλούχηση αυτού. Με τη βοήθεια του BLASTn, έγινε σύγκριση της αλληλουχίας αυτής με την επιθυμητή, προς ένθεση, αλληλουχία και επιβεβαιώθηκε η μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 από AT σε GC, στο πλασμίδιο pICH86966/GG-SE-241-242AT>GC:GFP (**Εικόνα 3.17**).

Range	2:899	to 1219 Graphics		Next Mat	ch 🔺 Previous	s Match 🛕 First Matc
Score 560 bi	ts(620)	Expect 3e-163	Identities 318/322(99%)	Gaps 1/322(0%)	Strand Plus/Minus	
Query	2	TAACTAGCTCAGTTTG	GTACTTTGTAGTGTCTGTATT	TAGTGTGTTGGTTACT	TGGTTTGT	61
Sbjct	1219	TAGCTAGCTCAGTTTC	TACTTTGTAGTGTCTGTATT	t-GTGTGTTGGTTACT	teetttet	1161
Query	62	AGATGCGGAAATTAGA	AGTGAGAAATGGAGAATTGA	AGATTGGTGAGGGGTG	GAGAGTAA :	121
Sbjct	1160	AGATGCGGAAATTAGA	AGTGAGAAATGGAGAATTGA	AGATTGGTGAGGGGTG	GAGAGTAA :	1101
Query	122	ATTTTAGATTTTGGAG	GTTTGGAGGAGATAAAATGTT	ттсатттасссссаа	AGTATTCT :	181
Sbjct	1100	ATTTTAGATTTTGGAG	STTTGGAGGAGATAAAATGTT	TTCATTTACCCCCAAA	AGTATTCT	1041
Query	182	TTAATTACTTAAAGTT	CCCAC GCGAAATGAGCTTTT	GCTTTTTAACCTCTTT	ACTCCAAG	241
Sbjct	1040	TTAATTACTTAAAGTT	CCCACATGAAATGAGCTTTT	GCTTTTTTAACCTCTTT	ACTCCAAG	981
Query	242	тсттатстстсссаа	ATATATTTGTAGACAATAGTT	GCTAAAATTGTCTATT		301
Sbjct	980	TCTTATCTCTCCCAA	ATATATTTGTAGACAATAGTT	GCTAAAATTGTCTATT		921
Query	302	TGGAAAAGATACTTAT	TATATCC 323			
Sbjct	920	TGGAAAAGATACTTAT	TATATCC 899			

**Εικόνα 3.17.** Σύγκριση της αλληλουχίας με την επιθυμητή (προς ένθεση) αλληλουχία. Όπου Query= genewizsequencing, επιθυμητή προς ένθεση αλληλουχία και Sbjct= η αλληλουχία αγρίου τύπου.

Στη συνέχεια, το πλασμίδιο pICH86966/GG-SE-241-242AT>GC:GFP ενσωματώθηκε σε βακτήρια *E. coli* στελέχους DH10b, από όπου και απομονώθηκε μετά τον πολλαπλασιασμό για να ενσωματωθεί εκ νέου σε αγροβακτήρια στελέχους C58C1, και χρησιμοποιήθηκαν για τον αγρο-εμποτισμό.

Αντίστοιχα, έγινε μια προσπάθεια κατασκευής του πλασμιδίου (pICH86966) που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -199-200, συντηγμένου με την GFP. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μεταλλαξιγένεσης σημείου, μέσω της οποίας έγινε απόπειρα της ενσωμάτωσης της μεταλλαγής στις θέσεις -199-200 του υποκινητή του γονιδίου, ώστε να μην αναγνωρίζεται ως θέση έναρξης της μεταγραφής (ATG) αλλά ως αλανίνη. Για την ενσωμάτωση και ενίσχυση των πλασμιδίων μέσω της PCR χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το πλασμίδιο pICH86966/GG-SE:GFP, το οποίο διαθέτει το εργαστήριο, και τα ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών, GG-SE-199-200AT>GC:GFP Forward & GG-SE-199-200AT>GC:GFP Reverse.

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε παράλληλα με ένα μάρτυρα ο οποίος δίνει γνωστού μεγέθους ζωνώσεις, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.18.



Εικόνα 3.18. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% μετά από PCR η για τη μεταλλαξιγένεση σημείου, και την ενίσχυση αυτής. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pICH86966-GG-SE:GFP. Το πλασμίδιο pICH86966 GG-SE-199-200AT>GC:GFP αναμένεται να έχει μέγεθος 8.914 bp. Ως μάρτυρας μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο DNA phage λ/PstI.

Ακολούθησαν οι διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και HindIII, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως για το πλασμίδιο pICH86966 GG-SE-241-242AT>GC:GFP και η ηλεκτροφόρηση αυτών. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδωσαν επανάληψη μιας μικρής περιοχής που περιλάμβανε τις σημειακές μεταλλαγές, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.19.



**Εικόνα 3.19.** Το χρωματογράφημα που προκύπτει μετά την αλληλούχηση του πλασμιδίου pICH86966-GG-SE:GFP που φέρει τον υποκινητή το γονιδίου SERRATE μαζί με την μεταλλαγή στις θέσεις -199-200 για την απενεργοποίηση της ATG θέσης.

Συνεπώς, το συγκεκριμένο πλασμίδιο δε χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς ακολούθησαν 2 ακόμα προσπάθειες για την απόκτηση του επιθυμητού προϊόντος της PCR. Η μεταλλαγή της δεύτερης θέσης ATG του υποκινητή του γονιδίου SERRATE συντηγμένου με το GFP δεν πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία λόγω χρονικών περιορισμών.

# 3.2.1 Παρατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE μέσω της GFP σε υγιή φυτά

Όσον αφορά το ερώτημα εάν η επιπλέον θέση ATG που βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου SERRATE διαδραματίζει κάποιον ρόλο στην έκφραση του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν φυτά, τόσο αγρίου τύπου όσο και SEi, τα οποία βρίσκονταν στο στάδιο των 6-8 φύλλων. Σε κάθε φυτό χρησιμοποιήθηκαν 3 φύλλα για τον αγροεμποτισμό και κάθε φύλλο αγρο-εμποτίστηκε με τα μετασχηματισμένα βακτήρια που φέρουν τα αντίστοιχα πλασμίδια pICH86966/GG-SE:GFP και pICH86966/GG-SE-241-242AT>GC:GFP, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.20. Παράλληλα, αγροεμποτίστηκαν και τα βακτήρια που φέρουν την κατασκευή pBin:GFP η οποία είναι ο θετικός μάρτυρας, καθώς και σκέτο διάλυμα αγρο-εμποτισμού το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Τρεις ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό, συλλέχθηκαν τομές από τις αγρο-εμποτισμένες περιοχές των φύλλων. Κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία, παρατηρήθηκαν φθορίζοντες πυρήνες, λόγω του πυρηνικού εντοπισμού του SERRATE. Η έκφραση της GFP, η οποία είναι συντηγμένη με τον υποκινητή του SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή, δε μπόρεσε να απεικονιστεί καθαρά σε φωτογραφία, καθώς υπήρχε έντονος διάχυτος φθορισμός.



**Εικόνα 3.20.** Απεικόνιση των σημείων εμποτισμού της κάθε κατασκευής, στην κάτω πλευρά των φύλλων του φυτού. Όπου PC= pBin:GFP-ο θετικός μάρτυρας (GFP), NC= μόνο το διάλυμα του αγρο-εμποτισμού χωρίς βακτήρια, pICH86966 GG-SE:GFP= η κατασκευή που φέρει τον αγρίου τύπου υποκινητή του γονιδίου SERRATE και pICH86966 GG-SE-241-242AT>GC:GFP= η κατασκευή που φέρει τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242.

Παράλληλα, συλλέχθηκε ιστός από τις αγρο-εμποτισμένες περιοχές και έγινε μια προσπάθεια ποσοτικοποίησης της GFP. Η ποσοτικοποίηση της GFP θα προσδιόριζε τη μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE καθώς και του SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242. Ωστόσο, οι μετρήσεις απορρόφησης και φθορισμού στο φασματοφωτόμετρο δεν οδήγησαν σε στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα.

