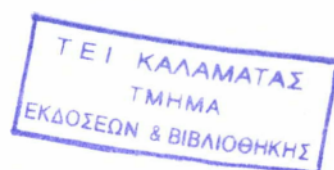


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ: «Μελέτη της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών στα ψυχανθή»

Σπουδάστρια: ΚΑΛΛΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

Επιβλέποντες Καθηγητές: ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ
ΚΑΒΡΟΥΛΑΚΗΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2005

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιβλέποντες καθηγητές Δρ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη και Δρ. Καβρουλάκη Νεκτάριο, για την καθοδήγηση, τη βοήθεια και τις γνώσεις που μου μετέφεραν.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ζερβάκη Γιώργο για την διάθεση των εργαστηριακών χώρων του Ινστιτούτου Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας Καλαμάτας, και τον Δρ. Ξυνιά Ιωάννη για τις εύστοχες παρατηρήσεις του.

Θα πρέπει επίσης να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στους συναδέλφους με τους οποίους κατά καιρούς συνεργάστηκα για την κάθε είδους, από μέρους τους, βοήθεια.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ τους γονείς μου Γιάννη και Φιλипπία για την υπομονή τους και τους Αλέκο, Βιβή, Κλημεντία και Γιάννη Κάρβελι, με την συμπαράσταση των οποίων διευκολύνθηκε η πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. ΓΕΝΙΚΑ	1
A.2. ΣΑΠΩΝΙΝΕΣ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΗ ΑΜΥΝΑ	1
A.2.1. Η χημική δομή των σαπωνίνων.....	1
A.2.2. Τοξικότητα των σαπωνίνων στους μύκητες.....	3
A.2.3. Σαπωνίνες και έλεγχος παθογενειών.....	3
A.3. ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΛΕΣ	4
A.3.1. Η απομόνωση της συνθάσης της β-αμυρίνης.....	7
A.3.2. Το φυλογενετικό δέντρο των OSCs.....	8
A.4. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΙ	10
A.4.1. Γενικά.....	10
A.4.2. <i>In-situ</i> υβριδισμός.....	11
A.5. ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΨΥΧΑΝΘΕΣ <i>Lotus japonicus</i>	12
A.5.1. Γνωρίσματα του φυτού.....	13
A.5.2. Ριζόβια και τα ψυχανθή του γένους <i>Lotus</i>	13
A.5.3. Γονιδιακά γνωρίσματα.....	14
A.6. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΦΥΜΑΤΙΟΥ	14
A.6.1. Μορφολογία ώριμων φυματίων.....	16
A.6.1.1. Ο κεντρικός ιστός.....	16
A.6.1.2. Οι περιφερειακοί ιστοί.....	17
A.6.2. Βακτηριοειδή, Περιβακτηριακή μεμβράνη, Περιβακτηριακός χώρος...	17

Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	19
B.2. ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	20
B.2.1. Χειρισμός σπόρων <i>Lotus japonicus</i> πριν από τη φύτευση.....	20
B.2.2. Συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας των φυτών. Μόλυνση με ριζόβιο.....	20
B.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΛΕΠΤΩΝ ΤΟΜΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ	20
B.3.1. Μονιμοποίηση των ιστών.....	20
B.3.2. Διαφανοποίηση των ιστών.....	21
B.3.3. Εγκλεισμός ιστών.....	21
B.3.4. Τομές ιστών.....	22
B.3.5. Απομάκρυνση της παραφίνης.....	22
B.4. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ	22
B.4.1. Πλασμιδιακοί φορείς και χαρακτηριστικά αυτών.....	22
B.4.2. Παρασκευή «ικανών» βακτηριακών κυττάρων (Competent cells).....	23
B.4.3. Μετασχηματισμός «ικανών» βακτηριακών κυττάρων με πλασμίδια (Transformation).....	24

B.4.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini Prep).....	24
B.5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	25
B.5.1. Πέψη DNA δείγματος με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	25
B.5.2. Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη (Phenol Extraction).....	26
B.5.3. Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων (Precipitation).....	27
B.5.4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	27
B.5.5. Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης (Gel Extraction).....	28
B.5.6. Ενσωμάτωση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς (Ligation).....	28
B.5.7. Η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR).....	29
B.6. In situ RNA ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ	31
B.6.1. Ανάπτυξη φυτών και προετοιμασία των τομών για υβριδισμό.....	31
B.6.2. <i>In-situ</i> RNA-RNA υβριδισμός σε λεπτές τομές φυματίων.....	31
B.6.2.1. Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα pBluescript KS+ πριν από την <i>in-vitro</i> μεταγραφή.....	32
B.6.2.2. <i>In-vitro</i> σύνθεση RNA. Σήμανση του ανιχνευτή με DIG-UTP.....	32
B.6.2.3. Υδρόλυση του σημασμένου RNA ανιχνευτή και προετοιμασία του μίγματος υβριδισμού.....	33
B.6.3. Προϋβριδισμός.....	34
B.6.4. Υβριδισμός.....	35
B.6.5. Πλύσεις υβριδισμού.....	35
B.6.6. Ανίχνευση των θέσεων υβριδισμού.....	36

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γ.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ cDNA ΤΗΣ ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΤΗΣ β-ΑΜΥΡΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pBLUESCRIPT KS+ (ΑΛΛΑΓΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ)	37
Γ.1.1. Απομόνωση του cDNA της συνθάσης της β-αμυρίνης.....	37
Γ.1.2. Αλλαγή πλασμιδιακού φορέα.....	39
Γ.1.3. Έλεγχος των pBluescript κλώνων της συνθάσης της β-αμυρίνης με τη χρήση της PCR.....	41
Γ.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΤΗΣ β-ΑΜΥΡΙΝΗΣ, ΣΕ ΩΡΙΜΑ ΦΥΜΑΤΙΑ <i>Lotus japonicus</i>, ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΟΥ <i>In-situ</i> ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ	43
Γ.2.1. Προετοιμασία λεπτών τομών φυματίων.....	43
Γ.2.2. Σχεδιασμός και σύνθεση του RNA ανιχνευτή (<i>In-vitro</i> ranscription)....	43
Γ.2.3. Υδρόλυση του σημασμένου RNA ανιχνευτή και προετοιμασία του μίγματος υβριδισμού.....	45
Γ.2.4. Προϋβριδισμός.....	46
Γ.2.5. Υβριδισμός και Πλύσεις.....	46
Γ.2.6. Ανοσολογική ανίχνευση του σήματος υβριδισμού. Μικροσκοπική παρατήρηση των τομών.....	47
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	49

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....	54

α. Εισαγωγή

A.1. ΓΕΝΙΚΑ

Τα φυτά κατά τη διάρκεια της κανονικής τους ανάπτυξης παράγουν ένα μεγάλο εύρος δευτερογενών μεταβολιτών, πολλοί από τους οποίους μπορούν να ρυθμίσουν την μικροβιακή ανάπτυξη *in-vitro*. Μάλιστα, αφού η ικανότητα σύνθεσης συγκεκριμένων δευτερογενών μεταβολιτών, περιορίζεται σε συγκεκριμένα φυτικά είδη, συμπεραίνεται ότι αυτοί δεν παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών καθώς και στις κύριες φυσιολογικές τους διεργασίες. Παρόλα αυτά, από μελέτες που έχουν γίνει, έχει αποδειχθεί ότι αυτοί οι ανασταλτικοί παράγοντες παρέχουν στα φυτά συγκριτικά πλεονεκτήματα ενάντια στα παθογόνα, στα ακάρεα καθώς και σε συνθήκες καταπόνησης. Επίσης, αποτελούν μια τεράστια πηγή πολύπλοκων μορίων που χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο για φαρμακευτικές και άλλες χρήσεις (Hostettman και Marston 1995).

A.2. ΣΑΠΩΝΙΝΕΣ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΗ ΑΜΥΝΑ

Οι σαπωνίνες είναι φυτικά γλυκοσίδια (glycosides) που απαντώνται σε πολλά φυτικά είδη και θεωρούνται ως πρόδρομα μόρια ανθεκτικότητας στους μύκητες. Αποτελούνται από τριτερπενοειδή, στεροειδή ή στεροειδικά γλυκοαλκαλοειδή μόρια που φέρουν έναν ή περισσότερους γλυκοζιτικούς δεσμούς. Χαρακτηρίζονται από τασιενεργές ιδιότητες και δίνουν σταθερό αφρό όταν αναμιχθούν με νερό. Η απορρυπαντική δράση των σαπωνινών είχε αναγνωριστεί εκατοντάδες χρόνια πριν, όταν εκχυλίσματα από φυτά, όπως η *Saponaria officinalis*, χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή σαπουνιών.

A.2.1. Η χημική δομή των σαπωνινών

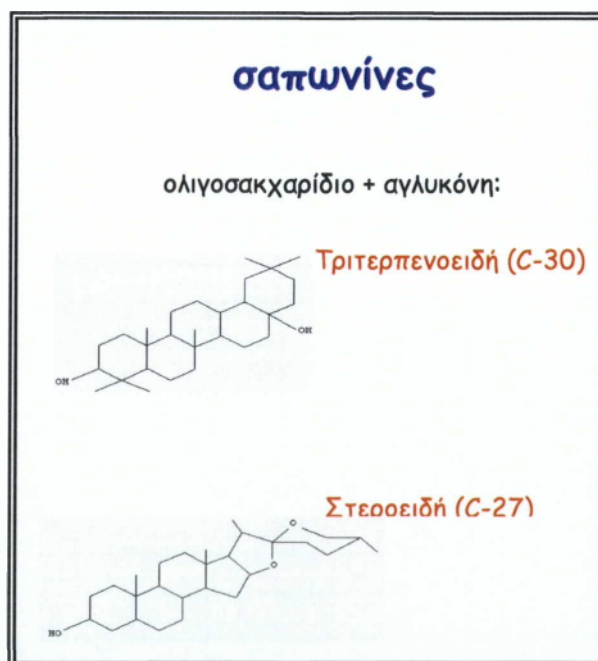
Οι σαπωνίνες διαθέτουν έναν γλυκοζιτικό δεσμό, συνδεδεμένο στον άνθρακα 3 (C-3) του μορίου τους, δια μέσου ενός μορίου οξυγόνου και για αυτό αναφέρονται ως μονοδεσμοσιδικές σαπωνίνες (monodesmosidic saponins).

Οι διδεσμοσιδικές σαπωνίνες (bidesmosidic) έχουν δύο γλυκοζιτικούς δεσμούς: ο ένας βρίσκεται στον C-3 του μορίου και ο άλλος, είτε στον C-27 για τις στεροειδικές σαπωνίνες, είτε στον C-30 για τις τριτερπενοειδείς σαπωνίνες. (ΕΙΚ.

1)

Οι τελευταίες υπολείπονται των ιδιοτήτων των μονοδεσμοσιδικών σαπωνίνων, αλλά μπορούν να μετατραπούν σε βιολογικώς ενεργές μορφές με την απομάκρυνση του σακχάρου από τον C-27 ή τον C-30 του μορίου τους. Η μετατροπή αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί από συγκεκριμένα φυτικά ένζυμα, τις γλυκοσιδάσες (glycosyl hydrolases). Το πιο χαρακτηριστικό από αυτά τα ένζυμα είναι η αβenaκοσιδάση, η οποία προέρχεται από τη βρώμη και μετατρέπει στεροειδικές σαπωνίνες που βρίσκονται στα φύλλα του φυτού (τα αβenaκοσίδια A και B), σε ενεργώς μονοδεσμοσιδικές μορφές. Σε υγιή ιστό φύλλου βρώμης, το ένζυμο εντοπίζεται στα πλαστίδια και οι σαπωνίνες στα κενοτόπια. Τραυματισμός του ιστού είτε από μηχανική βλάβη, είτε από επίθεση παθογόνου, προκαλεί ρήξη της διαμερισματοποίησης του κυττάρου με αποτέλεσμα το ένζυμο να μπορεί να έρθει σε επαφή με το σαπωνινικό του υπόστρωμα. Τότε το μόριο του σακχάρου που βρίσκεται στον C-27 απομακρύνεται με υδρόλυση για να παραχθούν τα μονοδεσμοσιδικά 27-αγλυκο αβenaκοσίδια A και B, οι οποίες είναι μυκητοτοξικές.

Παρόλο που οι διδεσμοσιδικές σαπωνίνες υπολείπονται αντιμικροβιακής δραστηριότητας, θεωρούνται ως πρόδρομοι ανασταλτικοί παράγοντες λόγω της ικανότητας μετατροπής τους, η οποία δεν απαιτεί επαγωγή γονιδιακής έκφρασης για την ανταπόκριση στα παθογόνα.



Εικόνα 1. Η χημική δομή των σαπωνίνων

A.2.2. Τοξικότητα των σαπωνίνων στους μύκητες

Το αρχικό μοντέλο δράσης των σαπωνίνων ενάντια στους μύκητες και γενικότερα στα παθογόνα, είναι παρόμοιο με αυτό των πολυενίων αντιβιοτικών. Περιλαμβάνει το σχηματισμό συμπλόκων με τις στερόλες των μεμβρανών, τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό πόρων και συνεπώς στην έλλειψη της ακεραιότητας της μεμβράνης. Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο οι σαπωνίνες ενσωματώνονται στις μεμβράνες είναι άγνωστος, ενώ οι μεμβρανολυτικές τους ιδιότητες φαίνεται να έχουν σχέση με τη φύση των ολιγοσακχαριτών των μορίων τους.

Η πιθανότητα να έχουν οι σαπωνίνες περισσότερες και πιο περίπλοκες συνέπειες στους μύκητες, επιπρόσθετα με την μεμβρανολυτική τους δράση, δεν μπορεί να απορριφθεί αν και λίγα είναι γνωστά σε αυτόν τον τομέα. Επίσης, δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη το πώς τα φυτά προστατεύονται από τις λυτικές συνέπειες των σαπωνίνων τους. Ο μηχανισμός δράσης των σαπωνίνων δεν είναι εξειδικευμένος και συνεπώς, αναμένεται να επηρεάζει όλους τους ευκαριωτικούς οργανισμούς που έχουν στερόλες στις μεμβράνες τους. Οι τριτερπενοειδείς σαπωνίνες είναι διδεδμοσιδικά μόρια και δεν αποτελούν απειλή για την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης των φυτών, σε αντίθεση με τα μονοδεδμοσιδικά μόρια τα οποία φαίνεται να εντοπίζονται σε κυτταρικά οργανίδια, των οποίων οι μεμβράνες περιέχουν χαμηλά επίπεδα στερολών.

A.2.3. Σαπωνίνες και έλεγχος παθογενειών

Εάν οι σαπωνίνες και τα ένζυμά τους παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της παθογένειας από μύκητες, τότε αυτό το φαινόμενο μπορεί να αποτελέσει τη βάση για στρατηγικές προστασίας των φυτών, οι οποίες θα ελέγχουν ένα ευρύ πλήθος παθογόνων. Ο χειρισμός των βιοσυνθετικών μονοπατιών των φυτικών σαπωνίνων θα μπορούσε να προσφέρει πολλά στον έλεγχο των παθογενειών, αλλά πρωτίστως θα πρέπει να εδραιωθεί ο ρόλος των σαπωνίνων.

