**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΠΜΣ Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

# "Μελέτη της επίδρασης της καταστολής της DCL3 στην μεταμεταγραφική σίγηση διαγονιδίου μάρτυρα."

Μαυροθαλασσίτη Ελένη

Επιβλέπων Καθηγητής
Αν. Καθηγητής Καλαντίδης Κρίτων

## Ευχαριστίες

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας μου, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κρίτων Καλαντίδη για την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση. Επίσης, ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Ευθυμία Τσαγρή και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σωτήριο Καμπράνη για τις παρατηρήσεις και τις διορθώσεις τους στην εργασία μου.

Οφείλω ευχαριστίες στον Dr. Frederic Verret που είχε αναλάβει την τεχνική επίβλεψη της εργασίας μου και ήταν πάντα πρόθυμος να συζητήσει τόσο το σχεδιασμό όσο και τα τεχνικά προβλήματα που κατά καιρούς με αποθάρρυναν. Σε αυτό το πλαίσιο θέλω να ευχαριστήσω και την Dr. Νάντια Κατσαρού, τον Γιάννη Βλατάκη και την Νικολέτα Κρυοβρυσανάκη καθώς μου έχουν αφιερώσει πάρα πολύ χρόνο και ήταν πολύ μεγάλη η βοήθεια που μου πρόσφεραν.

Φυσικά θέλω να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, την Αιμιλία Γρυπιώτη και τη Ρίτα Μέρμηγκα για όσα μου έμαθαν. Και ιδιαιτέρως τη Λένα Μήττα και τον Βασίλη Σκαλτσογιάννη τόσο για την βοήθεια στο πειραματικό μέρος της διατριβής μου αλλά και για την ευχάριστη ατμόσφαιρα στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και ιδιαιτέρως την μητέρα μου που με εμπνέει και με υποστηρίζει σε κάθε μου βήμα.

# Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες ..... 3

Περίληψη ..... 5

Abstract ..... 7

Μέρος 1ο: "Μελέτη της επίδρασης της καταστολής της DCL3 στην μεταμεταγραφική σίγηση διαγονιδίου μάρτυρα." ..... 8

Εισαγωγή ..... 8

1.1 RNA σίγηση ..... 8

1.2 Τα βασικά ένζυμα ..... 9

1.3 Τα μονοπάτια της RNA σίγησης ..... 11

1.3.1 TGS ..... 12

1.3.2 PTGS ..... 12

1.4 Παρουσίαση των φυτών μοντέλων ..... 14

1.4.1 Φυτά DCL3i ..... 14

1.4.2 Φυτά GFP6.4 ..... 16

1.4.3 Φυτά DCL3.1i×GFP6.4 ..... 17

1.5 Προκαταρκτικά αποτελέσματα ..... 18

1.6 Σκοπός: ..... 19

Υλικά και μέθοδοι ..... 21

2.1. Φαινοτυπικές μέθοδοι ..... 21

2.1.1 Παρατήρηση φαινότυπου GFP ..... 21

2.1.2 Επαγωγή της σίγησης με παροδική υπερέκφραση μέσω αγροεμποτισμού ..... 21

2.1.3 Μελέτη διάσχισης (segregation analysis) ..... 22

2.2 Μοριακές μέθοδοι ..... 23

2.2.1 Στύπωμα τύπου Southern ..... 23

2.2.2 Υβριδοποίηση ..... 25

2.2.3 Ανοσοανίχνευση ..... 25

Αποτελέσματα ..... 27

3.1 Μελέτη φυτών DCL3.1i×GFP6.4 ..... 27

3.2 Μελέτη φυτών GFP6.4 ..... 31

Συζήτηση ..... 41

4.1 Γενετικό υπόβαθρο GFP6.4 ..... 41

4.2 Φαινότυπος GFP6.4 NS ..... 42

Βιβλιογραφία ..... 44

Μέρος 2$^{o}$: “Διερεύνηση της επίδρασης της υπερέκφρασης του αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου ενζύμου DXS από το φυτό *Salvia pomifera την* βιοσύνθεση τερπενοειδών ενώσεων σε διαγονιδιακές σειρές *Nicotiana benthamiana*.” ..... 47
Εισαγωγή ..... 47
1.1 Δευτερογενής μεταβολισμός: ..... 47
1.2. Τερπένια: ..... 47
1.3. Βιοσύνθεση των τερπενίων: ..... 48
1.4 Βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις ..... 50
1.5 Το ένζυμο DXS ..... 50
1.6 Σκοπός ..... 51
Υλικά και μέθοδοι: ..... 52
2.1. Μελέτη διάσχισης (segregation analysis) ..... 52
2.2. Ομογενοποίηση φυτικού ιστού ..... 52
2.3. Απομόνωση γενομικού DNA ..... 52
2.4. Απομόνωση ολικού RNA ..... 53
2.5. Σύνθεση cDNA ..... 54
2.6. PCR ..... 54
Αποτελέσματα: ..... 55
3.1. Μελέτη διάσχισης (segregation analysis) ..... 55
3.2. Έλεγχος παρουσίας του γονιδίου στα φυτά ..... 56
3.3. Έλεγχος έκφρασης του διαγονιδίου ..... 57
Συζήτηση: ..... 58
Βιβλιογραφία ..... 59

## Περίληψη

Η παρούσα εργασία αναπτύσσεται σε δυο μέρη. Το πρώτο μέρος είναι η «Μελέτη της επίδρασης της καταστολής της DCL3 στην μεταμεταγραφική σίγηση διαγονιδίου μάρτυρα».

Η RNA σίγηση (RNA silencing ή RNA interference, RNAi) είναι η στοχευμένη καταστολή της γονιδιακής έκφρασης μέσω της συμμετοχής του RNA. Τα φυτά χρησιμοποιούν την RNA σίγηση για τρεις κυρίως σκοπούς: 1) τη δημιουργία και διατήρηση της ετεροχρωματίνης, 2) τη ρύθμιση ενδογενών γονιδίων και 3) την άμυνα

ενάντια σε ιογενείς και βακτηριακές μολύνσεις. Η αντι-ιική RNA σίγηση ενεργοποιείται από δίκλωνα RNA μόρια (dsRNAs) τα οποία μπορεί να προκύψουν κατά την αντιγραφή των ιών ή από το σχηματισμό δίκλωνων δομών στο ιικό γονιδίωμα. Από τα dsRNAs στη συνέχεια προκύπτουν μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA (siRNAs) που αποτελούν τους οδηγούς για την μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (PTGS) του RNA του ιού.

Στα πλαίσια αυτού του γνωστικού αντικειμένου επιχειρήθηκε να διερευνηθεί ένας πιθανός εναλλακτικός ρόλος της DCL3, ενός ενζύμου που στην βιβλιογραφία έχει συνδεθεί με το μονοπάτι που οδηγεί στη δημιουργία και διατήρηση της ετεροχρωματίνης. Η παρούσα μελέτη διερευνά τον ρόλο του ενζύμου αυτού στο μονοπάτι της μεταμεταγραφικής σίγησης. Στα πλαίσια της προσέγγισης της απάντησης εξετάζεται η μεταμεταγραφική σίγηση του διαγονιδίου στόχου GFP σε διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα.

Το δεύτερο μέρος αφορά τη «Διερεύνηση της επίδρασης της υπερέκφρασης του αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου ενζύμου DXS από το φυτό *Salvia pomifera*(φασκόμηλο) στην βιοσύνθεση τερπενοειδών ενώσεων σε διαγονιδιακές σειρές *Nicotiana benthamiana*». Αυτό το σκέλος της παρούσας εργασίας αποτελεί την συνέχεια προηγούμενης εργασίας που εκπονήθηκε στο εργαστήριο και έχει ως στόχο την παραγωγή φυτών με υπερέκφραση ενός γενετικά βελτιωμένου ενζύμου DXS.

## Abstract

This study is divided in two parts. The first part is about the "Study of the effect of DCL3 downregulation in the post transcriptional silencing of a reporter gene".

RNA silencing is the sequence-specific suppression of gene expression through the involvement of RNA. Plants use RNA silencing mostly for three purposes: 1) establishment and maintenance of heterochromatin state, 2) regulation of several endogenous genes and 3) antiviral defense. The trigger of antiviral RNA silencing is a double-stranded RNA that can occur during viral replication or in dsRNA structures into the viral genome. The dsRNAs are then processed into short interfering RNAs (siRNAs) and lead the post-transcriptional gene silencing (PTGS) of the viral RNA. Viruses encode for proteins that suppress RNA silencing, enabling the infection and its spread. Viral suppressors can target either the RNA molecules or the proteins and the complexes participating in the silencing pathway.

As part of the effort to understand the biology of the silencing mechanism in total, this study addresses the issue of a possible alternative role of the enzyme DCL3, which in the bibliography has been connected to the branch of silencing mechanism that leads to the formation and maintenance of heterochromatin. We investigated the role of this enzyme in the path of post transcriptional gene silencing. Trying to answer this question we investigated the post transcriptional gene silencing of the reporter gene GFP in different genetic backgrounds.

The second part of this report is the "Investigation of the effect of the overexpression of the wild type and the mutated DXS enzyme of the plant *Salvia pomifera*in the terpene production in transgenic *Nicotiana benthamiana* lines". This part of the study follows some previous work as part of a Bachelor's thesis and aims to produce stable plant lines overproducing an improved DXS enzyme.

## Μέρος 1ο: "Μελέτη της επίδρασης της καταστολής της DCL3 στην μεταμεταγραφική σίγηση διαγονιδίου μάρτυρα."

## Εισαγωγή

### 1.1 RNA σίγηση

Ο όρος RNA σίγηση (RNA silencing ή RNA interference, RNAi) αναφέρεται γενικώς σε μια ομάδα μηχανισμών που ρυθμίζουν ή καταστέλλουν την έκφραση συγκεκριμένων αλληλουχιών. Αυτές μπορεί να είναι γενετικές αλληλουχίες του ίδιου του οργανισμού (γονίδια ή επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, repetitive elements) ή αλληλουχίες εξωγενούς προέλευσης. Στην πρώτη περίπτωση συγκεκριμένοι μηχανισμοί της RNA σίγησης ρυθμίζουν την έκφραση ενδογενών γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του οργανισμού ή την απόκρισή του σε ακραίες συνθήκες στο περιβάλλον του (stress), επηρεάζοντας την σχετική ποσότητα των μεταγράφων τους στο κυτταρόπλασμα ή παρεμποδίζοντας την μεταγραφή ή την μετάφρασή τους. Στην δεύτερη περίπτωση οι αλληλουχίες εξωγενούς προέλευσης μπορεί να προέρχονται είτε από παθογόνα όπως βακτήρια, μύκητες και ιοί οπότε ο μηχανισμός της σίγησης λειτουργεί ως άμυνα ενάντια στην παρασιτική έκφραση γονιδίων του παθογόνου.

Ο μηχανισμός της RNA σίγησης είναι συντηρημένος στους περισσότερους ευκαρυώτες (Meister *et al.*, 2004) και από την ανακάλυψή του τα φυτά έχουν αποτελέσει βασικό οργανισμό μοντέλο για την μελέτη του.

Το βασικό χαρακτηριστικό των μηχανισμών της σίγησης είναι ότι ενεργοποιούνται από δίκλωνο RNA (dsRNA) και προκαλούν στοχευμένη καταστολή της έκφρασης των γονιδίων που περιέχουν αλληλουχίες ταυτόσημες ή με μεγάλη ομολογία με το αρχικό dsRNA. Στα φυτά, η RNA σίγηση δρα τόσο σε επίπεδο RNA όσο και DNA. Σε επίπεδο RNA περιλαμβάνονται η μεταμεταγραφική γονιδιακή σίγηση (Post Transcriptional Gene Silencing, PTGS) με άμεση καταστροφή του mRNA και η μεταφραστική καταστολή, ενώ σε επίπεδο DNA περιλαμβάνεται η μεθυλίωση DNA ή/και ιστονών και εν συνεχεία η μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (Transcriptional Gene Silencing, TGS), μέσω του σχηματισμού και συντήρησης της ετεροχρωματίνης (Hamilton *et al.* 2002, Wassenegger *et al.*, 2005).

Η βάση όλων των μηχανισμών της σίγησης είναι η ειδική αναγνώριση του δίκλωνου RNA (dsRNA) και η πέψη του σε μικρά RNA (small RNA, sRNA) μήκους 20-24

νουκλεοτιδίων. Αυτή η αναγνώριση γίνεται από εξειδικευμένα ένζυμα του μηχανισμού διαφορετικά ανάλογα με την φύση και την προέλευση των dsRNAs.

## 1.2 Τα βασικά ένζυμα

Η RNA σίγηση ενεργοποιείται από δίκλωνα RNA (dsRNAs). Τα ένζυμα DICER, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια RNAσών τύπου III, κόβουν το δίκλωνο RNA σε τμήματα μήκους 20-24 νουκλεοτιδίων, τα αποκαλούμενα μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (small interfering RNAs, siRNAs) (Bernstein *et al*. 2001). Η μία από τις δύο αλυσίδες των siRNAs ενσωματώνεται στο σύμπλεγμα RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Η αλληλουχία RNA που ενσωματώνεται στο RISC υβριδίζεται με το συμπληρωματικό RNA-στόχο ενεργοποιώντας τη νουκλεάση του συμπλόκου RISC η οποία κατακερματίζει τον στόχο. Το RISC έχει τη δυνατότητα να ανακυκλωθεί και να αποικοδομήσει πολλά mRNA-στόχους. Συνεπώς, από μια αλληλουχία που έχει εισαχθεί σε ένα κύτταρο σε περιορισμένη ποσότητα, καθίσταται δυνατή η εκθετική σίγηση μεγάλου αριθμού μορίων mRNA (Hutvágner & Zamore 2002), όπως περιγραφεται παρα κατω.

**RdRPs**

Η παρουσία των μικρών δίκλωνων RNA (dsRNAs) στο κυτταρόπλασμα είναι προϊόν της δράσης ειδικών ενζύμων, των RNA-εξαρτώμενων-RNA-πολυμερασών (RNA-dependent-RNA-polymerases, RdRPs). Οι RdRPs είναι ένζυμα που καταλύουν την σύνθεση RNA από RNA μήτρα. Ένζυμα με την ίδια δράση, χρησιμοποιούν οι RNA ιοί για την αντιγραφή τους, χωρίς ενδιάμεσο στάδιο μετατροπής του RNA σε DNA. Πλέον είναι γνωστό ότι και οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν RdRPs οι οποίες αντιγράφουν και πολλαπλασιάζουν τα μη φυσιολογικά (aberrant) RNA τα οποία θα αποτελέσουν μήτρα για την παραγωγή των μικρών RNA, ενισχύοντας έτσι το σήμα της σίγησης (Iyer *et al*. 2003). Αν και επιτελούν ουσιαστικά την ίδια λειτουργία (σύνθεση RNA από μήτρα RNA), οι κυτταρικές και οι ιικές RdRPs έχουν ανομοιότητα και στην αλληλουχία και στην δομή τους. Στα φυτά, οι κυτταρικές RdRPs έχουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή μικρών RNA μορίων κατά τη μόλυνση από ιούς (Diaz-Pendon *et al*. 2007). Οι RDR1, RDR2 και RDR6 είναι οι τρεις λειτουργικές πολυμεράσες στην *Arabidopsis thaliana* και την *Nicotiana benthamiana (N. benthamiana)* (Nakasugi et al. 2013).

**DICERs**

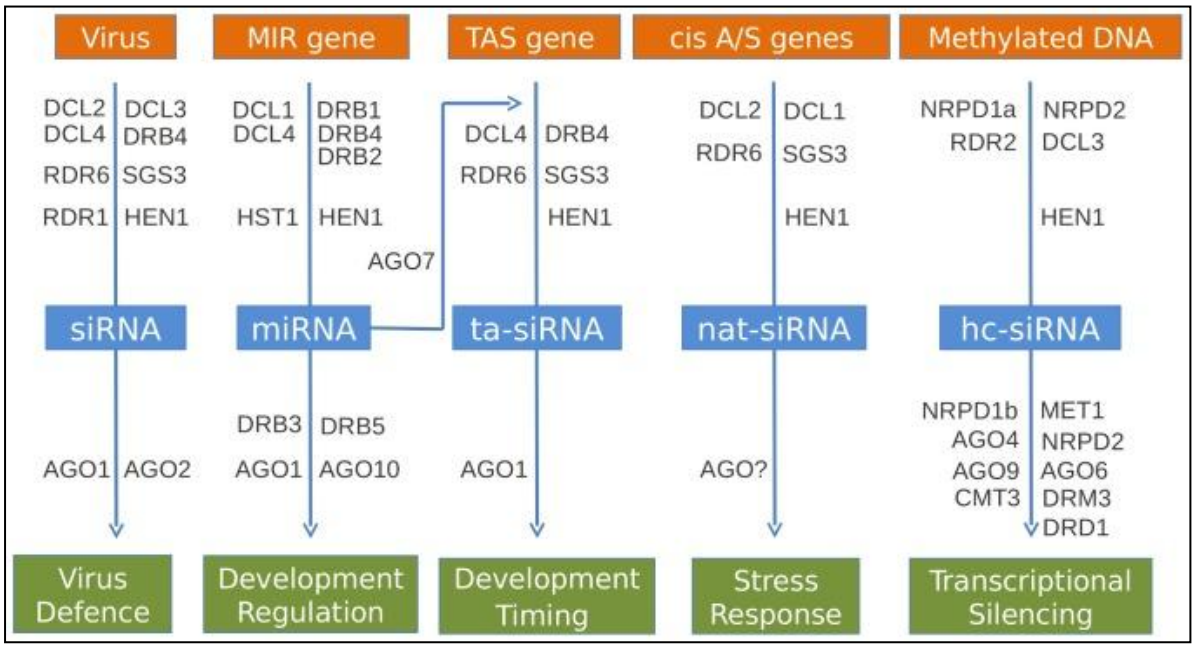
Αυτές οι δίκλωνες μορφές του RNA (dsRNA) αναγνωρίζονται από μια ομάδα πρωτεϊνών, τις DICER. Όπως προαναφέρθηκε οι DICERs είναι ενδονουκλεάσες με ενεργότητα τύπου RNάσης III. Το όνομά τους προέρχεται από το αγγλικό ρήμα "dice", που περιγράφει τέλεια την λειτουργία τους, δηλαδή το ότι κόβουν σε μικρά κομμάτια τα δίκλωνα μόρια που προσδένουν. Διαφορετικοί τύποι DICER παράγουν διαφορετικού είδους sRNA. Οι DICER των φυτών έχουν ονομασθεί DICER LIKE (DCL). Στην *N. benthamiana* έχουν χαρακτηρισθεί τέσσερα DCL ένζυμα με μεγάλη ομολογία με αυτά της *A. thaliana* (Nakasugi *et al.*, 2013). Η δομή των DCL έχει μελετηθεί αρκετά και είναι γνωστό ότι αποτελούνται από έξι πρωτεϊνικές υπομονάδες (domains). Κάθε μια από τις τέσσερις DCL έχει τον δικό της ρόλο και αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό μονοπάτι. Η DCL1 είναι πρωτίστως υπεύθυνη για την παραγωγή των micro-RNAs (miRNAs) μήκους 21 νουκλεοτιδίων από πρόδρομα RNA (primary miRNA, pri-miRNA) που κωδικοποιούνται από ενδογενή γονίδια (Xie *et al.*, 2014). Παράλληλα έχει προταθεί ότι η DCL1 έχει κάποιον ρόλο και στην μεθυλίωση του DNA, στην σίγηση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών καθώς και στην παραγωγή siRNAs (small interfering RNAs) εναντίων DNA ιών από άλλες DCLs (Blevins *et al.*, 2006; Laubinger *et al.*, 2010). Η DCL2 είναι υπεύθυνη για την παραγωγή siRNAs μήκους 22 νουκλεοτιδίων είτε από RNA εξωγενούς προέλευσης είτε από ενδογενή αντινοηματικά RNA (natural antisense siRNAs, nat-siRNAs) (Xie *et al.*, 2004; Borsani *et al.*, 2005). Η DCL2 έχει βασικό ρόλο και στο φαινόμενο της μεταβατικότητας της σίγησης (transitivity) κατά το οποίο RdRPs μετατρέπουν σε δίκλωνα τα RNAs εξαιτίας των οποίων παράχθηκαν τα πρωτογενή siRNAs, και από αυτά τα δίκλωνα RNAs οι DCL2 παράγει τα δευτερογενή siRNAs από διαφορετικές περιοχές της αρχικής αλληλουχίας ενισχύοντας το σήμα της σίγησης (Mlotshwa *et al.*, 2008). Για την DCL3 είναι γνωστό κυρίως ότι παράγει siRNAs μήκους 24 νουκλεοτιδίων που καθοδηγούν την μεθυλίωση του DNA (RNA-directed DNA methylation). Ο ρόλος της DCL4 είναι πιο ευρύς καθώς συμμετέχει στην παραγωγή των trans-acting siRNAs (tasi-RNAs) εναντίων ενδογενών μεταγράφων καθώς και αντιικών siRNAs ενώ τελευταία έχει προταθεί και ο ρόλος της στον τερματισμό της μετάφρασης (Fusaro *et al.*, 2006; Vazquez *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2012). Παρά τους σχετικά διαχωρισμένους ρόλους τους υπάρχει μεγάλη επικάλυψη μεταξύ των λειτουργιών των διαφόρων DCL γεγονός που καθιστά την μελέτη τους ακόμη πιο περίπλοκη (Bouche *et al.*, 2006).

**AGOs**

Τα δίκλωνα sRNAs που παράγονται από την κάθε DCL στην συνέχεια δεσμεύονται από μια άλλη σημαντική οικογενεια πρωτεινών, τις ARGONAUTES (AGOs). Στην *A. thaliana* έχουν χαρακτηρισθεί δέκα και στην *N. benthamiana* επτά διαφορετικές AGOs (Nakasugi *et al.*, 2013). Μέσω της AGO μόνο η μία από τις δυο αλυσίδες των sRNAs ενσωματώνεται στο σύμπλοκο RISC και το καθοδηγεί στην αλληλουχία στόχο (Hutvagner *et al.*, 2008).