# 3.2.2 Παρατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE μέσω του GUS σε υγιή φυτά

Για να απαντηθεί το ερώτημα εάν υπάρχει διαφορά στην μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή μεταξύ των αγρίου τύπου φυτών όσο και μεταξύ των SEi φυτών, ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων με τη χρήση ενός άλλου γονιδίου αναφοράς, το γονίδιο uidA το οποίο παράγει GUS (β-glucuronidase). Με τον τρόπο αυτό, αντιμετωπίστηκε το πρόβλημα οπτικοποίησης της μεταγραφικής δραστηριότητας του γονιδίου SERRATE.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ένας από τους στόχους της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του υποκινητή του γονιδίου SERRATE. Για να απαντηθεί το ερώτημα εάν αυτές οι επιπλέον θέσεις ATGs που βρίσκονται στον υποκινητή του γονιδίου SERRATE διαδραματίζουν κάποιον ρόλο στη μεταγραφική δραστηριότητατου γονιδίου τόσο σε φυτά αγρίου τύπου όσο και SEi, με τη χρήση του GUS ως γονίδιο αναφοράς, πραγματοποιήθηκε η κατασκευή ενός νέου πλασμιδίου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μεταλλαξιγένεσης σημείου, μέσω της οποίας έγινε η ενσωμάτωση της μεταλλαγής στις θέσεις -241-242 του ATG του υποκινητή του γονιδίου, από –ATG– σε –GCG–, μετατρέποντας δηλαδή τη μετάφραση της τριπλέτας από το αμινοξύ μεθειονίνη σε αλανίνη. Για την ενσωμάτωση και ενίσχυση των πλασμιδίων μέσω της PCR χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το πλασμίδιο pICH86966/GG-SE:GUS, το οποίο διαθέτει το εργαστήριο, και τα ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών, GG-SE-241-242AT>GC:GUS Forward & GG-SE-241-242AT>GC:GUS Reverse για τον υποκινητή του γονιδίου που φέρει την μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 (όπως αναφέρεται στα Υλικά και Μέθοδοι) (**Εικόνα 3.21**).



**Εικόνα 3.21.** Απεικόνιση του κατασκευασμένου πλασμιδίου pICH86966/GG-SE-241-242AT>GC:GUS. Το σύμβολο απεικονίζει τη σημειακή μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 (AT) του υποκινητή του γονιδίου SERRATE. Επιπλέον, φαίνονται τα ένζυμα περιορισμού τα οποία αναγνωρίζουν και κόβουν στο τμήμα της ένθεσης κάνοντας εφικτή την επιβεβαίωση της ένθεσης μέσα στο πλασμίδιο.

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε παράλληλα με ένα μάρτυρα ο οποίος δίνει γνωστού μεγέθους ζωνώσεις, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.22.



**Εικόνα 3.22.** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% μετά από PCR για τη μεταλλαζιγένεση σημείου, και την ενίσχυση αυτής. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pICH86966-GG-SE:GUS. Το pICH86966 GG-SE:241-242AT>GC:GUS αναμένεται να έχει μέγεθος 10.216bp. Ως μάρτυρας μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο λ/PstI.

Ακολούθησαν οι διαγνωστικές πέψεις περιορισμού ώστε να επιβεβαιωθεί η ένθεση του πλασμιδίου που φέρει την επιθυμητή μεταλλαγή. Για την επιβεβαίωση της μεταλλαγής GG-SE-241-242AT>GC:GUS πραγματοποιήθηκαν μονές πέψεις επιβεβαίωσης με τα ένζυμα περιορισμού EcoRV και HindIII. Πέψεις με το ένζυμο EcoRV στο πλασμίδιο pICH86966 δίνει 3 ζωνώσεις μεγέθους 7073, 2808 και 335 ζευγών βάσεων. Το ένζυμο HindIII, αντίστοιχα, δίνει 3 ζώνες μεγέθους 6131, 3982 και 103 ζευγών βάσεων.

Λόγω τεχνικών προβλημάτων δεν είναι δυνατή η παράθεση φωτογραφίας του πηκτώματος, ωστόσο φανερώθηκαν αχνές ζωνώσεις των μεγεθών που αναμένονταν. Στη συνέχεια, έγινε καθαρισμός του απομονωμένου πλασμιδίου με φαινόληχλωροφόρμιο και ακολούθησε η αλληλούχηση αυτού. Με τη βοήθεια του BLASTn, έγινε σύγκριση της αλληλουχίας αυτής με την επιθυμητή, προς ένθεση, αλληλουχία και επιβεβαιώθηκε η μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 στο πλασμίδιο pICH86966/GG-SE-241-242AT>GC:GUS.

-	-	-	
Query	2	TAACTAGCTCAGTTTGTACTTTGTAGTGTCTGTATTTAGTGTGTTGGTTACTTGGTTTGT	61
Sbjet	1413	TAGCTAGCTCAGTTTGTACTTTGTAGTGTCTGTATTT-GTGTGTTGGTTACTTGGTTTGT	1355
Query	62	AGATGCGGAAATTAGAAGTGAGAAATGGAGAATTGAAGATTGGTGAGGGGTGGAGAGTAA	121
Sbjet	1354	AGATGCGGAAATTAGAAGTGAGAAATGGAGAATTGAAGATTGGTGAGGGGTGGAGAGAGTAA	1295
Query	122	attttagattttggagtttggaggagataaaatgttttcatttacccccaaagtattct	181
Sbjet	1294	attttagattttggagtttggaggagataaaatgttttcatttacccccaaaagtattct	1235
Query	182	TTARTTACTTARAGTTCCCAC	241
Sbjet	1234	TTAATTACTTAAAGTTCCCAC <mark>ATG</mark> AAATGAGCTTTTGCTTTTTAACCTCTTTACTCCAAG	1175
Query	242	TCTTATCTCCCCAAATATATTTGTAGACAATAGTTGCTAAAATTGTCTATTATTATAA	301
Sbjet	1174	TCTTATCTCCCCAAATATATTTGTAGACAATAGTTGCTAAAATTGTCTATTATTATAA	1115
Query	302	TGGAAAAGATACTTATATATCC 323	
Sbjet	1114	TGGAAAAGATACTTATATATCC 1093	

Seg sample/SE promoter

**Εικόνα 3.23.** Σύγκριση της αλληλουχίας με την επιθυμητή (προς ένθεση) αλληλουχία. Όπου Query= genewizsequencing, επιθυμητή προς ένθεση αλληλουχία και Sbjct= η αλληλουχία αγρίου τύπου.

Ακολούθησε ο μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών όπως περιγράφηκε και προηγουμένως για τις GFP κατασκευές ώστε να δημιουργηθούν αγροβακτήρια C58C1 που φέρουν το πλασμίδιο piCH86966/GG-SE-241-242AT>GC:GUS.

Αντίστοιχα, έγινε μια προσπάθεια κατασκευής του πλασμιδίου (pICH86966) που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -199-200, συντηγμένου με GUS. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μεταλλαξιγένεσης σημείου, μέσω της οποίας έγινε απόπειρα της ενσωμάτωσης της μεταλλαγής στις θέσεις -199-200 του υποκινητή του γονιδίου, ώστε να μην αναγνωρίζεται ως ATG. Για την ενσωμάτωση και ενίσχυση των πλασμιδίων μέσω της PCR χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το πλασμίδιο pICH86966/GG-SE:GUS, το οποίο διαθέτει το εργαστήριο στο οποίο εκπονήθηκε η παρούσα εργασία, και τα ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών, GG-SE-199-200:GUS Forward & GG-SE-199-200:GUS Reverse.

Οι πρώτες προσπάθειες PCR δεν έδιναν κάποιο προϊόν, ενώ στην πορεία φανερώθηκαν ζωνώσεις στο πήκτωμα αγαρόζης οι οποίες δεν αντιστοιχούσαν στα ζεύγη βάσεων που αναμενόταν, όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.24. Συνεπώς, η προσπάθεια μεταλλαγής της δεύτερης θέσης ATG του υποκινητή του γονιδίου SERRATE συντηγμένου με το GUS παραιτήθηκε λόγω χρονικών περιορισμών.