A.3. ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΛΕΣ

Τα τριτερπένια είναι φυσικά συστατικά τα οποία παράγονται από τα ανώτερα φυτά. Όπως και οι στερόλες, προκύπτουν από το βιοσυνθετικό μονοπάτι των ισοπρενοειδών με την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλένιου (Abe κ.α. 1993). Όλες οι κυκλοποιήσεις καταλύονται από:

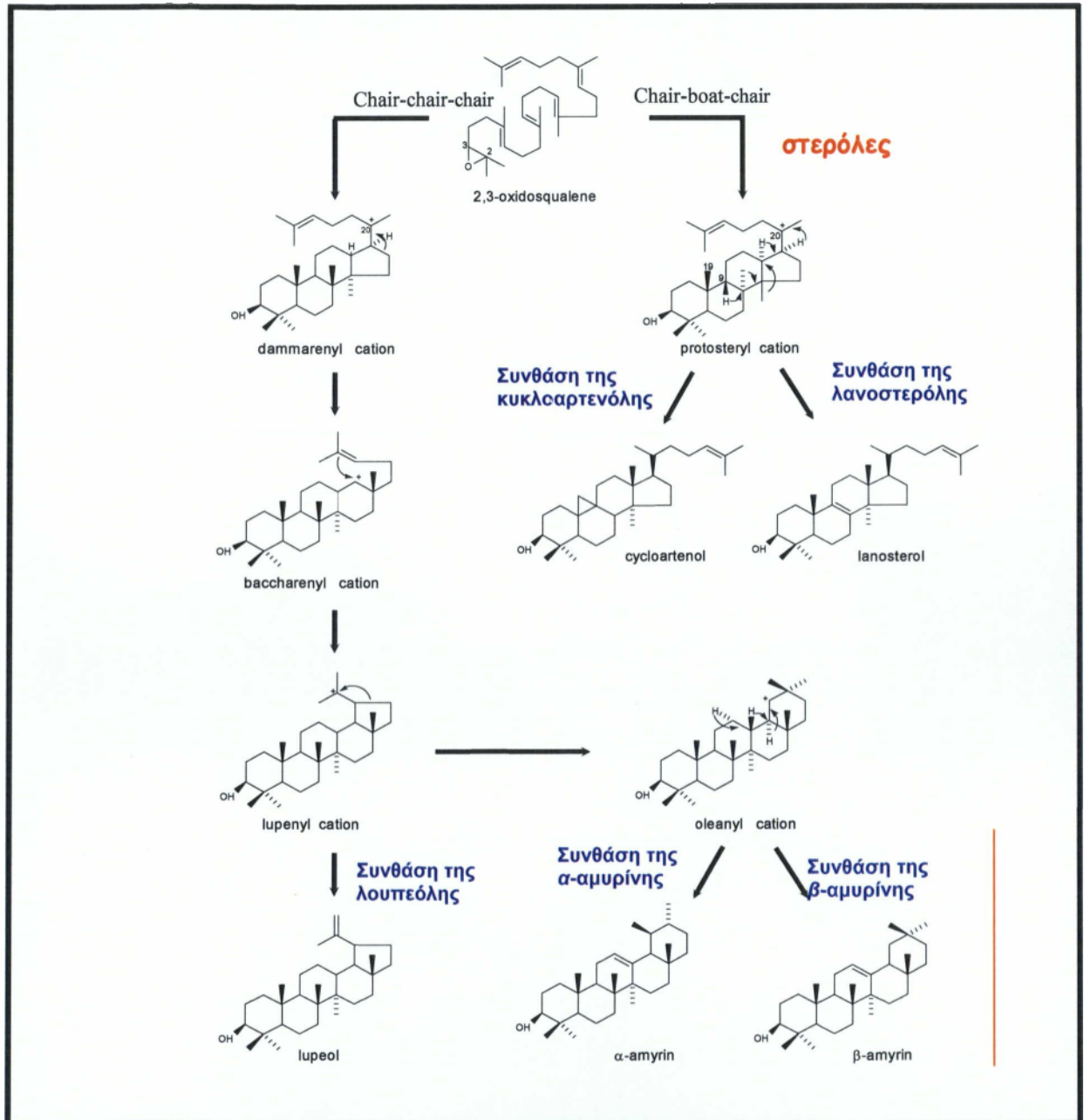
- κυκλάσες του οξειδοσκουαλένιου (OSCs),
- συνθάσες της κυκλοαρτενόλης και της λανοστερόλης για την παραγωγή στερολών και
- τριτερπενοειδείς συνθάσες για την παραγωγή πεντακυκλικών τριτερπενοειδών

(Nes και McKean 1977, Abe κ.α. 1993) (EIK.2).

Η κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλένιου σε στερόλες και τριτερπένια, αποτελεί το σημείο διακλάδωσης μεταξύ του πρωτογενούς και του δευτερογενούς μεταβολισμού. Οι στερόλες είναι ευρέως γνωστές ως βασικά δομικά συστατικά των μεμβρανών, ενώ λειτουργούν ως πρόδρομα μόρια στην βιοσύνθεση των ορμονών. Αντίθετα, η βιολογική λειτουργία των τριτερπένιων είναι λιγότερο καθαρή. Πολλά φυτά συσσωρεύουν άφθονες ποσότητες τριτερπένιων στις ρίζες τους, με τη μορφή γλυκοσιδίων (ή αλλιώς τριτερπενοειδών σαπωνίνων). Πολλά γλυκοσιλιωμένα τριτερπενοειδή παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση και προστατεύουν τα φυτά από επιθέσεις παθογόνων (Price κ.α. 1987, Hostettmann και Marston 1991, Papadopoulou κ.α. 1999). Εν τούτοις, μερικά από αυτά τα μόρια είναι δυνατόν να έχουν επιπρόσθετες λειτουργίες. Για παράδειγμα, σαπωνίνες από το μπιζέλι φαίνονται να ρυθμίζουν τον φυτικό γεωτροπισμό και τη σύνθεση της κυτταρίνης (Ohana κ.α. 1998, Rahman κ.α. 2001). Στο μπιζέλι και το σόργο η παραγωγή της β-αμυρίνης είναι πολύ έντονη κατά την ανάπτυξη και αμέσως μετά την εκβλάστηση, ενώ η βιοσύνθεση των στερολών αυξάνεται αρκετές μέρες μετά, γεγονός που υποδεικνύει ότι αυτές οι μεταβολικές αλλαγές είναι ένα κοινό φαινόμενο της φυτικής ανάπτυξης (Baisted 1971; Palmer και Bowden 1977, Abe κ.α. 1989).

Υψηλά επίπεδα β-αμυρίνης και άλλων τριτερπένιων μπορεί να αποτελούν ένδειξη ενεργούς βιοσύνθεσης σαπωνίνων. Παρόλα αυτά, και τα μη γλυκοσιλιωμένα τριτερπένια είναι δυνατόν να έχουν βιολογικές λειτουργίες, ενώ

έχουν προταθεί ως δομικά συστατικά των μεμβρανών κατά την φυτική ανάπτυξη (Baisted 1971, Nes και Hefimann 1981) και κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από συμβιωτικά ριζόβια και μυκόρριζες (Hernandez και Cooke 1996, Grandmougin-Ferjani κ.α. 1999).



Εικόνα 2. Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των ισοπρενοειδών.

Εφόσον οι κυκλάσες του οξειδοσκουαλένιου (OSCs) εμπλέκονται στη ροή του βιοσυνθετικού μονοπατιού των ισοπρενοειδών, το οποίο οδηγεί στις στερόλες και τα τριτερπενοειδή, τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αλλαγή ή στη ρύθμιση

αυτής της μεταβολικής ροής, ανάμεσα στα δύο μονοπάτια (Baisted 1971, Threlfall και Whitehead 1990). Η παραπάνω θεωρία ενισχύθηκε με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με ανασταλτικά, πρόδρομα μόρια τριτερπενοειδών σαπωνινών και αποδομητών, τα οποία ρύθμιζαν την δράση των OSCs, όπου και παρατηρήθηκαν ποικίλες μεταβολές στην σύνθεση τριτερπενίων και στερολών (Haralampidis κ.α. 2001a). Επίσης, τα τελευταία χρόνια πολλές OSCs κλωνοποιήθηκαν και τα προϊόντα τους επιβεβαιώθηκαν με έκφραση σε ζύμες (Haralampidis κ.α. 2001a). Πρόκειται για:

- συνθάσες της β-αμυρίνης από το *Panax ginseng* (Kushiro κ.α. 1998a, b), από τη γλυκύρριζα (*Glycyrrhiza glabra*) (Hayashi κ.α. 2001a) και το μπιζέλι (*Pisum sativum*) (Morita κ.α. 2000),
- συνθάσες της λουπεόλης από την ελιά (*Olea europea*) (Shibuya κ.α. 1999), από το dandelion (*Taraxacum officinale*) (Shibuya κ.α. 1999) και το *Arabodopsis thaliana* (Herrera κ.α. 1998),
- πολυλειτουργικές συνθάσες, οι οποίες παράγουν α- και β-αμυρίνη, από το μπιζέλι (Morita κ.α., 2000),
- πολυλειτουργικές συνθάσες, οι οποίες παράγουν α- και β-αμυρίνη συν λουπεόλη, από το *Arabodopsis thaliana* (Kushiro κ.α. 2000a, Husselstein-Muller κ.α. 2001),
- μια συνθάση της ισοπολυφλορενόλης από το φυτό *Luffa cylindrica* (Hayashi κ.α. 2001b)
- και τέλος, μια συνθάση της β-αμυρίνης από τη βρώμη (*Avena strigosa*), σαφώς διακριτή από αυτή των δικότυλων (Haralampidis κ.α. 2001b).

Οι παραπάνω κλωνοποιημένες συνθάσες αποτελούν σημαντικά εργαλεία στην έρευνα της ρύθμισης της σύνθεσης και του φυσιολογικού ρόλου των τριτερπενίων. Σε διαγονιδιακά φυτά, είτε με υπερέκφραση είτε με γονιδιακή σίγαση, θα μπορούσε να ερευνηθεί περαιτέρω η περιεκτικότητα συγκεκριμένων φυτικών ειδών σε στερόλες και τριτερπένια.

A.3.1. Η απομόνωση της συνθάσης της β -αμυρίνης

Το 2003 ο Iturbe-Ormaetxe και οι συνεργάτες του κλωνοποίησαν και χαρακτήρισαν τρεις τριτερπενοειδείς συνθάσες από τα μοντέλα ψυχανθή *Lotus japonicus* και *Medicago truncatula*. Η ανάλυση της έκφρασης των συνθασών αυτών, καθώς και άλλων από τη μηδική και το μπιζέλι, έδειξε ότι παρουσιάζουν διαφορετικά μοντέλα έκφρασης, ανάλογα με το φυτικό ιστό. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι διαδραματίζουν ποικίλους ρόλους στη φυτική ανάπτυξη και φυσιολογία.

Πιο συγκεκριμένα, ο παραπάνω ερευνητής, χρησιμοποίησε εκκινητές για να ενισχύσει με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), σχετικές αλληλουχίες cDNA το οποίο απομόνωσε από τις ρίζες των εν λόγω φυτών. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν βάση αλληλουχιών της συνθάσης της β -αμυρίνης από το μπιζέλι. Από τα προϊόντα της PCR ελήφθησαν τρεις διακριτοί cDNA κλώνοι:

- ο *MtAMY1* από τη μηδική,
- ο *LjAMY1*
- και ο *LjAMY2* από το *Lotus japonicus*, ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο των *MtAMY1* και *LjAMY2* βρέθηκε ότι αποτελείται από 2286 ζευγάρια βάσεων (bp), που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες 762 αμινοξέων, περίπου 87kDa. Οι αλληλουχίες των *MtAMY1*, *LjAMY1* και *LjAMY2* παρουσίασαν υψηλή ομοιότητα με τη συνθάση της β -αμυρίνης από το μπιζέλι, με ομολογία αμινοξέων 97, 96 και 92% αντίστοιχα. Η *MtAMY1* παρουσίασε 91 και 95% ομολογία με τις *LjAMY1* και *LjAMY2* αντίστοιχα, ενώ η ομολογία των δυο κλώνων του *Lotus japonicus* ήταν 94%. Οι *LjAMY1* και *LjAMY2* περιέχουν το συγκεκριμένο μοτίβο αμινοξέων DCTAE, το οποίο εμπλέκεται στην δέσμευση υποστρώματος (Abe και Prestwich 1995), καθώς και τα μοτίβα β -έλικας QW, τα οποία είναι χαρακτηριστικά για την υπεροικογένεια των κυκλασών του οξειδοσκουαλένιου (OSCs) (Poralla κ.α. 1994).

Στη συνέχεια, τα προϊόντα του *LjAMY2* ελέγχθηκαν με έκφραση σε ζύμες, όπου και ανιχνεύθηκε λουπεόλη και β -αμυρίνη σε ίσες σχεδόν ποσότητες. Έπειτα, η έκφραση της *LjAMY2* αναλύθηκε, με μεταφορά κατά Northern, σε φύλλα, ρίζες

και φυμάτια του *Lotus japonicus*, αλλά το σήμα ανιχνεύτηκε μόνο στις ρίζες. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι με τη μεταφορά κατά Northern υβριδισαν και άλλες αλληλουχίες, οι οποίες πιθανόν να κωδικοποιούν για OSCs που συνθέτουν διάφορα τριτερπενοειδή προϊόντα.

Στο παρελθόν ανιχνεύτηκαν τριτερπενοειδείς σαπωνίνες σε σπόρους του γένους *Lotus* (Jurzysta 1973), ενώ οι Hernandez και Cooke το 1996, δεν κατόρθωσαν να εντοπίσουν την β -αμυρίνη σε μεμβράνες ριζοβίων. Έτσι, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η τελευταία, που ανίχνευσαν στην περιβακτηριακή μεμβράνη (PBM) αυτών των βακτηρίων, συντίθεται από το φυτό ξενιστή.

Στην παρούσα μελέτη, λοιπόν, με την τεχνική του *in-situ* υβριδισμού έγινε μια προσπάθεια εντοπισμού της συνθάσης της β -αμυρίνης, σε φυμάτια του *Lotus japonicus*. Αυτό, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην περαιτέρω ανίχνευση τριτερπενοειδών σαπωνίνων σε διάφορους φυτικούς ιστούς θα αποτελέσει σημαντικό εργαλείο στην έρευνα της βιοσύνθεσής τους αλλά και των αλληλεπιδράσεών τους με μικροσυμβιωτές και παθογόνα.