## 1.3 Τα μονοπάτια της RNA σίγησης

Ανάλογα με το είδος του RNA που επάγει τον μηχανισμό ενεργοποιούνται διαφορετικές DICER πρωτεΐνες (Εικόνα 1).




**Εικόνα 1** Τα μονοπάτια της σίγησης. Στα πορτοκαλί κουτιά αναγράφονται οι επαγωγείς και από κάτω οι τελεστές της σίγησης σε κάθε περίπτωση. Στα μπλε κουτιά αναγράφονται τα RNA μόρια τα οποία μεσολαβούν για να γίνει η καταστολή και στα πράσινα κουτιά η βιολογική διεργασία που επιτελείται. (Nakasugi *et al.*, 2013).

Τα μονοπάτια της RNAs σίγησης μπορούν να χωριστούν σε δυο ομάδες αυτή της μεταγραφικής σίγησης (Transcriptional Gene Silencing, TGS) και αυτή της μεταμεταφραστικής σίγησης (Post Transcriptional Gene Silencing, PTGS).

### 1.3.1 TGS

Το TGS μονοπάτι περιλαμβάνει την σίγηση που λαμβάνει χώρα στον πυρήνα και είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό και τη διατήρηση της ετεροχρωματίνης σε ορισμένες περιοχές του γονιδιώματος. Περιοχές ετεροχρωματίνης ή επαναλαμβανόμενου DNA παράγουν μετάγραφα μέσω της RNA πολυμεράσης IV (Pol IV), τα οποία αναγνωρίζονται ως μη φυσιολογικά (aberrant). Αυτά τα μετάγραφα μετατρέπονται από την RDR2 σε dsRNAs τα οποία, εντός του πυρήνα, κόβονται από την DCL3 σε RNA δίκλωνα μήκους 24 νουκλεοτιδίων με δύο προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο (3' overhangs). Μετά την μεθυλίωση της υδροξυλομάδας 2'-OH από την πρωτεΐνη HEN1, ο συμπληρωματικός κλώνος απορρίπτεται ενώ ο οδηγός κλώνος συνδέεται με την AGO4 ή μερικές φορές με την AGO6 ή την AGO9. Σχηματίζεται τότε ένα σύμπλοκο που οδηγεί σε μεταγραφική σίγηση επαγόμενη από RNA (RNA-induced transcriptional silencing, RITS) το οποίο εμπλέκεται στη συντήρηση της μεθυλίωσης των ιστονών και των κυτοσινών του DNA. Αυτό είναι το μονοπάτι μέσω του οποίου διατηρούνται ανενεργές και οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA (Matzke *et al.* 2009).

### 1.3.2 PTGS

Η μεταμεταγραφική γονιδιακή σίγηση (PTGS) χρησιμοποιείται κυρίως για την ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται σε λειτουργίες, όπως η ανάπτυξη και η απόκριση στο στρες. Τρία είναι τα βασικά μονοπάτια σίγησης: το miRNA μονοπάτι, το ta-siRNA μονοπάτι και το nat-siRNA μονοπάτι (Vazquez *et al.*, 2010)

**miRNA μονοπάτι:**

Τα miRNA παράγονται από ενδογενή γονίδια του φυτού, τα MIR γονίδια, και δρουν *in trans* ρυθμίζοντας την έκφραση άλλων ενδογενών γονιδίων. Τα γονίδια που κωδικοποιούν miRNA παρότι εντοπίζονται σε μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος, μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (Pol II). Τα πρωτογενή μετάγραφα (primary miRNA, pri-miRNA) εμφανίζουν συμπληρωματικότητα σε κάποια σημεία τους με αποτέλεσμα τον σχηματισμό δίκλωνων δομών, που ονομάζονται φουρκέτες, οι οποίες αποτελούν υπόστρωμα για το ένζυμο DCL1 στο οποίο έγινε αναφορά την προηγούμενη ενότητα. Έπειτα από επεξεργασία από την DCL1 και στη συνέχεια από ορισμένα άλλα ένζυμα προκύπτει το pre-miRNA (miRNA precursor), το οποίο εξάγεται στο κυτταρόπλασμα. Τα miRNA ωριμάζουν στο κυτταρόπλασμα και παραλαμβάνονται

από τα σύμπλοκα AGO1-RISC που τα καθοδηγούν στα μόρια-στόχους. Η αλυσίδα-οδηγός καθορίζεται από την σταθερότητα των 5' άκρων τους. Ο κλώνος με το λιγότερο σταθερό 5' άκρο επιλέγεται ως οδηγός. Η αναγνώριση αυτή βασίζεται στους κανόνες συμπληρωματικότητας (χωρίς όμως να απαιτείται πλήρης συμπληρωματικότητα) και οδηγεί είτε σε αποδόμηση του mRNA-στόχου με ενδονουκλεολυτική πέψη ή σε παρεμπόδιση της μετάφρασης με μηχανική παρεμπόδιση της κίνησης του ριβοσώματος κατά μήκος του mRNA. Ανάμεσα στα γονίδια των οποίων η ρύθμιση πραγματοποιείται από το μονοπάτι των miRNA είναι και αυτά που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες AGO1 και DCL1, όπου ουσιαστικά πρόκειται για μονοπάτι αυτορύθμισης μέσω των μικρών RNA (feedback regulation) (Xie *et al.*, 2003; Vaucheret *et al.*, 2004).

**ta-siRNA μονοπάτι:**

Τα ta-siRNAs κωδικοποιούνται από τα TAS γονίδια. Αρχικά τα μετάγραφα των TAS φέρουν 5' καλύπτρα και πολυαδενυλιωμένη ουρά αλλά είναι αντικείμενο επεξεργασίας από την DCL4 ώστε να δημιουργηθούν τα ta-siRNAs μέσω πέψης που καθοδηγείται από συγκεκριμένα miRNAs (Allen *et al.*, 2005). Ωστόσο, αντί να σιγηθούν, αυτά τα μη κωδικά RNA μετάγραφα χρησιμοποιούνται ως μήτρα για τη σύνθεση δίκλωνου RNA από την RDR6. Το dsRNA στη συνέχεια κόβεται ξανά από την DCL4 σε ta-siRNAs 21 νουκλεοτιδίων ξεκινώντας από την περιοχή που είναι συμπληρωματική του miRNA. Τα αρχικά ta-siRNAs επομένως ρυθμίζουν την παραγωγή δευτερογενών μικρών RNA, τα οποία με την σειρά τους ρυθμίζουν διάφορα γονίδια-στόχους, συνήθως μέλη της ίδιας οικογένειας.

**nat-siRNA μονοπάτι**

Τα nat-siRNAs παράγονται από επικαλυπτόμενες δίκλωνες περιοχές RNA οι οποίες σχηματίζονται από φυσικά αντινοηματικά μετάγραφα (natural anti-sense transcripts, NAT) όταν υβριδοποιούνται με τα αντίστοιχα συμπληρωματικά τους ενδογενή μετάγραφα. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: cis-nat-siRNA, τα οποία προκύπτουν από μετάγραφα που προέρχονται από τον ίδιο γονιδιακό τόπο, και trans-nat-siRNA που προκύπτουν από μετάγραφα που προέρχονται από μακρινούς γονιδιακούς τόπους. Τα cis-nat-siRNAs σχηματίζονται κάτω από συγκεκριμένες αναπτυξιακές συνθήκες ή συνθήκες στρες (Borsani *et al.*, 2005). Συνήθως το ένα γονίδιο του ζεύγους NAT εκφράζεται πάντα ενώ το δεύτερο επάγεται. Το δίκλωνο μόριο RNA που σχηματίζεται από αυτές τις συμπληρωματικές αλληλουχίες αποτελεί υπόστρωμα για επεξεργασία από την DCL2 και δημιουργία ενός nat-siRNA 24 νουκλεοτιδίων. Αυτό το nat-siRNA

στοχεύει στη συνέχεια ένα από τα δύο μετάγραφα του cis-antisense ζεύγους γονιδίων για κοπή, και το μόριο RNA που προκύπτει μετατρέπεται σε δίκλωνο. Στη συνέχεια, το νεοσυντιθέμενο μόριο dsRNA μετατρέπεται σε nat-siRNAs 21 νουκλεοτιδίων μέσω της δράσης της DCL1. Τα 21-nt nat-siRNAs, όπως και τα ta-siRNAs, χρησιμοποιούνται με τη σειρά τους ως οδηγοί για την στοχευμένη σίγηση ομόλογων mRNAs.

Από τα μονοπάτια που προαναφέρθηκαν πιθανότατα το πλέον μελετημένο είναι αυτό των siRNAs που παράγονται ως απόκριση στην μόλυνση του φυτού από ιούς, καθώς η κατανόησή του έχει άμεσες εφαρμογές στην προστασία των καλλιεργούμενων φυτών. Παρόλα αυτά πολύ μεγάλο ενδιαφέρον έχει και η κατανόηση του μηχανισμού σίγησης των διαγονιδίων καθώς και η καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού αυτού μπορεί να οδηγήσει στην βελτίωση των τεχνολογιών και τον σχεδιασμό γενετικά σταθερότερων διαγονιδιακών φυτών.

Η DCL3 φαίνεται να παίζει βασικό ρόλο στην μεταγραφική σίγηση των διαγονιδίων και την διασυστηματική κίνηση του σήματος της μεταγραφικής σίγησης, όπως έδειξαν μελέτες που έγιναν σε φυτά *A. thaliana* (Daxinger *et al.*, 2009) (Melnyk *et al.*, 2011). Συγκεκριμένα η DCL3 δεν φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή του σήματος της σίγησης αλλά έχει συνδεθεί με την αναγνώριση του σήματος (Brosnan et al., 2007).

Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει πως η παροδική καταστολή της έκφρασης της DCL3 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της έναρξης της διασυστηματικής σίγησης της GFP σε GFP6.4 φυτά. Η παροδική καταστολή έγινε με την μέθοδο ιικής επαγωγής γονιδιακής σίγησης (virus induced gene silencing VIGS) χρήση του ιού TRV (Kotakis *et al.*, 2011).

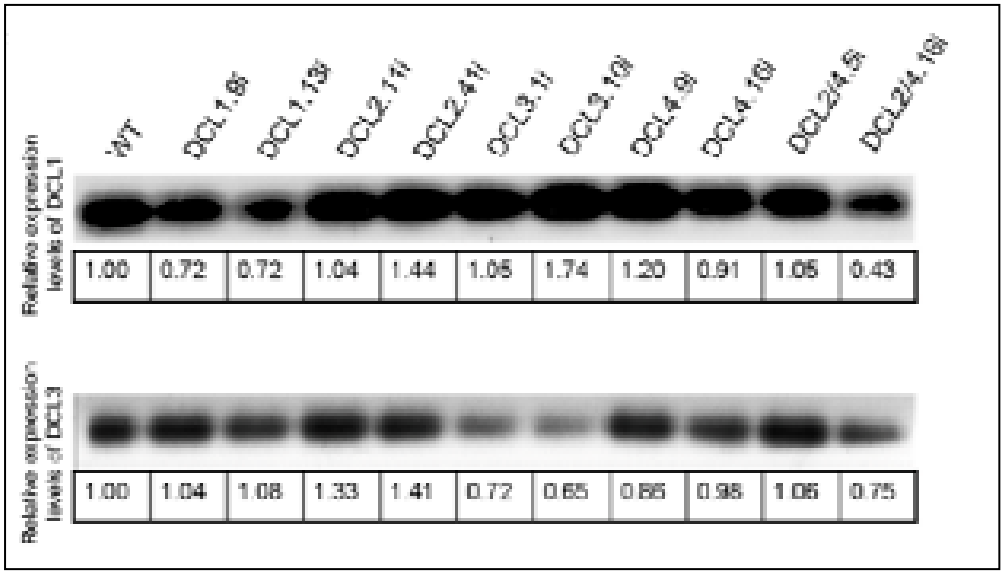
## 1.4 Παρουσίαση των φυτών μοντέλων

### 1.4.1 Φυτά DCL3i

Ως εργαλείο για την μελέτη της λειτουργίας των DCL έχουν σχεδιασθεί φυτά *Nicotiana benthamiana* με μερική καταστολή (knockdowns), χρήσει του ίδιου του μηχανισμού της σίγησης σε κάθε μια από τις DCL (DCL1i, DCL2i, DCL3i, DCL4i) καθώς και σε λογικούς συνδυασμούς τους (DCL2/4i). Επειδή οι DCL πρωτεΐνες έχουν και αναπτυξιακό ρόλο η πλήρης καταστολή τους ενδέχεται να έχει θνησιγόνο φαινότυπο. Έτσι οι DCLi σειρές εκφράζουν η κάθε μια μία φουρκέτα που επάγει την σίγηση των

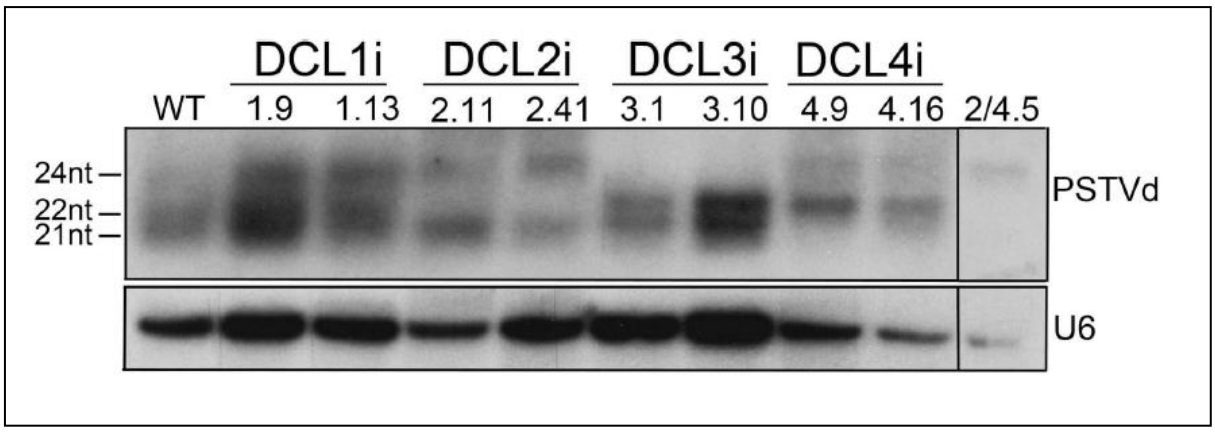
εκάστοτε DCL πρωτεΐνών. Οι σειρές αυτές ονομάζονται DCLi καθώς η μερική καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης στηρίζεται σε RNAi μηχανισμούς (Eleni Dadami PhD, 2012).

Για κάθε DCL σειρά έχουν επιλεγεί πάνω από μια ανεξάρτητη σειρά, που να έχει δηλαδή προκύψει από ανεξάρτητο γεγονός γενετικού μετασχηματισμού, ώστε να εξασφαλιστεί ότι ο τυχόν φαινότυπος δεν συνδέεται με την θέση ένθεσης. Για την DCL3 έχουν επιλεγεί οι σειρές DCL3.1i και DCL3.10i και η καταστολή του ενζύμου έχει ελεγχθεί με ημιποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (semi-qPCR) (Εικόνα 2).




**Εικόνα 2** Ημιποσοτική αλυσιδοτή αντίδραση πολυμεράσης (semi-qPCR) για την ανίχνευση των επιπέδων της DCL1 (επάνω) και DCL3(κάτω) στις σειρές DCLi (Ελένη Νταντάμη PhD, 2012).

Επιπλέον η επίδραση της καταστολής του εκάστοτε ενζύμου έχει ελεγχθεί με στύπωμα τύπου northern σε φυτά μολυσμένα με το ιοειδές PSTVd και όπως είναι εμφανές από την Εικόνα 3 τα φυτά DCL3i αδυνατούν να παράγουν τα siRNA 24 νουκλεοτιδίων (Katsarou *et al.*, 2016) (Εικόνα 3).




**Εικόνα 3.** Τα 21, 22 και 24nt siRNA που παράγονται ενάντια στο ιοειδές PSTVd τρείς εβδομάδες μετά την μόλυνση ανιχνεύονται σε στύπωμα κατά Northern. Ως ποσοτικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA U6. Είναι εμφανές ότι ανάλογα με την DCL που έχει κατασταλεί απουσιάζει και ο αντίστοιχος πληθυσμός siRNAs (Katsarou *et al*., 2016).

Με στύπωμα τύπου Southern έχει διαπιστωθεί ότι τα φυτά DCL3.1i έχουν μια ένθεση της φουρκέτας σίγησης ενώ τα DCL3.10i έχουν δυο ενθέσεις (Ελένη Νταντάμη PhD, 2012).

### 1.4.2 Φυτά GFP6.4

Τα φυτά GFP6.4 έχουν προκύψει από τροποποίηση με τη μέθοδο μεταφοράς γονιδίων με Αγροβακτήριο (Agrobacterium tumefaciens). Η τροποποίηση τους αφορά στην έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP (Green Fluorescent Protein) υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή p35S του ιού CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) (Kalantidis *et al*., 2006).

Σε συνέχεια της μελέτης των GFP φυτών διαπιστώθηκε ότι από τις δεκατέσσερις σειρές που δημιουργήθηκαν διακρίνονται τρείς κατηγορίες έκφρασης του διαγονιδίου. Τα φυτά της πρώτης κατηγορίας πήραν τον χαρακτηρισμό Type I και εκφράζουν το διαγονίδιο διασυστηματικά καθ' όλη την πορεία της ανάπτυξης τους, φαίνονται κάτω από UV ακτινοβολία να φθορίζουν έντονα και εμφανίζοντας μόνο σε ορισμένες περιοχές κόκκινες κηλίδες. Αυτές οι κόκκινες κηλίδες αντιπροσωπεύουν την σίγηση του διαγονιδίου τοπικά. Τα φυτά της δεύτερης κατηγορίας, τα Type II εκφράζουν το διαγονίδιο λιγότερο έντονα με αποτέλεσμα να φαίνονται πορτοκαλί κάτω από UV ακτινοβολία λόγω του συνδυασμού του πράσινου φθορισμού της GFP και του κόκκινου φθορισμού της χλωροφύλλης, τα φυτά αυτά επίσης εμφάνιζαν κόκκινες κηλίδες σε μεγάλη συχνότητα και διασυστηματική σίγηση η οποία κυμαίνεται από 5% μέχρι 90% των φυτών ανάλογα με την ηλικία του φυτού και τις περιβαλλοντικές συνθήκες

(Kotakis *et al*. 2011). Η τρίτη κατηγορία τα Type III φυτά εμφανίζουν διασυστηματική σίγηση πολύ σύντομα στα πρώτα στάδια μετά την βλάστηση (Kalantidis *et al*., 2006).

Η σειρά GFP6.4 ανήκει στην κατηγορία Type III και εμφανίζει διασυστηματική σίγηση του διαγονιδίου μέσω PTGS. Το σήμα της σίγησης έχει αποδειχθεί ότι διαδίδεται διασυστηματικά καθιστώντας τα φυτά αυτά ιδανικά για την μελέτη της κίνησης του σήματος της σίγησης (Tournier *et al*., 2006). Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι γενιάς μεγαλύτερης από την 35η.

### 1.4.3 Φυτά DCL3.1i×GFP6.4

Όπως προαναφέρθηκε η DCL3 είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του πληθυσμού των siRNA 24 νουκλεοτιδίων που ευθύνονται για τη μεθυλίωση ομόλογων τμημάτων DNA (RNA-κατευθυνόμενη-DNA μεθυλίωση, RdDM) (Chan *et al*., 2004). Για τον λειτουργικό έλεγχο των DCL3i σειρών έπρεπε με κάποιο τρόπο να εξετασθεί η μεθυλίωση μιας αλληλουχίας μάρτυρα σε αυτό το γενετικό υπόβαθρο. Εάν τα siRNAs μήκους 24 νουκλεοτιδίων είναι υπεύθυνα για την εκ νέου (de novo) RNA εξαρτώμενη DNA μεθυλίωση RdDM (Chan et al., 2004; Daxinger et al., 2009) και εάν η DCL3 είναι υπεύθυνη για την παραγωγή τους, τότε η εκ νέου RdDM πρέπει να παρουσιάζει διαταραχές στις DCL3i σειρές. Προς τον σκοπό αυτό έγινε διασταύρωση των DCL3i φυτών με τα GFP6.4, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως αλληλουχία μάρτυρας για την de novo μεθυλίωση η αλληλουχία της GFP, για την οποία είναι γνωστό ότι παράγονται siRNAs 24 νουκλεοτιδίων (Tournier *et al*., 2006).

Τα φυτά που προέκυψαν από τη διασταύρωση DCL3.1i×GFP6.4 αυτογονιμοποιήθηκαν και από γενιά σε γενιά επιλέγονταν τα φυτά με τον πιο έντονο φθορισμό ως ομόζυγα για την GFP. Στην γενιά $F_5$ παρατηρήθηκε ότι από τα 21 φυτά που παρακολουθούνταν κανένα δεν εκδήλωσε μεταμεταγραφική σίγηση της GFP. Ελέγχοντας και την προηγούμενη γενιά διαπιστώθηκε ότι ούτε τα φυτά της $F_4$ γενιάς εμφανίζουν μεταμεταγραφική σίγηση της GFP (Νίκος Γλαμπεδάκης, πτυχιακή εργασία 2013).

Η DCL3 μέχρι τώρα θεωρείται ότι δεν εμπλέκεται σε μονοπάτια μετακίνησης του σήματος της σίγησης αλλά μόνο στην επαγωγή του σχηματισμού ετεροχρωματίνης. Το 2007 η Dunoyer με την ομάδα της έδειξαν ότι άλλα RdDM-σχετιζόμενα ένζυμα συμμετέχουν στην μεταφορά του σήματος σίγησης, αλλά όχι η DCL3. Συγκεκριμένα

διασταυρώνοντας φυτά *A.* thaliana με πλήρη καταστολή της DCL3, με φυτά που εκφράζουν μια κατασκευή μάρτυρα για την διασυστηματική σίγηση διαπίστωσαν ότι η σίγηση του μάρτυρα ήταν αντίστοιχη με αυτή των φυτών με WT γενετικό υπόβαθρο (ως προς το μηχανισμό της σίγησης).