Εικόνα 3.24. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% μετά από PCR για τις σημειακές μεταλλαγές στις θέσεις -199-200 ώστε να απενεργοποιηθεί η θέση ATG. Αριστερά δεν υπήρζε παραγωγή κάποιου προϊόντος, ενώ δεξιά η παραγωγή του προϊόντος δεν ανταπεξέρχεται στο μέγεθος που αναμένεται να έχει η επιθυμητή αλληλουχία, καθώς το πλασμίδιο έχει μέγεθος 10.216 bp.



**Εικόνα 3.25.** Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό. PC=positive control, NC=negative control, GG-SE:GUS=η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE αγρίου τύπου και GG-SE-241-242AT>GC:GUS=η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 στον υποκινητή αυτού. Ο ιστός είναι φύλλο του φυτού N. benthamiana αγρίου τύπου.

Επιπλέον, θελήσαμε να δούμε εάν η έκφραση του GUS:myc (θετικός μάρτυρα) διαφέρει μεταξύ υγειών και μολυσμένων φυτών. Οπότε πραγματοποιήθηκε αγροεμποτισμός σε υγιή και μολυσμένα φυτά αγρίου τύπου, καθώς και σε μολυσμένα

φυτά καταστολής του γονιδίου SERRATE. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.26, η έκφραση του GUS δε διαφέρει μεταξύ αυτών των αγροεμποτισμένων περιοχών.



**Εικόνα 3.26.** Αριστερά απεικονίζεται αγρο-εμποτισμένη περιοχή με το πλασμίδιο GUS:myc σε φύλλο υγιούς φυτού N. benthamiana wt, στο Κέντρο απεικονίζεται αγρο-εμποτισμένη περιοχή με το πλασμίδιο GUS:myc σε φύλλο μολυσμένου φυτού N. benthamiana wt, ενώ στα Δεζιά απεικονίζεται αγρο-εμποτισμένη περιοχή με το πλασμίδιο GUS:myc σε φύλλο μολυσμένου φυτού N. benthamiana SEi.

#### 3.2.2.1 Ποσοτικοποίηση του GUS σε υγιή φυτά

Ακολούθησε η ποσοτικοποίηση του GUS με κατάλληλο χειρισμό του ιστού που συλλέχθηκε 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό. Συγκεκριμένα, έγινε εκχύλιση της πρωτεΐνης η οποία στη συνέχεια μετρήθηκε με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου σε δύο χρονικές στιγμές, 0 και 30 λεπτά μετά την προσθήκη του MUG (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι).

Οι τιμές που έδωσε το φασματοφωτόμετρο δείχνουν ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ της έκφρασης του SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 στα SEi φυτά σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση στα φυτά αγρίου τύπου, ούτε μεμονωμένα αλλά ούτε και στο σύνολο των πειραμάτων (Εικόνα 3.27).

![](_page_49_Figure_6.jpeg)

Εικόνα 3.27. Ποσοτικοποίηση της δραστικότητας του GUS η οποία απεικονίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE. Η αρίθμηση αφορά τη σειρά των διαδοχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Η δραστικότητα του GUS συντηγμένου με τον υποκινητή που φέρει τις μεταλλαγές στις θέσεις -241-242 στα αγρίου τύπου φυτά ορίστηκε ως μονάδα. Στα διαγράμματα φαίνεται το τυπικό σφάλμα. Εδώ παρουσιάζεται η έκφραση του GUS το οποίο είναι

συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στα υγιή φυτά SEi συγκρινόμενη με αυτή του SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στα υγιή φυτά αγρίου τύπου.

Όσον αφορά τη μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242, δε φαίνεται να υπάρχει διαφορά σε σχέση με αυτή του SERRATE αγρίου τύπου, στα φυτά αγρίου τύπου χωρίς την παρουσία βιοτικής καταπόνησης (Εικόνα 3.28).

![](_page_50_Figure_2.jpeg)

Εικόνα 3.28. Ποσοτικοποίηση της δραστικότητας του GUS η οποία απεικονίζει τη μεταγραφική δταστηριότητα του SERRATE. Η αρίθμηση αφορά τη σειρά των διαδοχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Η δραστικότητα του GUS στα υγιή φυτά ορίστηκε ως μονάδα. Στα διαγράμματα φαίνεται το τυπικό σφάλμα. Στην εικόνα παρουσιάζεται η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE στα υγιή φυτά αγρίου τύπου συγκρινόμενη με αυτή του SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 στα υγιή φυτά αγρίου τύπου. Οπου SE η μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE και SE SD η μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή.

#### 3.2.2.2 Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS σε υγιή φυτά

Παράλληλα με τη συλλογή ιστού για την ποσοτικοποίηση του GUS, γίνεται και η συλλογή ιστού για την οπτικοποίηση της έκφρασης του GUS. Με τη χρήση κατάλληλων διαλυμάτων και ακολουθώντας μια διαδικασία που αναφέρεται στην Ενότητα 2.12, γίνεται ο αποχρωματισμός των φύλλων ο οποίος καθιστά δυνατή την οπτικοποίηση του GUS ως μπλε κουκκίδες, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο την έκφραση του GUS και συνεπώς και τη μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.29.

![](_page_50_Figure_6.jpeg)

**Εικόνα 3.29.** Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό. PC=positive control, GG-SE:GUS=η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE αγρίου τύπου, GG-SE-241-242AT>GC:GUS= η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου

SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 και NC=negative control. Ο ιστός είναι φύλλο του φυτού Ν. benthamiana αγρίου τύπου.

Ωστόσο, τα αποτελέσματα των πειραμάτων δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά, καθώς τα διαγράμματα των διαδοχικών πειραμάτων δεν είχαν πάντα την ίδια τάση. Επιπλέον, ο αγρο-εμποτισμός δεν είχε την ίδια επιτυχία ούτε μεταξύ των διαφορετικών φυτών αγρίου τύπου ή SEi, αντίστοιχα, αλλά ούτε μεταξύ των διαφορετικών φύλλων του ίδιου φυτού.

Έτσι λοιπόν, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, με τη χρήση της GFP ως μάρτυρας της επιτυχίας του αγρο-εμποτισμού (Εικόνα 3.7).

Ακολουθώντας και πάλι τις ίδιες τεχνικές, καταγράφηκαν οι τιμές που έδωσε το φασματοφωτόμετρο, οι οποίες μετά από επεξεργασία, απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

Φαίνεται ότι η μεταγραφή του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 δε διαφέρει από αυτήν του αγρίου τύπου στα μεμονωμένα πειράματα όσον αφορά τα αγρίου τύπου φυτά χωρίς να υπάρχει βιοτική καταπόνηση

![](_page_51_Figure_5.jpeg)

Εικόνα 3.30. Ποσοτικοποίηση της δραστικότητας του GUS η οποία απεικονίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου SERRATE. Η αρίθμηση αφορά τη σειρά των διαδοχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Η δραστικότητα του GUS στα υγιή φυτά ορίστηκε ως μονάδα. Στα διαγράμματα φαίνεται το τυπικό σφάλμα. Παρουσιάζεται η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του SERRATE στα υγιή φυτά αγρίου τύπου.

Η μεταγραφή του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 δε φαίνεται να διαφέρει ούτε στα SEi φυτών, σε αγρίου τύπου συνθήκες, όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 3.31.

![](_page_52_Figure_0.jpeg)

Εικόνα 3.31. Ποσοτικοποίηση της δραστικότητας του GUS η οποία απεικονίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου SERRATE. Η αρίθμηση αφορά τη σειρά των διαδοχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Η δραστικότητα του GUS του αγρίου τύπου υποκινητή ορίστηκε ως μονάδα. Στα διαγράμματα φαίνεται το τυπικό σφάλμα. Παρουσιάζεται η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242, στα υγιή φυτά SEi.

# 3.3 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγών στη μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης

Για να απαντηθεί το ερώτημα εάν αυτές οι επιπλέον θέσεις ATGs που βρίσκονται στον υποκινητή του γονιδίου SERRATE διαδραματίζουν κάποιον ρόλο στην έκφραση του γονιδίου κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων η οποία αναλύεται παρακάτω.