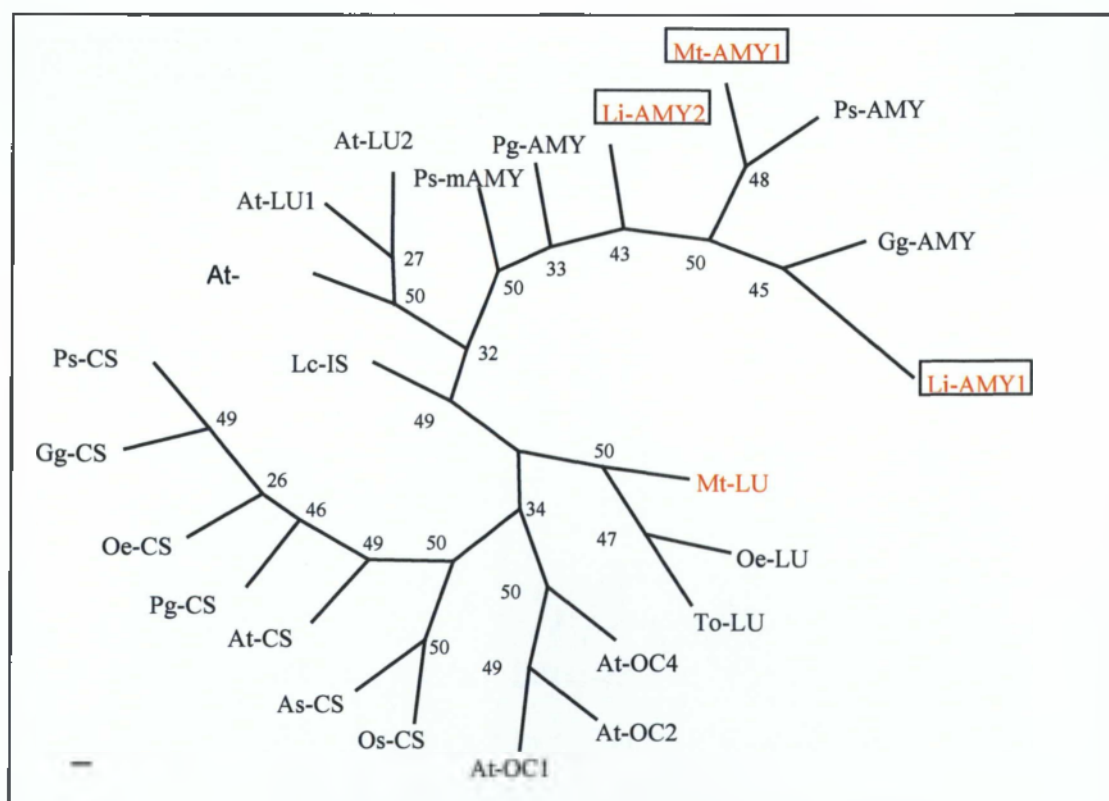
A.3.2. Το φυλογενετικό δέντρο των OSCs

Πολυάριθμα γονίδια κυκλασών του οξειδοσκουαλενίου (OSCs), που καταλύουν τη σύνθεση τριτερπένιων, όπως η β -αμυρίνη, η α -αμυρίνη και η λουπεόλη, κλωνοποιήθηκαν πρόσφατα και τα προϊόντα τους επιβεβαιώθηκαν με έκφραση σε ζύμες. Συγκρίσεις των αλληλουχιών των αμινοξέων τους έδειξαν ότι αυτές οι τριτερπενοειδείς συνθάσες είναι σαφώς διακριτές (διαφορετικές) από τις συνθάσες της κυκλοαρτενόλης (Haralampidis κ.α. 2001a).

Το 2003 ο Iturbe-Ormaetxe και οι συνεργάτες του σχεδίασαν ένα φυλογενετικό δέντρο βάση αλληλουχιών αμινοξέων 24 διαφορετικών OSCs, συμπεριλαμβανομένης της συνθάσης της β -αμυρίνης καθώς και συνθασών της κυκλοαρτενόλης, της λουπεόλης, πολυλειτουργικών συνθασών της β -αμυρίνης και άλλων ένζυμων δηλωμένων με το γενικό όνομα των τριτερπένιων ή των OSCs. Παρατήρησε, λοιπόν, ότι οι κλώνοι που απομόνωσε σχετίζονται αμεσότερα με τη συνθάση της β -αμυρίνης από το μπιζέλι (EIK.3, Ps-AMY), τη γλυκόριζα (Gg-AMY) και το τζίνσενγκ (Pg-AMY). Επιπλέον, είναι πιο κοντά σε μια πολυλειτουργική συνθάση από το μπιζέλι που συνθέτει α - και β -αμυρίνη (Ps-

mAMY) (Morita κ.α. 2000), στη συνθάση της λουπεόλης από το φυτό αραβίδοψη (At-LU1), σε μια άλλη συνθάση, από το ίδιο φυτό, η οποία παράγει α-αμυρίνη, β-αμυρίνη και λουπεόλη σε ποσοστό 55%:30%:15% (At-LU2) (Kushiro κ.α. 2000a, Husselstein-Muller κ.α. 2001) και τέλος σε μια συνθάση της οποίας τα προϊόντα είναι ακόμη άγνωστα (At-OC3) (Husselstein-Muller κ.α. 2001).

Οι συνθάσες της λουπεόλης από την ελιά (Oe-LU) και το *Taraxacum officinale* (To-LU) παράγουν μόνο λουπεόλη αλλά διαφέρουν από την At-LU1 (Kushiro κ.α. 1999a b). Έτσι λοιπόν, αυτά τα ένζυμα, αλλά και η συνθάση της λουπεόλης από το *Medicago truncatula*, σχηματίζουν μια ξεχωριστή υποομάδα (Gammas κ.α. 1996; Shibuya κ.α. 1999). Επίσης, τρεις συνθάσες από την αραβίδοψη, αγνώστων μέχρι στιγμής προϊόντων, σχηματίζουν μια ακόμη ομάδα στην υπεροικογένεια των κυκλασών του οξειδοσκουαλένιου (At-OC1, At-OC2 και At-OC4) (Husselstein-Muller κ.α. 2001).



Εικόνα 3. Το φυλογενετικό δέντρο των OSCs.

A.4. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΙ

A.4.1. Γενικά

Πρώτοι οι Marmour και Doty στις αρχές της δεκαετίας του '60 περιέγραψαν το μοριακό υβριδισμό. Ο μοριακός υβριδισμός είναι ο σχηματισμός δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος (DNA:DNA, DNA:RNA και RNA:RNA) από δύο συμπληρωματικές ακολουθίες. Για να γίνει ο υβριδισμός πρέπει οι δύο ακολουθίες, που θα σχηματίσουν το διπλό κλώνο να παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα. Η σταθερότητα του διπλού κλώνου εξαρτάται από το βαθμό της συμπληρωματικότητας των δύο ακολουθιών. Ο μοριακός υβριδισμός χρησιμοποιείται κυρίως για να τον έλεγχο της ομοιότητας μεταξύ κάποιας γνωστής ακολουθίας νουκλεϊκού οξέος, του ανιχνευτή (probe) και των προς εξέταση νουκλεϊκών οξέων. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται σχεδόν σε όλα τα πεδία της σύγχρονης βιολογίας: από τη βασική έρευνα της μοριακής βιολογίας έως τις εφαρμογές της βιοτεχνολογίας.

Για να εντοπιστεί ο υβριδισμός θα πρέπει ο ανιχνευτής που θα χρησιμοποιηθεί, να έχει σημασθεί με κάποιο ραδιενεργό ή μη ραδιενεργό τρόπο, ο οποίος διευκολύνει την ανίχνευση του. Όταν ο ανιχνευτής σημασθεί με ραδιενεργά μόρια, τότε ο εντοπισμός του σήματος υβριδισμού γίνεται με φωτογραφικό γαλάκτωμα και με αυτοραδιογραφικά φιλμ. Όταν όμως σημασθεί με μη ραδιενεργά μόρια, η ανίχνευση του σήματος υβριδισμού γίνεται συνήθως με χρωμοαντιδράσεις. Τα πιο γνωστά ραδιενεργά ισότοπα που χρησιμοποιούνται στις σημάσεις των ανιχνευτών είναι ο ^{32}P , το ^3H και το ^{35}S . Στις μη ραδιενεργές σημάσεις οι πιο γνωστές ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι η βιοτίνη (Bio-11-UTP) και η διγοξυγενίνη (Dig-11-dUTP).

Σήμερα υπάρχουν πολλές τεχνικές που επιτρέπουν τη σήμανση των ανιχνευτών, την ενσωμάτωση δηλαδή στους ανιχνευτές των πρόδρομων σημασμένων μορίων. Ανάλογα με το είδος του ανιχνευτή εφαρμόζεται και η κατάλληλη τεχνική. Για παράδειγμα, η σήμανση δίκλωνων μορίων DNA γίνεται είτε με τη μέθοδο της μετάφρασης εγκοπής (nick translation), είτε με αυτή των τυχαίων εξαμερών (random priming). Άλλες μέθοδοι είναι η σήμανση των άκρων (end labeling), η σήμανση των ολιγονουκλεοτιδίων του RNA και διάφορες άλλες. Όσο πιο καθαρό

είναι το μόριο του ανιχνευτή τόσο πιο πετυχημένη είναι η σήμανση, άρα τόσο καλύτερα αποτελέσματα αναμένονται από τον υβριδισμό.

A.4.2. *In situ* υβριδισμός

Γύρω στα τέλη της δεκαετίας του '60 οι Pardue, Gall και Jones δουλεύοντας ανεξάρτητα ανακάλυψαν τον *in situ* υβριδισμό. Πρόκειται για έναν τρόπο ανίχνευσης ακολουθιών νουκλεϊκών οξέων, σε κύτταρα που έχουν μονιμοποιηθεί πάνω σε αντικειμενοφόρους μικροσκοπίου. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως άμεση διαγνωστική μέθοδος στις παρακάτω περιπτώσεις:

- στον καθορισμό της θέσης διάφορων ακολουθιών νουκλεϊκών οξέων πάνω σε μεταφασικά χρωμοσώματα (χαρτογράφηση των ακολουθιών τους) ή σε μεσοφασικούς πυρήνες,
- στην κατανομή του κυτταρικού RNA, σε κυτταρολογικά παρασκευάσματα.

Μερικές από τις ερωτήσεις που μπορούν να απαντηθούν με τη βοήθεια του *in situ* υβριδισμού είναι οι εξής:

1. σε ποιο σημείο του γονιδιώματος εδράζεται ένα γονίδιο;
2. τα γονίδια των πολυγονιδιακών οικογενειών είναι ομαδοποιημένα ή διασκορπισμένα στο γονιδίωμα;
3. ένα γονίδιο εκφράζεται σε όλους τους ιστούς;
4. το mRNA ενός γονιδίου εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα ενός ιστού;

Για να απαντηθούν οι ερωτήσεις 1 και 2 συνήθως χρησιμοποιούνται πολυταινικά και μεταφασικά χρωμοσώματα, ενώ για την απάντηση των ερωτημάτων 3 και 4 μπορούν να χρησιμοποιηθούν λεπτές τομές ολόκληρων οργανισμών ή ιστών οποιοδήποτε οργανισμού.

Με τον RNA:RNA *in situ* υβριδισμό, καθορίζεται το πρότυπο έκφρασης γονιδίων τοπολογικά και χρονικά σε διάφορα στάδια ανάπτυξης των ιστών. Σε συνδυασμό με τα συμπεράσματα που εξάγονται από τον χαρακτηρισμό των cDNA και γενωματικών κλώνων, που κωδικοποιούν για κάθε γονίδιο, είναι δυνατόν να αποδοθεί πιθανός ρόλος *in vivo* ακόμη και σε άγνωστα προϊόντα γονιδίων. Επίσης, μπορούν να μελετηθούν προϊόντα γονιδίων τα οποία, είτε εξαιτίας της μικρής συγκέντρωσής τους στους ιστούς είτε εξαιτίας της διαμερισματοποίησης και άλλων φυσικών χαρακτηριστικών τους, δεν είναι εύκολο να απομονωθούν και να

μελετηθούν με τις κλασικές μεθόδους βιοχημείας. Τέλος, με την τεχνική αυτή μπορεί να συσχετιστεί η δράση γνωστών ενζύμων και πρωτεϊνών με συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια του φυτικού ιστού.

A.5. ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΨΥΧΑΝΘΕΣ *Lotus japonicus*

Σε παγκόσμια βάση τα ψυχανθή συνεισφέρουν ουσιαστικά στη διατροφική αλυσίδα, γιατί καλλιεργούνται είτε για την ανθρώπινη διατροφή είτε για την διατροφή των ζώων αποτελώντας μια βασική πηγή πρωτεϊνών. Η εξέλιξη των ψυχανθών σχετίζεται άμεσα με αυτή μιας ομάδας αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων της ριζόσφαιρας τα οποία είναι γνωστά ως ριζόβια. Υπάρχουν περίπου 3.000 είδη ψυχανθών, το 90% εκ των οποίων σχηματίζουν αζωτοδεσμευτικά φυμάτια (Allen και Allen 1981).

Η εφαρμογή τεχνικών μοριακής βιολογίας στο παρελθόν, είχε επικεντρωθεί μόνο σε ψυχανθή σημαντικά για την γεωργία, όπως η σόγια, το φασόλι, το μπιζέλι, η μηδική (*Medicago sativa*) και μερικά είδη τριφυλλιών. Τεχνικές ιστοκαλλιέργειας για πολλά από αυτά τα είδη έχουν περιγραφεί (Bajaj 1990). Η μεταμόρφωση και η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών ήταν δύσκολη για τα καλλιεργούμενα είδη, εκτός από τη σόγια και τη μηδική (de Bruijn κ.α. 1990, Hinchee κ.α. 1988), διότι το μέγεθος, η πλοειδία, τα γονιδιακά χαρακτηριστικά και η αναπαραγωγική συμπεριφορά τους, περιόριζαν την χρησιμοποίησή τους ως πειραματικά συστήματα. Παρόλα αυτά, η διπλοειδής μηδική *Medicago truncatula* προτάθηκε ως μοντέλο ψυχανθές το 1990 από τον Barker και συνεργάτες του, ενώ το τετραπλοειδές και αυτοασυμβίβαστο *Lotus corniculatus*, χρησιμοποιήθηκε ως δέκτης γονιδίων από τη σόγια, το 1986 από τον Stougaard και συνεργάτες του. Το 1992 όμως οι Handberg και Stougaard, πρότειναν το *Lotus japonicus*, βιότυπος Gifu [accession number B-129 (Grant κ.α. 1962, Larsen 1955)] ως μοντέλο ψυχανθές, χρήσιμο για έρευνες γενετικής και μοριακής βιολογίας.