Στην περίπτωση των DCL3.1i×GFP6.4 φυτών αφενός έχουμε μερική και όχι πλήρη καταστολή του ενζύμου της DCL3 αφετέρου το γονίδιο μάρτυρας δεν είναι μια κατασκευή σχεδιασμένη να στοχεύεται από κάποιο συγκεκριμένο μηχανισμό σίγησης του φυτού. Έτσι η πιθανή επίδραση της καταστολής της DCL3 στην αποφυγή της μεταμεταγραφικής σίγησης του διαγονιδίου παρουσιάζει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον καθώς θα συμβάλει στην κατανόηση των μηχανισμών σίγησης των διαγονιδιακών φυτών, ένα ρεαλιστικό πρόβλημα της σύγχρονης γενετικής μηχανικής.

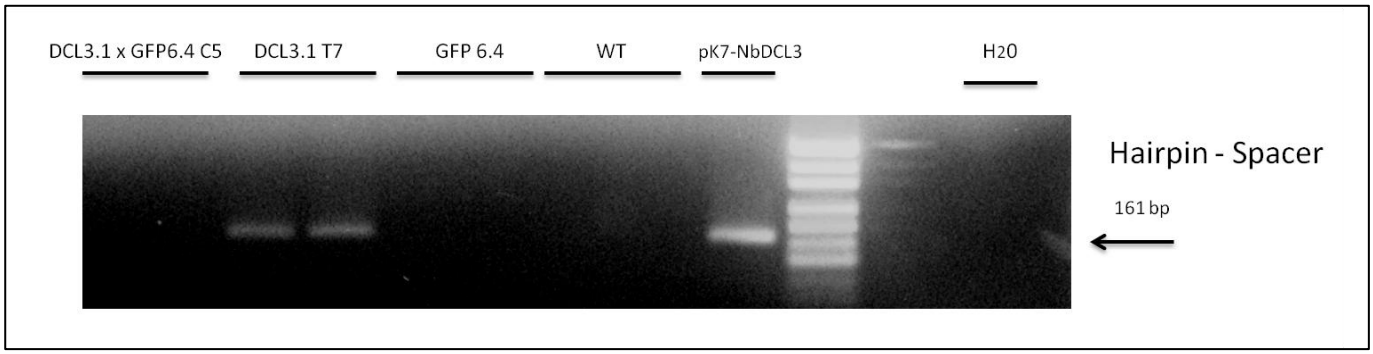
## 1.5 Προκαταρκτικά αποτελέσματα

Οι αρχικές διασταυρώσεις DCL3.1i×GFP6.4 πραγματοποιήθηκαν από την Ελένη Νταντάμη, στα πλαίσια της διδακτορικής της διατριβής, και από τα φυτά της γενιάς $F_2$ επιλέχθηκαν αυτά που ήταν ομόζυγα για το διαγονίδιο GFP (GFP+/+). Η επιλογή των ομόζυγων φυτών για το GFP γονίδιο έγινε βάσει της έντασης του φθορισμού υπό ακτινοβολία UV. Επίσης επιλέχθηκαν αυτά που ήταν θετικά για τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο της φουρκέτας (hp+/+ ή hp+/-) όπως διαπιστώθηκε από στύπωμα τύπου Northern (Ελένη Νταντάμη PhD, 2012).

Έτσι τα φυτά της $F_3$ γενιάς θεωρήθηκε ότι είχαν γονότυπο GFP+/+ και hp+/?. Στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας του Νίκου Γλαμπεδάκη το 2013, παρατηρήθηκε ότι τα φυτά της γενιάς $F_4$ και $F_5$ είχαν χάσει την ικανότητα αυθόρμητης σίγησης του διαγονιδίου μέσω μεταμεταγραφικής σίγησης.

Παρά την αρχική συσχέτιση του φαινοτύπου με την καταστολή της DCL3i, έπειτα από έλεγχο των φυτών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την παρουσία της φουρκέτας στο γονιδίωμα, διαπιστώθηκε ότι η φουρκέτα απουσίαζε από όλα τα φυτά της $F_4$ και $F_5$ γενιάς που ελέγχθηκαν (Εικόνα 4). Και τα επίπεδα της DCL3 βρίσκονταν στα ίδια επίπεδα με αυτά των φυτών αγρίου τύπου (WT) επίπεδα. Αυτή η σειρά φυτών γενιάς $F_5$ ονομάστηκε M καθώς παρότι προέρχεται από την διασταύρωση DCL3.1i×GFP6.4 δεν φέρει κανένα από τα αλλήλόμορφα της φουρκέτας της σίγησης της DCL3.

Άρα απουσία της μεταμεταγραφικής σίγησης δεν οφείλεται στην καταστολή της DCL3 της γενιάς στην οποία εμφανίζεται για πρώτη φορά ο φαινότυπος, αλλά ενδεχομένως να οφείλεται στην καταστολή της DCL3 στην προηγούμενη γενιά. Επειδή όμως αυτός ο φαινότυπος παρατηρείται στους απογόνους μιας μοναδικής διασταύρωσης θα μπορούσε να οφείλεται και στο γεγονός της διασταύρωσης καθεαυτό. Για να επιβεβαιωθεί ότι το αποτέλεσμα είναι πράγματι προϊόν της διασταύρωσης των επιμέρους γονοτύπων πραγματοποιήθηκαν επιπλέον διασταυρώσεις της ίδιας φοράς από τον Dr. Frederic Verret.




**Εικόνα 4** Ανίχνευση του διαγονιδίου που κωδικοποιεί την φουρκέτα σίγησης της DCL3 με ανιχνευτές που υβριδοποιούν ένας μέσα στην αλληλουχία της DCL3 και ένας στην αλληλουχία που αντιστοιχεί στο βρόχο της φουρκέτας (spacer). Τα φυτά που ελέγχθηκαν στην παρούσα αντίδραση είναι τα DCL3.1i×GFP6.4 F5, ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν φυτά DCL3i και GFP6.4 αντίστοιχα, ενώ ως τεχνικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιακός φορέας που φέρει την αλληλουχία στόχο (Νίκος Γλαμπεδάκης, 2013).

## 1.6 Σκοπός:

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να εμβαθύνει στην μελέτη των φυτών DCL3.1i×GFP6.4. Πιο συγκεκριμένα διερευνήθηκε η υπόθεση ότι η καταστολή της DCL3 παρεμποδίζει την μεταμεταγραφική σίγηση του διαγονιδίου μάρτυρα. Το πρώτο ερώτημα που τίθεται είναι αν ως αποτέλεσμα των ανεξάρτητων διασταύρωσης DCL3.1i×GFP6.4 παρατηρείται ξανά φαινοτυπικά η μείωση της συχνότητας εμφάνισης μεταμεταγραφικής σίγησης σε σύγκριση με τα GFP6.4 φυτά. Όπως προαναφέρθηκε αυτός ο φαινότυπος έχει παρατηρηθεί κατά την καταστολή της DCL3 με το σύστημα VIGS (Kotakis *et al.*, 2011). Έτσι υπάρχει ήδη μια ένδειξη που οδηγεί στην υπόθεση ότι ο φαινότυπος πιθανότατα οφείλεται στην καταστολή της DCL3.

Μια πρώτη απάντηση στο ερώτημα θα δοθεί αν ο φαινότυπος της απώλειας της σίγησης επανεμφανιστεί στους απογόνους και άλλων ανεξάρτητων διασταυρώσεων DCL3.1i×GFP6.4. Αν επαληθευθεί η υπόθεση και διαπιστωθεί πράγματι μειωμένη συχνότητα εμφάνισης της μεταμεταγραφικής σίγησης του διαγονιδίου, αυτό θα αποτελεί ένδειξη ότι η DCL3 εμπλέκεται με κάποιο τρόπο στην παραγωγή ή στην αντίληψη από το φυτό, του σήματος και αυτού του μονοπατιού της σίγησης.

# Υλικά και μέθοδοι

## 2.1. Φαινοτυπικές μέθοδοι

### 2.1.1 Παρατήρηση φαινότυπου GFP

Για την μακροσκοπική παρατήρηση του φθορισμού της GFP υπό υπεριώδη ακτινοβολία χρησιμοποιήθηκε χειροκίνητη UV λάμπα 1000W (B100AP; Ultraviolet Products, UVP).

### 2.1.2 Επαγωγή της σίγησης με παροδική υπερέκφραση μέσω αγροεμποτισμού

Για τον αγροεμποτισμό χρησιμοποιήθηκαν πολύ νεαρά φυτά, ηλικίας μόλις τριών πραγματικών φύλλων. Τα φυτά που εξετάζονταν για την ικανότητά τους να σιγούν την GFP ήταν τα φυτά M $F_5$. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα φυτά GFP 16C τα οποία εκφράζουν σταθερά την GFP και είναι γνωστό ότι μπορούν να σιγήσουν το διαγονίδιο της με επαγωγή μέσω παροδικής υπερέκφρασης αλλά όχι αυθόρμητα (Ruiz *et al*., 1998).

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τον αγροεμποτισμό ήταν:

1. το pBIN 35S-mGFP4 (Haseloff *et al*., 1997), που κωδικοποιεί ολόκληρο το μετάγραφο της GFP,
2. το pFGC5941-hpGFP (Koscianska *et al*., 2005), που κωδικοποιεί μια φουρκέτα (hairpin GFP, hpGFP) που παράγει siRNAs εναντίων της GFP,
3. το pFGC5941-aGFP (Koscianska), που κωδικοποιεί το αντινοηματικό μετάγραφο της GFP ( antisence GFP, aGFP),
4. και ένας πλασμιδιακός φορέας pB2GW7 (Weiste *et* al., 2007) που φέρει μόνο τον υποκινητή p35S.

Για τον αγροεμποτισμό (Schöb *et al*. 1997) τα αγροβακτήρια επωάστηκαν για 16 ώρες σε υγρό θρεπτικό μέσο LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Την επόμενη μέρα και εφόσον είχαν αναπτυχθεί ικανοποιητικά, φυγοκεντρήθηκαν στις 2700rpm για 10 λεπτά στους 4$^{o}$C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε αντίστοιχη ποσότητα MMA. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 28$^{o}$C και επαναφυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Έπειτα έγιναν τρείς πλύσεις με 10mM χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) ίσης ποσότητας με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις και τελικά επαναδιαλύθηκαν στο ίδιο διάλυμα και αραιώθηκαν έως ότου η οπτική απορρόφηση

(OD600) είναι μεταξύ 0,2 και 0,5. Στη συνέχεια έγινε ο εμποτισμός με σύριγγα του 1ml σε αμυχές στο κάτω μέρος του φύλλου, για την δημιουργία των οποίων χρησιμοποιήθηκε η βελόνα της σύριγγας.

**MMA**
1x MS υγρό θρεπτικό μέσο
10mM 2-μορφολινο-αιθανικό σουλφονικό οξύ (2-[N-Morpholino] ethane sulfonic acid, MES)
200μM ακετοσυρινγκόνη (acetosyringone, Acs) σε διαλυμένη σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)

**Murashige Skoog (MS) θρεπτικό μέσο:**
**Μακροστοιχεία**
1650 mg/l Νιτρικό αμμώνιο (Ammonium nitrate, $NH_4NO_3$)
332,2 mg/l Χλωριούχο κάλιο (Calcium chloride, $CaCl_2$-$2H_2O$)
180,7 mg/l Θειικό μαγνήσιο (Magnesium sulfate, $MgSO_4$-7H2O)
170 mg/l Φωσφορικό κάλιο (Potassium phosphate, $KH_2PO_4$)
1900 mg/l Νιτρικό κάλιο (Potassium nitrate, $KNO_3$)
**Μικροστοιχεία**
6,2 mg/l Βορικό οξύ (Boric acid, $H_3BO_3$)
0,025 mg/l Χλωριούχο κοβάλτιο (Cobalt chloride, $CoCl_2$-$6H_2O$)
0,025 mg/l Θειικός χαλκός (Cupric sulfate, $CuSO_4$-$5H_2O$)
27,8 mg/l Θειικός σίδηρος (Ferrous sulfate, $FeSO_4$-$7H_2O$)
16,9 mg/l Θειικό μαγγάνιο (Manganese sulfate, $MnSO_4$-4H2O)
0,83 mg/l Ιωδιούχο κάλιο (Potassium iodide, KI)
0,25 mg/l Μολυβδαινικό νάτριο (Sodium molybdate, $Na_2MoO_4$- $2H_2O$)
8,6 mg/l Θειικός ψευδάργυρος (Zinc sulfate, $ZnSO_4$-$7H_2O$)
37,3 mg/l Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό δινάτριο (Disodium EDTA, $Na_2EDTA$-$2H_2O$)
**Βιταμίνες**
100 mg/l Ινοσιτόλη
0,5 mg/l Νιασίνη
0,5 mg/l Πυριδοξίνη
0,1 mg/l Θειαμίνη
2,0 mg/l Γλυκίνη

Για στερεό θρεπτικό μέσο προστίθεται άγαρ σε συγκέντρωση 7g/l.
Τα μακροστοιχία, τα μίκροστοιχία και οι βιταμίνες είναι της εταιρίας PhytoTechnology Laboratories.

### 2.1.3 Μελέτη διάσχισης (segregation analysis)

Ο υπολογισμός του αριθμού των ενθέσεων του διαγονιδίου στο γονιδίωμα γίνεται σύμφωνα με την κληρονόμηση ενός γονιδίου μάρτυρα, συνδεδεμένου με το διαγονίδιο. Συνήθως το γονίδιο μάρτυρας είναι γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (Kanamycin). Έτσι αν οι σπόροι των $T_0$ φυτών, δηλαδή των φυτών που αναγεννήθηκαν από τους γενετικά τροποποιημένους κάλλους, όταν αναπτυχθούν σε επιλεκτικό

θρεπτικό μέσο δώσουν περίπου 75% ανθεκτικούς απογόνους, σύμφωνα με τον πρώτο νόμο του Mendel οι σπόροι έχουν προέλθει από φυτό ετερόζυγο για έναν γενετικό τόπο.

Για την ανάλυση αυτού του τύπου οι υπό μελέτη σπόροι αποστειρώθηκαν με πλύση σε διάλυμα χλωρίνης 20% για 10 λεπτά και τρείς διαδοχικές δίλεπτες πλύσεις με αποστειρωμένο νερό. Έπειτα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS που με 100μg/ml καναμυκίνη. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν σπόροι αγρίου τύπου (WT).

## 2.2 Μοριακές μέθοδοι

Κάθε φορά ο ιστός συλλέγοντας και καταψύχονταν ακαριαία με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Στη συνέχεια κονιορτοποιούνταν σε λεπτή πούδρα με γουδί και γουδοχέρι χωρίς να ξεπαγώσει, πάλι με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται ότι ο ιστός παραμένει αναλλοίωτος και τα δείγματα αντιπροσωπεύουν μοριακά την κατάσταση του φυτού τη στιγμή της συλλογής του.

### 2.2.1 Στύπωμα τύπου Southern

Το ολικό γενομικό DNA (genomic DNA, gDNA) εκχυλίστηκε από τα φυτά με την μέθοδο CTAB. Στη συνέχεια το gDNA επωάσθηκε με RNάσηΑ για την καταστροφή τυχών υπολειμματικού RNA που μπορεί να επηρεάσει την μετέπειτα υβριδοποίηση.

Για το στύπωμα τύπου Southern (Southern blot) έγινε πέψη 20μg gDNA από κάθε δείγμα με το περιοριστικό ένζυμο HindIII (NEB) χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) που παρέχεται από τη εταιρία. Η πέψη έγινε σε τελικό όγκο 100μl στους 37°C σε υδατόλουτρο και διήρκησε πάνω από 16 ώρες (overnight). Ακολούθησε συμπίκνωση του δείγματος της αντίδρασης από 100μl στα 20μl με εφαρμογή κενού, με Vacuum Concentrator (Speedvac).

Τα δείγματα αναμίχθηκαν με χρωστική Orange G (5μl από 6×Orange G προστέθηκε σε κάθε 20μl δείγματος) και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% (agarose gel) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1×TAE με μικρή συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου, στα 20V για 16 ώρες (overnight).

Όταν τα δείγματα είχαν αναλυθεί καλά κρίνοντας από τον διαχωρισμό των ζωνών του μάρτυρα DNA (DNA ladder) το πήκτωμα αγαρόζης υπέστη πλύση αποπουρίνωσης σε 0,25N HCl (depurination buffer) για 7 λεπτά. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει τον κατακερματισμό των μεγαλομοριακών τμημάτων DNA (>10kb) σε μικρότερα τμήματα ώστε να μπορέσει να γίνει καλά η μεταφορά τους στην μεμβράνη.

Στην συνέχεια το πήκτωμα επωάσθηκε σε διάλυμα αποδιάταξης (1,5M NaCl, 0,5M NaOH, denaturating buffer) δύο φορές για 20 λεπτά. Το ίδιο και για το διάλυμα εξουδετέρωσης (3M NaCl, 0,5M Tris-HCl pH 7, neutralizing buffer) άλλα δυο εικοσάλεπτα πλυσίματα. Τέλος, εξισορροπείται για τουλάχιστον 10 λεπτά σε διάλυμα 10×SSC.

**20×SSC**
3M Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
0,3M Κιτρικό νάτριο ($C_6H_5Na_3O_7$-$2H_2O$)
Ρύθμιση του pH στο 7,0 με υδροχλώριο 1M HCl

Τα θραύσματα DNA μεταφέρονται σε μεμβράνη (Whatman, NytranR N, UK 0.2μm) (στύπωμα). Το στύπωμα γίνεται με μεταφορά με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων. Στη συνέχεια μονιμοποιούνται με ακτινοβολία UV, 60.000 μjoules/cm$^2$ σε ειδικό μηχάνημα (Stratalinker® UV Crosslinker).

Η ανίχνευση της αλληλουχίας στόχου έγινε με ανιχνευτή DIG (digoxigenin). Ο ανιχνευτής προκύπτει από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR DIG labeling (Roche PCR DIG Probe Synthesis Kit). Δηλαδή είναι μια PCR με μήτρα που περιέχει την αλληλουχία στόχο (pBIN p35S-mGFP4), εκκινητές ειδικούς για την αλληλουχία στόχο. Συγκεκριμένα:

mGFP4For2: TATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTC
mGFP4Rev2: TTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC

από την αντίδραση ενισχύονται κομμάτια μήκους 717bp που αντιστοιχεί στην πλήρη αλληλουχία mGFP4.

Ο έλεγχος της επιτυχίας της μεθόδου γίνεται με ηλεκτροφόρηση μικρού όγκου του ενισχυμένου τμήματος με νουκλεοτίδια DIG σε σύγκριση με τμήμα ενισχυμένο με απλά νοθκλεοτίδια. Αν η σήμανση έχει γίνει επιτυχώς το τμήμα που θα ενισχυθεί χρήσει DIG νουκλεοτιδίων πρέπει να έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος σε σχέση με το άλλο (band shift).

### 2.2.2 Υβριδοποίηση

Η υβριδοποίηση έγινε σε κυλίνδρους υβριδοποίησης στους 65°C για πάνω από 16 ώρες (overnight) σε διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης SDS (Church and Gilbert buffer).

**Διάλυμα υβριδισμού Church and Gilbert**
1% w/v BSA
1mM EDTA, pH 8
7% w/v Sodium dodecyl sulfate, SDS
0,5M phosphate buffer $NaPO_4$ pH7,2

### 2.2.3 Ανοσοανίχνευση

Στη συνέχεια η μεμβράνη με τα θραύσματα DNA, από τα οποία ο ανιχνευτής DIG έχει υβριδοποιηθεί μόνο με αυτά που φέρουν την αλληλουχία στόχο, υφίσταται δυο πεντάλεπτες πλύσεις στους 25°C με ένα διάλυμα 2×SSC, 0,1%SDS (Low Stringency Buffer). Στην συνέχεια ακολουθούν δυο μισάωρες πλύσεις στους 68°C με ένα διάλυμα 0,1×SSC, 0,1%SDS (High Stringency Buffer). Η διαδικασία λαμβάνει χώρα στους ίδιους κυλίνδρους στους οποίους προηγήθηκε η υβριδοποίηση.

Αμέσως μετά ακολούθησαν πλύσεις τους 25°C με τα ακόλουθα διαλύματα:

1. 1×Μαλεικό Οξύ, 0,3% Tween 20(v/v) (Washing buffer) για 10 λεπτά
2. 1×Μαλεικό Οξύ, 3% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη w/v (Regilait) (Blocking buffer) για 60 λεπτά
3. Προσθήκη του αντισώματος Anti-DIG fab fragment (Roche) στο Blocking buffer σε τελική συγκέντρωση 1/20000 και επώαση για 30 λεπτά
4. Washing buffer για 10 λεπτά ×2
5. 1×Μαλεικό Οξύ για 10 λεπτά
6. 0,1 M Tris 9,5, 0,1M NaCl (Detection buffer) για 10 λεπτά

Στη συνέχεια η μεμβράνη μεταφέρθηκε σε πλαστικό φάκελο και διαβρέχθηκε με διάλυμα εμφάνισης (8μl CDP-Star (Roch) σε 1ml Detection buffer). Παρέμεινε μέσα στον κλειστό φάκελο για 5 λεπτά και στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε καινούριο πλαστικό φάκελο και τοποθετήθηκε σε κασέτα αυτοραδιογραφίας. Η απεικόνιση του αποτελέσματος έγινε σε φιλμ αυτοραδιογραφίας σε χρόνους 5 έως 45 λεπτών μέχρι να αποτυποθεί το αποτέλεσμα με ευκρίνεια.