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που αναλύεται στην Ενότητα 3.1, χρησιμοποιώντας τον ίδιο αριθμό φυτών, κάνοντας τις αντίστοιχες μολύνσεις.

# 3.3.1 Παρατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE μέσω της GFP κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης

Για τον αγρο-εμποτισμό, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pICH86966/GG-SE:GFP, το οποίο έχει κατασκευαστεί με τη μέθοδο golden gate και διαθέτει το εργαστήριο, το πλασμίδιο pICH86966 GG-SE-241-242AT>GC:GFP καθώς επίσης ο θετικός μάρτυρας pBin:GFP και απλό διάλυμα αγρο-εμποτισμού ως αρνητικός μάρτυρας, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.20**. Τρεις ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό, συλλέχθηκαν τομές από τις αγρο-εμποτισμένες περιοχές των φύλλων, τόσο των μολυσμένων όσο και των μη μολυσμένων φυτών. Κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία, παρατηρήθηκαν φθορίζοντες πυρήνες, λόγω του πυρηνικού εντοπισμού του *SERRATE*. Λόγω του έντονου αυτοφθορισμού, η οπτικοποίηση της έκφρασης της GFP, η οποία είναι συντηγμένη με τον υποκινητή του γονιδίου *SERRATE*, καθώς και η συλλογή αντιπροσωπευτικών εικόνων δεν ήταν εφικτή. Παράλληλα, με κατάλληλους χειρισμούς πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή της πρωτεΐνης για την ποσοτικοποίηση της GFP (όπως αναφέρεται στα Υλικά και Μέθοδοι).

# 3.3.2 Παρατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE μέσω του GUS κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης

Για να απαντηθεί το ερώτημα εάν η επίδραση των μεταλλαγών επηρεάζει την μεταγραφή του SERRATE κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης, ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων με τη χρήση ενός άλλου γονιδίου αναφοράς, το γονίδιο uidA το οποίο παράγει GUS (β-glucuronidase), όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.

Δύο εβδομάδες μετά την μόλυνση μέρος των φυτών και των δυο γονοτύπων, συλλέχθηκε ιστός από τα κορυφαία φύλλα ώστε να επιβεβαιωθεί η μόλυνση. Η μόλυνση των φυτών επιβεβαιώθηκε μέσω της διαδικασίας του υβριδισμού με τον μηραδιενεργό ανιχνευτή, DIG (όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι) δείχνοντας την παρουσία ή όχι του ιοειδούς PSTVd, όπως παρουσιάζεται στις **Εικόνες 3.8-3.10**. Την ίδια ημέρα, έγινε αγρο-εμποτισμός με τα πλασμίδια GUS:myc, pICH86966 GG-SE:GUS και pICH86966 GG-SE-241-242AT>GC:GUS, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.32**. Ακολούθησε η συλλογή ιστού, 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό με τις κατασκευές που προαναφέρθηκαν. Κατόπιν, έγινε η ποσοτικοποίηση και ο ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS, όπως έχει ήδη αναφερθεί.

![](_page_53_Picture_3.jpeg)

**Εικόνα 3.32.** Απεικόνιση των σημείων εμποτισμού της κάθε κατασκευής, στην κάτω πλευρά των φύλλων του φυτού. Όπου PC= pBin:GFP-ο θετικός μάρτυρας (GFP), NC= μόνο το διάλυμα του αγρο-εμποτισμού χωρίς βακτήρια, pICH86966 GG-SE:GFP= η κατασκευή που φέρει τον αγρίου τύπου υποκινητή του γονιδίου SERRATE και pICH86966 GG-SE-241-242AT>GC:GFP= η κατασκευή που φέρει τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242.

Σε αυτή την ενότητα, το ερώτημα που προσεγγίζεται είναι εάν οι σημειακές μεταλλαγές στις θέσεις -241-241, οι οποίες οδήγησαν στην αλλαγή της τριπλέτας ATG σε GCC, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν στη μετατροπή της μεθειονίνης σε αλανίνη, επηρεάζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου SERRATE κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης.

Οι τιμές που έδωσε το φασματοφωτόμετρο αναλύθηκαν και απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

3.3.2.1 Ποσοτικοποίηση του GUS κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης

Σε ένα από τα πειράματα, καθώς και στο σύνολο των πειραμάτων, φαίνεται πως στα μολυσμένα φυτά αγρίου τύπου, η μεταγραφή του SERRATE μειώνεται όταν υπάρχει η μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 σε σχέση με τη μεταγραφή του SERRATE αγρίου τύπου (Εικόνα 3.33).

![](_page_54_Figure_2.jpeg)

Εικόνα 3.33. Ποσοτικοποίηση της δραστικότητας του GUS η οποία απεικονίζει τα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242, συγκρινόμενη με τη μεταγραφή του SERRATE αγρίου τύπου, στα μολυσμένα φυτά αγρίου τύπου. Η αρίθμηση αφορά τη σειρά των διαδοχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Η δραστικότητα του GUS στα μολυσμένα φυτά αγρίου τύπου ορίστηκε ως μονάδα. Στα διαγράμματα φαίνεται το τυπικό σφάλμα.

Αντίθετα, στα SEi φυτά φαίνεται πως η μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 δεν επηρεάζει τη μεταγραφή του γονιδίου SERRATE (Εικόνα 3.34).

![](_page_54_Figure_5.jpeg)

Εικόνα 3.34. Ποσοτικοποίηση της δραστικότητας του GUS η οποία απεικονίζει τα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242, συγκρινόμενη με τη μεταγραφή του SERRATE αγρίου τύπου, στα μολυσμένα SEi φυτά. Η αρίθμηση αφορά τη σειρά των διαδοχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Η δραστικότητα του GUS στα μολυσμένα SEi φυτά ορίστηκε ως μονάδα. Στα διαγράμματα φαίνεται το τυπικό σφάλμα.

Όσον αφορά τη μεταγραφή του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242, σε ένα μεμονωμένο πείραμα, φαίνεται ότι η έκφρασή του μειώνεται στα SEi φυτά συγκριτικά με τα αγρίου τύπου φυτά. Ωστόσο, στο σύνολο των πειραμάτων δε φαίνεται να υπάρχει διαφορά στη μεταγραφή του γονιδίου SERRATE που φέρει τη

μεταλλαγή στις θέσεις -241-242, μεταξύ μολυσμένων αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών (Εικόνα 3.35).

![](_page_55_Figure_1.jpeg)

Εικόνα 3.35. Ποσοτικοποίηση της δραστικότητας του GUS η οποία απεικονίζει τα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242, συγκρίνοντάς τα μολυσμένα SEi φυτά σε σχέση με τα μολυσμένα αγρίου τύπου φυτά. Η αρίθμηση αφορά τη σειρά των διαδοχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Η δραστικότητα του GUS στα μολυσμένα φυτά αγρίου τύπου ορίστηκε ως μονάδα. Στα διαγράμματα φαίνεται το τυπικό σφάλμα.

Όταν συγκρίθηκαν τα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -242-241 μεταξύ των υγιών και μολυσμένων φυτών αγρίου τύπου, δε φάνηκε να υπάρχει κάποια διαφορά (Εικόνα 3.36).

![](_page_55_Figure_4.jpeg)

Εικόνα 3.36. Ποσοτικοποίηση της δραστικότητας του GUS η οποία απεικονίζει τα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 στα μολυσμένα φυτά αγρίου τύπου συγκρινόμενη με τα επίπεδα μεταγραφής του SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 στα υγιή φυτά αγρίου τύπου. Η αρίθμηση αφορά τη σειρά των διαδοχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Η δραστικότητα του GUS στα υγιή φυτά ορίστηκε ως μονάδα. Στα διαγράμματα φαίνεται το τυπικό σφάλμα.

Επίσης, όταν συγκρίθηκαν τα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -242-241 μεταξύ των υγιών και μολυσμένων SEi φυτών, ανεξάρτητα σε κάθε πείραμα, δε φάνηκε να υπάρχει κάποια επίδραση στη μεταγραφική δραστηριότητατου SERRATE παρουσία βιοτικής καταπόνησης, με το ιοειδές PSTVd, σε σχέση με τις αγρίου τύπου συνθήκες. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε το ίδιο μεμονωμένα σε όλα τα πειράματα (Εικόνα 3.37).