Το γένος *Lotus* αποτελείται από 200 περίπου είδη, με κέντρο καταγωγής τη Μεσόγειο όπου και απαντάται η μεγαλύτερη ποικιλία των φυτικών ειδών. Το φυσικό περιβάλλον του *Lotus japonicus* είναι η Άπω Ανατολή συμπεριλαμβανομένων και των περιοχών γύρω από την Ιαπωνία, την Κορέα και

την Κίνα. Μόνο τα *Lotus corniculatus*, *L. uliginosus* και *L. tenuis* χρησιμοποιούνται στη γεωργία (Swanson κ.α. 1990).

A.5.1. Γνωρίσματα του φυτού

Το πολυετές *Lotus japonicus*, έχει το πλεονέκτημα ότι ανθοφορεί σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα μετά την σπορά. Η γονιμοποίηση και η παραγωγή των σπόρων συμβαίνουν χωρίς τεχνητούς χειρισμούς των ανθέων, ενώ το αρχικό φυτό είναι πολύ μικρό και κατά συνέπεια μπορεί να αναπτυχθεί *in vitro* σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Τα ώριμα φυτά είναι θαμνώδη και αποτελούνται από κλαδιά μήκους μέχρι και 30 εκατοστών. Τα μεγάλα κίτρινα άνθη φέρονται ακτινωτά και ανά ζεύγη στους μασχαλιαίους οφθαλμούς, κατά μήκος των κλαδιών. Η άνθηση δεν είναι ταυτόχρονη, αλλά συνεχίζεται στα νέα κλαδιά. Σε περίοδο έξι μηνών ένα και μόνο φυτό αποδίδει 6.000 σπόρους. Σε ένα τυπικό αναπτυξιακό κύκλο οι σπόροι δημιουργούνται με την πάροδο τριών μηνών, ενώ ακολουθούν ακόμη δύο σποροπαραγωγές, μετά από 4 και 6 μήνες. Οι σπόροι είναι αρκετά μικροί με μέσο βάρος 1,2 mg. Μετά την συλλογή των σπόρων το σκαριφάρισμα αυξάνει τη βλαστικότητα τους, αλλά δεν έχει αναφερθεί φυσιολογικός λήθαργος. Σπόροι διατηρημένοι στους 4°C, ακόμα και για δύο χρόνια, παρουσιάζουν υψηλή βλαστική ικανότητα. Φυτά, επίσης, μπορούν να προκύψουν από πολλαπλασιασμό κομβικών σημείων, με συχνότητα ριζοβολίας της τάξης του 90%.

A.5.2. Ριζόβια και τα ψυχανθή του γένους *Lotus*

Τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που συμβιώνουν με το γένος *Lotus* περιλαμβάνουν γρήγορα όπως και αργά αναπτυσσόμενα στελέχη. Τα γρήγορα αναπτυσσόμενα στελέχη έχουν ταξινομηθεί στο είδος *Rhizobium loti*, τα αργά αναπτυσσόμενα στελέχη κατατάσσονται στο γένος *Bradyrhizobium sp.*, ενώ στο γένος *Mesorhizobium sp.* ταξινομούνται στελέχη ενδιάμεσης ανάπτυξης (Jarvis κ.α. 1982). Τα αργά αναπτυσσόμενα στελέχη σχηματίζουν ενεργά φυμάτια στο είδος *Lotus pedunculatus*, ενώ τα φυμάτια που σχηματίζουν στα είδη *L. corniculatus* και *L. tenuis* δεν παρουσιάζουν αζωτοδεσμευτική ικανότητα. Τα γρήγορα αναπτυσσόμενα στελέχη N2P2213 και N2P2037 του *R. loti*, καθώς και το ενδιάμεσης ανάπτυξης στέλεχος N2P2235 του *M. loti*, συμβάλουν στην επαγωγή

ικανών φυματίων στα προαναφερθέντα είδη και στο *L. japonicus*, αντίστοιχα (Jarvis κ.α. 1982, Pankhust κ.α. 1987). Όπως είναι χαρακτηριστικό για την οικογένεια *Loteae*, τα φυμάτια που σχηματίζονται από τα είδη *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, και *Bradyrhizobium*, είναι καθορισμένα χωρίς μόνιμο μερίστωμα (Corby 1981).

A.5.3. Γονιδιακά γνωρίσματα

Το απλοειδές γονιδίωμα του *Lotus japonicus* αποτελείται από έξι χρωμοσώματα: ένα μεγάλο χρωμόσωμα, το οποίο εύκολα ξεχωρίζει από τα τρία μεσαίου μεγέθους χρωμοσώματα και από δύο μικρά. Πέντε από τα χρωμοσώματα είναι υπομετακεντρικά (submetacentric) ενώ το έκτο είναι σχεδόν μετακεντρικό.

Στο απλοειδές χρωμόσωμα του φυτού περιέχονται 0,5 pg DNA, συγκριτικά με το μικρό *Arabidopsis thaliana* (0,2 pg DNA) και το μεγάλο μπιζέλι (4,9 pg DNA).

Συνυπολογίζοντας, λοιπόν, το μικρό μέγεθος του αρχικού φυτού και του γονιδιώματος του, το μικρό βιολογικό του κύκλο καθώς και άλλων ευνοϊκών χαρακτηριστικών, το *Lotus japonicus* είναι ένα ψυχανθές ιδανικό για έρευνες μοριακής βιολογίας (Handberg και Stougaard 1992).

A.6. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΦΥΜΑΤΙΟΥ

Πίσω από την περίπλοκη και καλά οργανωμένη δομή και λειτουργία του φυματίου, κρύβεται μια σειρά αναπτυξιακών γεγονότων εξίσου περίπλοκων, που αφορά στο κάθε στάδιο της αλληλεπίδρασης φυτού-ριζοβίου και σχετίζεται και με τους δύο συμβιωτές.

Ο σχηματισμός των φυματίων χωρίζεται σε τρία στάδια:

- το “προ-μολυσματικό στάδιο”
- το “στάδιο μόλυνσης και σχηματισμού του φυματίου” και
- το “στάδιο αζωτοδέσμευσης” (Vincent 1980, Scheres κ.α. 1990).

Το “προ-μολυσματικό στάδιο” περιλαμβάνει τον αποικισμό της ριζόσφαιρας του φυτού, από το συγκεκριμένο είδος ριζοβίου που το μολύνει, καθώς επίσης και τις διαδικασίες της προσκόλλησης των βακτηρίων στη ρίζα και της εισόδου τους στο

φυτικό κύτταρο. Τα ριζόβια κινούνται προς τη ρίζα του φυτού χημειοτακτικά (Bergman κ.α. 1988) από τα φλαβονοειδή και τις ισοφλαβόνες, τα οποία αποτελούν μοριακά μηνύματα που εκκρίνονται από το φυτό (Phillips κ.α. 1993). Για τα περισσότερα στελέχη ριζοβίων, τα πρωταρχικά σημεία-στόχοι από τα οποία αρχίζει η μόλυνση, είναι τα αναπτυσσόμενα ριζικά τριχίδια, αλλά και το σημείο από όπου αναπτύσσεται το ριζικό τριχίδιο: το επάκριο μερίστωμα (Smit κ.α. 1992).

Αρχικά ένα βακτηριακό κύτταρο δεσμεύεται χαλαρά στην επιφάνεια του ριζικού τριχιδίου και κατόπιν σχηματίζεται μια αποικία βακτηρίων. Τα βακτήρια παράγουν ένα δίκτυο ινών κυτταρίνης, με τις οποίες συγκρατούνται ισχυρότερα πάνω στο ριζικό τριχίδιο. Από την άλλη πλευρά, το φυτό παράγει ειδικές πρωτεΐνες (λεκτίνες), οι οποίες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη της βακτηριακής αποικίας (Díaz κ.α. 1989). Η προσκόλληση των ριζοβίων στα ριζικά τριχίδια έχει ως αποτέλεσμα ένα ποσοστό από αυτά να πάρουν τη μορφή μπαστουνιού. Αυτό το φαινόμενο αποδιάταξης της δομής των νεοαναπτυσσόμενων ριζικών τριχιδίων, είναι γνωστό ως «κατσάρωμα». Σχηματίζεται έτσι μια κύρτωση του ριζικού τριχιδίου, μέσα στην οποία παγιδεύονται τα ριζόβια και πιέζονται πάνω στο κυτταρικό τοίχωμα του ίδιου ή κάποιου γειτονικού ριζικού τριχιδίου, προκαλώντας αλλαγή στην οσμωτική πίεση του κυττάρου. Στο σημείο αυτό, το κυτταρικό τοίχωμα υδρολύεται τοπικά με ένα μηχανισμό που παραμένει άγνωστος. Το φυτό αντιδρά εναποθέτοντας νέα υλικά γύρω από το σημείο υδρόλυσης και κατά μήκος της κυτοπλασματικής μεμβράνης. Η τελευταία, στο σημείο εκείνο εγκολπώνεται και μεγαλώνει προς το εσωτερικό του φυτικού κυττάρου. Κατά αυτόν τον τρόπο αρχίζει να σχηματίζεται μια σωληνοειδής δομή, που ονομάζεται νήμα μόλυνσης, μέσω της οποίας τα βακτήρια θα μολύνουν τα φυτικά κύτταρα (Brewin 1991, Kinje κ.α. 1992). Το τοίχωμα του νήματος μόλυνσης φαίνεται να είναι φυτικής προέλευσης μια και μοιάζει αρκετά με αυτό του φυτικού κυττάρου (Rae κ.α. 1992).

Ταυτόχρονα με τη διαδικασία μόλυνσης των ριζικών τριχιδίων και το σχηματισμό των μολυσματικών νημάτων, μια ομάδα της εξωτερικής στοιβάδας κυττάρων του φλοιού της ρίζας, που χαρακτηρίζονται από πολλά κενοτόπια, ενεργοποιούνται και αρχίζουν να διαιρούνται για να δημιουργηθεί το αρχέφυτρο του φυματίου (Newcomb 1981). Σχηματίζονται έτσι, σχετικά μικρά κύτταρα, με μεγάλη κυτοπλασματική πυκνότητα, λίγα διάσπαρτα κενοτόπια, μεγάλους πυρήνες και εμφανείς πυρηνίσκους. Το αρχέφυτρο συνεχώς μεγαλώνει με τη διαίρεση αυτών

των κυττάρων, η οποία επεκτείνεται και προς τα εσωτερικά κυτταρικά στρώματα του φλοιού (Calvert κ.α. 1984). Τα νήματα μόλυνσης περνώντας από το ριζικό τριχίδιο αναπτύσσονται ελάχιστα και αμέσως εισχωρούν στα κύτταρα του κεντρικού τμήματος του αρχέφυτρου, απελευθερώνοντας τα βακτήρια. Στην περιφέρεια του αρχέφυτρου τα κύτταρα διατηρούν τη μιτωτική τους δράση και σχηματίζουν ένα σφαιρικό μερίστωμα, το οποίο διατηρείται για λίγες μόνο ημέρες (Vance κ.α. 1983). Η μεριστωματική δραστηριότητα συνεχίζεται στην επάκρια περιφέρεια του κεντρικού ιστού αλλά κατόπιν, αφού μολυνθούν και αυτά τα κύτταρα, η επιπλέον αύξηση φυματίου περιορίζεται στην αύξηση του όγκου των μολυσμένων κυττάρων (Newcomb 1981). Τα φυμάτια αυτού του τύπου καλούνται καθορισμένα επειδή όλα τα κύτταρα του ώριμου φυματίου βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης.

A.6.1. Μορφολογία ώριμων φυματίων

Η οργάνωση των ιστών στα καθορισμένα φυμάτια είναι η εξής: υπάρχει μια περιοχή στην οποία εντοπίζονται τα ριζόβια, ο κεντρικός ιστός του φυματίου, που περιβάλλεται από τους περιφερειακούς ιστούς. Οι περιφερειακοί ιστοί είναι το παρέγχυμα και ο εξωτερικός φλοιός, οι οποίοι διαχωρίζονται μεταξύ τους από την ενδοδερμίδα (Franssen κ.α. 1992).

A.6.1.1. Ο κεντρικός ιστός

Στα ώριμα καθορισμένα φυμάτια, ο κεντρικός ιστός, αποτελείται από μολυσμένα και μη μολυσμένα κύτταρα, τα οποία διακρίνονται εύκολα μορφολογικά: τα μολυσμένα κύτταρα, εξαιτίας της παρουσίας των βακτηρίων μέσα σε αυτά, είναι πολύ μεγαλύτερα σε μέγεθος, με εμφανείς πυρήνες. Τα μη μολυσμένα κύτταρα συνήθως συνιστούν ένα συνεχές δίκτυο σε όλη την έκταση του κεντρικού ιστού, ενώ στην περιφέρειά του σχηματίζουν ένα οριακό στρώμα κυττάρων, που διαχωρίζει τον κεντρικό ιστό από τους περιφερειακούς ιστούς.

A.6.1.2. Οι περιφερειακοί ιστοί

Το παρέγχυμα του φυματίου αποτελείται από κύτταρα μικρότερα και πυκνά διατεταγμένα μεταξύ τους, χωρίς πολλούς μεσοκυττάριους χώρους.

Χαρακτηρίζονται από την παρουσία αμυλοκόκκων, γεγονός που παρατηρείται και στα μη μολυσμένα κύτταρα. Φυσιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι το παρέγχυμα του φυματίου συνεισφέρει σημαντικά στη διατήρηση της χαμηλής συγκέντρωσης O_2 , που είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της νιτρογενάσης. Αυτό σημαίνει ότι και οι περιφερειακοί ιστοί συνεισφέρουν στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του φυματίου, ως όργανο όπου γίνεται η αζωτοδέσμευση.

Στο παρέγχυμα του φυματίου βρίσκονται και τα αγωγά στοιχεία του φυματίου, τα οποία διακλαδίζονται γύρω από τον κεντρικό ιστό. Γύρω από τις αγωγές δεσμίδες αναπτύσσεται ο παρεγχυματικός κολεός των αγωγών δεσμιδών, που αποτελείται από αρκετά στρώματα κυττάρων πλούσια σε κυτταρόπλασμα. Το κυτταρικό τοίχωμα αυτών των κυττάρων χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες προεξοχές και γι'αυτό θεωρείται ότι επιτελούν λειτουργίες μεταφοράς συστατικών.

Ο παρεγχυματικός κολεός περιβάλλεται από την ενδοδερμίδα των αγωγών στοιχείων του φυματίου, η οποία είναι σε συνέχεια με την ενδοδερμίδα της ρίζας (Yang κ.α. 1993). Στα καθορισμένα φυμάτια υπάρχουν και τα συνδετικά αγωγά στοιχεία, δηλαδή αγωγές δεσμίδες που συνδέουν τα αγωγά στοιχεία του φυματίου με τον κεντρικό κύλινδρο της ρίζας. Περιβάλλονται από ενδοδερμίδα και παρεγχυματικά κύτταρα, όμοια με τα κύτταρα του παρεγχύματος του φυματίου, με τα οποία έρχονται σε συνέχεια.