**1×Μαλεικό Οξύ (Maleic acid)**
1,5M Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
1 M Μαλεικό Οξύ (Maleic acid)
Ρύθμιση του pH στο 7,5 με πελέτες καυστικού νατρίου (NaOH)

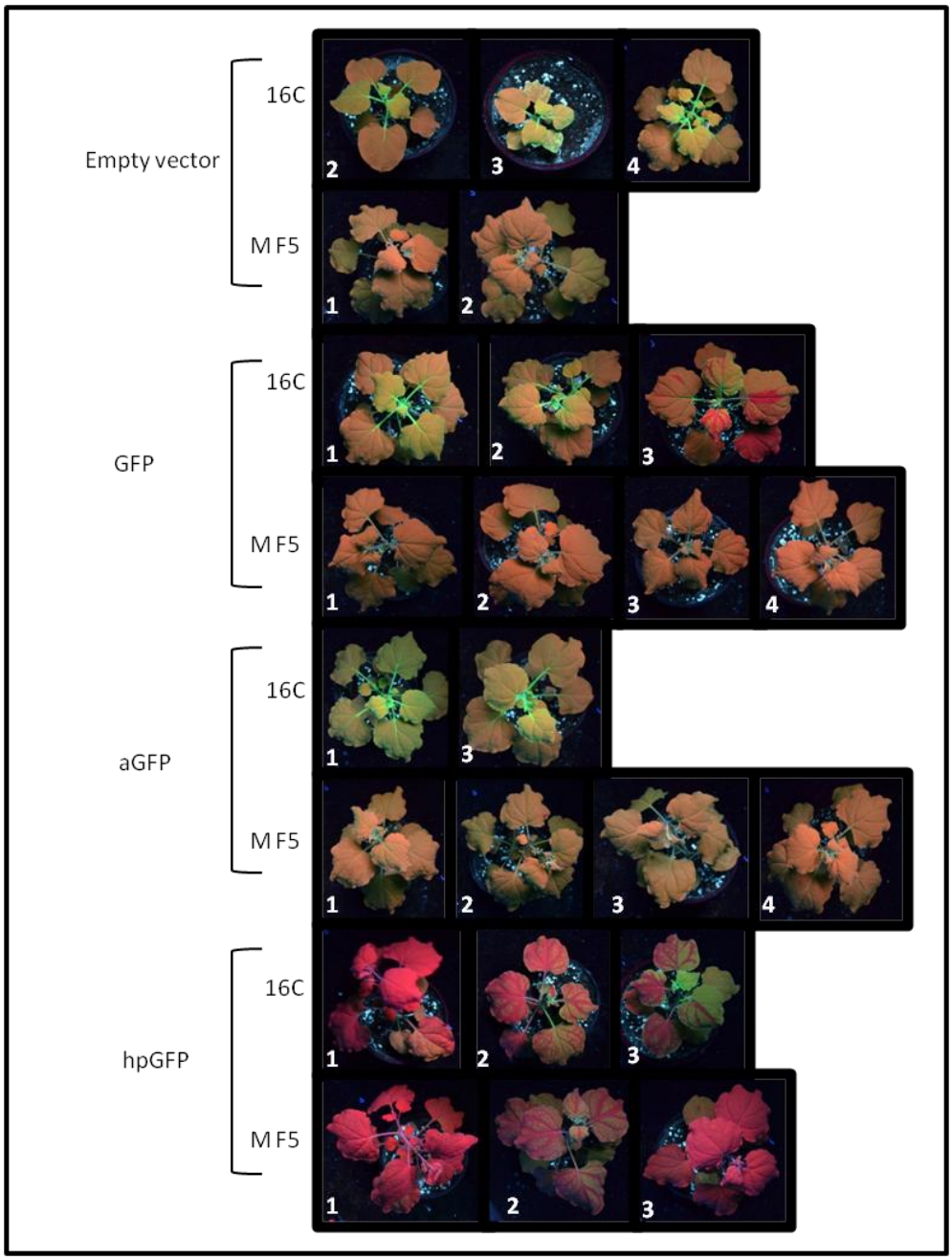
# Αποτελέσματα

## 3.1 Μελέτη φυτών DCL3.1i×GFP6.4

Όπως διατυπώθηκε και στην παράγραφο 1.5 άμεσος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να ελεγχθεί η υπόθεση ότι η καταστολή της DCL3 στα φυτά που έφεραν την φουρκέτα έχει κάποια επίδραση στην ικανότητα των απογόνων τους να σιγούν αυθόρμητα το διαγονίδιο της GFP.

Αρχικά τέθηκε το ερώτημα αν τα φυτά DCL3i×GFP της $F_5$ γενιάς δηλαδή η σειρά M, έχουν χάσει μόνο την ικανότητα της αυθόρμητης σίγησης του διαγονιδίου μάρτυρα ή αν έχουν χάσει πλήρως την ικανότητα σίγησης του διαγονιδίου. Για το σκοπό αυτό έγινε επαγωγή της μεταμεταγραφικής σίγησης σε νεαρά φυτά με παροδική υπερέκφραση με αγροεμπορισμό τριών διαφορετικών κατασκευών, ολόκληρης της GFP, αντινοηματικής GFP (antisence GFP, aGFP) και φουρκέτας GFP (hairpin GFP, hpGFP). Έτσι μπορεί να εξεταστεί ταυτόχρονα αν η αδυναμία της σίγησης της GFP οφείλεται σε κάποιο συγκεκριμένο βήμα του μονοπατιού παραγωγής των μικρών RNA. Για να ελεγχθεί ότι ίδια η μεταχείριση δεν επάγει τον μηχανισμό της σίγησης χρησιμοποιήθηκε ως τεχνικός μάρτυρας της μεθόδου πλασμιδιακός φορέας που φέρει μόνο την αλληλουχία του υποκινητή p35S.

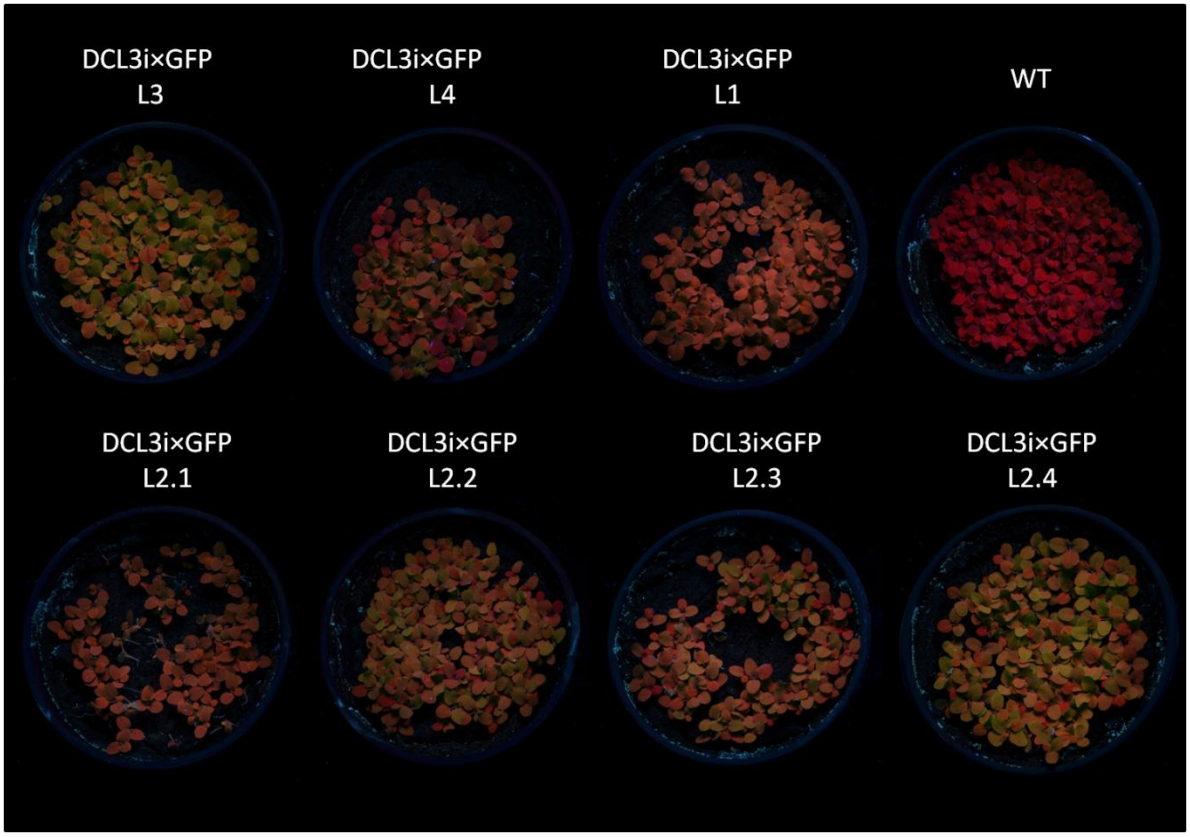
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5 τα φυτά στα οποία έγινε αγροεμποτισμός με τον πλασμιδιακό φορέας που φέρει μόνο την αλληλουχία του υποκινητή p35S δεν έγινε επαγωγή της σίγησης ούτε στα φυτά M ούτε στα φυτά 16C. Άρα αν σε κάποια από τις άλλες μεταχειρίσεις γίνει επαγωγή της σίγησης τότε κατά πάσα πιθανότητα η επαγωγή οφείλεται στην αλληλουχία που ακολουθεί μετά τον υποκινητή. Τόσο η υπερέκφραση της ίδιας της GFP (στην σειρά M στο φυτό 3) όσο και της φουρκέτας της (hpGFP) είναι ικανή να επάγει την σίγηση του διαγονιδίου GFP. Η υπερέκφραση της αντινοηματικής GFP (aGFP) δεν ενεργοποιεί την μεταμεταγραφική σίγηση του διαγονιδίου, αλλά δεδομένου ότι και ολόκληρη η GFP μπορεί να επάγει την σίγηση αυτό οφείλεται μάλλον σε τεχνικούς λόγους και όχι σε δυσκολία του μονοπατιού.




**Εικόνα 5** Επαγωγή της σίγησης του μεταγράφου της GFP μέσω αγροεμποτισμού Σε φυτά 16C και M F5. Τα φυτά φωτογραφήθηκαν 25 μέρες μετά τον αγροεμποτισμό κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

Τα φυτά M της γενιάς F5 παρουσιάζουν ενδιαφέροντα φαινότυπο, αλλά είναι απόγονοι μιας αρχικής διασταύρωσης. Για να γίνει ο συσχετισμός του φαινοτύπου της απώλειας της μεταμεταγραφικής σίγησης στους απογόνους φυτών με καταστολή της DCL3 πρέπει να εντοπιστεί αντίστοιχη επίδραση της καταστολής της DCL3 και στους απογόνους επιπλέον, πολλαπλών ανεξάρτητων διασταυρώσεων. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκαν οι φαινότυποι ως προς την σίγηση της GFP στους απογόνους. Από τις διασταυρώσεις που έγιναν από την Ελένη Ντανταμη ελέγχθηκαν οι απόγονοι ενός

ατόμου της σειράς L3 και ενός ατόμου της σειράς L4 από τις διασταυρώσεις που έγιναν από τον Dr.Verret ελέγχθηκαν οι απόγονοι ενός ατόμου της σειράς L1 και τεσσάρων ατόμων της σειράς L2. Δηλαδή συνολικά τέσσερις διαφορετικές διασταυρώσεις. Τα σπορεία αναπτύχθηκαν στις ίδιες συνθήκες σε θάλαμο 25°C.



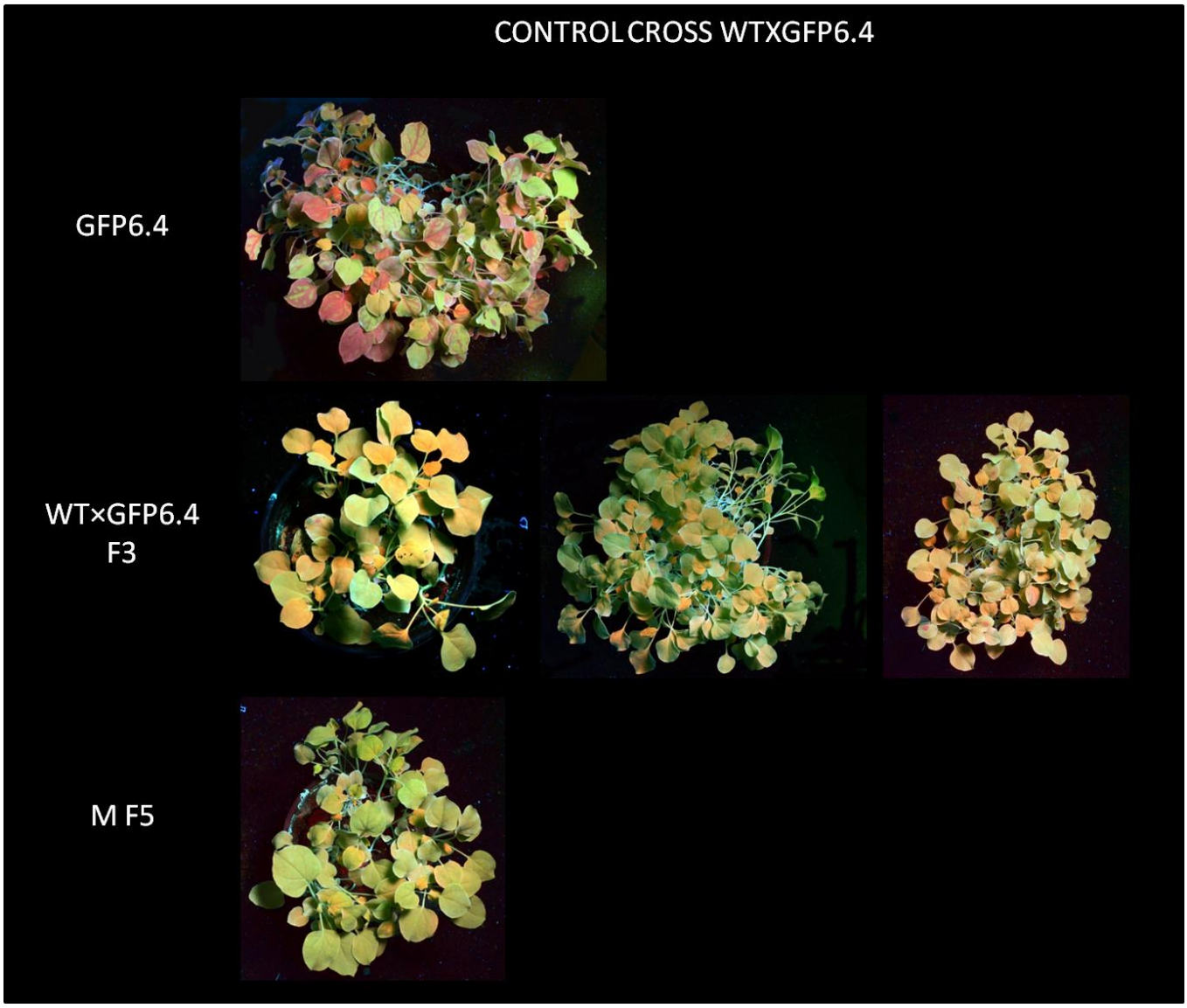

**Εικόνα 6** Απόγονοι τεσσάρων ανεξάρτητων διασταυρώσεων στην F3 γενιά. Οι διασταυρώσεις DCL3.1i×GFP6.4 L3 και L4 έγιναν στα πλαίσια του PhD της Ελένης Ντανταμη, ενώ οι διασταυρώσεις L1 και L2 έγιναν ανεξάρτητα. Για τις σειρές L1, L3 και L4 χρησιμοποιήθηκαν σπόροι ενός φυτού της F2 γενιάς που επιλέχτηκε φαινοτυπικά ως ομόζυγο για το διαγονίδιο της GFP. Για την σειρά L2 χρησιμοποιήθηκαν σπόροι από τέσσερα φυτά της F2 που επιλέχθηκαν ως ομόζυγα.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 6 η απώλεια της μεταμεταγραφικής σίγησης εντοπίζεται και στις σειρές DCL3.1i×GFP6.4 L2.1 και L1 γενιάς $F_2$. Δηλαδή ενώ στους απογόνους των L3, L4 και L2.2-4 παρατηρούνται κάποια φυτά με διασυστηματική σίγηση του διαγονιδίου μάρτυρα στο νέο αναπτυσσόμενο φύλλο, οι απόγονοι των σειρών L2.1 και L1 εμφανίζουν ομοιογενή φαινότυπο που θυμίζει φυτά γενιάς $F_1$. Αυτή η παρατήρηση ενισχύει την υπόθεση ότι η παρουσία της φουρκέτας κατά της DCL3 στο φυτό έχει επίδραση στην ικανότητα των απογόνων του να ενεργοποιούν την μεταμεταγραφική σίγηση του διαγονιδίου μάρτυρα.

Για να διαπιστωθεί αν η απώλεια της αυθόρμητης μεταμεταγραφικής σίγησης είναι πράγματι αποτέλεσμα της διασταύρωσης των συγκεκριμένων γονότυπων και όχι καθεαυτής της διασταύρωσης, πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις GFP φυτών με WT φυτά σαν μάρτυρας (Dr. Frederic Verret).

Από την διασταύρωση αυτή προέκυψαν επίσης σειρές στις οποίες δεν ενεργοποιούνταν ο μηχανισμός της αυθόρμητης σίγησης του διαγονιδίου μάρτυρα (Εικόνα 7). Την στιγμή που τα φυτά GFP6.4 έχουν ήδη ξεκινήσει να σιγούν το διαγονίδιο μάρτυρα υπάρχουν σπορεία WT×GFP6.4 γενιάς $F_3$ που ακόμη εκφράζουν ισχυρά το διαγονίδιο μάρτυρα και φαινοτυπικά είναι πανομυότυπα με τα φυτά M, δηλαδή τους απογόνους της αρχικής DCL3.1i×GFP6.4 διασταύρωσης που εντοπίστηκαν στην γενιά $F_5$ και παρότι δεν φέρον την φουρκέτα καταστολής της DCL3 δεν εμφανίζουν αυθόρμητη μεταμεταγραφική σίγηση.

Έτσι η αρχική υπόθεση ότι η απώλεια της μεταμεταγραφικής σίγησης σχετίζεται με την καταστολή της DCL3 στις προηγούμενες γενιές είναι μάλλον λανθασμένη. Το φαινόμενο φαίνεται να συνδέεται με το γεγονός της διασταύρωσης. Αυτό δημιουργεί αμφιβολίες για την γενετική σύσταση των γονικών GFP6.4 φυτών.




**Εικόνα 7** Σύγκριση απογόνων της διασταύρωσης GFP6.4×WT στην γενιά F3 με την σειρά M $F_5$.

## 3.2 Μελέτη φυτών GFP6.4

### WT×GFP6.4

Τα GFP6.4 φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την διασταύρωση ήταν πολύ προχωρημένης γενιάς (>$F_{35}$). Για να διαπιστωθεί αν έφεραν μια μοναδική ένθεση, όπως είχε αρχικά υποτεθεί, τα φυτά που διασταυρώθηκαν με αγρίου τύπου φυτά (backcross με WT) $F_2$ γενιάς, αναπτυχθήκαν σε στερεό θρεπτικό επιλεκτικό μέσο με καναμυκίνη. Αν τα φυτά έφεραν μια μοναδική ένθεση του διαγονιδίου το αναμενόμενο ποσοστό

θνησιμότητας στο αντιβιοτικό είναι 25%, σύμφωνα με τους νόμους κληρονόμησης του Mendel.

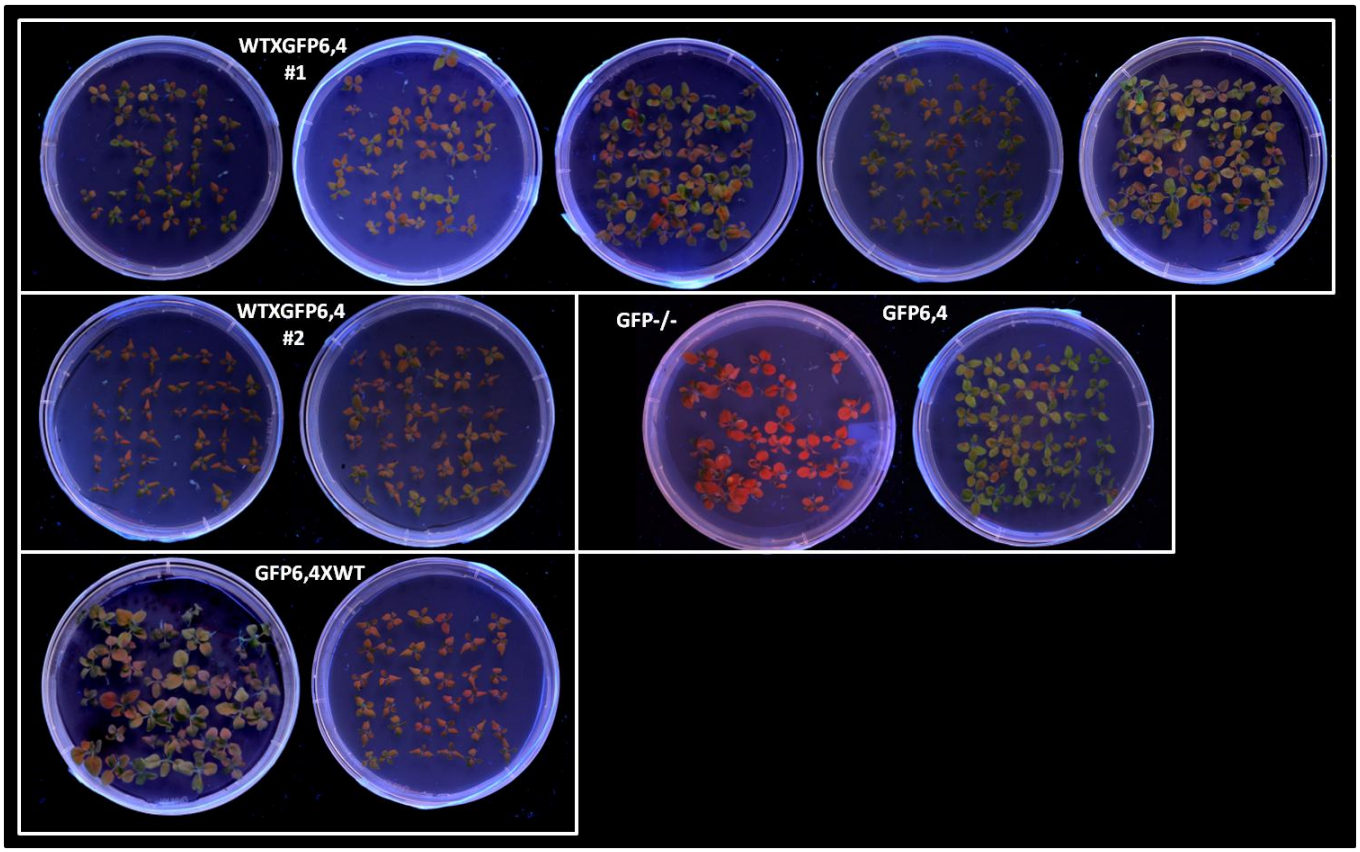
Τα μη ανθεκτικά φυτά (Kanamycin susceptible, $Kan^S$) δεν φέρουν κανένα αντίγραφο του διαγονιδίου, ενώ τα φυτά που επιβιώνουν στο αντιβιοτικό φέρουν τουλάχιστον ένα αντίγραφο του διαγονιδίου (Πίνακας 1). Φυτά WT και GFP6.4 χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός και θετικός μάρτυρας της τεχνικής αντιστοίχως (technical control).