![](_page_56_Figure_0.jpeg)

Εικόνα 3.37. Ποσοτικοποίηση της δραστικότητας του GUS η οποία απεικονίζει τα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 στα μολυσμένα φυτά SEi συγκρινόμενη με τα επίπεδα της μεταγραφής του SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 στα υγιή φυτά SEi. Η αρίθμηση αφορά τη σειρά των διαδοχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Η δραστικότητα του GUS στα υγιή φυτά ορίστηκε ως μονάδα. Στα διαγράμματα φαίνεται το τυπικό σφάλμα.

3.3.2.2 Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε και ο ιστοχημικός εντοπισμός όπως έχει ήδη περιγραφεί στην Ενότητα 3.1. Με αυτή την τεχνική, μπορούν να διεξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την έκφραση του GUS συγκρίνοντας τα επίπεδα της χρώσης που δίνει αυτό το γονίδιο.

Στην Εικόνα 3.38, παρατηρούνται έντονες μπλε κουκκίδες στον θετικό μάρτυρα, λιγότερο έντονο μπλε χρώμα στα φύλλα υγιών φυτών αγρίου τύπου που αγροεμποτίστηκαν με το pICH86966/GG-SE:GUS, ενώ ακόμα λιγότερο έντονο μπλε χρώμα στα φύλλα μολυσμένων φυτών αγρίου τύπου που αγρο-εμποτίστηκαν με το ίδιο πλασμίδιο. Αντίθετα, δε φαίνεται να διαφέρουν οι χρωματισμοί μεταξύ των αγροεμποτισμένων περιοχών των αγρίου τύπου υγιών φυτών με το πλασμίδιο pICH86966/GG-SE:GUS και των αγρο-εμποτισμένων περιοχών με το πλασμίδιο pICH86966/GG-SE-241-242AT>GC:GUS, με γυμνό μάτι, στα υγιή φυτά. Επιπλέον, ο χρωματισμός στις αγρο-εμποτισμένες περιοχές των μολυσμένων φυτών αγρίου τύπου δε φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των αγρο-εμποτισμένων περιοχών με το πλασμίδιο pICH86966/GG-SE:GUS και των αγρο-εμποτισμένων περιοχών με το πλασμίδιο 2000 μεται να διαφέρει μεταξύ των αγρο-εμποτισμένων περιοχών με το πλασμίδιο 2000 μεται να διαφέρει μεταξύ των αγρο-εμποτισμένων περιοχών με το πλασμίδιο 2000 μεται να διαφέρει μεταξύ των αγρο-εμποτισμένων περιοχών με το πλασμίδιο 2000 μεται να διαφέρει μεταξύ των αγρο-εμποτισμένων περιοχών με το πλασμίδιο 2000 μεται να διαφέρει μεταξύ των αγρο-εμποτισμένων περιοχών με το πλασμίδιο 2000 μεται να διαφέρει μεταξύ των αγρο-εμποτισμένων περιοχών με το πλασμίδιο 2000 μεται να διαφέρει μεταξύ των αγρο-εμποτισμένων περιοχών με το πλασμίδιο 2000 μεται να διαφέρει μεταξύ των αγρο-εμποτισμένων περιοχών με το πλασμίδιο 2000 μεται να διαφέρει μεταξύ των αγρο-εμποτισμένων περιοχών με το πλασμίδιο 2000 μεται του αγρο-εμποτισμένων περιοχών με το πλασμίδιο

![](_page_57_Figure_0.jpeg)

**Εικόνα 3.38.** Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό. PC=positive control, NC=negative control, GG-SE:GUS=η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE αγρίου τύπου και GG-SE-241-242AT>GC:GUS=η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 στον υποκινητή αυτού. Ο ιστός είναι φύλλο του φυτού Ν. benthamiana αγρίου τύπου. Με κόκκινο σημαίνεται ο ιστός ο οποίος προέρχεται από μολυσμένα φυτά Ν. benthamiana αγρίου τύπου, με το ιοειδές PSTVd.

Στις Εικόνα 3.39 και Εικόνα 3.40, δίνονται τα αποτελέσματα από δυο ανεξάρτητα πειράματα ιστοχημικού εντοπισμού της δραστικότητας του GUS, όπου παρατηρούνται έντονες μπλε κουκκίδες στο θετικό μάρτυρα, ενώ στον αρνητικό μάρτυρα δεν υπάρχουν καθόλου μπλε κουκκίδες. Οι εντάσεις του μπλε χρώματος απεικονίζουν την έκφραση του γονιδίου SERRATE σε κάθε ιστό, ο οποίος είναι αγρο-εμποτισμένος σε κάθε περίπτωση με τα πλασμίδια pICH86966/GG-SE:GUS και pICH86966/GG-SE-241-242AT>GC:GUS. Έτσι, γίνεται σύγκριση της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE μεταξύ αγρίου τύπου φυτών σε συνθήκες με ή χωρίς βιοτική καταπόνηση καθώς επίσης και πως η μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 επηρεάζει τη μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE μεταξύ SEi φυτών σε συνθήκες με ή χωρίς βιοτική καταπόνηση καθώς επίσης και πως η μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 επηρεάζει τη μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE μεταξύ δραστηριότητας του SERRATE μεταξύ Ει φυτών σε συνθήκες με ή χωρίς βιοτική καταπόνηση καθώς επίσης και πως η μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 επηρεάζει τη μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE μεταξύ Ει φυτών σε συνθήκες με ή χωρίς βιοτική καταπόνηση καθώς επίσης και πως η μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE σε αυτά τα φυτά. Επιπλέον, γίνεται σύγκριση της μεταγραφικής δραστηριότητας του δελαγή στις θέσεις -241-242 επηρεάζει την μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE σε αυτά τα φυτά. Ωστόσο, το φωτογραφικό υλικό από μόνο του δεν είναι δυνατόν να δώσει αποτελέσματα.

![](_page_58_Figure_0.jpeg)

**Εικόνα 3.39.** Πείραμα 3. Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό. PC=positive control, NC=negative control, GG-SE:GUS=η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE αγρίου τύπου και GG-SE-241-242AT>GC:GUS=η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 στον υποκινητή αυτού. Με κόκκινο σημαίνεται ο ιστός ο οποίος προέρχεται από μολυσμένα φυτά, με το ιοειδές PSTVd.

![](_page_58_Figure_2.jpeg)

**Εικόνα 3.40.** Πείραμα 4. Ιστοχημικός εντοπισμός της δραστικότητας του GUS 6 ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό. PC=positive control, NC=negative control, GG-SE:GUS=η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE αγρίου τύπου και GG-SE-241-242AT>GC:GUS=η έκφραση του GUS το οποίο είναι συντηγμένο με τον υποκινητή του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 στον υποκινητή αυτού. Με κόκκινο σημαίνεται ο ιστός ο οποίος προέρχεται από μολυσμένα φυτά, με το ιοειδές PSTVd.

# 4. Συζήτηση

Δεν είναι η πρώτη φορά που μελετάται ο ρόλος της RNA σίγησης ως ρυθμιστικός μηχανισμός και ειδικότερα η συμμετοχή του στη ρύθμιση της σχέσης μεταξύ φυτώνξενιστών, στο εργαστήριό μας αλλά και σε άλλα. Όλες αυτές οι μελέτες, ερευνούσαν το μονοπάτι της σίγησης σε σχέση με την απόκριση σε εξωγενές RNA, είτε ως έκφραση διαγονιδίων ή ως αποτέλεσμα μολύνσεων με ιούς και ιοειδή. Μέσα από αυτές τις έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο όπου εκπονήθηκε η παρούσα εργασία, εντοπίστηκαν παράγοντες του μηχανισμού της σίγησης οι οποίοι επηρεάζουν είτε θετικά ή αρνητικά τη δραστικότητα των παθογόνων (Kryovrysanaki et al. 2019) (Katsarou et al., 2016).