Η ενδοδερμίδα του φυματίου αποτελείται από κύτταρα, στα οποία εναποτίθεται λιγνίνη και διαχωρίζει τον εξωτερικό φλοιό από το παρέγχυμα. Τέλος, ο εξωτερικός φλοιός του φυματίου, είναι σε συνέχεια με τον φλοιό της ρίζας, με τον οποίο μοιάζει μορφολογικά.

A.6.2. Βακτηριοειδή, Περιβακτηριακή μεμβράνη, Περιβακτηριακός χώρος

Από τη στιγμή που τα ριζόβια απελευθερώνονται μέσα στο φυτικό κύτταρο, ονομάζονται βακτηριοειδή (Bergensen, 1982). Μέσα στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή παραμένουν καλυμμένα από μια μεμβράνη φυτικής προέλευσης που ονομάζεται περιβακτηριακή ή συμβιωσωμική μεμβράνη (ΠΒΜ). Ο χώρος που περικλείεται ανάμεσα στις δύο μεμβράνες ονομάζεται περιβακτηριακός ή συμβιωσωμικός χώρος (ΠΒΧ) (Robertson κ.α. 1978). Ο όρος συμβίωση που προτάθηκε από τους Roth και συνεργάτες (1989), περιλαμβάνει το βακτηριοειδές,

τον ΠΒΧ και την ΠΒΜ, θεωρώντας τα όλα μαζί σαν μια ενιαία λειτουργική μονάδα. Με τον όρο αυτό, τονίζεται η ομολογία του συμβιωσώματος με άλλα κυτταρικά οργανίδια, όπως είναι οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια που αναπτύχθηκαν με ανεξάρτητες εξελικτικές ενδοσυμβιωτικές διαδικασίες. Τα βακτηριοειδή περιέχουν 4-8 φορές περισσότερο DNA και το μέγεθός τους είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό των ελεύθερων ριζοβίων (Bisseling 1977).

Μέσα στο φυμάτιο τα βακτηριοειδή εξαρτώνται από το φυτό για τη συντήρηση των μεταβολικών τους διαδικασιών. Μέσω του φυτικού κυττάρου το βακτηριοειδές προσλαμβάνει πηγές άνθρακα, οξυγόνο και μεταλλικά ιόντα, ενώ το δεσμευμένο άζωτο μεταφέρεται προς το φυτό. Όλοι αυτοί οι μεταβολίτες πρέπει να διαπεράσουν τον ΠΒΧ και την ΠΒΜ. Μερικά από τα συστήματα μεταφοράς είναι παθητικά ενώ άλλα απαιτούν ενεργητικές διαδικασίες, οι οποίες αναπτύσσονται ειδικά ή επάγονται ακριβώς από την αζωτοδεσμευτική διαδικασία.

Κατά μια άποψη η ΠΒΜ θα μπορούσε να θεωρηθεί μια απλοποιημένη μορφή της πλασματικής μεμβράνης και κατά μια άλλη σαν ένα εξειδικευμένο τμήμα του ενδομεμβρανικού συστήματος (Mellor και Verner 1990), με ειδικές λειτουργίες που σχετίζονται με τους μηχανισμούς μεταφοράς από και προς τον συμβιωτή (Udvardi κ.α. 1990). Επίσης, η ΠΒΜ φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε φαινόμενα κυτταρικής αναγνώρισης, ανάμεσα στο φυτό και στο ριζόβιο, επειδή με την παρουσία της αποφεύγεται η επαφή του ριζοβίου με το φυτικό κυτταρόπλασμα και κατ' επέκταση αποφεύγεται η αντίδραση άμυνας από το φυτό (παραγωγή φυτοαλεξίνων) (Werner κ.α. 1988).

β. Υλικά και Μέθοδοι

B.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DH5a του εντεροβακτηρίου *Escherichia coli* για την ανάπτυξη πλασμιδίων. Το βακτήριο αυτό, φέρει μια μετάλλαξη η οποία επιτρέπει την α-συμπληρωματικότητα με το αμινοτελικό άκρο της β-γαλακτοσιδάσης, που κωδικοποιείται σε φορείς του τύπου pUC, ενώ δίνει την δυνατότητα επιλογής των λευκών ανασυνδυασμένων αποικιών με επίστρωσή τους σε X-gal. (Hanahan 1983). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος N2P2235 του ριζοβίου *Mesorhizobium loti* για την επαγωγή φυματίων στις ρίζες των φυτών *Lotus japonicus*. Η συντήρηση των εντεροβακτηρίων και των ριζοβίων έγινε σε τριβλία που περιείχαν πλήρες θρεπτικό μέσο LB και YMB αντίστοιχα. [Πίνακας B.1]

Τα βακτηριακά στελέχη, μετά την ανάπτυξη τους στα κατάλληλα θρεπτικά μέσα, διατηρήθηκαν στους 4° C. Για τη μακρά διατήρηση τους σε υπερκατάψυξη (-80° C), σε ένα ml υγρής καλλιέργειας προστέθηκε αποστειρωμένη γλυκερόλη (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 20% και ακολούθησε άμεση ψύξη σε υγρό άζωτο και περαιτέρω φύλαξη. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε καθημερινή βάση φυλάχτηκαν σε τριβλία με στερεά θρεπτικά υλικά, που ανανεώνονταν κάθε μήνα.

Ως αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκε η Αμπικιλίνη, για τις περιπτώσεις εκείνες που ήταν αναγκαία η επιλογή μετασχηματισμένων στελεχών με πλασμίδια, που έφεραν γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αυτό.

Αμπικιλίνη (μητρικό διάλυμα 100mg/ml σε νερό) σε τελική συγκέντρωση εργασίας 10μg/ml.

ΠΙΝΑΚΑΣ B.1

LB	YMB
1% (w/v) Tryptone [USB]	1% (w/v) Manitol [MERCK]
0,5% (w/v) Yeast Extract [MERCK]	0,05% (w/v) Yeast Extract [MERCK]
0,5% (w/v) NaCl [BDH]	0,02% (w/v) MgSO ₄ 7H ₂ O
	0,01% (w/v) NaCl [BDH]
	0,05% (w/v) K ₂ HPO ₄ [MERCK]

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται 1,5% (w/v) Άγαρ [MERCK].

B.2. ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

B.2.1. Χειρισμός σπόρων *Lotus japonicus* πριν από τη φύτευση

Σπόροι *Lotus japonicus* αφέθηκαν για 3 λεπτά σε πυκνό H₂SO₄ και στη συνέχεια πλύθηκαν πολύ καλά με παγωμένο απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Κατόπιν παρέμειναν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

B.2.2. Συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας των φυτών. Μόλυνση με ριζόβιο.

Μοναδιαία αποικία στελέχους του ριζοβίου *Mesorhizobium loti*, εμβολιάστηκε σε 50ml υγρού θρεπτικού μέσου YMB και μεταφέρθηκε στους 25° C, υπό συνεχή ανάδευση για περίπου τέσσερις (4) ημέρες, προκειμένου να αναπτυχθεί. Σε κατάλληλα δοχεία με αποστειρωμένο περλίτη φυτεύτηκαν περίπου 25 προβλαστημένοι σπόροι ανά δοχείο.

Κάθε έκφυτο χωριστά, εμβολιάστηκε με 5ml από την καλλιέργεια του ριζοβίου, η οποία τη μέρα της σποράς βρισκόταν σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης 5X10⁸ κύτταρα ανά ml. Τα φυτά ποτίστηκαν με **θρεπτικό διάλυμα φυτών**¹ (βλέπε παράρτημα) χωρίς πηγές αζώτου, στο οποίο είχαν προστεθεί οι απαραίτητες συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων (**διάλυμα ιχνοστοιχείων**²). Η ανάπτυξη των φυτών έγινε σε ελεγχόμενο περιβάλλον με φωτοπερίοδο 16 ωρών και σε θερμοκρασίες ημέρας/νύχτας: 22/18°C.

Στο επιθυμητό αναπτυξιακό στάδιο, δηλαδή 21 ημέρες μετά τη μόλυνση, τα φυτά μεταφέρθηκαν προσεκτικά από τα δοχεία ανάπτυξης σε κατάλληλα δοχεία με αποστειρωμένο νερό για να ξεπλυθούν οι ρίζες και να απομονωθούν τα φυμάτια για περαιτέρω μελέτη.

B.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΛΕΠΤΩΝ ΤΟΜΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ

B.3.1. Μονιμοποίηση των ιστών

Συλλέχθηκαν με προσοχή φυμάτια με μικρό τμήμα ρίζας και μονιμοποιήθηκαν σε **διάλυμα μονιμοποίησης**³. Οι ιστοί έμειναν σε κενό αέρος για μια ώρα για την απομάκρυνση του εγκλωβισμένου αέρα και να διευκολυνθεί η μονιμοποίηση. Το

διάλυμα μονιμοποίησης αντικαταστάθηκε με νέο και οι ιστοί παρέμειναν στους 4°C για μια ολόκληρη νύχτα.

Το διάλυμα μονιμοποίησης αντικαταστάθηκε με **ρυθμιστικό διάλυμα μονιμοποίησης**⁴ στο οποίο παρέμεινε για 20 λεπτά. Ακολούθησε αφυδάτωση των ιστών σε σειρά αυξανόμενων συγκεντρώσεων αιθανόλης (10%, 30%, 50%, 70%, 80% και 90%) για 20 λεπτά κάθε αλλαγή και τελικά 100% αιθανόλη, τρεις αλλαγές της μιας ώρας.

Η χρώση των ιστών με σαφρανίνη έγινε στο στάδιο 50% αιθανόλης με τελική συγκέντρωση σαφρανίνης 0,5%. Κατόπιν οι τομές ξεπλύθηκαν με 50% αιθανόλη και συνεχίστηκε η αφυδάτωση, όπως περιγράφεται παραπάνω. Στο στάδιο 70% αιθανόλης οι τομές μπορούν να φυλαχτούν στους -70°C.

B.3.2. Διαφανοποίηση των ιστών

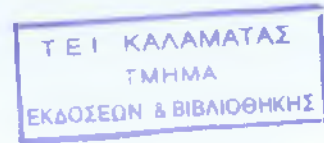
Για τη διαφανοποίηση των ιστών η αιθανόλη αντικαταστάθηκε σταδιακά με διάλυμα αυξανόμενης συγκέντρωσης ξυλένιου (BDH) 25%, 50%, 75% και 100%, σε 100% αιθανόλη, για μια ώρα σε κάθε αλλαγή. Η πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης έγινε με δυο πλέον αλλαγές της μιας ώρας σε 100% ξυλένιο.

B.3.3. Εγκλεισμός ιστών

Για τον εγκλεισμό των ιστών χρησιμοποιήθηκε παραφίνη Paramat (BDH). Αρχικά, προστέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, μικρά κομμάτια παραφίνης σε καθένα από τα φιαλίδια που περιείχε τους ιστούς. Η ποσότητα παραφίνης που προστέθηκε ήταν ανάλογη του όγκου του ξυλένιου. Η διαδικασία επαναλήφθηκε στους 42°C μέχρι το στάδιο κορεσμού του ξυλένιου από παραφίνη. Το μείγμα παραφίνης-ξυλένιου απομακρύνθηκε γρήγορα και αντικαταστάθηκε από φιλτραρισμένη παραφίνη, λιωμένη στους 60°C ενώ οι ιστοί τοποθετήθηκαν και αυτοί στους 60°C. Ακολούθησαν τουλάχιστον 10 αλλαγές της παραφίνης κάθε 10-12 ώρες.

Κατασκευάστηκαν μικρά δισκάκια από αλουμινόχαρτο σε μέγεθος ενός τριβλίου και τοποθετήθηκαν στους 60°C πάνω σε θερμαντική πλάκα. Μικρή ποσότητα παραφίνης προστέθηκε στα δισκάκια και γρήγορα προστέθηκαν και οι ιστοί μαζί με την παραφίνη που ήδη υπήρχε στα φιαλίδια.

Οι ιστοί προσανατολίστηκαν όσο το δυνατόν καλύτερα με μια ήδη ζεσταμένη βελόνα και τα δισκάκια μεταφέρθηκαν σε παγωμένη πλάκα, ώστε η παραφίνη να πήξει σχετικά γρήγορα. Οι εγκλεισμένοι ιστοί φυλάχτηκαν στους 4°C.



B.3.4. Τομές ιστών

Οι τομές των φυματίων (7-10μm) έγιναν σε απλή μικροτόμο με μεταλλικό μαχαίρι. Η ποιότητα των τομών ελέγχθηκε σε στερεοσκόπιο και οι καλύτερες από αυτές τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους πολύ-L-λυσίνης, σε σταγόνες αποστειρωμένου νερού.

Η περίσσεια του νερού απομακρύνθηκε και οι τομές παρέμειναν σε θερμαντική πλάκα στους 42°C για μια ολόκληρη νύχτα. Οι τομές φυλάχτηκαν στους 4°C για περαιτέρω ανάλυση.

B.3.5. Απομάκρυνση της παραφίνης

Οι αντικειμενοφόροι που φέρουν τις τομές τοποθετήθηκαν σε 100% ξυλένιο για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν μεταφέρθηκαν σε 50% ξυλένιο/100% αιθανόλη για 10 λεπτά και τελικά σε 100% αιθανόλη για 5-10 λεπτά. Αφού στέγνωσαν καλά σε θερμοκρασία δωματίου, παρέμειναν για αρκετό χρονικό διάστημα στον αέρα για την απομάκρυνση του ξυλένιου. Οι καλύτερες τομές επιλέχθηκαν στο μικροσκόπιο και φυλάχτηκαν στους -20°C.

B.4. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

B.4.1. Πλασμιδιακοί φορείς και χαρακτηριστικά αυτών

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς με σκοπό:

- α. Να υποκλωνοποιηθούν τμήματα cDNA και γονιδιωματικού DNA προκειμένου να χαρακτηριστούν ή και απλά να διατηρηθούν ευκολότερα.
- β. Να παραχθούν σημασμένοι με διγοξυγενίνη RNA ανιχνευτές προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στον *in-situ* υβριδισμό.

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τα γνωρίσματα τους περιγράφονται στον πίνακα Β.2.

ΠΙΝΑΚΑΣ Β.2. Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν και τα γνωρίσματά τους.