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 το ποσοστό των μη ανθεκτικών φυτών απέχει πολύ από το 25%, και είναι πλησιέστερο στο 6% που αντιστοιχεί στην συχνότητα εμφάνισης απογόνων $F_2$ γενιάς χωρίς κανένα αντίγραφο του διαγονιδίου, για φυτά με δύο ενθέσεις.

**Πίνακας 1** Υπολογισμός του ποσοστού μη ανθεκτικών στην καναμυκίνη φυτών (Kanamycin susceptible, $Kan^S$) στην $F_2$ γενιά δυο ανεξάρτητων διασταυρώσεων WT×GFP6.4 (#1 και #2) και της αντίστροφής διασταύρωσης GFP6.4×WT. Οι WT και GFP6.4 σπόροι χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός και θετικός τεχνικός μάρτυρας αντίστοιχα.

| **Φυτό** | **Συνολικός αριθμός φυτών που βλάστησαν** | **$Kan^S$** | **Ποσοστό $Kan^S$** |
|---|---|---|---|
| WT×GFP6.4 #1 | 177 | 15 | 8% |
| WT×GFP6.4 #2 | 40 | 4 | 10% |
| GFP6.4×WT | 72 | 1 | 1% |
| WT | 36 | 0 | 100% |
| GFP6.4 | 36 | 36 | 0% |

Για να επιβεβαιωθεί ότι η κληρονόμηση της ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη αντικατοπτρίζει την κληρονόμηση του διαγονιδίου, τα φυτά που επιβίωσαν στο επιλεκτικό θρεπτικό ελέγχθηκαν και κάτω από UV ακτινοβολία και διαπιστώθηκε ότι πράγματι τα ανθεκτικά φυτά έχουν GFP φθορισμό (Εικόνα 8). Είναι άρα πολύ πιθανό τα φυτά GFP6.4 να φέρουν πράγματι δύο ενθέσεις του διαγονιδίου.

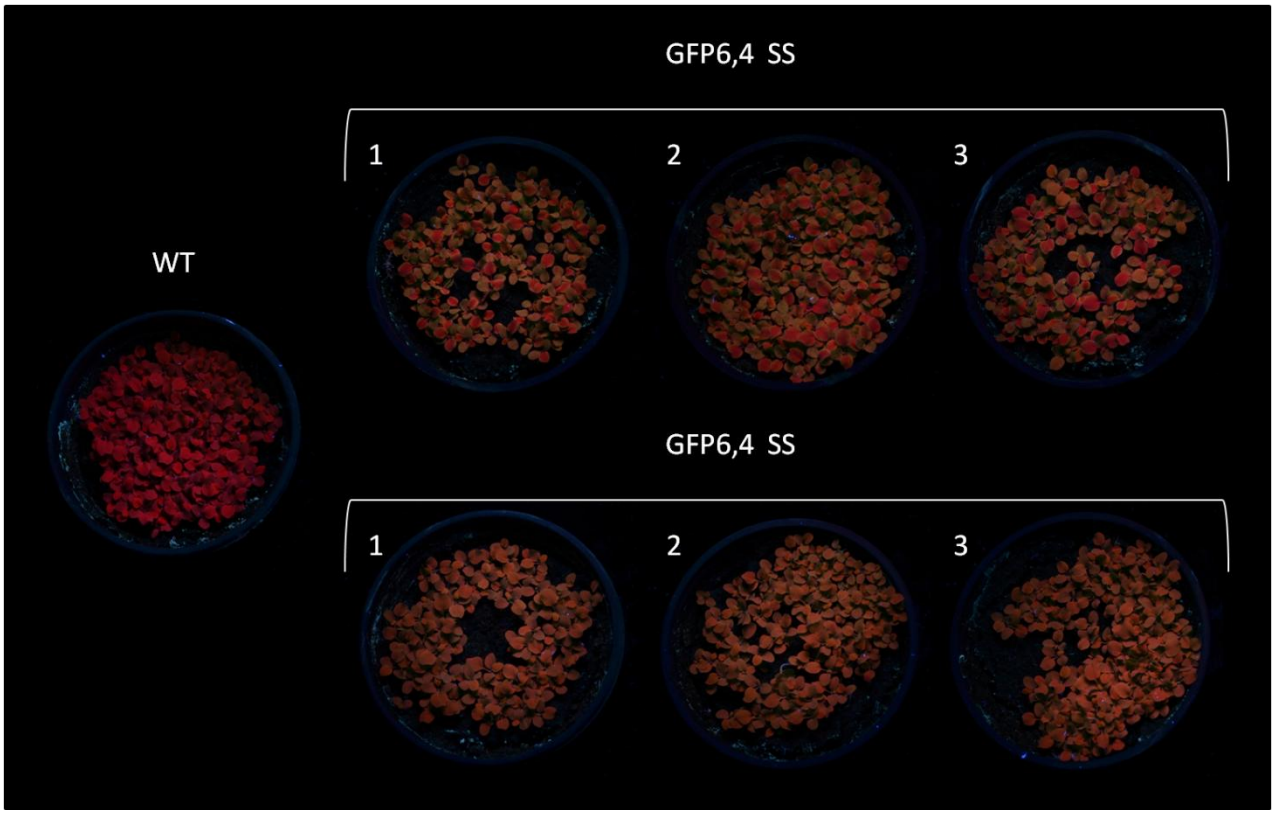



**Εικόνα 8** Τρυβλία με επιλεκτικό μέσο καναμυκίνης για ανάλυση διάσχισης του GFP διαγονιδίου κάτω από UV ακτινοβολία. Τα φυτά φωτογραφήθηκαν 30 ημέρες μετά την σπορά. Η ανθεκτικότητα των φυτών στην καναμυκίνη συνδέεται με την έκφραση του διαγονιδίου GFP.

## GFP6.4 NS/SS

Παράλληλα με την φαινοτυπική εξέταση των διασταυρώσεων των GFP6.4 φυτών ελέγχθηκαν για τον φαινότυπό τους υπό UV ακτινοβολία και φυτά που προέρχονται από GFP6.4 φυτά τα οποία δεν είχαν σιγήσει μεταμεταγραφικά το διαγονίδιο κατά την περίοδο της συλλογής των σπόρων. Για να διαχωριστούν τα φυτά αυτά σημειώνονται ως GFP6.4 NS (not silenced) σε αντιδιαστολή με τα αντίστοιχης γενιάς φυτά που προέρχονται από γονείς που έχουν σιγήσει διασυστηματικά το διαγονίδιο και σημειώνονται ως GFP6.4 SS (systemically silenced).

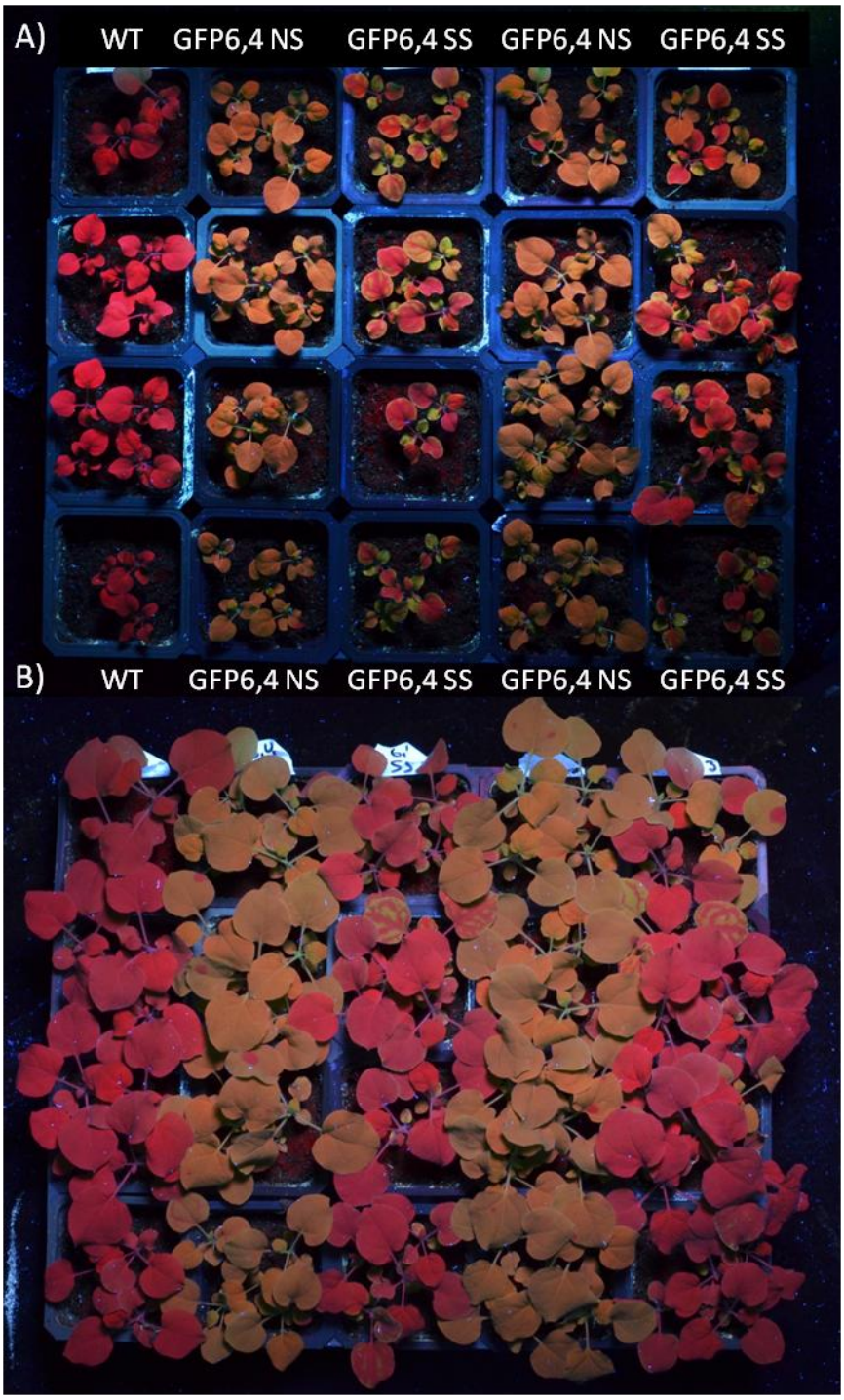
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 9 τα GFP6.4 NS φυτά δεν σιγούν το διαγονίδιο στον ίδιο χρόνο με τα GFP6.4 SS. Η καθυστέρηση αυτή έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς εμπλέκει την κατάσταση του φυτού γονέα ως προς την σίγηση του διαγονιδίου στην ικανότητα σίγησης των απογόνων του.




**Εικόνα 9**. Σπόροι GFP6.4 NS και GFP6.4 SS δύο εβδομάδες μετά την σπορά τους επιδεικνύουν διαφορά στην κάτω από UV ακτινοβολία

Για τεχνικούς λόγους η παρακολούθηση της εξέλιξης του φαινότυπου των φυτών αυτών δεν ήταν δυνατή. Αναμένονταν κάποια από τα GFP6.4 NS φυτά να σιγούν μεταμεταγραφικά το διαγονίδιο σε μεγαλύτερη ηλικία. Έτσι για να μελετηθεί η διαφορά στον φαινότυπο των GFP6.4 NS και SS φυτών για μεγαλύτερο χρόνο το πείραμα επαναλήφθηκε αυτή τη φορά εξετάζοντας δύο εκπροσώπους του εκάστοτε φαινότυπου.

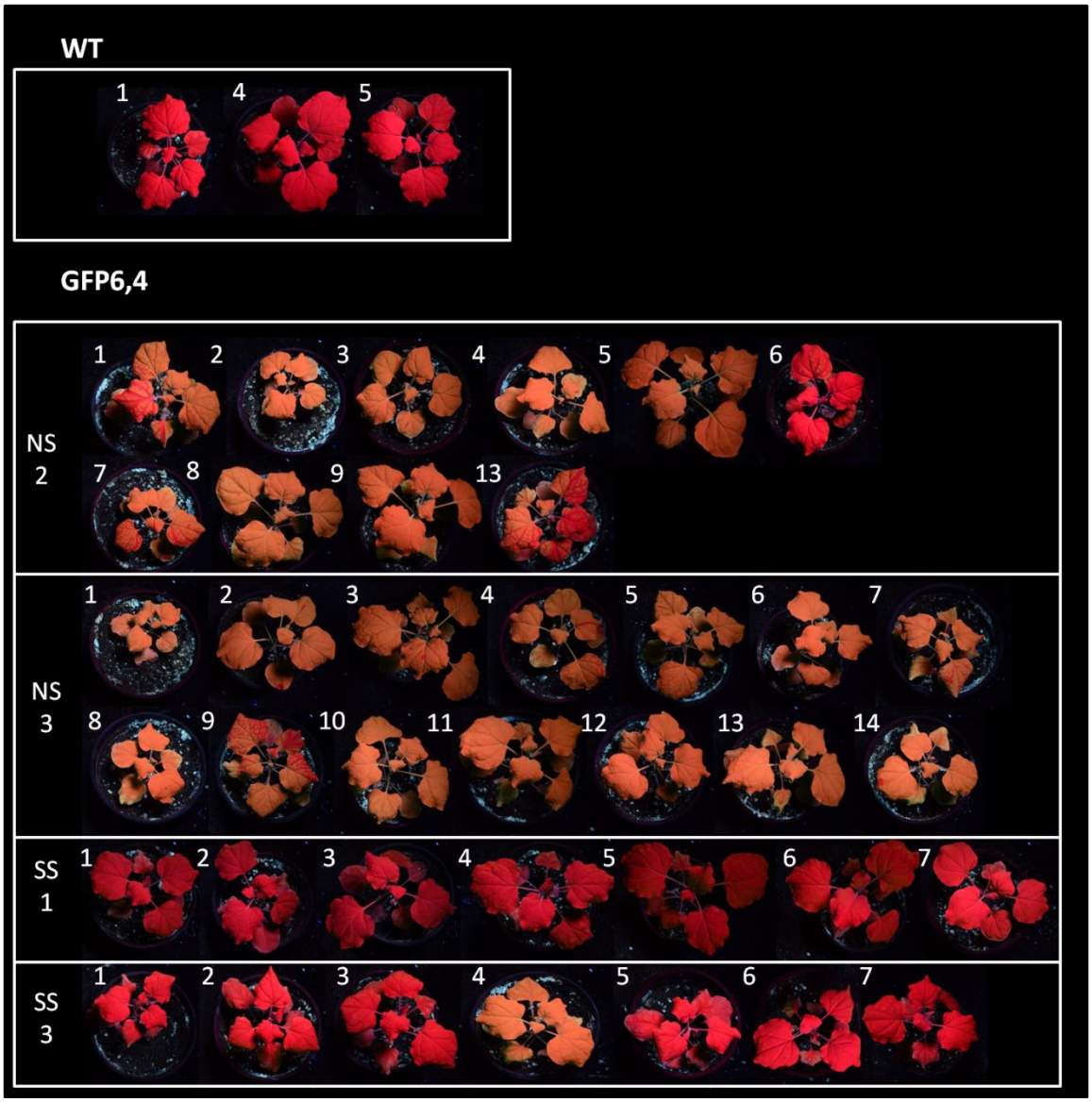
Η διαφορά στην ενεργοποίηση της σίγησης του διαγονιδίου είναι ξεκάθαρη. Τα φυτά GFP6.4 NS μέσα στις πρώτες τρείς εβδομάδες ανάπτυξης τους δεν έχουν εκδηλώσει στην πλειονότητα τους μεταμεταγραφική σίγηση του διαγονιδίου. Στον ίδιο χρόνο τα GFP6.4 SS φυτά έχουν περάσει από την φάση της διασυστηματικής σίγησης και έχουν σιγήσει πλήρως το διαγονίδιο (Εικόνα 10).




**Εικόνα 10** Φυτά GFP6.4 NS και SS υπό UV ακτινοβολία, ηλικίας A) δυο εβδομάδων, όπου τα SS φυτά έχουν ήδη περάσει στην φάση διασυστηματικής σίγησης και B) τριών εβδομάδων, όπου τα φυτά SS έχουν πλέον σιγήσει πλήρως το διαγονίδιο.

Τα φυτά μεταφυτεύθηκαν σε ατομικές γλάστρες και η ανάπτυξή τους συνεχίστηκε στο θερμοκήπιο. Από τα φυτά GFP6.4 NS κάποια μπήκαν σε φάση σίγησης αλλά τα περισσότερα διατήρησαν τον NS φαινότυπο. Αντιστοίχως από τα GFP6.4 SS φυτά μόνο ένα δεν σίγησε το

διαγονίδιο για αρκετό διάστημα ενώ όλα τα υπόλοιπα είχαν μπει στην φάση της πλήρους διασυστηματικής σίγησης (Εικόνα 11).



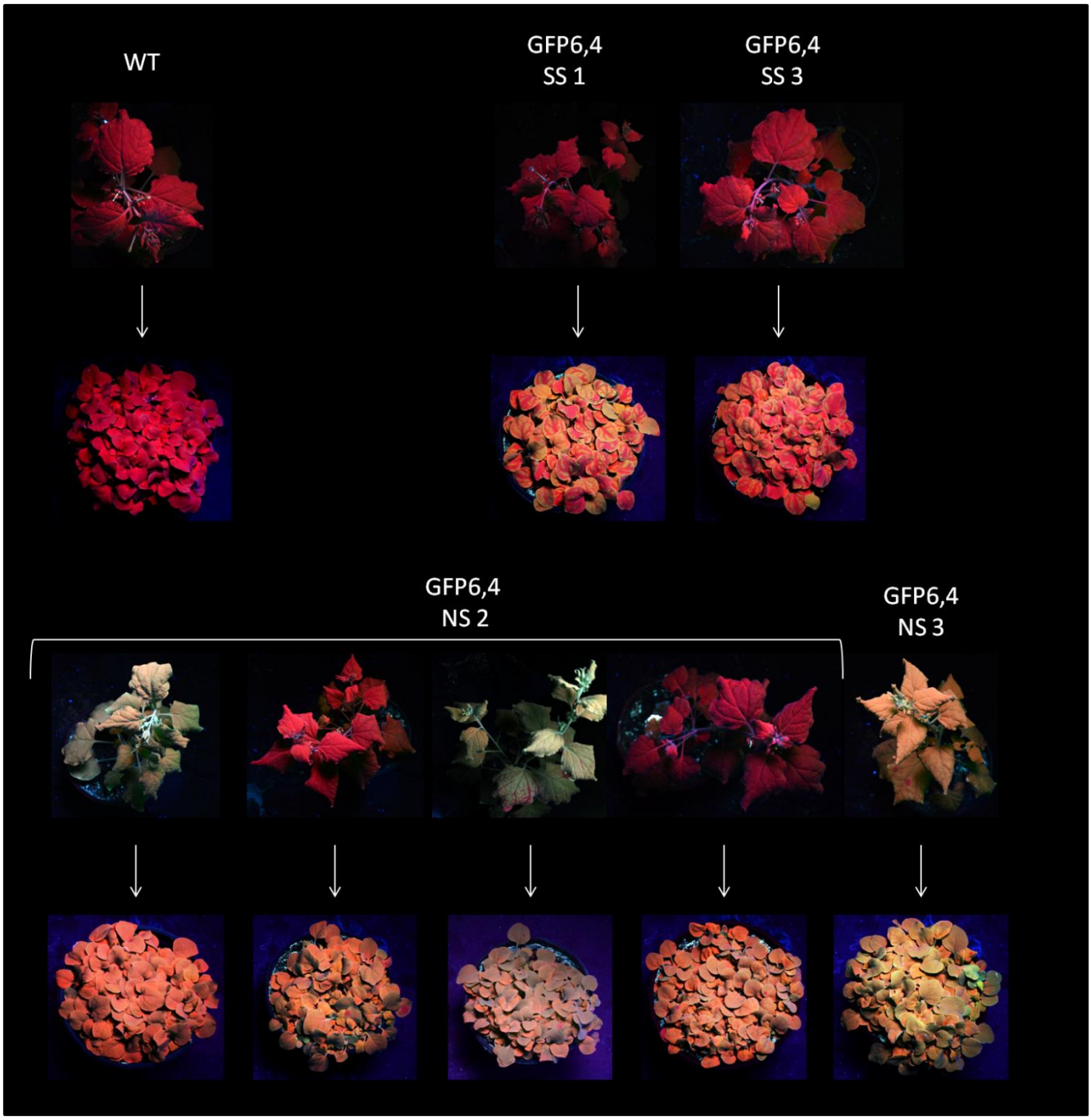

**Εικόνα 11** Απόγονοι των GFP6.4 NS και SS φυτών πέντε εβδομάδες μετά την βλάστηση τους.

Τα φυτά GFP6.4 NS και SS έχουν προέλθει από κοινό γονικό φυτό έπειτα από αυτογονιμοποίηση. Για το λόγο αυτό θεωρείται ότι γενετικά είναι πανομοιότυπα. Επομένως, η ανικανότητα των απογόνων των GFP6.4 NS φυτών να σιγούν το διαγονίδιο οφείλεται σε κάποιο επιγενετικό γεγονός το οποίο επηρεάζει την ικανότητα του φυτού να αναγνωρίζει τα διαγονιδιακά μετάγραφα ως μη φυσιολογικά (aberrant). Είναι σημαντικό να ελεγχθεί αν αυτή η ανικανότητα σίγησης του διαγονιδίου είναι κληρονομήσιμη, αν δηλαδή τα φυτά που προήλθαν

από GFP6.4 NS φυτό αλλά στην πορεία της ανάπτυξής τους ενεργοποίησαν την διασυστηματική σίγηση του διαγονιδίου δίνουν απογόνους τύπου GFP6.4 NS ή SS. Αντιστοίχως φυτά απόγονοι GFP6.4 SS που δεν σίγησαν τελικά το διαγονίδιο αν το φαινόμενο είναι κληρονομήσιμο πρέπει να δίνουν απογόνους που επίσης αργούν ή αδυνατούν να σιγήσουν το διαγονίδιο.