Όσον αφορά τα ιοειδή, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς λόγω της ιδιαιτερότητας της δομής τους πιθανόν να αντιμετωπίζονται ως pri-miRNA. Επιπλέον, τα vdsiRNAs που παράγονται παρουσιάζουν παρόμοια δράση με αυτή των miRNAs, δηλαδή, ρυθμίζουν την έκφραση ενδογενών γονιδίων με αποτέλεσμα να δημιουργούν συνθήκες οι οποίες ευνοούν την επιβίωση και κατ' επέκταση την υπεροχή τους (Wang et al., 2004). Όπως ήδη αναφέρθηκε στην Ενότητα 1, τα ιοειδή είναι ικανά να επάγουν την RNA σίγηση, ενώ παράλληλα αποτελούν και στόχο αυτής (Tabler & Tsagris, 2004).Είγε προταθεί η υπόθεση ότι η ικανότητα των ιοειδώννα ξεφεύγουν από το μηχανισμό της RNA σίγησης οφείλεται στη δευτεροταγή τους δομή (Itaya et al., 2007), ωστόσο, νεότερες μελέτες έδειξαν ότι δε συμβαίνει κάτι τέτοιο. Αντίθετα, μελέτες υποστηρίζουν ότι τα μέλη της οικογένειας Pospiviroidae πιθανόν να έγουν προσαρμοστεί προκειμένου να στογεύουν την επεξεργασία τους από την DCL4, αντί του πιο εχθρικού συνδυασμού DCL2 και/ή DCL3. Παρόλο που υποβάλλονται σε επεξεργασία με DCL4, το ιοειδές υπερβαίνει αυτή την κυτταρική απόκριση για την παραγωγή μιας αποτελεσματικής μόλυνσης του ξενιστή. Η κατανόηση του μηχανισμού των ιοειδών να αποφεύγουν τη δράση της RNA σίγησης με αποτέλεσμα την επιτυχή μόλυνση του ξενιστή παραμένει ενδιαφέρουσα πρόκληση για τη μελέτη της παθογένειας των ιοειδών (Katsarou et al., 2016). Γνωρίζοντας, λοιπόν, όλα τα παραπάνω, εστιάσαμε στη σχέση μεταξύ του miRNA μονοπατιού της σίγησης και των ιοειδών. Για το σκοπό αυτό, το εργαστήριο ήδη είχε δημιουργήσει φυτά με κατεσταλμένη λειτουργικότητα του μονοπατιού της σίγησης και με αυτό το τρόπο κατέστη δυνατή η μελέτη της επίδρασης τους στη μολυσματικότητα των ιοειδών. Η καταστολή του miRNA μονοπατιού της σίγησης, δε θα μπορούσε να επιτευχθεί καταστέλλοντας τον βασικό παράγοντα του μονοπατιού, την DCL1, διότι ισχυρή καταστολή αυτής προκαλεί θνησιμότητα των φυτών. Συνεπώς, η διατάραξη του μονοπατιού βασίστηκε στην καταστολή της έκφρασης ενός άλλου σημαντικού ρυθμιστή του μονοπατιού, την πρωτεΐνη SERRATE. Έχοντας λοιπόν στα χέρια μας αγρίου τύπου φυτά καθώς και κατεσταλμένα ως προς την έκφραση του SERRATE, προχωρήσαμε σε μολύνσεις με το ιοειδές PSTVd ώστε να διαπιστωθεί η σχέση του ιοειδούς με το miRNA μονοπάτι της σίγησης, σε μεταγραφικό επίπεδο.

Πραγματοποιήθηκαν 2 σειρές πειραμάτων, μια χωρίς κανονικοποίηση των τιμών και μια με κανονικοποίηση των τιμών με τη χρήση της GFP. Ωστόσο θα εστιάσουμε μόνο στη δεύτερη σειρά πειραμάτων ώστε να οδηγηθούμε σε κάποιο συμπέρασμα σχετικά με τα υπο μελέτη ερωτήματα που μας απασχόλησαν.

## 4.1 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του SERRATE κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης

Από πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί προηγουμένως στο εργαστήριό μας, υπάρχουν ενδείξεις για άμεση συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της μόλυνσης και των επιπέδων της πρωτεΐνης SERRATE. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε μετά από παρατήρηση υγιών και μολυσμένων φυτών του ίδιου γονοτύπου, και δείχθηκε ότι υπάρχει αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης SERRATE μετά από τη μόλυνση με το ιοειδές PSTVd. Ωστόσο, η αύξηση αυτή, σημειώνεται και σε επίπεδο μεταγράφων στα NbSEi, αλλά όχι στα αγρίου τύπου φυτά. Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι φυτά με χαμηλή έκφρασή του γονιδίου SERRATE είχαν χαμηλά επίπεδα του ιοειδούς PSTVd, ενώ υπήρχαν και φυτά που δε είχαν μολυνθεί καθόλου.

Στην παρούσα εργασία, τα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου SERRATE στα φυτά SEi σε σύγκριση με την μεταγραφή του στα αγρίου τύπου φυτά, δε φάνηκε να υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (Εικόνα 3.5). Επιπλέον, αναλύθηκε η επίδραση του ιοειδούς PSTVd στη διαφοροποίηση των επιπέδων των μεταγράφων του γονιδίου SERRATE, και απεικονίζεται στα διαγράμματα της Εικόνας 3.11. Συγκεκριμένα, στην Εικόνα 3.11Α φαίνεται ότι η μεταγραφή του γονιδίου SERRATE δε διαφέρει μεταξύ των υγιών και μολυσμένων φυτών αγρίου τύπου. Στην Εικόνα 3.11Β, φαίνεται πως η μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου SERRATE δεν επηρεάζεται ούτε στα SEi φυτά.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων συγκεντρωτικά δεν ήταν δυνατή καθώς δεν πραγματοποιήθηκαν ποσοτικοποιήσεις των επιπέδων του ιοειδούς για το κάθε φυτό. Τα SEi φυτά έχουν καταστολή του γονιδίου SERRATE, συνεπώς, είναι αναμενόμενο και τα μετάγραφα αυτού να βρίσκονται σε χαμηλότερα επίπεδα. Καθώς τα επίπεδα της πρωτεΐνης που παράγει ένα γονίδιο βρίσκεται σε εξάρτηση με τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου και τον ρυθμό αποδόμησης της πρωτεΐνης, πιθανώς στα SEi φυτά να μειώνεται ο ρυθμός αποδόμησης της πρωτεΐνης, οδηγώντας τελικά στην αύξηση της συσσώρευσής του SERRATE, κάτι που φάνηκε σε προηγούμενες μελέτες.

# 4.2 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγών στη μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE

Ένας από τους στόχους της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του υποκινητή του γονιδίου SERRATE. Πιο συγκεκριμένα, έπειτα από βιοπληροφορική ανάλυση και σύγκριση του υποκινητή του SERRATE από διαφορετικά φυτά, βρέθηκε ότι στο φυτό N. tabacum υπάρχουν 2 επιπλέον θέσεις έναρξης της μεταγραφής (ATGs), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.14. Όπως προαναφέρθηκε, πολλά γονίδια διαθέτουν ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, τα οποία ρυθμίζουν τη μεταγραφή. Συγκεκριμένα, τα ORFs είναι εξαιρετικά άφθονα στο γονιδίωμα των αγγειόσπερμων, και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση (Von Arnim et al., 2014). Επιπλέον, η ύπαρξη μη μεταφραστικών περιοχών στα mRNAs των φυτών είναι ικανές να δημιουργούν πολλαπλές παραλλαγές mRNAs του ίδιου γονιδίου. Αυτή η ικανότητα, που διαθέτουν ιδιαίτερα οι 5' αμετάφραστες περιοχές (5' UTRs) στοχεύει σε διαφορετικούς τρόπους ρύθμισης τόσο της αύξησης και ανάπτυξης των φυτών, όσο και στον μηχανισμό άμυνας αυτών σε διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης (Holly A. Swartz, Jessica C. Levenson,

2012). Συνεπώς, στην παρούσα εργασία, θελήσαμε, επιπλέον, να διαλευκάνουμε εάν και κατά πόσο αυτές οι επιπλέον θέσεις έναρξης της μεταγραφής διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη μεταγραφή του γονιδίου SERRATE, τόσο σε συνθήκες απουσίας όσο και παρουσίας βιοτικής καταπόνησης.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να απαντηθεί το ερώτημα εάν η επιπλέον θέση ATG, η οποία βρίσκεται στις θέσεις -140-141-142, επηρεάζει είτε θετικά ή αρνητικά την μεταγραφή του γονιδίου SERRATE. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων απεικονίζονται στην **Εικόνα 3.30**. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η μεταλλαγή στις θέσεις -241-242, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της θέσης έναρξης της μεταγραφής από το αμινοξύ μεθειονίνη σε αλανίνη δεν επηρεάζει τη μεταγραφή του γονιδίου SERRATE ούτε στα αγρίου τύπου φυτά αλλά ούτε στα διαγονιδιακά (**Εικόνα 3.31**). Ωστόσο, είναι πιθανόν οι ριβοσωμικές υπομονάδες να προσδένονται «λανθασμένα» στη θέση ATG η οποία βρίσκεται στην 5' αμετάφραστη περιοχή του υποκινητή του γονιδίου SERRATE, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο την απόδοση της μεταγραφής δρώντας είτε συνεργατικά είτε ανταγωνιστικά με την «πραγματική» θέση εναρξης της μεταγραφής.