Πλασμιδιακός Φορέας	Κυριότερα Γνωρίσματα
pYES	Φέρει πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη. Διαθέτει μόνο τον προαγωγέα T7 της RNA πολυμεράσης, ενώ συνήθως χρησιμοποιείται για να εκφράζει γενωματικές βιβλιοθήκες (cDNA libraries). Έχει μέγεθος 5,9kb. [Κατάλογος Invitrogen]
pBluescript KS+/-	Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA. Φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη καθώς και το γονίδιο lacZ, του οποίου το αναγνωστικό πλαίσιο σπάει όταν στο φορέα αυτό κλωνοποιηθεί «ξένο» DNA. Η απώλεια της δράσης του lacZ διαπιστώνεται με τη μεταβολή του χρώματος των αποικιών που περιέχουν ένα τέτοιο πλασμίδιο, από μπλε σε άσπρες, με την χρησιμοποίηση IPTG και X-gal. Μπορεί να αντιγράφεται και σαν μονόκλωνο και σαν δίκλωνο DNA. Διαθέτει μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης ένθεν και ένθεν της οποίας βρίσκονται οι προαγωγοί T3 και T7 της RNA πολυμεράσης. Έχει μέγεθος 2,964bp. [Κατάλογος Stratagene 1994, σελ.29]

B.4.2. Παρασκευή «ικανών» βακτηριακών κυττάρων (Competent cells)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε προκειμένου «γυμνό» πλασμιδιακό DNA να εισαχθεί σε κατάλληλα προετοιμασμένα βακτηριακά κύτταρα της *E.coli* έτσι ώστε να είναι δυνατή η απομόνωσή του, σε επαρκείς ποσότητες, από βακτηριακές καλλιέργειες.

Μια μοναδιαία αποικία κυττάρων DH5a μεταφέρθηκε από ένα τριβλίο σε υγρό θρεπτικό υλικό LB και αναπτύχθηκε στους 37°C για 12 περίπου ώρες. Από αυτή την καλλιέργεια μεταφέρθηκαν 2 ml σε κωνική φιάλη που περιείχε 200ml θρεπτικού υλικού LB και τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας γίνει $O.D_{600} = 0,4$. Αμέσως η βακτηριακή καλλιέργεια τοποθετήθηκε στον πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 5.000 στροφές/λεπτό, στους 4° C. Το βακτηριακό ίζημα επαναωορήθηκε σε 25 ml

διαλύματος $MgCl_2$ 0,1M (BDH) με πολύ απαλές κινήσεις και φυγοκεντρήθηκε όπως προηγουμένως.

Ακολούθως, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 25 ml διαλύματος $CaCl_2$ 0,1M (BDH), παρέμεινε στον πάγο για 20 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε όπως και παραπάνω. Το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10 ml διαλύματος $MgCl_2$ 0,1M (BDH) που περιείχε 20% (v/v) γλυκερόλη (MERCK). Τα βακτηριακά κύτταρα κατανεμήθηκαν κατόπιν σε σωλήνες erpendorf ανά 200 μ l, ψύχθηκαν γρήγορα σε υγρό άζωτο και φυλάχθηκαν προς χρήση στους $-80^\circ C$.

B.4.3. Μετασχηματισμός «ικανών» βακτηριακών κυττάρων με πλασμίδια (Transformation)

1. Σε 100 μ l «ικανών» βακτηριακών κυττάρων προστέθηκε στον πάγο πολύ μικρή ποσότητα (5 μ l) απομονωμένου πλασμιδιακού DNA. Το δείγμα αναμίχθηκε καλά και παρέμεινε στον πάγο για μια ώρα.
2. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν για 1 λεπτό στους $42^\circ C$ (heat-shock).
3. Αμέσως προστέθηκαν 200 μ l θρεπτικού μέσου LB.
4. Το δείγμα έμεινε για επώαση για 1 ώρα στους $37^\circ C$.

Τα κύτταρα επιστρώθηκαν απ' ευθείας σε τριβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB στο οποίο είχε προστεθεί το απαραίτητο αντιβιοτικό (Αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 10 μ g/ml).

Στην περίπτωση κλωνοποίησης τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα που περιείχε το γονίδιο της β -γαλακτοσιδάσης και άρα ήταν δυνατή η επιλογή μπλε/άσπρων αποικιών, στο θρεπτικό υλικό προστέθηκε X-gal⁵ και IPTG⁶ σε τελική συγκέντρωση 5×10^{-3} (w/v) και 50mM, αντίστοιχα.

B.4.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini Prep)

Η μέθοδος που θα ακολουθήσει αναφέρεται στην απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα μικρής καλλιέργειας σε όγκο και γι' αυτό ονομάζεται μικρής κλίμακας. Εφαρμόστηκε η μέθοδος του βρασμού.

1. Μοναδιαία αποικία κυττάρων *E.coli*, μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο, εμβολιάστηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία αμπικιλίνης, όπου και

παρέμεινε για 18 ώρες στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση προκειμένου να αναπτυχθεί.

2. 1,5-3 ml της καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στρ./λεπτό για 1 λεπτό.
3. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα αφέθηκε όσο το δυνατόν πιο στεγνό.
4. Προστέθηκαν 150 μl **STEL ρυθμιστικού διαλύματος**⁷ και 2μl λυσοζύμης (50 mg/ml) και το ίζημα επαναδιαλύθηκε με ισχυρή ανάδευση.
5. Ακολούθησε βρασμός του δείγματος για 1 λεπτό (heat-shock).
6. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στρ./λεπτό για 20 λεπτά.
7. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλο σωλήνα και προστέθηκαν 180μl ισοπροπανόλης (κατακρήμιση του DNA).
8. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 στρ./λεπτό για 5 λεπτά.
9. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά και το DNA ξεπλύθηκε με 400μl παγωμένης αιθανόλης 70%.
10. Το δείγμα επαναδιαλύεται σε 30μl απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού (ddH₂O).

B.5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

B.5.1. Πέψη DNA δείγματος με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Σε κάθε αντίδραση πέψης ενός δείγματος DNA με ενδονουκλεάσες (ένζυμα) περιορισμού ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω. Οι παραλλαγές συνίστανται συνήθως στον τελικό όγκο στον οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση, ο οποίος εξαρτάται από την συγκέντρωση του DNA. Έτσι, για παράδειγμα, για πέψη σε τελικό όγκο 30μl σε νερό αναμίχθηκαν:

- | | |
|--|-----------|
| • DNA (σε ddH ₂ O) | έως 10 μl |
| • 10X TA ρυθμιστικό διάλυμα ⁸ | 3 μl |
| • Ένζυμο περιορισμού | 1-3 μl |
| • RNάση | 1 μl |

Σε πέψεις με ταυτόχρονη δράση δύο ή και τριών ενδονουκλεασών εξασφαλίστηκε η κατάλληλη συγκέντρωση των ενζύμων με την προϋπόθεση ότι ο συνολικός όγκος τους δεν υπερέβαινε το 10% του τελικού όγκου της αντίδρασης.

B.5.2. Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη (Phenol Extraction)

Ο καθαρισμός των νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) με φαινόλη είναι η πιο ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδος στις τεχνικές της μοριακής βιολογίας. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των πρωτεϊνών ενός υδατικού διαλύματος νουκλεϊκών οξέων. Η φαινόλη ευνοεί την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό τους από το DNA ή το RNA. Η παράλληλη χρήση χλωροφορμίου ενισχύει την αποδιάταξη των πρωτεϊνών ενώ συμβάλλει ουσιαστικά στην απομάκρυνση των λιπιδίων. Η φυγοκέντρωση του μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου/νουκλεϊκών οξέων έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο φάσεων, της οργανικής που περιέχει τις πρωτεΐνες και της υδατικής που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα. Σε μια ενδιάμεση φάση ανάμεσα σε αυτές τις δύο, η οποία είναι λευκή και ιξώδης, συγκεντρώνεται συνήθως το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης.

Πρακτικά, στο υδατικό διάλυμα που περιείχε το DNA προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης, pH:8,0 και οι δύο φάσεις αναμίχθηκαν πολύ καλά. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 13.000 στρ/λεπτό και η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα προσέχοντας να μην διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση. Προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης/χλωροφορμίου 1:1 και ύστερα από καλή ανάμιξη το μείγμα φυγοκεντρήθηκε όπως και παραπάνω. Στη συνέχεια, η υδατική υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα όπου και αναμίχθηκε με ίσο όγκο χλωροφορμίου, προκειμένου να απομακρυνθούν και τα τελευταία ίχνη φαινόλης. Ακολούθησε ανάμιξη και φυγοκέντρωση. Το DNA που υπήρχε στη νέα υδατική φάση που συλλέχθηκε, κατακρημνίσθηκε με αιθανόλη όπως περιγράφεται στην παρακάτω παράγραφο.

B.5.3. Κατακρήμιση νουκλεϊκών οξέων (Precipitation)

Η κατακρήμιση των νουκλεϊκών οξέων έγινε με αιθανόλη παρουσία μονοκατιόντων σε χαμηλές θερμοκρασίες (-20°C ή -70°C). Είναι η πιο εύκολη μέθοδος συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων, μετά την απομόνωση ή τον ενζυμικό *in-vitro* χειρισμό τους.

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 3,0 όγκοι αιθανόλης και 3M οξικό νάτριο, pH:5,2 (σε τελική συγκέντρωση 0,3M). Η καθίζηση έγινε για 12 ώρες περίπου στους -20°C ή για 10-30 λεπτά στους -70°C . Ακολούθησε φυγοκέντρηση του διαλύματος για 15 λεπτά στις 13.000 στρ/λεπτό, το ίζημα πλύθηκε με 70% αιθανόλη, στέγνωσε για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο απιονισμένου-αποστειρωμένου νερού.

B.5.4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

1. Σε ορισμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE⁹ προστέθηκε η απαραίτητη ποσότητα αγαρόζης, ώστε να εξασφαλισθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης, βάση του εύρους διαχωρισμού που ήταν αναγκαίος για κάθε περίπτωση και ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που επρόκειτο να ηλεκτροφορηθούν. Για παράδειγμα, για την προετοιμασία 1% πηκτής προστέθηκε 1,0 gr αγαρόζης σε 100 ml 1X TAE διαλύματος (Sugden κ.α. 1975).
2. Το υλικό θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου η αγαρόζη διαλύθηκε εντελώς.
3. Το διάλυμα κρύωσε έως τους 60°C περίπου και στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα 10 mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml, το οποίο αναμίχθηκε καλά.
4. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία είχε τοποθετηθεί χτένα και η πηκτή αφέθηκε να πολυμεριστεί για περίπου μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Η χτένα απομακρύνθηκε προσεκτικά και η πηκτή βυθίστηκε σε 1X TAE διάλυμα, έτσι ώστε η επιφάνειά της να καλύπτεται από αυτό κατά περίπου 1-2mm.

6. Στα δείγματα του DNA προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης¹⁰ και εναποτέθηκαν στις εγκοπές της πηκτής.
7. Εφαρμόστηκε συνεχής τάση 50-110V ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού και το μέγεθος της πηκτής.

B.5.5. Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτική αγαρόζης (Gel Extraction)

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για την απομόνωση συγκεκριμένου τμήματος DNA από την πηκτική αγαρόζης, με σκοπό την υποκλωνοποίησή του στον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα.

Συγκεκριμένα, ύστερα από την ηλεκτροφορητική ανάλυση του DNA και τον πλήρη διαχωρισμό του προς απομόνωση κλάσματος από τα υπόλοιπα, απομακρύνθηκε με ένα αποστειρωμένο νυστέρι μια μικρή ζώνη αγαρόζης που περιείχε αυτό το κλάσμα και τοποθετήθηκε σε σωλήνα erpendorf με 1,5 ml νερό (ddH₂O), όπου και παρέμεινε για 1 ώρα, σε σκοτεινό μέρος. Κατόπιν, η ανάκτηση του κλάσματος DNA από την πηκτική, έγινε με τη χρησιμοποίηση του QI Aquick Gel Extraction Kit Protocol της QIAGEN.

B.5.6. Ενσωμάτωση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς (Ligation)

Οι αντιδράσεις ενσωμάτωσης αφορούν στην εισαγωγή ενός τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα. Η *in vitro* κατασκευή χμιαϊκών μορίων DNA ήταν και παραμένει μια από τις σημαντικότερες μεθόδους στην τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA. Η ομοιοπολική ένωση (ligation) του φορέα και του επιθυμητού τμήματος DNA, γίνεται με ένζυμα βακτηριακής προέλευσης (*E.coli*) που ονομάζονται DNA λιγάσες και καταλύουν το σχηματισμό ενός φωσφωδιεστερικού δεσμού ανάμεσα στα μόρια του σακχάρου δύο γειτονικών νουκλεοτιδίων.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τόσο την ένωση των μορίων όσο και τη φύση των τελικών προϊόντων, είναι κυρίως η θερμοκρασία που γίνεται η αντίδραση, η συγκέντρωση του ενζύμου και κυρίως η μοριακή αναλογία των προς ένωση μορίων. Όσο πιο υψηλή είναι η συγκέντρωση των DNA στο διάλυμα της αντίδρασης, τόσο πιο πιθανό είναι δύο άκρα κομματιών DNA να βρεθούν κοντά και να ενωθούν. Κατ'επέκταση, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η πιθανότητα για την

ένωση των δύο άκρων του ίδιου κομματιού DNA, είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με την πιθανότητα ένωσης των δύο άκρων.

Στην παρούσα εργασία, η αντίδραση της ενσωμάτωσης περιλάμβανε:

- | | |
|---|--------|
| • ddH ₂ O | 5,5 μl |
| • DNA πλασμιδιακού φορέα | 0,5 μl |
| • DNA ένθεσης | 2 μl |
| • ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (Boehringer) | 1μl |
| • λιγάση (1 unit/μl) (Boehringer) | 1μl |

και έγινε στους 16°C για 18 ώρες ή στους 37 °C για 3 ώρες.

B.5.7. Η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA. Η DNA πολυμεράση είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA σαν μήτρα, για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής ως προς αυτό αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'-3'. Μόρια μονόκλωνου DNA μπορούν να παραχθούν απλά με θέρμανση. Η DNA πολυμεράση χρειάζεται επίσης κι ένα 3' άκρο προκειμένου να αρχίσει την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Για το λόγο αυτό, το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA από το συγκεκριμένο ένζυμο, μπορεί να καθοριστεί με την παροχή ενός ολιγονουκλεοτιδίου (εκκινητής ή primer), συμπληρωματικό ως προς μια δεδομένη αλληλουχία του αντιγραφόμενου κλώνου, το οποίο υπό κατάλληλες συνθήκες υβριδίζεται στο σημείο έναρξης της αντιγραφής.

Είναι φανερό, λοιπόν, ότι κατά την PCR οι εκκινητές επιλέγονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να υβριδίζουν έναν και έναν της περιοχής του DNA που πρόκειται να αντιγραφεί. Με αυτόν τον τρόπο, οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες καλύπτουν αντίστοιχα, τα σημεία δέσμευσης των εκκινητών δημιουργώντας καινούριες θέσεις δέσμευσης των ολιγονουκλεοτιδίων. Το μίγμα της αντίδρασης επαναθερμένεται και οι αρχικές αλυσίδες, καθώς και οι νεοσυντιθέμενες μπορούν να χρησιμεύσουν ξανά σαν μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδιστούν τα ολιγονουκλεοτίδια, θα ακολουθήσει σύνθεση του DNA και επαναποδιάταξη των δίκλωνων αλυσίδων. Το τελικό αποτέλεσμα μιας αντίδρασης PCR είναι ότι στο τέλος n κύκλων, η

αντίδραση περιέχει θεωρητικά 2^ν δίκλιωνα μόρια DNA που αποτελούν αντίγραφα της ακολουθίας ανάμεσα στους δύο εκκινητές.