Από τα φυτά της Εικόνας 9 λίγα επιβίωσαν λόγω συγκεκριμένων στρεσσογόνων περιβαλλοντικών συνθηκών (έγινε ψεκασμός με αντιμυκιτιακό για την αντιμετώπιση φυτόφθορας με σκεύασμα που αφορά ξυλώδη φυτά και δεν είχε δοκιμαστεί ξανά στην *N. benthamiana*). Το φυτό 4 από την σειρά GFP6.4 SS 3 δεν επιβίωσε και δεν έδωσε σπόρο. Μπορέσαμε έτσι να ελέγξουμε μόνο το πρώτο σκέλος του ερωτήματος. Αν δηλαδή τα φυτά SS που προήλθαν από NS γονείς εμφανίζουν επίσης SS φαινότυπο. *A priori* το φαινόμενο αναμένεται, αν είναι όντως επιγενετικής φύσης, να αναστρέφεται. Δηλαδή η κληρονόμηση της άμεσης ενεργοποίησης του διαγονιδίου να εξαρτάται από το αν ο γονέας είναι σε κατάσταση πλήρους σίγησης κατά την παραγωγή των σπόρων.

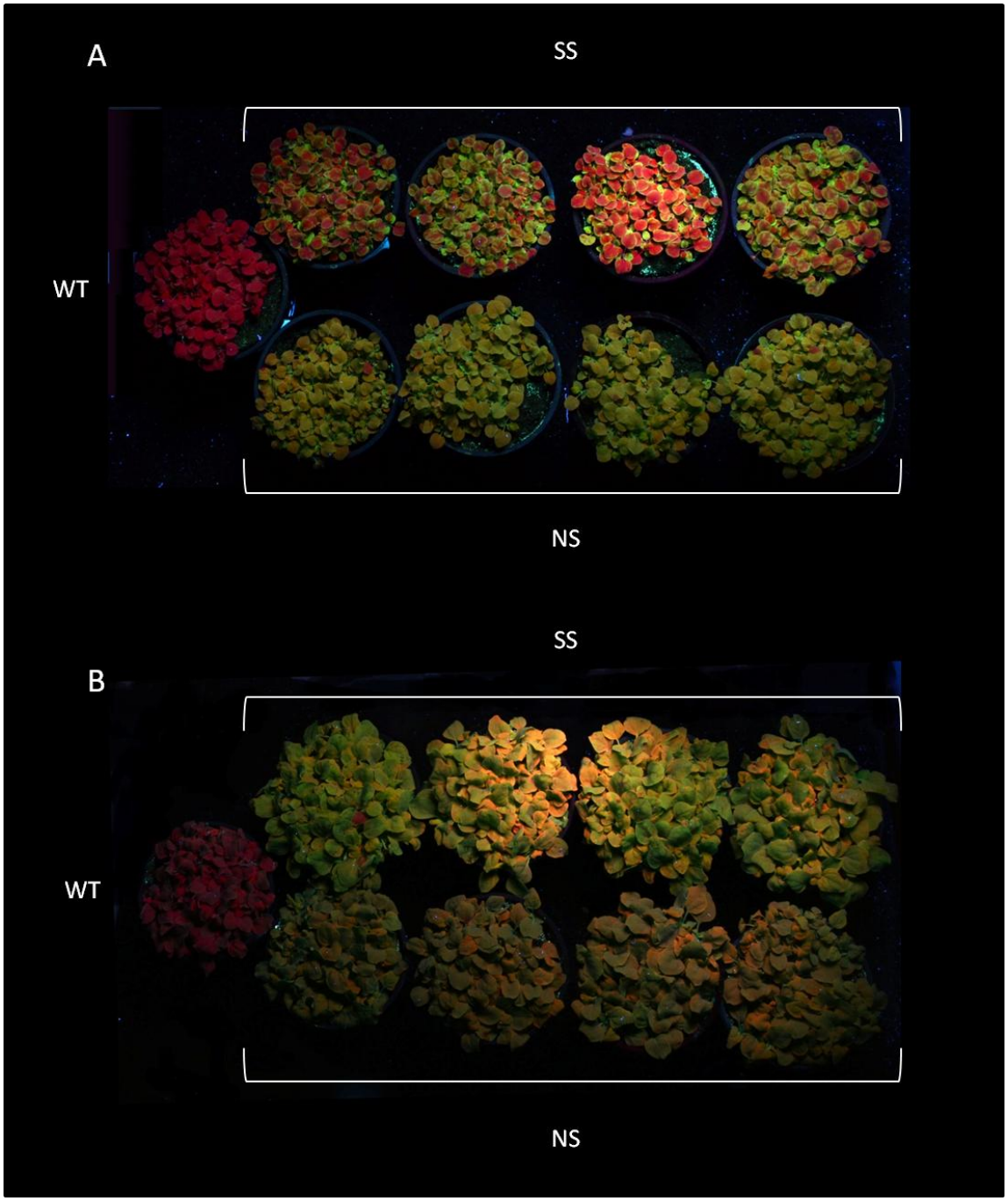
Η συγκεκριμένη υπόθεση κατατρίφθηκε καθώς όπως φαίνεται στην Εικόνα 12 τα φυτά απόγονοι των GFP6.4 NS που σίγησαν το διαγονίδιο και κατά την άνθηση τους βρίσκονταν σε κατάσταση πλήρους διασυστηματικής σίγησης, δίνουν απογόνους που εξακολουθούν να εμφανίζουν τον φαινότυπο NS.




**Εικόνα 12** Φυτά που προήλθαν από GFP6.4 NS και SS γονείς και οι απόγονοί τους. Το κάθε σπορείο εκπροσωπεί το αντίστοιχο φυτό γονέα και έχει προέλθει από μίξη των σπόρων από όλες τις κάψες.

Πρέπει να υπογραμμισθεί ότι οι συνθήκες βλάστησης των σπόρων ήταν ελεγχόμενες και είχε διαπιστωθεί ότι είναι οι ιδανικές διαθέσιμες συνθήκες για επαγωγή της σίγησης του διαγονιδίου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 10 σε διαφορετικές θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν ο φαινότυπος GFP6.4 NS είναι διακριτός από τον φαινότυπο GFP6.4 SS σε θερμοκρασία που επάγει την σίγηση, 25°C. Στην θερμοκρασία

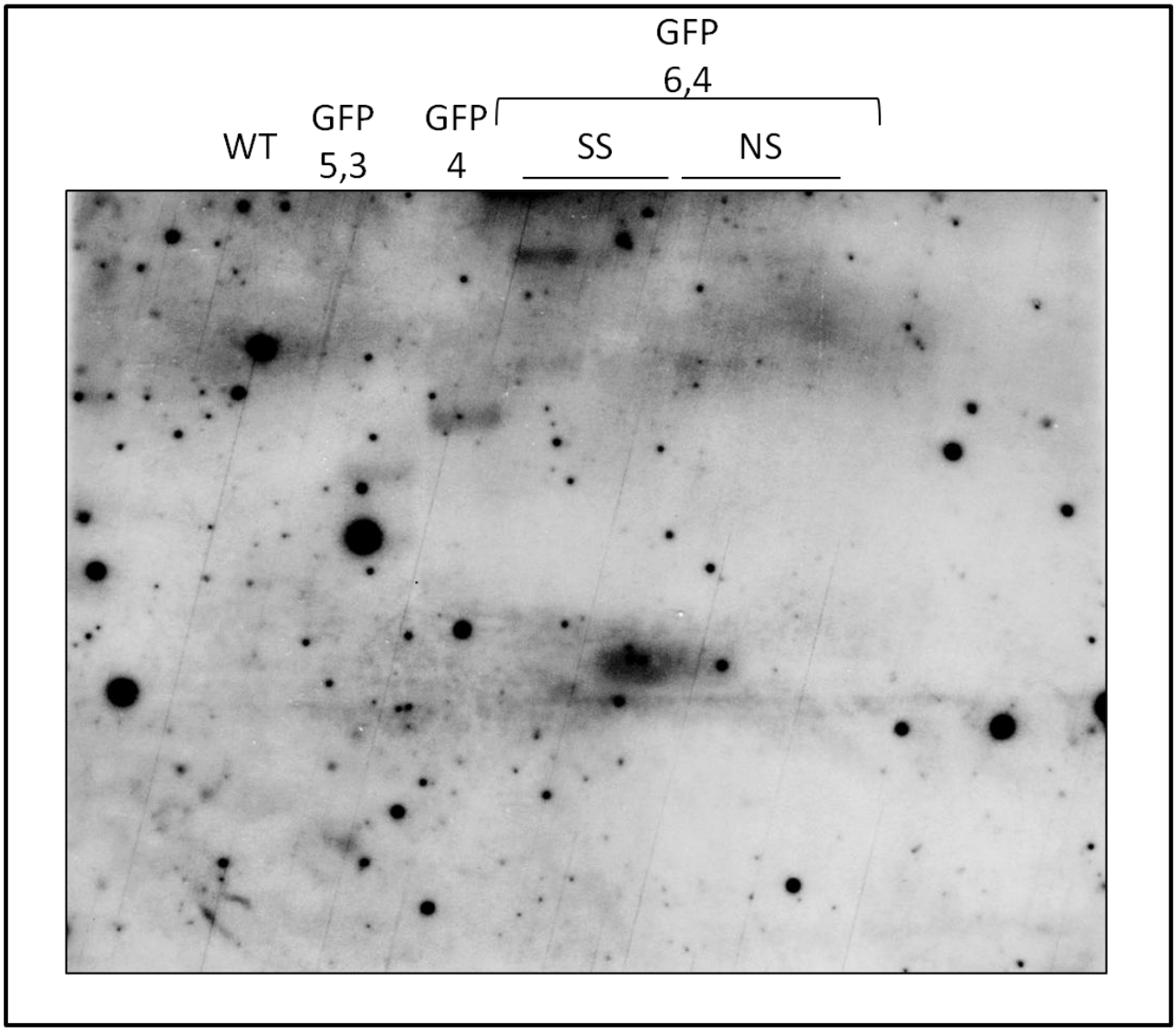
που δεν επάγει την σίγηση εξακολουθεί να παρατηρείται μειωμένη έκφραση του διαγονιδίου στα GFP6.4 NS φυτά σε σχέση με τα GFP6.4 SS.




**Εικόνα 3** Φυτά GFP NS και SS σε θερμοκρασία A) που επάγει την σίγηση του διαγονιδίου, 25°C και B) που δεν επάγει την σίγηση 23°C.

Η οριστική απάντηση δόθηκε με την ανίχνευση του διαγονιδίου GFP σε στύπωμα τύπου Southern. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα φυτά GFP5.3 τα οποία είναι

γνωστό ότι φέρουν δυο ενθέσεις και GFP4 τα οποία φέρουν μια ένθεση του διαγονιδίου. Όπως αποκαλύφθηκε τα GFP6.4 φυτά φέρουν δύο ενθέσεις του διαγονιδίου τόσο στην SS όσο και στην NS κατάσταση (Εικόνα 11). Στο δείγμα GFP5.,3 είναι εμφανείς δύο ζώνες παρότι η δεύτερη καλύπτεται από μια κηλίδα μη ειδικής υβριδοποίησης είναι συχνό ελάττωμα της μεθόδου χημικής ανίχνευσης και οφείλεται πιθανότατα σε υπολείμματα άλατος που προσδένονται από το αντίσωμα κατά την ανοσολογική ανίχνευση (immunodetection). Στο δείγμα GFP4 παρατηρείται ξεκάθαρα μια μοναδική ζώνη. Στα δείγματα GFP6.4 και στις δύο περιπτώσεις φαίνονται δύο ζώνες. Στα SS δείγματα η μεγαλύτερου μοριακού βάρους ζώνη είναι πιο έντονη.




**Εικόνα 4** Ανίχνευση του διαγονιδίου GFP με στύπωμα τύπου Southern σε ολικό DNA έπειτα από πέψη με το ένζυμο *Hind*III.

## Συζήτηση

## 4.1 Γενετικό υπόβαθρο GFP6.4

Η αρχική υπόθεση ότι τα φυτά που έφεραν την φουρκέτα καταστολής της DCL3 και διασταυρώθηκαν με GFP6.4 φυτά έπειτα από κάποιες γενιές παράγουν απογόνους που έχουν χάσει την ικανότητα σίγησης του διαγονιδίου, παρότι ήταν σύμφωνη με την βιβλιογραφία που εμπλέκει την DCL3 στην σίγηση των διαγονιδίων, κατατρίφθηκε από το γεγονός ότι και η διασταύρωση των GFP6.4 φυτών με φυτά αγρίου τύπου (WT) έπειτα από δύο γενιές είχε το ίδιο αποτέλεσμα. Έτσι η απώλεια της ικανότητας μεταμεταγραφικής σίγησης του γονίδιου μάρτυρα GFP οφείλεται στο γεγονός ότι τα φυτά δεν ήταν πλέον ομόζυγα και για τους δύο γενετικούς τόπους που αντιστοιχούν στο GFP διαγονίδιο.

Αυτή η παρατήρηση εξηγείται απόλυτα από την διαπίστωση ότι τα φυτά φέρουν δύο ενθέσεις και άρα η κληρονόμηση του διαγονιδίου καθώς και η ποσότητα των αλληλομόρφων που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση του μηχανισμού της σίγησης είναι προς διερεύνηση. Δεν είναι δηλαδή σαφές πόσα από τα τέσσερα αλληλόμορφα του διαγονιδίου αντιστοιχούν στον κάθε φαινότυπο ως προς την ένταση του φθορισμού και καθως επίσης πόσα είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση της σίγησης του. Θα μπορούσε για παράδειγμα η σίγηση του διαγονιδίου να προϋποθέτει την παρουσία του διαγονιδίου και στις δύο θέσεις ένθεσης σε ομόζυγη κατάσταση. Αυτό ενδεχομένως να εξηγεί και το ότι τα φυτά που θα σιγήσουν το διαγονίδιο φαίνεται να φθορίζουν περισσότερο. Σε αυτή την περίπτωση τα φυτά που φαίνονται να έχουν λιγότερο έντονο φθορισμό εκπροσωπούν τους υπόλοιπους συνδυασμούς των τριών αλληλομόρφων.

Αυτή η υπόθεση θα εξηγούσε την εμφάνιση του φαινότυπου μη σίγησης του διαγονιδίου στην περίπτωση των διασταυρώσεων καθώς είναι η πιθανότητα εμφάνισης του ομόζυγου γονότυπου στην F2 γενιά μετά την διασταύρωση είναι 6% (1:16) σύμφωνα με τον δεύτερο νόμο κληρονόμησης του Mendel. Αυτό όμως δεν καλύπτει την περίπτωση εμφάνισης του NS φαινότυπου σε απογόνους GFP6.4 ομόζυγων φυτών. Το ότι τα φυτά GFP6.4 NS είναι ομόζυγα και για τους δύο γενετικούς τόπους προκύπτει από το γεγονός ότι είναι απόγονοι φυτών GFP6.4 πολύ προχωρημένης γενιάς (>$F_{35}$). Για οποιοδήποτε διαγονίδιο που έχει εισαχθεί δυο φορές στο γονιδίωμα από γενιά σε γενιά οι δυο ενθέσεις κληρονομούνται ως ανεξάρτητα ασύνδετα γονίδια. Έτσι στις επόμενες γενιές λόγω γενετικής παραλλακτικότητας θα

εμφανίζονταν φυτά με όλους τους συνδυασμούς των αλληλομόρφων και λόγω του ότι τα ομόζυγα φυτά και για τις δύο ενθέσεις (GFP+/+:GFP+/+) είναι λιγότερο συχνά από τα ομόζυγα για τη μια ένθεση (GFP+/+:GF+/-) θα προέκυπταν στον πληθυσμό και φυτά τα οποία θα έφεραν μια μόνο ομόζυγη ένθεση (GFP+/+:GFP-/-), σύμφωνα με το φαινόμενο γενετικής απομάκρυνσης λόγω διάσχισης (segregation). Στην περίπτωση όμως των GFP φυτών επειδή το διαγονίδιο έχει εμφανή φαινότυπο, τον φθορισμό, είναι εύκολη η τεχνητή γενετική επιλογή. Συγκεκριμένα, κάθε φορά από ένα σπορείο επιλέγονταν κάτω από UV ακτινοβολία τα φυτά με τον πιο έντονο φθορισμό πρακτικά αυξάνονταν η συχνότητα των αλληλομόρφων GFP από γενιά σε γενιά. Έτσι γνωρίζοντας ότι τα φυτά GFP6.4 φέρουν δυο ενθέσεις είναι ασφαλές να υποτεθεί ότι και οι δυο ενθέσεις είναι σε ομόζυγη κατάσταση. Επιπλέον ένδειξη για το ότι τα GFP6.4 φυτά είναι ομόζυγα και για τους δυο γενετικούς τόπους είναι ότι όταν διασταυρώθηκαν με WT φυτά το ποσοστό των GFP-/- στην γενιά F2 (μη ανθεκτικά στην καναμυκίνη, Πίνακας 1), είναι πολύ κοντά στο 6% που σύμφωνα με τον δεύτερο νόμο του Mendel είναι χαρακτηριστικό της αυτογονιμοποίησης φυτών ετερόζυγων για δυο γενετικούς τόπους. Στην περίπτωση που ο γονέας ήταν ομόζυγος για τον ένα και ετερόζυγος για τον άλλο γενετικό τόπο (GFP+/+: GFP+/-) στην F2 θα αναμένονταν μεγαλύτερη συχνότητα μη ανθεκτικών στην καναμυκίνη απογόνων.

## 4.2 Φαινότυπος GFP6.4 NS

Είναι μάλλον ασφαλές να θεωρήσουμε ότι ο φαινότυπος της απώλειας της μεταμεταγραφικής σίγησης είναι ασύνδετος με την καταστολή της DCL3, καθώς είναι πλέον εμφανές ότι η κατάσταση της σίγησης του διαγονιδίου στον γονέα επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης καθώς και τον χρόνο και την συχνότητα εμφάνισης της αυθόρμητης σίγησης του διαγονιδίου μάρτυρα στους απογόνους.

Παράλληλα όμως τα φυτά GFP6.4 αναδεικνύονται ως πολύ ενδιαφέρον μοντέλο για την μελέτη του φαινομένου της αυθόρμητης σίγησης του διαγονιδίου μάρτυρα. Εκ πρώτης όψεως το φαινόμενο μη σίγησης του διαγονιδίου έγκειται μάλλον σε κάποια επιγενετική τροποποίηση αλλά το γεγονός ότι δεν αντιστρέφεται όπως φάνηκε στην Εικόνα 10 μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν είναι τόσο προφανής η απάντηση.

Επιπλέον αν εξετασθούν σαν σύνολο οι απόγονοι των GFP6.4 NS φυτών διαπιστώνεται ότι παρότι δεν εμφανίζουν διασυστηματική σίγηση κατά την ανάπτυξή

τους κάποια άτομα εμφανίζουν κηλίδες σίγησης. Παράλληλα η ένταση του φθορισμού τους είναι ομοιογενής αλλά σταθερά χαμηλότερη από αυτή των GFP6.4 SS. Δηλαδή θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι τα φυτά GFP6.4 NS εμφανίζουν πλέον φαινότυπο Type-II με χαμηλότερη ένταση φθορισμού και εμφάνιση κηλίδων τοπικής σίγησης που δεν εξελίσσονται σε διασυστηματική σίγηση παρά μόνο σε λίγες περιπτώσεις. Αυτή η λογική αναδεικνύει το σύστημα GFP6.4 NS/SS σε ένα πολύ ενδιαφέρον μοντέλο μελέτης των διαφορών και ενδεχομένως της σχέσης των δύο αποκρίσεων.

Αξίζει να αποσαφηνιστεί αν κατά την διασυστηματική σίγηση του διαγονιδίου από τα φυτά GFP6.4 NS (στις συγκεκριμένες περιπτώσεις) παράγονται ο γνωστοί πληθυσμοί siRNA σε αναντιστοιχία με τα GFP6.4 SS φυτά. Ή αν η διαφορά στην ικανότητα των απογόνων τους να σιγήσουν το διαγονίδιο έγκειται στην μη παραγωγή κάποιου σήματος από τους γονείς.

Ερωτήματα που αξίζει να απαντηθούν άμεσα για την συνέχιση της πορείας του εργαστηρίου προς την κατανόηση του μηχανισμού είναι αν το φαινόμενο της διαφορετικής απόκρισης (Type-II και Type-III) των φυτών με το ίδιο γενετικό προφίλ στην έκφραση του διαγονιδίου μπορεί να συσχετιστεί με διαφορές στο πρότυπο μεθυλίωσης του διαγονιδίου. Κάτι τέτοιο θα εξηγούσε τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου που οδηγούν στο χαμηλότερο φθορισμό.