# 4.3 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγών στη μεταγραφική δραστηριότητα του SERRATE κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να διαλευκάνουμε εάν και κατά πόσο αυτή η επιπλέον θέση έναρξης της μεταγραφής, που βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου SERRATE, στις θέσεις -240-241-242, διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη μεταγραφή του γονιδίου κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης.

Η συλλογή και επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών των πειραμάτων, έδειξε ότι δεν υπάρχει διαφορά στα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου SERRATE που φέρει τη μεταλλαγή στις θέσεις -241-242 μεταξύ υγιών και μολυσμένων φυτών αγρίου τύπου όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.36. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε πειράματα στα διαγονιδιακά φυτά (Εικόνα 3.37).

## Μελλοντικά πλάνα

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας καταφέραμε να αποκτήσουμε μόνο ενδείξεις για το τι συμβαίνει μεταξύ του ιοειδούς και του miRNA μονοπατιού της RNA σίγησης, σε μεταγραφικό επίπεδο. Ωστόσο, δε διαλευκάνθηκε ο ακριβής μηχανισμός της σχέσης ιοειδούς- miRNA μονοπατιού. Για να μπορέσουμε να φτάσουμε σε αυτό το σημείο, θα πρέπει να επαναληφθεί η ίδια διαδικασία και να διεξαχθεί η μέθοδος της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (quantitative PCR, qPCR), μέσω της οποίας θα αναλυθεί η έκφραση του γονιδίου SERRATE μέσω της ανίχνευσης των μεταγράφων, σε επίπεδο RNA. Επιπλέον, θα μπορούσε να γίνει μια προσέγγιση των επιπέδων της μόλυνσης των φυτών για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει κάποια συσχέτιση των επιπέδων της μόλυνσης με το μηχανισμό της RNA σίγησης. Αυτό θα έριχνε φως και στο γιατί υπάρχει σχετικά μεγάλη απόκλιση μεταξύ των τιμών που πήραμε από την πειραματική διαδικασία παρόλο που οι τιμές κανονικοποιήθηκαν με όποιο δυνατό τρόπο.

# 5. Βιβλιογραφία

- Abraitiene, A., Zhao, Y., & Hammond, R. (2008). Nuclear targeting by fragmentation of the Potato spindle tuber viroid genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(3), 470–475. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.043
- Adkar-Purushothama, C. R., & Perreault, J. P. (2018). Alterations of the viroid regions that interact with the host defense genes attenuate viroid infection in host plant. *RNA Biology*, 15(7), 955–966. https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1462653
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, *431*(7006), 356–363. https://doi.org/10.1038/nature02874
- Bouché, N., Lauressergues, D., Gasciolli, V., & Vaucheret, H. (2006). An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO Journal*, 25(14), 3347–3356. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601217
- Bozorov, T. A., Baldwin, I. T., & Kim, S. G. (2012). Identification and profiling of miRNAs during herbivory reveals jasmonate-dependent and -independent patterns of accumulation in Nicotiana attenuata. *BMC Plant Biology*, 12. https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-209
- Chen, Q., Lai, H., Hurtado, J., Stahnke, J., Leuzinger, K., & Dent, M. (2014). Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Adv Tech Biol Med.*, 1(1), 1–21. https://doi.org/10.4172/atbm.1000103.Agroinfiltration
- Di Serio, F., Flores, R., Verhoeven, J. T. J., Li, S. F., Pallás, V., Randles, J. W., Sano, T., Vidalakis, G., & Owens, R. A. (2014). Current status of viroid taxonomy. *Archives of Virology*, 159(12), 3467–3478. https://doi.org/10.1007/s00705-014-2200-6
- Diener, T. O. (1971). IV. A Replicating, Virology, 428, 411-428.
- Dissanayaka Mudiyanselage, S. D., Qu, J., Tian, N., Jiang, J., & Wang, Y. (2018). Potato spindle tuber viroid RNA-templated transcription: Factors and regulation. *Viruses*, 10(9), 1–11. https://doi.org/10.3390/v10090503
- Eamens, A. L., Smith, N. A., Dennis, E. S., Wassenegger, M., & Wang, M. B. (2014). In Nicotiana species, an artificial microRNA corresponding to the virulence modulating region of Potato spindle tuber viroid directs RNA silencing of a soluble inorganic pyrophosphatase gene and the development of abnormal phenotypes. *Virology*, 450–451, 266–277. https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.12.019
- Eamens, A., Wang, M. B., Smith, N. A., & Waterhouse, P. M. (2008). RNA silencing in plants: Yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiology*, 147(2), 456–468. https://doi.org/10.1104/pp.108.117275
- Gas, M. E., Hernández, C., Flores, R., & Daròs, J. A. (2007). Processing of nuclear viroids in vivo: An interplay between RNA conformations. *PLoS Pathogens*, 3(11). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030182
- Hamilton, A. J., & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in

posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441), 950–952. https://doi.org/10.1126/science.286.5441.950

- Holly A. Swartz, Jessica C. Levenson, and E. F. U. (2012). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *43*(2), 145–153. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.11.003.UTR
- Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A. R., Molina, C., Nelson, R. S., & Ding, B. (2007). A Structured Viroid RNA Serves as a Substrate for Dicer-Like Cleavage To Produce Biologically Active Small RNAs but Is Resistant to RNA-Induced Silencing Complex-Mediated Degradation. *Journal of Virology*, 81(6), 2980–2994. https://doi.org/10.1128/jvi.02339-06
- Jefferson, R. A. (1989). The GUS reporter gene system. *Nature*, *342*(6251), 837–838. https://doi.org/10.1038/342837a0
- Jiang, J., Smith, H. N., Ren, D., Dissanayaka Mudiyanselage, S. D., Dawe, A. L., Wang, L., & Wang, Y. (2018). Potato Spindle Tuber Viroid Modulates Its Replication through a Direct Interaction with a Splicing Regulator. *Journal of Virology*, 92(20). https://doi.org/10.1128/jvi.01004-18
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *57*, 19–53. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218
- 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. https://doi.org/10.1128/jvi.00974-07
- Kapoor, M., Arora, R., Lama, T., Nijhawan, A., Khurana, J. P., Tyagi, A. K., & Kapoor, S. (2008). Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice. *BMC Genomics*, 9, 1–17. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-451
- Katsarou, K., Mavrothalassiti, E., Dermauw, W., Van Leeuwen, T., & Kalantidis, K. (2016). Combined Activity of DCL2 and DCL3 Is Crucial in the Defense against Potato Spindle Tuber Viroid. *PLoS Pathogens*, 12(10), 1–24. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005936
- Katsarou, K., Mitta, E., Bardani, E., Oulas, A., Dadami, E., & Kalantidis, K. (2019). DCL-suppressed Nicotiana benthamiana plants: valuable tools in research and biotechnology. *Molecular Plant Pathology*, 20(3), 432–446. https://doi.org/10.1111/mpp.12761
- Keese, P., & Symons, R. H. (1985). Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(14), 4582– 4586. https://doi.org/10.1073/pnas.82.14.4582
- Kryovrysanaki, N., Alexiadis, A., Grigoriadou, A. M., Katsarou, K., & Kalantidis, K. (2019). SERRATE, a miRNA biogenesis factor, affects viroid infection in Nicotiana benthamiana and Nicotiana tabacum. *Virology*, 528(December 2018),