Στην παρούσα εργασία, ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν οι:

AMY2-F (forward): 5' - d(CTT GTA AAG ATA GCT GTG TGC AC) -3'
AMY2-R (reverse): 5' - d(GGC AAC AAA CCG ACA CTA AAT AC) -3'

με αλληλουχίες συμπληρωματικές στο 3' άκρο του ένθετου του φορέα.

Η αντίδραση έγινε ως εξής:

• DNA	1μl
• Εκκινητής AMY2-F	1μl
• Εκκινητής AMY2-R	1μl
• Ρυθμιστικό διάλυμα	5μl
• Μείγμα dNTPs	1μl
• DNA πολυμεράση	1μl
• ddH ₂ O	40μl

σε σωλήνες φυγόκεντρου Eppendorf των 0,5 ml και το μείγμα μεταφέρθηκε στον κυκλικό εναλλακτή θερμότητας. Οι κύκλοι που ακολούθησαν ήταν:

1 ^{ος} κύκλος	94°C για 3 λεπτά 54 °C για 2 λεπτά 72 °C για 2 λεπτά
2 ^{ος} - έως 34 ^{ος} κύκλος	94 °C για 1 λεπτό 54 °C για 2 λεπτά 72 °C για 2 λεπτά
35 ^{ος} κύκλος	94 °C για 1 λεπτό 54 °C για 2 λεπτά 72 °C για 10 λεπτά.

B.6. *In-situ* RNA ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

Ο μοριακός υβριδισμός *in-situ* αποτελεί μια δυναμική τεχνική η οποία επιτρέπει τον εντοπισμό αλληλουχιών νουκλεϊνικών οξέων (είτε DNA, είτε RNA) στο κυτταρόπλασμα, τα κυτταρικά οργανίδια και τα χρωμοσώματα ή τους πυρήνες του βιολογικού υλικού.

Η βασική διαφορά της μεθόδου σε σχέση με τις υπόλοιπες τεχνικές ανάλυσης (ανάλυση κατά Southern και Northern) είναι ότι το σήμα του υβριδισμού ανιχνεύεται χωροταξικά και στην προκειμένη περίπτωση, απ' ευθείας πάνω στο φυτικό ιστό. Πιο συγκεκριμένα, σημασμένοι RNA ανιχνευτές υβριδίζονται *in-situ* με ομόλογες αλληλουχίες RNA σε κύτταρα ή τομές ιστών.

Στην παρούσα μελέτη, η τεχνική *in-situ* χρησιμοποιήθηκε σε τομές φυματίων του ψυχανθούς *Lotus japonicus*, σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, για τον καθορισμό της χρονικής και τοπολογικής έκφρασης του γονιδίου που αναλύθηκε.

B.6.1. Ανάπτυξη φυτών και προετοιμασία των τομών για υβριδισμό

Οι διαδικασίες αποστείρωσης των σπόρων, μόλυνσης με ριζόβιο και ανάπτυξης των φυτών, έχουν ήδη περιγραφεί στις παραγράφους B.2.1. και B.2.2. Η προετοιμασία των λεπτών τομών των φυματίων για υβριδισμό, έχει επίσης ήδη περιγραφεί στην §B.3.

B.6.2. *In-situ* RNA-RNA υβριδισμός σε λεπτές τομές φυματίων

Η διαδικασία του *in-situ* RNA-RNA υβριδισμού περιλαμβάνει:

- την προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα στον οποίο είναι κλωνοποιημένος ο cDNA “ανιχνευτής”, έτσι ώστε να είναι δυνατή η *in-vitro* μεταγραφή του,
- την σήμανση του RNA με DIG-UTP και την υδρόλυσή του, και
- τον υβριδισμό και ανίχνευση του σήματος.

B.6.2.1. Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα pBluescript KS⁺ πριν από την *in vitro* μεταγραφή

Η *in-vitro* μεταγραφή ενός cDNA προϋποθέτει ότι ο πλασμιδιακός φορέας του έχει καταστεί γραμμικό δίκλωνο μόριο. Όπως έχει ήδη περιγραφεί (πίνακας B.2) ο πλασμιδιακός φορέας pBluescript KS⁺ φέρει στα άκρα της πολλαπλής θέσης κλωνοποίησής του τους προαγωγείς T3 και T7 της RNA πολυμεράσης. Αυτό σημαίνει ότι για να υποστεί πέψη, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν τα κατάλληλα για κάθε περίπτωση ένζυμα περιορισμού, έτσι ώστε η μεταγραφή του κλωνοποιημένου cDNA να γίνει από τον T3 ή τον T7 προαγωγέα.

Η επιλογή του κατάλληλου ένζυμου περιορισμού εξαρτάται από:

- τη φορά υποκλωνοποίησης του ένθετου cDNA στον πλασμιδιακό φορέα
- το ποια DNA αλυσίδα επιθυμούμε να μεταγραφεί.

Συνεπώς, για την παραγωγή πληροφοριακού (sense) RNA, το πλασμίδιο πρέπει να υποστεί πέψη με περιοριστικό ένζυμο, με θέση αναγνώρισης μετά το 3' άκρο του cDNA. Αντίθετα, για την παραγωγή αντιπληροφοριακού (antisense) RNA, το πλασμίδιο πρέπει να υποστεί πέψη με περιοριστικό ένζυμο, με θέση αναγνώρισης πριν το 5' άκρο του cDNA.

Η πέψη του πλασμιδιακού DNA έγινε όπως περιγράφεται παραπάνω [§ B.5.1]. Μετά από την πέψη ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο [§ B.5.2]. Στη συνέχεια το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίσθηκε με αιθανόλη [§B.5.3] και επαναδιαλύθηκε σε αποστειρωμένο νερό σε συγκέντρωση περίπου 0,2 μg/μl.

Όλες οι διεργασίες μετά την πέψη γίνονται με γάντια και υπό συνθήκες απουσίας RNασών.

B.6.2.2. *In-vitro* σύνθεση RNA. Σήμανση του ανιχνευτή με DIG-UTP.

1. Η σύνθεση του RNA ανιχνευτή γίνεται με *in-vitro* μεταγραφή του cDNA. Η αντίδραση έγινε ως εξής:

- | | |
|---------------------------------------|-------|
| • DNA (σε τελικό όγκο 12,5μl) | 1-2μg |
| • 10X NTP μίγμα σήμανσης (Boehringer) | 2μl |
| • 5X Διάλυμα T3 ή T7 (Promega) | 5μl |

- Αναστολέας των ριβονουκλεασών (RNasin, Promega) 0,5μl
- T3 ή T7 πολυμεράση (Promega) 2μl

Το μίγμα επωάστηκε στους 37°C για 2 ώρες.

2. Στο μίγμα προστέθηκε 1μl DNάση και η επώαση συνεχίστηκε για 10 λεπτά στους 37°C.
3. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 2μl EDTA 0,2M pH{8,0} και ακολούθησε καθίζηση του RNA με προσθήκη 2,5μl LiCl 4M και 75μl αιθανόλης.
4. Το RNA επαναδιαλύθηκε σε 100μl αποστειρωμένου νερού και αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης προκειμένου να ελεγχθεί η ποιότητα και η συγκέντρωσή του.

B.6.2.3. Υδρόλυση του σημασμένου RNA ανιχνευτή και προετοιμασία του μίγματος υβριδισμού.

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η καλύτερη διείδυση του ανιχνευτή στις λεπτές τομές των φυματίων, επιβάλλεται η υδρόλυσή του και συνεπώς η δημιουργία ενός μίγματος μορίων μέσου μήκους 150 βάσεων. Η υδρόλυση του RNA έγινε με προσθήκη σε αυτό ίσου όγκου διαλύματος **HYDRO**¹¹ και επώαση στους 60°C για μια ώρα. Κατόπιν προστέθηκαν:

- CH₃COOH 5% 2μl
- CH₃COONa 3M pH {5,4} 2,5μl
- Αιθανόλη 100% 300μl
- Γλυκογόνο 5μl

Ακολούθησε φυγοκέντρηση για την καθίζηση του υδρολυμένου ανιχνευτή, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 10μl αποστειρωμένου νερού και προστέθηκαν 10 μl φορμαμιδίου. Το μίγμα τοποθετήθηκε στους 60°C για 10 λεπτά και αμέσως μετά στον πάγο. Στα 20 μl του μίγματος RNA-φορμαμιδίου προστέθηκαν 80 μl μίγματος υβριδισμού το οποίο περιείχε:

- Φορμαμίδιο 40μl

• 5M NaCl	6μl
• 50X Denhardt's ¹²	2μl
• 100X TE ¹³ pH{7,5}	1μl
• 1 M DTT (PROMEGA)	7μl
• 50% Dextran sulphate (BDH)	20μl
• H ₂ O	4μl

Το νέο μίγμα τοποθετήθηκε για 3 λεπτά στους 60°C, αναμίχθηκε πολύ καλά και χρησιμοποιήθηκε αμέσως για τον υβριδισμό.

B.6.3. Προϋβριδισμός

Οι τομές των ιστών, πριν από τη διαδικασία του υβριδισμού, υπέστησαν μια επεξεργασία η οποία είναι γνωστή με τον όρο προϋβριδισμός. Στο στάδιο αυτό επιδιώκεται:

- η διευκόλυνση του υβριδισμού του ανιχνευτή πάνω στα νουκλεϊκά οξέα-στόχους
- η μείωση των μη ειδικών δεσμεύσεων του ανιχνευτή πάνω σε πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια του κυττάρου.

Ο προϋβριδισμός έγινε ως εξής:

1. Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές, έμειναν για τουλάχιστον μια ώρα έξω από τους -20°C, όπου φυλάγονταν, για να ξεπαγώσουν και να στεγνώσουν.
2. Ενυδατώθηκαν σε σειρά 100% (δύο φορές), 90%, 70%, 50%, 30% και 10% αλκοολών, για ένα λεπτό σε κάθε συγκέντρωση και τρεις φορές σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό.
3. Στη συνέχεια επωάστηκαν σε διάλυμα πρωτεΐνάσης **K**¹⁴, στους 37°C για 30-40 λεπτά. Κατόπιν, οι αντικειμενοφόροι με τους ιστούς, πλύθηκαν τρεις φορές με απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό
4. Οι ιστοί επωάζονται σε διάλυμα 0,1 M τριαιθανολαμίνης/0,25% οξικού ανυδρίτη για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με ήπια ανάδευση.

5. Ακολούθησε πλύση των ιστών σε **2X SSC**¹⁵ για 5 λεπτά και αφυδάτωση στην σειρά διαλυμάτων αιθανόλης που αναφέρθηκε παραπάνω, κατά την αντίστροφη φορά.
6. Τέλος, οι τομές στέγνωσαν υπό κενό αέρος για τουλάχιστον μια ώρα.

B.6.4. Υβριδισμός

1. Πάνω σε κάθε αντικειμενοφόρο τοποθετήθηκαν 100 μl του μίγματος υβριδισμού (§B.6.5) και οι τομές καλύφθηκαν προσεκτικά με μια καλυπτρίδα.
2. Οι αντικειμενοφόροι τοποθετήθηκαν μέσα σε ένα κουτί-δοχείο, στο οποίο υπήρχε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με 2X SSC, ώστε να διατηρείται η υγρασία και να μην εξατμιστεί η μικρή ποσότητα του μίγματος υβριδισμού.
3. Το κουτί σφραγίστηκε γύρω γύρω με κολλητική ταινία και οι αντικειμενοφόροι με τους ιστούς επώαστηκαν στους 42°C για τουλάχιστον 12 ώρες.

B.6.5. Πλύσεις υβριδισμού

1. Μετά το πέρας του υβριδισμού, οι αντικειμενοφόροι με τις τομές μεταφέρθηκαν σε δοχείο χρώσης, το οποίο περιείχε διάλυμα 4X SSC/5 mM DTT [PROMEGA], όπου αφέθηκαν έως ότου αποκολληθούν οι καλυπτρίδες.
2. Κατόπιν, μεταφέρθηκαν σε νέο δοχείο με 4X SSC/5 mM DTT για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με πολύ ήπια ανάδευση. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές.
3. Οι αντικειμενοφόροι μεταφέρθηκαν σε 200 ml **διαλύματος RN1**¹⁶ στο οποίο παρέμειναν για 30 λεπτά στους 37°C.
4. Στην συνέχεια, στην ίδια θερμοκρασία, ακολούθησαν τέσσερα ξεπλύματα των 20 λεπτών σε **διάλυμα RN2**¹⁷.
5. Τέλος, οι τομές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 2X SSC/1 mM DTT, όπου και παρέμειναν για 30 λεπτά αναδεύοντας ήπια.

B.6.6. Ανίχνευση των θέσεων υβριδισμού

1. Για την ανοσολογική ανίχνευση του υβριδισμένου Dig-RNA ανιχνευτή, οι αντικειμενοφόροι αρχικά εξισορροπήθηκαν σε διάλυμα DET1¹⁸, για λίγα λεπτά.
2. Ακολούθως επωάστηκαν για 30 λεπτά σε διάλυμα DET2¹⁹.
3. Για το ίδιο χρονικό διάστημα, οι αντικειμενοφόροι έμειναν να επωαστούν σε διάλυμα DET3²⁰, στο οποίο είχε προστεθεί 1% (w/v) BSA.
4. Στην συνέχεια, οι τομές επωάστηκαν για δύο ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου, σε διάλυμα DET3/0,1% BSA στο οποίο προστέθηκε σε αραιώση 1:500 αντί-Dig αντίσωμα.
5. Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνθηκε με πλύση των αντικειμενοφόρων σε διάλυμα DET3/1% BSA, για 10 λεπτά και τρία ξεπλύματα των 20 λεπτών σε διάλυμα DET1. Οι πλύσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση.
6. Οι αντικειμενοφόροι μεταφέρθηκαν σε διάλυμα ανίχνευσης DET4²¹ για 5 λεπτά.
7. Τέλος, σε κάθε αντικειμενοφόρο προστέθηκαν 500 μl διαλύματος χρωματικής αντίδρασης²². Η ανάπτυξη του σήματος γίνεται στο σκοτάδι για χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από 4 έως 16 ώρες. Η αντίδραση ελέγχονταν στο μικροσκόπιο ανά τακτά χρονικά διαστήματα.
8. Όταν κρίθηκε σκόπιμο η χρωματική αντίδραση τερματίστηκε σε διάλυμα TE¹³ και οι τομές μεταφέρθηκαν σε νερό.
9. Οι τομές αφυδατώθηκαν σε σειρά αλκοολών αυξανόμενης συγκέντρωσης (10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% και 100%) και στη συνέχεια αφέθηκαν να στεγνώσουν.
10. Η μονιμοποίηση των τομών έγινε με DPX (εγκλειστικό που χρησιμοποιείται για την μονιμοποίηση ιστών, παρέχεται έτοιμο από την BDH) και τοποθέτηση καλυπτρίδων.