Τέλος, πρέπει να υπογραμμισθεί ότι η κατανόηση του μηχανισμού που επιτρέπει στις επόμενες γενιές να μην αναγνωρίζουν ένα διαγονίδιο που εκφράζεται διασυστηματικά υπό ισχυρό υποκινητή ως μη φυσιολογικό και να το σιγούν, πέρα από πολύτιμη συμβολή στην κατανόηση της λειτουργίας των μηχανισμών της σίγησης αποτελεί και γνώση αξιοποιήσιμη στην βιοτεχνολογία φυτών.

## Βιβλιογραφία


1. Bernstein, E. Caudy, A.A., Hammond S. M., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Letters to Nature 409,363–366.
2. Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Meins, F. Jr., Hohn, T., Pooggin, M.M. 2006. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. Nucleic Acids Research 34, 6233-6246.
3. Bologna, N.G., Voinnet, O., 2014. The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in *Arabidopsis*. Annual Review of Plant Biology Annu. Rev. Plant Biol. 65, 473–503.
4. Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., Zhu, J.K. 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. Cell. 123, 1279-1291.
5. Brosnan, C., Mitter, N., Christie, M., Smith, N., Waterhouse, P., Carroll, B., 2007. Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 14741-14746.
6. Chan, S.W., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L.K., Carrington, J.C., and Jacobsen, S.E. 2004. RNA silencing genes control de novo DNA methylation. Science 303, 1336.
7. Daxinger, L., Kanno, T., Bucher, E., van der Winden, J., Naumann, U., Matzke, A., Matzke, M., 2008. A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. The EMBO Journal 28, 48-57.
8. Diaz-Pendon, J., Li, Ding, 2007. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *The Plant cell*, 19(6), 2053–63.
9. Dunoyer, P., Himber, C., Ruiz-Ferrer, V., Alioua, A., and Voinnet, O. 2007. Intra- and intercellular RNA interference in Arabidopsis thaliana requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. Nature Genetics 39, 848-856.
10. Eamens, A., Wang, M., Smith, N., Waterhouse, P., 2008. RNA Silencing in Plants: Yesterday, Today, and Tomorrow. Plant Physiology 147, 456-468.
11. Fusaro, A., Matthew, L., Smith, N., Curtin, S., Dedic-Hagan, J., Ellacott, G., Watson, J., Wang, M., Brosnan, C., Carroll, B., Waterhouse, P., 2006. RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. EMBO reports 7, 1168-1175.
12. Hamilton, A., 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. The EMBO Journal 21, 4671-4679.
13. Haseloff, J., Siemering, K., Prasher, D., Hodge, S., 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. Proceedings of the National Academy of Sciences 94, 2122-2127.
14. Hutvagner, G., 2002. A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex. Science 297, 2056-2060.

15. Hutvágner, G., Zamore, P.D., 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5589), 2056–60.
16. Kalantidis, K., Tsagris, M., Tabler, M., 2006. Spontaneous short-range silencing of a GFP transgene inNicotiana benthamianais possibly mediated by small quantities of siRNA that do not trigger systemic silencing. The Plant Journal 45, 1006-1016.
17. Koscianska, E., Kalantidis, K., Sadowski, J. and Tabler, M., 2005. Analysis of RNA silencing in agro-infiltrated leaves of Nicotiana benthamiana and Nicotiana tabacum. Plant Molecular Biology, 59(4), 647-61.
18. Kotakis, C., Vrettos, N., Daskalaki, M., Kotzabasis, K., Kalantidis, K., 2011. DCL3 and DCL4 are likely involved in the light intensity - RNA silencing cross talk in Nicotiana benthamiana. Plant Signaling & Behavior 6, 1180-1182.
19. Laubinger, S., Zeller, G., Henz, S.R., Buechel, S., Sachsenberg, T., Wang, J.W., G., Weigela, D. 2010. Global effects of the small RNA biogenesis machinery on the Arabidopsis thaliana transcriptome. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 107, 17466-17473.
20. Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B., Matzke, A., 2009. RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. Current Opinion in Cell Biology 21, 367-376.
21. Meister, G.Tuschl, T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature 431, 343-349.
22. Melnyk, C., Molnar, A., Bassett, A., Baulcombe, D., 2011. Mobile 24 nt Small RNAs Direct Transcriptional Gene Silencing in the Root Meristems of Arabidopsis thaliana. Current Biology 21, 1678-1683.
23. Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Peragine, A., Endres, M.W., Li, J., Chen, X., Poethig, R.S., Bowman, L.H., Vance, V. 20083. DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in Arabidopsis. PLoS One e1755.
24. Ruiz, M.T., Voinnet, O., Baulcombe, D.C. 1998.Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. Plant Cell 10, 937-946.
25. Schöb, H., Kunz, C. & Meins, F., 1997. Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. Molecular and General Genetics MGG 256, 581-585.
26. Tournier, B., Tabler, M., Kalantidis, K., 2006. Phloem flow strongly influences the systemic spread of silencing in GFPNicotiana benthamianaplants. The Plant Journal 47, 383-394.
27. Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gasciolli, V., Mallory, A., Hilbert, J., Bartel, D., Crété, P., 2004. Endogenous trans-Acting siRNAs Regulate the Accumulation of Arabidopsis mRNAs. Molecular Cell 16, 69-79.
28. Wassenegger, M., 2005. The Role of the RNAi Machinery in Heterochromatin Formation. Cell 122, 13-16.
29. Weiste, C., Iven, T., Fischer, U., Oñate-Sánchez, L., Dröge-Laser, W. 2007. In planta ORFeome analysis by large-scale over-expression of GATEWAY-compatible cDNA clones: screening of ERF transcription factors involved in abiotic stress defense. Plant Journal, 52, 382–390.
30. Xie, M., Zhang, S., Yu, B., 2015. microRNA biogenesis, degradation and activity in plants. Cellular and Molecular Life Sciences 72(1), 87-99.

31. Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilbermanm, D., Jacobsen, S.E., Carrington, J.C. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. PLOS Biology 2, 642-652.

## Μέρος 2ο: "Διερεύνηση της επίδρασης της υπερέκφρασης του αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου ενζύμου DXS από το φυτό *Salvia pomifera την* βιοσύνθεση τερπενοειδών ενώσεων σε διαγονιδιακές σειρές *Nicotiana benthamiana*."

### Εισαγωγή

### 1.1 Δευτερογενής μεταβολισμός:

Δευτερογενής μεταβολισμός ονομάζεται η μεταβολική δραστηριότητα μέσω της οποίας παράγονται προϊόντα από πρόδρομα μόρια του πρωτογενούς μεταβολισμού. Το πρότυπο παραγωγής των δευτερογενών μεταβολιτών ποικίλει μεταξύ των διαφόρων φυτικών ειδών, διαμορφώνοντας μία ξεχωριστή φυτοχημική ταυτότητα σε κάθε είδος. Με βάση τα πρόδρομα μόρια από τα οποία προέρχονται, οι δευτερογενής μεταβολίτες, διακρίνονται σε φαινολικές ουσίες (οι οποίες έχουν τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο), αζωτούχες ενώσεις και τερπένια.

### 1.2. Τερπένια:

Τα τερπένια (αλλιώς, τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή) έχουν ως βασική δομική μονάδα το ισοπρένιο ($C_5H_8$). Αποτελούν μία κατηγορία οργανικών ενώσεων των οποίων ο βασικός σκελετός είναι ένα μόριο υδρογονάνθρακα με 5 άτομα άνθρακα. Με τον πολυμερισμό των βασικών ομάδων (2,4,6,8,...,n) δημιουργούνται μεγαλύτερα μόρια, διαφορετικά μεταξύ τους, τα οποία ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των μορίων ισοπρενίου στο μόριο τους σε μονοτερπένια $(C_5H_8)_2$, σεσκιτερπένια $(C_5H_8)_3$, διτερπένια $(C_5H_8)_4$, τριτερπένια $(C_5H_8)_6$, τετρατερπένια $(C_5H_8)_8$, πολυτερπένια $(C_5H_8)_n$ (Φυσιολογία Φυτών, Κεφάλαιο 10, Γεώργιος Καραμπουρνιώτης).

Πέρα από τον φυσιολογικό τους ρόλο στην βιολογία των φυτών, τα τερπένια έχουν και μεγάλη αξία και στην ζωή του ανθρώπου. Πολλά τερπένια έχουν μεγάλη εμπορική αξία καθώς χρησιμοποιούνται στην αρωματοποιία, στην φαρμακοβιομηχανία και στην ιατρική. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της αξίας των τερπενοειδών στην ανθρώπινη ζωή αποτελούν η ταξόλη, ένα διτερπενιο πολύ αποτελεσματικό στην θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου (Jennewein & Croteau., 2001) και οι αρτεμισίνες από το

φυτό *Artemisia annua* που αποτελούν θεραπέια ενάντια στην ελονοσία (Martin *et al*., 2003)(Paddon *et al*., 2013).

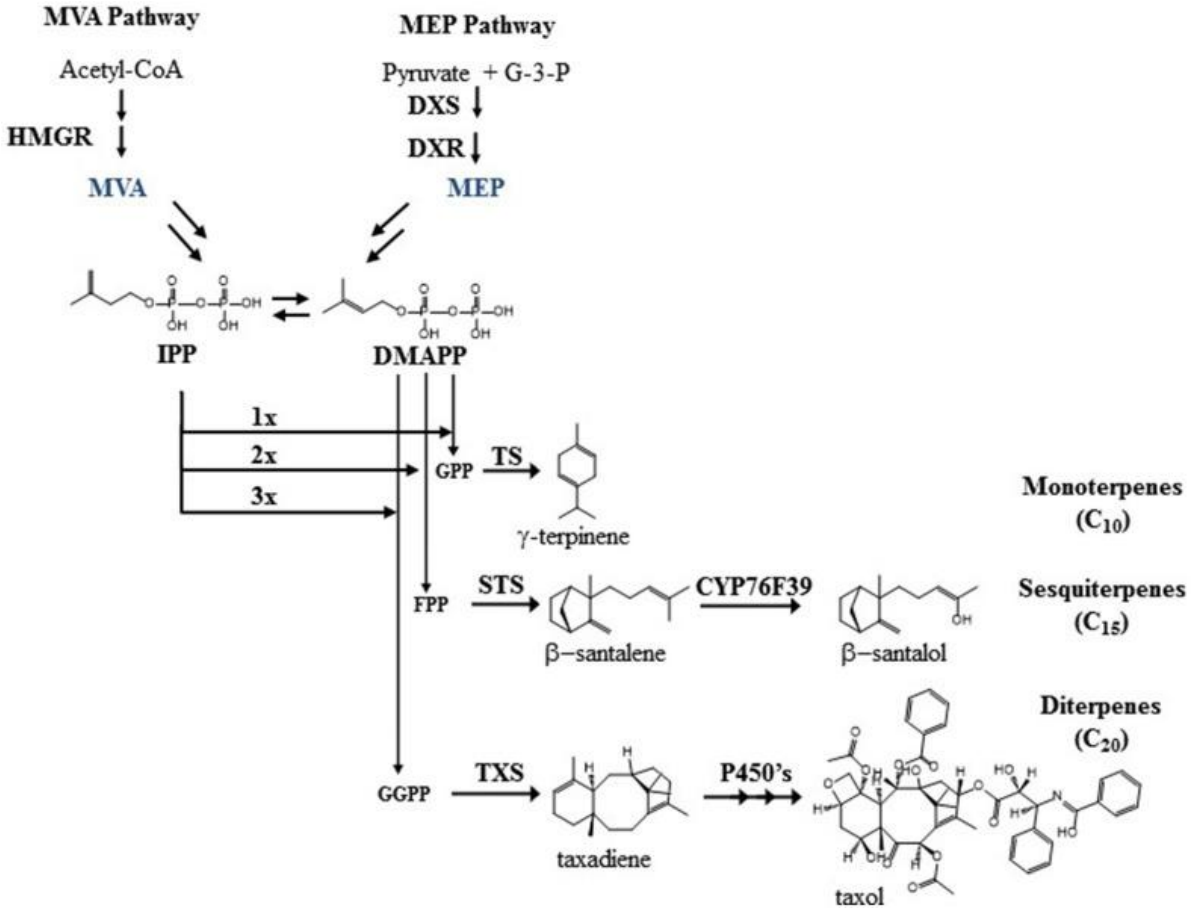
## 1.3. Βιοσύνθεση των τερπενίων:

Όλα τα ισοπρενοειδή βιοσυντίθενται από δύο πρόδρομα μόρια, το διφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) και το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (isopentenyl diphosphate, IPP). Για την βιοσύνθεση αυτών των δύο πρόδρομων μορίων τα φυτά διαθέτουν δύο μονοπάτια, ένα κυτταροπλασματικό και ένα πλαστιδιακό. Το κυταροπλασματικό μονοπάτι ονομάζεται μονοπάτι του μεβαλονικού οξέως (mevalonate pathway, MVA) και απαντάται στους περισσότερους οργανισμούς (όπως τα αρχαία, τα ζώα και τα gram-θετικά βακτήρια) ενώ το πλαστιδιακό ονομάζεται μονοπάτι του 2-C-μέθυλ-D-ερυθριτολ-4-φωσφορικού οξέος (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway, MEP) και απαντάται μόνο στα φύκη και τα gram-αρνητικά βακτήρια.

Το MVA μονοπάτι ξεκινά με την συμπύκνωση δύο μορίων ακέτυλο-συνενζύμου Α (CoA) από το ένζυμο C-ακετυλοτρανσφεράση (C-acetyltransferase, AACT) με τελικό προϊόν της αντίδρασης το ακετυλοακετυλ-CoA. Στη συνέχεια ακολουθεί μετατροπή του ακετυλοακετυλ-CoA σε 3-μεθυλγλουταρυλο-CoA (3-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA) από το ένζυμο συνθάση του HMG (HMG synthase, HMGS). Κατόπιν το HMG-CoA μετατρέπεται σε μεβαλονικό οξύ (mevalonate acid, MVA) μέσω δύο διαδοχικών σταδίων αναγωγής από το ένζυμο 3-υδροξυ3-μεθυλγλουταρυλο-CoA αναγωγάση (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR). Αυτό είναι και η επιμέρους αντίδραση που περιορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης (rate limiting step) (Song *et al*., 2012). Τελικά μέσω διαδοχικών φωσφορυλιώσεων προκύπτει το IPP (Kuzuyama, 2002; Vranová *et al*., 2013) (Εικόνα 1).

Το πλαστιδιακό MEP μονοπάτι βιοσύνθεσης του IPP χρησιμοποιεί πυρουβικό οξύ και 3-φωσφορική-D-γλυκεαλδεϋδη για το σχηματισμό του 1-δεοξυ-D-ξυλουλόζη-5-φωσφορικού οξεός (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, DXP). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την DXP συνθετάση (DXP synthase, DXS) και θεωρείται ως το περιοριστικό βήμα (rate limiting step) για το σχηματισμό ισοπρενοειδών στα πλαστίδια μέσω του MEP μονοπατιού (Estevez *et al*., 2001). Στη συνέχεια, το DXP μετατρέπεται σε 2-C-μεθυλ-D-ερυθριτολ-4-φωσφορικό οξύ (MEP) μέσω της DXP

αναγωϊσομεράσης (DXR). Μέσω μιας σειράς συμπυκνώσεων "κεφαλής προς ουρά", τις οποίες καταλύουν διαδοχικά τα ένζυμα MCT, CMK, MDS, HDS και HDR, προκύπτει το IPP. Παράλληλα μέσω της IPP ισομεράσης, το IPP μετατρέπεται στο αλληλικό ισομερές του, το DMAPP (Kuzuyama, 2002; Cordoba *et al.*, 2009) (Εικόνα 1).




**Εικόνα 5** Σχηματική απεικόνιση του MVA και MEP μονοπατιού βιοσύνθεσης των μορίων IPP και DMAPP, βασικών δομικών λίθων των τερπενοειδών ενώσεων, καθώς και της βιοσύνθεσης μονο-, σεσκι- και διτερπενίων (Ikram *et al.*, 2015).

Τα μόρια IPP και DMAPP που προκύπτουν από τα δύο μονοπάτια που προαναφέρθηκαν χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για την σύνθεση τελικών προϊόντων ισοπρενοειδών στο κυτταρόπλασμα ή στα πλαστίδια αντίστοιχα. Ειδικά ένζυμα, οι πρενυλ-τρανσφεράσες καταλύουν αντιδράσεις συμπύκνωσης με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μεγαλύτερων μορίων, τα οποία θα αποτελέσουν τους δομικούς λίθους για την παραγωγή των επιμέρους κατηγοριών ισοπρενοειδών.

Συγκεκριμένα συμπύκνωση ενός μορίου DMAPP και ενός IPP έχει ως προϊόν το διφωσφορικό γερανύλιο (geranyl diphosphate, GPP) που αποτελεί το πρόδρομο μόριο των μονοτερπενοειδών ($C_{10}$). Συμπύκνωση ενός μορίου DMAPP και δύο μορίων IPP

παράγει το διφωσφορικό φαρνεσύλιο (farnesyl diphosphate, FPP) που αποτελεί το πρόδρομο μόριο για την σύνθεση των σεσκιτερπενοειδών ($C_{15}$) ενώ από το διφωσφωρικό γερανυλ-γερανύλιο (geranyl- geranyl diphosphate, GGPP) συνθέτονται τα διτερπένια ($C_{20}$) (Davis & Croteau, 2000).

## 1.4 Βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις

Η ετερόλογη έκφραση τερπενοειδών σε βακτήρια παρότι έχει προφανή πλεονεκτήματα την ταχύτητα και τον μεγάλο όγκο παραγωγής με μικρό σχετικό κόστος, παρουσιάζει το μειονέκτημα των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων του προϊόντος που προϋποθέτει την εισαγωγή ολόκληρου του βιοσυνθετικού μονοπατιού στο γονιδίωμα του προκαρυότη, το οποίο είναι μεγάλη πρόκληση για τον τομέα της βιοτεχνολογίας. Σε αυτό το πλαίσιο εναλλακτική παράκαμψη αυτού του προβλήματος μπορεί να αποτελέσει η αναπαραγωγή σύνθετων μεταβολικών μονοπατιών στο γονιδίωμα της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, ένα συστήματα που εκμεταλλεύεται τις κυτταρικές βιοχημικές διεργασίες του ευκαριώτη και τη δυνατότητα ανάπτυξης σε μεγάλη κλίμακα των μικροοργανισμών (Dai *et al*., 2012). Μια άλλη κατεύθυνση της βιοτεχνολογίας που απαντά στο πρόβλημα των σύνθετων τροποποιήσεων των μεταβολικών προϊόντων μπορεί να αποτελέσει η παραγωγή τερπενοειδών *in planta*, σε κυτταρικές σειρές που συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των μικροοργανισμών και του φυτού (Ikram *et al*., 2015).

## 1.5 Το ένζυμο DXS

Το ένζυμο συνθάση του 1-δεοξυ-D-ξυλουλόζη-5-φωσφορικού οξεός (1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase, DXS) είναι υπεύθυνο για την παραγωγή τερπενοειδών στα πλαστίδια. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την DXS είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένα στα ανώτερα φυτά, ενώ ο αριθμός τους ποικίλει μεταξύ των ειδών (Cordoba *et al*., 2009; Khemvong & Suvachittanont, 2005).

Όπως προαναφέρθηκε η DXS είναι το rate limiting ένζυμο του MEP μονοπατιού. Για το λόγο αυτό η DXS είναι ένας προφανής στόχος της βιοτεχνολογικής μελέτης στη προσπάθεια βελτίωσης της παραγωγής τερπενίων σε φυτά και μικροοργανισμούς. Μια στρατηγική που έχει εφαρμοσθεί σε πολλές μελέτες είναι η υπερέκφραση του ενζύμου

που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των παραγόμενων τερπενοειδών. Για παράδειγμα, σε διαγονιδιακά φυτά λεβάντας που υπερέκφραζαν το DXS, παρατηρήθηκε συνολική αύξηση της παραγωγής του αιθέριου ελαίου καθώς και της περιεκτικότητας του σε τερπενοειδής ενώσεις (Munoz-Bertomeu *et al*., 2006). Σε άλλη μελέτη διαγονιδιακές καλλιέργειες κυττάρων ρίζας (hairy root cultures) του αρωματικού φυτού *Salvia sclarea* με υπερέκφραση της DXS εμφανίζουν αύξηση της παραγωγής αμπιετανικών διτερπενίων (Vaccaro *et al*., 2014). Υπερέκφραση της DXS έχει επιτευχθεί και σε φυτά *Nicotiana benthamiana* (Brückner & Tissier, 2013) καθώς και σε βακτήρια.

Πέρα από την υπερέκφραση της DXS, αύξηση της παραγωγής των τερπενίων μπορεί να επιτευχθεί και με αλλαγή στην ενζυμική δραστικότητα του ενζύμου με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής. Παραδείγματος χάριν μια σημειακή μεταλλαγή στο γονίδιο της DXS του αμπελιού (*Vitis vinifera*) ποικιλίας Muscat έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σχετικής συγκέντρωσης μονοτερπενίων που της προσδίδουν ένα χαρακτηριστικό πλούσιο άρωμα. Σε περεταίρω μελέτες εντοπίστηκε ένας πολυμορφισμός μοναδιαίας θέσης (single nucleotide polymorphism, SNP) στο αλληλόμορφο VvDXS του αμπελιού που έχει ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση ενός αμινοξέως και κωδικοποιεί μια DXS πιο σταθερή με μεγαλύτερη καταλυτική ενεργότητα (Battilana *et al*., 2011).

Στα πλαίσια παλαιότερης εργασίας δημιουργήθικαν διαγονιδιακά φυτά *Nicotiana benthamiana* που υπερεκφράζουν το διαγονίδιο SpDXS mutant, δηλαδή ένα γονίδιο απομονωμένο από το φασκόμηλο τροποποιημένο έτσι ώστε να φέρει το SNP που προαναφέρθηκε ότι βρέθηκε στην VvDXS για να διερευνηθεί αν αυτή η κατασκευή έχει αυξημένη απόδοση στην βιοσύνθεση τερπενίων. Η τροποποίηση των φυτών έγινε με η μέθοδο μετασχηματισμού φυλλικών δίσκων μέσω του αγροβακτηρίου. Το διαγονονίδιο έχει σχεδιαστεί να εκφράζεται υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή p35S. Πέντε διαγονιδιακές σειρές επιβίωσαν τελικά (Πηνελόπη Μουτεσίδη, πτυχιακή εργασία 2015).