164-175. https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.12.011

- Mackie, A. E., Rodoni, B. C., Barbetti, M. J., McKirdy, S. J., & Jones, R. A. C. (2016). Potato spindle tuber viroid: alternative host reservoirs and strain found in a remote subtropical irrigation area. *European Journal of Plant Pathology*, 145(2), 433–446. https://doi.org/10.1007/s10658-016-0857-2
- Maniataki, E., Tabler, M., & Tsagris, M. (2003). Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein VirP1. *Rna*, 9(3), 346–354. https://doi.org/10.1261/rna.2162203
- Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B., & Matzke, A. J. (2009). RNAmediated chromatin-based silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(3), 367–376. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.01.025
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins: Functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*, 14(7), 447–459. https://doi.org/10.1038/nrg3462
- Millar, A. A., & Waterhouse, P. M. (2005). Plant and animal microRNAs: Similarities and differences. *Functional and Integrative Genomics*, 5(3), 129–135. https://doi.org/10.1007/s10142-005-0145-2
- Morillo, S. A., & Tax, F. E. (2006). Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots. *Current Opinion in Plant Biology*, *9*(5), 460–469. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.07.009
- Nakasugi, K., Crowhurst, R. N., Bally, J., Wood, C. C., Hellens, R. P., & Waterhouse, P. M. (2013). De Novo Transcriptome Sequence Assembly and Analysis of RNA Silencing Genes of Nicotiana benthamiana. *PLoS ONE*, 8(3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059534
- Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M. E., Delgado, S., Flores, R., & Di Serio, F. (2012). Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast- replicating viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *Plant Journal*, 70(6), 991–1003. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04940.x
- Nohales, M. Á., Flores, R., & Daròs, J. A. (2012). Viroid RNA redirects host DNA ligase 1 to act as an RNA ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), 13805–13810. https://doi.org/10.1073/pnas.1206187109
- Owens, R. A. (2007). Potato spindle tuber viroid: The simplicity paradox resolved? *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 549–560. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00418.x
- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., & Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 425(6955), 257–263. https://doi.org/10.1038/nature01958
- Prigge, M. J., & Ry Wagner, D. (2001). The Arabidopsis SERRATE gene encodes a zinc-finger protein required for normal shoot development. *Plant Cell*, 13(6), 1263–1279. https://doi.org/10.1105/tpc.13.6.1263
- Pumplin, N., & Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: Defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews*

Microbiology, 11(11), 745–760. https://doi.org/10.1038/nrmicro3120

- Qin C., Li B., Fan Y., Zhang X., Yu Z., Ryabov E., Zhao M., Wang H., Shi N., Zhang P., Jackson S., Tör M., Cheng Q., Liu Y., Gallusci P. & Hong Y. (2017). Roles of dicer-like proteins 2 and 4 in intra- and intercellular antiviral silencing. *Plant Physiology*, 174(2), 1067-1081. doi: 10.1104/pp.17.00475
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes and Development*, 16(13), 1616–1626. https://doi.org/10.1101/gad.1004402
- Rossman, T. G., & Wang, Z. (1999). Expression cloning for arsenite-resistance resulted in isolation of tumor-suppressor fau cDNA: Possible involvement of the ubiquitin system in arsenic carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 20(2), 311–316. https://doi.org/10.1093/carcin/20.2.311
- Schindler, I. M., & Mühlbach, H. P. (1992). Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Science*, 84(2), 221–229. https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90138-C
- Smith, H. A., Swaney, S. L., Parks, T. D., Wernsman, E. A., & Dougherty, W. G. (1994). Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: Expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell*, 6(10), 1441–1453. https://doi.org/10.2307/3869980
- Stepien, A., Knop, K., Dolata, J., Taube, M., Bajczyk, M., Barciszewska-Pacak, M., Pacak, A., Jarmolowski, A., & Szweykowska-Kulinska, Z. (2017).
  Posttranscriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(3). https://doi.org/10.1002/wrna.1403
- Tabler, M., & Tsagris, M. (2004). Viroids: Petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends in Plant Science*, 9(7), 339–348. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.05.007
- Vance, V., & Vaucheret, H. (2001). RNA silencing in plants Defense and counterdefense. *Science*, 292(5525), 2277–2280. https://doi.org/10.1126/science.1061334
- Verhoeven, J. T. J., Hüner, L., Marn, M. V., Plesko, I. M., & Roenhorst, J. W. (2010). Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of Brugmansia suaveoles, Solanum jasminoides and potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128(4), 417–421. https://doi.org/10.1007/s10658-010-9675-0
- Vogler, H., Kwon, M. O., Dang, V., Sambade, A., Fasler, M., Ashby, J., & Heinlein, M. (2008). Tobacco mosaic virus movement protein enhances the spread of RNA silencing. *PLoS Pathogens*, 4(4). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000038
- Voinnet, O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, *136*(4), 669–687. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046
- Voinnet, O., Lederer, C., & Baulcombe, D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in Nicotiana benthamiana. *Cell*, *103*(1), 157–167. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00095-7

Voisin, D., Nawrath, C., Kurdyukov, S., Franke, R. B., Reina-Pinto, J. J., Efremova,

N., Will, I., Schreiber, L., & Yephremov, A. (2009). Dissection of the complex phenotype in cuticular mutants of Arabidopsis reveals a role of SERRATE as a mediator. *PLoS Genetics*, *5*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000703

- Von Arnim, A. G., Jia, Q., & Vaughn, J. N. (2014). Regulation of plant translation by upstream open reading frames. *Plant Science*, *214*, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.09.006
- Waring, M. J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 269–282. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80096-1
- Wassenegger, M., Spieker, R. L., Thalmeir, S., Gast, F. U., Riedel, L., & Sänger, H. L. (1996). A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for Nicotiana tabacum. *Virology*, 226(2), 191–197. https://doi.org/10.1006/viro.1996.0646

# 6. Παράρτημα

Πίνακας 6.1. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταλλαξιγένεση σημείου.

Εκκινητής	Αλληλουχία
GG-SE-241-242AT>GC:GFP Forward	5'- GCAAAAGCTCATTTCGCGTGGGAACTTTAAGTAAT -3'
& GG-SE-241-242AT>GC:GFP Reverse	5'- ACTTAAAGTTCCCACGCGAAATGAGCTTTTGCTTT -3'
GG-SE-241-242AT>GC:GUS Forward	5'- GCAAAAGCTCATTTCGCGTGGGAACTTTAAGTAAT -3'
& GG-SE-241-242AT>GC:GUS Reverse	5'- ACTTAAAGTTCCCACGCGAAATGAGCTTTTGCTTT -3'
GG-SE-199-200AT>GC:GFP Forward	5'-GTAATTAAAGAATACTTTTGGGGGGTAAGCGAAAACATTTTATCTCCTCCAAACTCC-3'
& GG-SE-199-200AT>GC:GFP Reverse	5'-GGAGTTTGGAGGAGATAAAATGTTTTCGCTTACCCCCAAAAGTATTCTTTAATTAC-3'
GG-SE-199-200AT>GC:GUS Forward	5'-GTAATTAAAGAATACTTTTGGGGGGTAAGCGAAAACATTTTATCTCCTCCAAACTCC-3'
& GG-SE-199-200AT>GC:GUS Reverse	5'-GGAGTTTGGAGGAGATAAAATGTTTTCGCTTACCCCCAAAAGTATTCTTTAATTAC-3'

![](_page_67_Figure_0.jpeg)

**Εικόνα 6.1.** Οι DNA μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Αριστερά ο λ DNA/PstI και δεζιά ο Long Range DNA, με τις αντίστοιχες ζωνώσεις που δίνουν όταν ηλεκτροφορηθούν παράλληλα με τα υπο μελέτη δείγματα.

![](_page_67_Figure_2.jpeg)

Εικόνα 6.2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς 4-ΜU.

![](_page_68_Figure_0.jpeg)

Εικόνα 6.3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Bradford με τη χρήση βόειας αλβουμίνης (BSA).