## 1.6 Σκοπός

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η επιλογή φυτών *Nicotiana benthamiana*, ομόζυγων για το διαγονίδιο DXS του φυτού *Salvia pomifera*με μια αμινοξική αλλαγή (λυσίνης σε ασπαραγίνη). Στη συνέχεια θα ελεγχθεί η έκφραση του διαγονιδίου και θα γίνει χημική ανάλυση για να διερευνηθεί αν πράγματι παρατηρείται αύξηση των τερπενίων.

Από τις πέντε διαγονιδιακές σειρές που προέκυψαν από την πτυχιακή εργασία της Πηνελόπης Μουτεσίδη η σειρά L1 έχει ήδη ελεγχθεί στα πλαίσιο της πτυχιακής εργασίας για το πλήθος των ενθέσεων και φέρουν μάλλον μια μοναδική ένθεση και σε ετερόζυγη κατάσταση. Για την σειρά αυτή θα γίνει επιλογή των ομόζυγων σειρών και στη συνέχεια έλεγχος έκφρασης του διαγονιδίου και χημική ανάλυση.

Για τις σειρές L2-5 θα γίνει έλεγχος για το πλήθος των ενθέσεων και φέρουν και στη συνέχεια θα επιλεγούν οι σειρές που φέρουν μια μοναδική ένθεση σε ομόζυγη κατάσταση για περαιτέρω ανάλυση.

**Υλικά και μέθοδοι:**

## 2.1. Μελέτη διάσχισης (segregation analysis)

Τα υλικά και η μέθοδος για την μελέτη διάσχισης περιγράφηκαν στην παράγραφο 2.1.3.

## 2.2. Ομογενοποίηση φυτικού ιστού

Ο ιστός συλλεγόταν και ψυχόταν αμέσως σε υγρό άζωτο. Για την ομογενοποίηση του, κονιορτοποιήθηκε σε παγωμένο γουδί παρουσία υγρού αζώτου, συλλέχθηκε σε σωληνάρια eppendorf και φυλάχθηκε στους -80°C.

## 2.3. Απομόνωση γενομικού DNA

Για τον έλεγχο της παρουσίας του διαγονιδίου στα φυτά αρχικά απομονώθηκε το ολικό γενομικό DNA από περίπου 200mg ιστού με την μέθοδο εκχύλισης cTAB. Σε αυτή την περίπτωση δεν κρίθηκε αναγκαία η καταστροφή τυχόν υπολειμμάτων RNA με RNaseA, καθώς τα δείγματα προορίζονταν για PCR.

**Διάλυμα CTAB 2X:**
2% CTAB
100 mM Tris, pH=8
20 mM EDTA
1,4 M NaCl
1% PVP

## 2.4. Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε η τεχνική εκχύλισης τύπου TRIzol. Σε 100mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού, προστέθηκε TRIzol σε αναλογία 10:1, όσο ο ιστός ήταν παγωμένος. Ακολούθησε έντονη ανάδευση και μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 11000rpm για 10 λεπτά στους 4 βαθμούς. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάριο eppendorf, όπου προστέθηκαν 200μl χλωροφόρμιο. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες και η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf σωληνάριο. Κατόπιν προστέθηκαν 250μl ισοπροπανόλης και 250μl πυκνού διαλύματος αλάτων και το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στην περίπτωση που ο σκοπός του πειράματος είναι η ανάλυση των RNA μικρού μεγέθους, το πρωτόκολλο τροποποιείται σε αυτό το στάδιο ώστε να αυξηθεί η κατακρήμνιση των μικρών RNA. Συγκεκριμένα γίνεται προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης και το δείγμα μεταφέρεται στους -80 βαθμούς για τουλάχιστον μία ώρα. Και στις δύο περιπτώσεις, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 11000 για 20 λεπτά στους 4 βαθμούς. Η πελέτα ξεπλένεται με 70% παγωμένη αιθανόλη για τον καθαρισμό του ιζήματος από υπολείμματα ισοπροπανόλης. Μετά την απομάκρυνση της αιθανόλης, η πελέτα στεγνώνει και επαναδιαλύεται σε 30μl απιονισμένου νερού ελέυθερου RNασών. Η ποσοτικοποίηση των ριβονουκλεϊκών οξέων γίνεται με φωτόμετρο (NanoDrop 1000 Spectrophotometer). Η καθαρότητα των δειγμάτων εκφράζεται από τους λόγους 260/280 και 260/230, οι οποίοι πρέπει να κυμαίνονται κοντά στο 2.

Το δείγμα επωάζεται στους 37°C με ένζυμο μη ειδικής πέψης νουκλεϊκών οξέων (DNase) ώστε να απομακρυνθούν τα κατάλοιπα DNA από το δείγμα.

**TRIzol**

38% Ουδέτερη φαινόλη (φαινόλη/Tris pH 8,0) 20

0,8M Θειοκυανική γουανιδίνη

0,4M Θειοκυανικό αμμώνιο

0,1M Οξικό νάτριο pH 5,0 (stock 3M)

5% Γλυκερόλη

## 2.5. Σύνθεση cDNA

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε με την αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase, RT) M-MLV της εταιρίας Invitrogen, σύμφωνα με της οδηγίες χρήσης. Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκαν 3μg RNA από κάθε δείγμα.

## 2.6. PCR

Για τον έλεγχο της παρουσίας του διαγονιδίου στα φυτά αρχικά απομονώθηκε το ολικό γενομικό DNA από περίπου 200mg ιστού με την μέθοδο εκχύλισης cTAB. Σε αυτή την περίπτωση δεν κρίθηκε αναγκαία η καταστροφή τυχόν υπολειμμάτων RNA με RNaseA, καθώς τα δείγματα προορίζονταν για PCR.

Στην αντίδραση, οι συνθήκες της οποίας περιγράφονται στον Πίνακα 1, χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα 100ngr ολικού γενομικού DNA από κάθε δείγμα. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της τεχνικής, χρησιμοποιήθηκαν 20ngr από τον πλασμιδιακό φορέα pBIN-pROK/spDXS mutant. Παράλληλα, η ποιότητα των DNA των δειγμάτων ελέγχθηκε μέσω PCR με εκκινητές για το γονίδιο της ακτίνης (actin), το αποτέλεσμα της οποίας λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε DNA από φυτά αγρίου τύπου ώστε να ελεγχθεί η ευαισθησία των εκκινητών για το διαγονίδιο.

Με τις ίδιες συνθήκες (Πίνακας 2) αντίδρασης ελέγχθηκαν στην συνέχεια τα δείγματα και σε επίπεδο RNA για να διαπιστωθεί αν όντως συνθέτουν το διαγονίδιο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 28,5ngr από το cDNA.

Και στις δύο περιπτώσεις τα δείγματα ηλεκτροφορήθικαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1×TAE. Οι εκκινητές της ακτίνης έχουν Tm 55°C και του DXS 56°C.

**Πίνακας 2** Συνθήκες διεξαγωγής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

| **Αριθμός κύκλων** | **Στάδιο** | **Θερμοκρασία** | **Χρόνος** |
|---|---|---|---|
| ×1 | Αναδιάταξης της DNA μήτρας | 90◦C | 5min |
| ×35 | Αναδιάταξη του DNA | 90◦C | 30sec |
| | Υβριδοποίηση εκκινητών | Tm εκκινητών | 30sec |
| | Επιμήκυνση | 72◦C | Εξαρτάται από το μήκος του τμήματος-στόχου |
| ×1 | Τελική επιμήκυνση | 72◦C | 5min |

# Αποτελέσματα:

## 3.1. Μελέτη διάσχισης (segregation analysis)

Η διαδικασία της παραγωγής διαγονιδιακών φυτών επιτρέπει την ένθεση του διαγονιδίου συνήθως στο ένα αντίγραφο του γονιδιώματος. Έτσι τα φυτά της γενιάς $T_0$ ιδανικά θα συμπεριφέρονται ως ετερόζυγα και σύμφωνα με τον πρώτο νόμο του Mendel αναμένεται το ποσοστό των απογόνων τους που δεν θα φέρουν κανένα αντίγραφο του διαγονιδίου να είναι 25%.

Η παρουσία του διαγονιδίου συσχετίζεται με την ανθεκτικότητα των φυτών στο αντιβιοτικό επιλογής. Έτσι και για τις τέσσερις σειρές που εξετάστηκαν μπορεί να υποτεθεί ότι στα αρχικά φυτά που προέκυψαν από τους τροποποιημένους κάλους είχε γίνει μία ένθεση στο ένα αντίγραφο του γονιδιώματος. Αυτή η υπόθεση στηρίζεται στο ότι 23% ποσοστό ατόμων μη ανθεκτικών στην Καναμυκίνη είναι πολύ κοντά στο προβλεπόμενο 25% (Πίνακας 3).

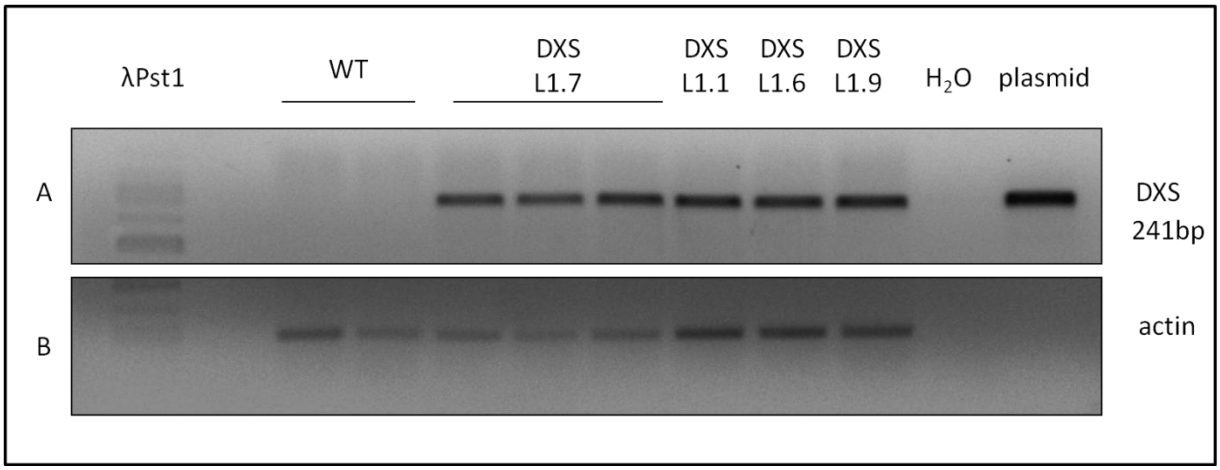
Επιπλέον για τα φυτά της σειράς L1 με την ίδια λογική τα φυτά L1.7 είναι τα πιο πιθανά ομόζυγα. Τα φυτά L1.1 θα μπορούσαν επίσης να είναι ομόζυγα καθώς το ποσοστό μη ανθεκτικών απέχει πολύ από το 25% (Πίνακας 3).

**Πίνακας 3** Ποσοστά μη ανθεκτικών φυτών της T1 και T2 γενιάς.

| Φυτό | Συνολικός αριθμός φυτών | Αριθμός μη ανθεκτικών φυτών | Ποσοστό μη ανθεκτικών φυτών |
|---|---|---|---|
| DXS L2 T1 | 107 | 25 | 23% |
| DXS L3 T1 | 136 | 31 | 23% |
| DXS L4 T1 | 140 | 32 | 23% |
| DXS L5 T1 | 103 | 31 | 30% |
| WT | 36 | 33 | 92% |
| DXS L1.1 T2 | 127 | 14 | 11% |
| DXS L1.2 T2 | 105 | 39 | 37% |
| DXS L1.3 T2 | 149 | 42 | 28% |
| DXS L1.4 T2 | 113 | 24 | 21% |
| DXS L1.5 T2 | 137 | 14 | 10% |
| DXS L1.6 T2 | 134 | 33 | 25% |
| DXS L1.7 T2 | 133 | 2 | 2% |
| DXS L1.8 T2 | 146 | 33 | 23% |
| DXS L1.9 T2 | 127 | 28 | 22% |
| DXS L1.10 T2 | 175 | 39 | 22% |
| DXS L1.11 T2 | 176 | 34 | 19% |
| DXS L1.12 T2 | 177 | 40 | 23% |
| DXS L1.13 T2 | 164 | 28 | 17% |
| DXS L1.14 T2 | 130 | 34 | 26% |

## 3.2. Έλεγχος παρουσίας του γονιδίου στα φυτά

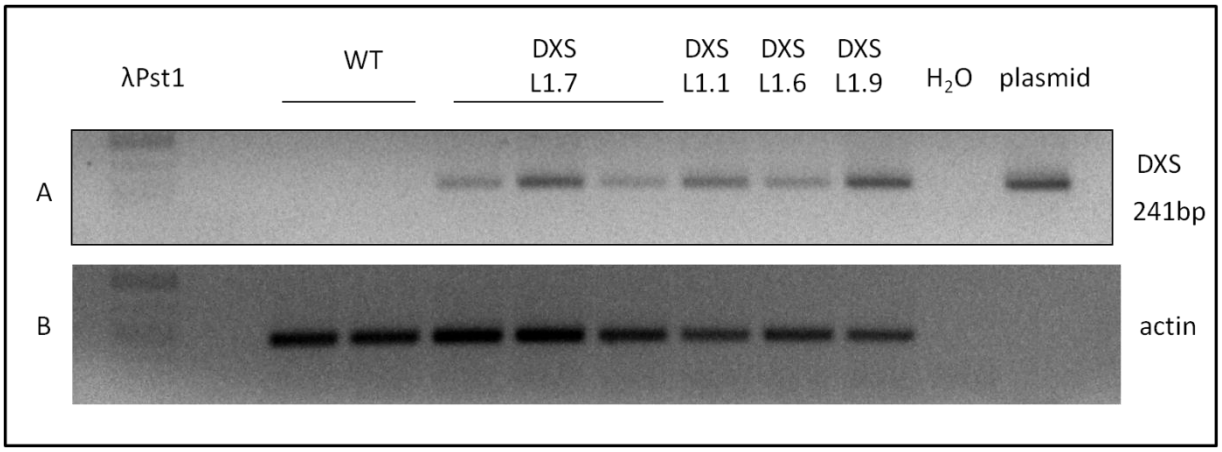
Πριν οποιαδήποτε περαιτέρω ενέργεια είναι απαραίτητο να εξακριβωθεί ότι τα ανθεκτικά στην καναμυκίνη φυτά όντως φέρουν το διαγονίδιο. Πράγματι όπως διαπιστώθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) όλα τα DXS φυτά που ελέγχθηκαν ήταν θετικά για το γονίδιο της DXS (Εικόνα 3).




**Εικόνα 6** Ανίχνευση της παρουσίας στο γονιδίωμα Α) του διαγονιδίου DXS και Β) του γονιδίου της ακτίνης. Τα DXS L1.7 και DXS L1.1 είναι ομόζυγα φυτά και τα DXS L1.6 και DXS L1.9 ετερόζυγα.

## 3.3. Έλεγχος έκφρασης του διαγονιδίου

Αφού επιβεβαιώθηκε ότι τα φυτά έχουν στο γονιδίωμα τους το διαγονίδιο η ίδια αντίδραση PCR εφαρμόσθηκε σε cDNA από τα ίδια φυτά. Τόσο στα ομόζυγα L1.7 και L1.1 όσο και τα ετερόζυγα L1.6 και L1.9 φυτά ανιχνεύονται αντίγραφα της DXS (Εικόνα 4).




**Εικόνα 3** Ανίχνευση της παρουσίας στο cDNA Α) του διαγονιδίου DXS και Β) του μεταγράφου της ακτίνης. Τα DXS L1.7 και DXS L1.1 είναι ομόζυγα φυτά και τα DXS L1.6 και DXS L1.9 ετερόζυγα.

## Συζήτηση:

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο έλεγχος της παραγωγής τερπενίων από τις σειρές DXS που δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο. Καταρχάς οι διαγονιδιακές σειρές DXS L2-5 καθυστέρησαν πολύ να παράγουν σπόρο όχι λόγο της τροποποίησης τους αλλά μάλλον λόγω των συνθηκών ανάπτυξης. Αυτό προκύπτει από την σύγκρισή τους με τα φυτά αγρίου τύπου.

Για την διαγονιδιακή σειρά DXS L1 στην οποία έγιναν οι μοριακές αναλύσεις διαπιστώθηκε τόσο η παρουσία του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του φυτού όσο και η επιτυχής έκφραση του (Εικόνα 2 και 3). Για να ολοκληρωθεί ο χαρακτηρισμός της σειράς είναι απαραίτητο να γίνει και η χημική ανάλυση των τερπενικών προϊόντων του φυτού μέσω αέριας χρωματογραφίας (GC-MS). Η χημική ανάλυση θα δώσει απάντηση στο αν το φυτό παράγει τερπένια σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Σε αυτή την φάση η αναμενόμενη απάντηση είναι ότι πράγματι τα διαγονιδιακά φυτά θα παράγουν αυξημένες συγκεντρώσεις τερπενίων σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου. Και αυτό επειδή η SpDXS mutant στα φυτά DXS παράγεται υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή p35S. Αυτό όμως δεν αποτελεί καινοτομία (Brückner & Tissier, 2013). Το ζητούμενο είναι να μελετηθεί η επίδραση της ενίσχυσης της DXS του φασκόμηλου με τον πολυμορφισμό της VvDXS (SpDXS mutant) στην απόδοση της. Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα πρέπει να υπάρχει κάποιο δείγμα συγκρίσει του οποίου θα γίνει η έκφραση της σχετικής αύξησης. Δηλαδή η σύγκριση της SpDXS mutant με την απλή SpDXS όταν αυτή εκφράζεται υπό τον ίδιο υποκινητή.

Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητη η παρασκευή φυτών που να υπερεκφράζουν την SpDXS υπό τον p35S. Κατά την διαδικασία παραγωγής των SpDXS mutant φυτών παράλληλα εξελίσσονταν και η παραγωγή των SpDXS φυτών. Όμως λόγω επίμονων μολύνσεων του θρεπτικού εν τέλει καμία SpDXS σειρά δεν επιβίωσε ενώ για τις SpDXS mutant σειρές διασώθηκαν μόνο πέντε φυτά.

Η προτεραιότητα για την συνέχιση άρα της παρούσας εργασίας είναι η δημιουργία των SpDXS φυτών και η επανάληψη της ίδιας λογικής χαρακτηρισμού που ακολουθήθηκε για την σειρά SpDXS mutant. Ιδανικά σε βάθος χρόνου θα έχουμε διαθέσιμες σειρές SpDXS mutant και SpDXS φυτών σε ομόζυγη κατάσταση με μια μοναδική ένθεση του διαγονιδίου και σταθερή παραγωγή της εκάστοτε SpDXS.

## Βιβλιογραφία


1. Battilana, J., Emanuelli, F., Gambino, G., Gribaudo, I., Gasperi, F., Boss, P. K., & Grando, M. S. 2011. Functional effect of grapevine 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase substitution K284N on Muscat flavour formation. *Journal of Experimental Botany*, *62*(15), 5497–5508.
2. Brückner, K., & Tissier, A. 2013. High-level diterpene production by transient expression in Nicotiana benthamiana. *Plant Methods*, *9*(1), 46.
3. Cordoba, E., Salmi, M., & León, P. 2009. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, *60*(10), 2933–2943.
4. Davis, E. M., & Croteau, R. 2000. Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes. *Topics in Current Chemistry*, *209*, 53–95.
5. Estevez, J. M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., & Leon, P. 2001. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase, a Limiting Enzyme for Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(25), 22901–22909.
6. Ignea, C., Ioannou, E., Georgantea, P., Loupassaki, S.,. Trikka F.A., Kanellis, A.K., Makris A.M., Roussis, V, Kampranis, S. C. 2015. Reconstructing thechemica ldiversity of labdane-typediterpene biosynthesis inyeast. Metabolic Engineering 28, 91-103.
7. Jennewein, S., Croteau, R. 2001. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. Applied Microbiology and Biotechnology, *57*(1-2), 13–19.
8. Khemvong, S., & Suvachittanont, W. 2005. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase from oil palm Elaeis guineensis Jacq. *Plant Science*, *169*(3), 571–578.
9. Kuzuyama, T. 2002. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *66*(8), 1619–1627.
10. Martin, V. J. J., Pitera, D. J., Withers, S. T., Newman, J. D., & Keasling, J. D. 2003. Engineering a mevalonate pathway in Escherichia coli for production of terpenoids. *Nature Biotechnology*, *21*(7), 796–802.
11. Munoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I., Ros, R., & Segura, J. 2006. Up-Regulation of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase Enhances Production of Essential Oils in Transgenic Spike Lavender. *Plant Physiology*, *142*(3), 890–900.
12. Paddon, C. J., Westfall, P. J., Pitera, D. J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., Newman, J. D. 2013. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, *496*(7446), 528–532.
13. Song, A. A. L., Abdullah, J. O., Abdullah, M. P., Shafee, N., Othman, R., Tan, E. F., Raha, A. R. 2012. Overexpressing 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A

Reductase (HMGR) in the Lactococcal Mevalonate Pathway for Heterologous Plant Sesquiterpene Production. *PLoS ONE*, *7*(12), 1–10.

14. Vaccaro, M., Malafronte, N., Alfieri, M., De Tommasi, N., & Leone, A. 2014. Enhanced biosynthesis of bioactive abietane diterpenes by overexpressing AtDXS or AtDXR genes in Salvia sclarea hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *119*(1), 65–77.
15. Vranová, E., Coman, D., & Gruissem, W. 2013. Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, *64*(1), 665–700.
16. Φυσιολογία Φυτών: Από το Μόριο στο Περιβάλλον. 2003. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Επιμελήτρια έκδοσης Π. Ρουμπελάκη–Αγγελάκη. Κεφάλαιο 10.