**γ. Αποτελέσματα
και Συζήτηση**

Γ.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ cDNA ΤΗΣ ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΤΗΣ β -ΑΜΥΡΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pBLUESCRIPT KS+ (ΑΛΛΑΓΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ)

Γ.1.1. Απομόνωση του cDNA της συνθάσης της β -αμυρίνης

Αρχικά, παρασκευάστηκαν “ικανά” κύτταρα DH5a του εντεροβακτηρίου *Escherichia coli* (§B.4.2). Ο όρος “ικανά” περιγράφει μια συγκεκριμένη κατάσταση των κυττάρων, κατά την οποία ο κυτταρικός φάκελος είναι διαπερατός σε ξένο DNA. Τα κύτταρα υφίστανται χημική επεξεργασία με κατιόντα ασβεστίου και μαγνησίου, τα οποία ουδετεροποιούν τα αρνητικά φορτία του DNA και των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, επιτρέποντας έτσι στο ξένο DNA να εισέλθει στο βακτηριακό κύτταρο.

Τα “ικανά”, πλέον, βακτηριακά κύτταρα μεταμορφώθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pYES που φέρει το (ένθετο) cDNA της β -αμυρίνης (§B.4.3). Σκοπός της μεταμόρφωσης είναι ο πολλαπλασιασμός του φορέα κλωνοποίησης και κατ’ επέκταση του cDNA που φέρει, διότι σε θρεπτικό μέσο LB στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση, τα κύτταρα της *E. coli* διπλασιάζονται κάθε είκοσι λεπτά περίπου.

Στη συνέχεια, απομονώθηκε το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο pYES από τα βακτηριακά κύτταρα, με τη μέθοδο του βρασμού (§B.4.4). Η λυσοζύμη δημιούργησε μικρές οπές στα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα, διαλύοντας τα πολυμερή συστατικά τους και το απορρυπαντικό που χρησιμοποιήθηκε (STEL buffer) απομάκρυνε τα λιπίδια από τις μεμβράνες. Η ισοπροπανόλη και η παγωμένη αιθανόλη κατακρήμνισαν το πλασμίδιο, το οποίο απομονώθηκε κατόπιν φυγοκέντρησης και τελικά επαναδιαλύθηκε σε επιθυμητό όγκο νερού.

Ακολούθησε πέψη του κλώνου pYES με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και Xho (§B.5.1), με σκοπό την απομόνωση του ένθετου cDNA. Τα ένζυμα αυτά, είναι μια ειδική κατηγορία ενδονουκλεασών, οι οποίες συναντώνται σε πολλά βακτήρια και διασπών το DNA σε εξειδικευμένες θέσεις-στόχους. Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα αποτελούνται από 4 έως 8 ζευγάρια βάσεων, σε δίκλιωνα μόρια DNA και διασπών και τις δύο αλυσίδες του μορίου σε συγκεκριμένη θέση, με τέτοιο τρόπο ώστε τα δύο τμήματα που δημιουργούνται, να έχουν μονόκλιωνα άκρα. Οι αλληλουχίες των μονόκλωνων άκρων είναι

συμπληρωματικές λόγω συμμετρίας και συνεπώς μπορούν να επανασυνδεθούν. Τα συμπληρωματικά αυτά άκρα είναι πολύ σημαντικά για τον ανασυνδιασμό του DNA στο εργαστήριο. Όταν δύο διαφορετικά μόρια DNA κοπούν με το ίδιο ένζυμο, τότε το ένα μονόκλωνο άκρο από το ένα μόριο μπορεί να ζευγαρώσει με την συμπληρωματική μονόκλωνη αλληλουχία από το άλλο μόριο, για την παραγωγή ενός ανασυνδιασμένου μορίου DNA.

Τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Πρόκειται για μια διαδικασία η οποία επιτρέπει τον διαχωρισμό τμημάτων DNA. Το δείγμα του DNA που υπέστη πέψη και φέρει τα διαφορετικού μεγέθους τμήματα, τοποθετήθηκε σε μια εγκοπή (πηγαδάκι) της πηκτής και η πηκτή εμβαπτίστηκε σε ένα δοχείο με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (TAE). Εφαρμόστηκε ηλεκτρική τάση στα άκρα του δοχείου και τα τμήματα του DNA μετακινήθηκαν στο πεδίο που δημιουργήθηκε από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο (§B.5.4). Η πηκτή της αγαρόζης λειτουργεί ως ένα είδος μοριακού κόσκινου, μέσα στους πόρους της οποίας τα τμήματα DNA διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, καθώς τα μικρότερα τμήματα θα κινούνται γρηγορότερα και μεγαλύτερα αργότερα, για ένα συγκεκριμένο χρόνο εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου. Επομένως, η απόσταση που μετακινείται ένα τμήμα DNA μέσω της πηκτής, είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού του βάρους.

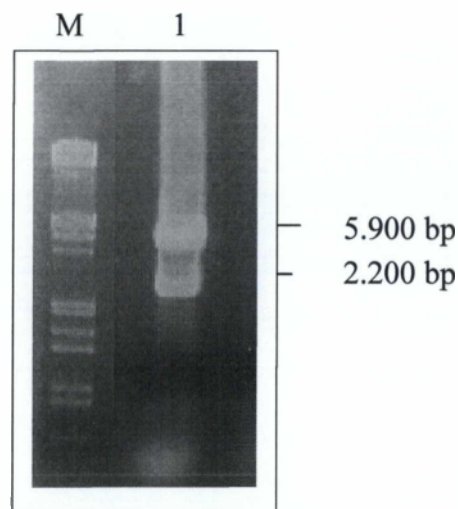
Τμήματα DNA που έχουν το ίδιο μέγεθος κινούνται συγχρόνως μέσω της πηκτής και συγκεντρώνονται σε ζωνώσεις. Η πρόοδος της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται με τη μετακίνηση μιας χρωστικής, μικρού μοριακού βάρους (χρωστική ιχνηθέτης), η οποία προστίθεται σε κάθε δείγμα στην αρχή της ηλεκτροφόρησης. Όταν η χρωστική φτάσει στο τέλος της πηκτής, η ηλεκτροφόρηση τελειώνει.

Το άχρωμο DNA καθίσταται ορατό με χρώση της πηκτής αγαρόζης, με κατάλληλες χρωστικές που δεσμεύονται επάνω στο μακρομόριο του DNA. Διακριτές ζωνώσεις παρατηρούνται όταν υπάρχει αρκετό DNA για να δεσμεύσει τη χρωστική και όταν τα μακρομόρια κάθε δείγματος έχουν ευκρινώς διαφορετικά μεγέθη. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το φθορίζον υπό υπεριώδες φως βρωμιούχο αιθίδιο, καθώς επίσης κι ένας δείκτης μοριακών βαρών (σε bp), ο οποίος κάλυπτε όλο το εύρος διαχωρισμού της πηκτής, προκειμένου να καθορίζεται το

μοριακό βάρος κάθε ζώνωσης. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4, στην πηκτή παρατηρήθηκαν οι εξής ζωνώσεις (από πάνω προς τα κάτω):

- γραμμικό πλασμίδιο, που υπέστη πέψη και με τα δύο ένζυμα, γύρω στις 5.900bp και τέλος
- το ένθετο cDNA, μεγέθους περίπου 2.200bp.

Με την παραπάνω διαδικασία, στην ουσία απομονώθηκε το ένθετο cDNA από τον πλασμιδιακό φορέα pYES και βρίσκεται στην τελευταία ζώνωση της πηκτής. Με καθαρό νυστέρι, λοιπόν, απομακρύνθηκε από την πηκτή το συγκεκριμένο κομμάτι και μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα erpendorf, όπως περιγράφεται στην παράγραφο Β.5.5.

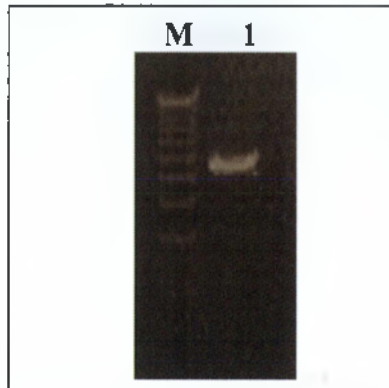


Εικόνα 4. Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης (1) των προϊόντων της πέψης του pYES κλώνου της συνθάσης της β-αμυρίνης από το φυτό *Lotus japonicus*.
M: δείκτης μοριακών βαρών

Γ.1.2. Αλλαγή πλασμιδιακού φορέα

Προκειμένου να κλωνοποιηθεί το cDNA της β-αμυρίνης στον φορέα pBS, θα πρέπει ο τελευταίος, να έχει καταστεί γραμμικό δίκλωνο μόριο, με άκρα συμπληρωματικά του cDNA. Για το λόγο αυτό ο φορέας υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και Xho (§Β.5.1). Τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν

με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (§B.5.4) (Εικόνα 5). Στην εικόνα αυτή από πάνω προς τα κάτω οι ζωνώσεις που διακρίνονται αντιστοιχούν στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript KS⁺ και στο ένθετο cDNA της β-αμυρίνης.



Εικόνα 5. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης (1) των προϊόντων της πέψης του πλασμιδίου pBluescriptKS⁺.

M: δείκτης μοριακών βαρών

Ακολούθησε καθαρισμός φαινόλης (§B.5.2), για την απομάκρυνση των υδρολυτικών ενζύμων (RNάσες) και κυρίως των ενζύμων περιορισμού, τα οποία ήταν παρόντα στην πέψη και κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA, με αιθανόλη και οξικό νάτριο (§B.5.3). Η σύνδεση του πλασμιδιακού φορέα με το cDNA της β-αμυρίνης πραγματοποιήθηκε με την δράση του ενζύμου T4 DNA λιγάση (§B.5.6). Οι DNA λιγάσες καταλύουν το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού, μεταξύ δύο αλυσίδων DNA, με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός νέου μορίου.

Στη συνέχεια, το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο εισήχθη σε ικανά βακτηριακά κύτταρα *E.coli* (§B.4.3). Μετά το τέλος της μεταμόρφωσης, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τριβλία καλλιέργειας, με θρεπτικό μέσο LB παρουσία αμπικιλίνης, IPTG και X-gal. Τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C όλη τη νύχτα και κατόπιν παρατηρήθηκαν οι αποικίες, για την επιλογή του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου. Μια λευκή μοναδιαία αποικία εμβολιάστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό LB παρουσία αμπικιλίνης και έμεινε για επώαση στους 37°C όλη τη νύχτα. Τα κύτταρα τα οποία έχουν προσλάβει την κατασκευή φορέα-ένθετου cDNA, μπορούν να αναγνωριστούν και να επιλεγούν από τα υπόλοιπα βακτηριακά κύτταρα, με την ανίχνευση του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης.

Η ανίχνευση του συγκεκριμένου ενζύμου, στηρίζεται σε ένα σύστημα όπου ο πλασμιδιακός φορέας περιλαμβάνει τμήμα του γονιδίου lacZ, το οποίο κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοσιδάση (το αμινοτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου) και το βακτηριακό χρωμόσωμα περιλαμβάνει το υπόλοιπο τμήμα του ίδιου γονιδίου (το

καρβοξυτελικό άκρο). Τα δύο αυτά ατελή πολυπεπτιδικά τμήματα της β-γαλακτοσιδάσης συμπληρώνονται, εφ' όσον το πλασμίδιο έχει μεταμορφωθεί επιτυχώς στο βακτηριακό κύτταρο, οπότε και προκύπτει η λειτουργική πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να μετατρέψει ένα άχρωμο υπόστρωμα του ενζύμου (X-gal), σε ένα παράγωγό του που έχει μπλε χρώμα. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως α-συμπληρωματικότητα.

Εάν όμως, έχει εισαχθεί στο φορέα, σε ορισμένη θέση κλωνοποίησης, κάποιο άλλο υπό μελέτη γονίδιο, έτσι ώστε να διακοπεί το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου lacZ, τότε δεν είναι δυνατόν να παραχθεί ενεργό ένζυμο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό λευκών αποικιών. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως απενεργοποίηση ένθεσης.

Για την ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης χρησιμοποιούνται οι εξής δύο ουσίες:

- X-gal: είναι το χρωμογόνο υπόστρωμα της αντίδρασης της β-γαλακτοσιδάσης, διάσπαση του οποίου προσδίδει μπλε χρώμα στις αποικίες
- IPTG: δρα ως επαγωγέας της μεταγραφής του γονιδίου lacZ και βοηθά στην εντονότερη εμφάνιση του μπλε χρώματος.

Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τα βακτηριακά κύτταρα (§B.4.4) και έλεγχος του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου όπως περιγράφεται στην παράγραφο που ακολουθεί.

Γ.1.3. Έλεγχος των pBluescript κλώνων της συνθάσης της β-αμυρίνης με τη χρήση της PCR

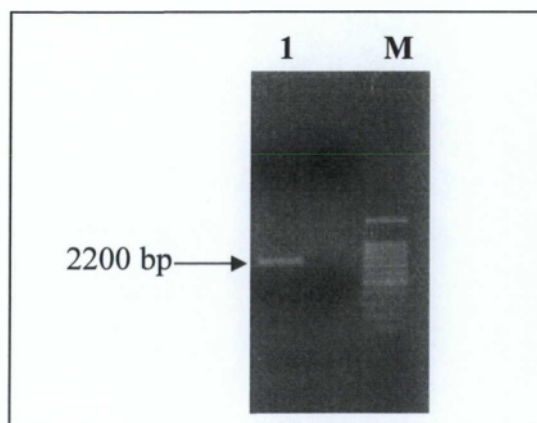
Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική ευρείας χρήσεως με τεράστιο πεδίο εφαρμογής και γιαυτό το λόγο είναι ανέφικτη η αναφορά στις ειδικές παραμέτρους της αντίδρασης, παρά μόνο στις γενικές συνθήκες που την διέπουν. Στην παρούσα μελέτη, το DNA που παράχθηκε με αυτή τη μέθοδο είχε ως στόχο να επιβεβαιώσει την ένθεση του cDNA στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript KS+. Για την αντίδραση PCR απαιτήθηκαν:

- ο κλώνος pBluescript

- τα δύο πρόδρομα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές (primers), τα οποία επιλέχθηκαν κατά τέτοιο τρόπο ώστε να υβριδίσουν ένθεν και ένθεν της περιοχής του cDNA που επρόκειτο να αντιγραφεί
- το ένζυμο DNA πολυμεράση, το οποίο χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA σαν μήτρα, για την σύνθεση μιας συμπληρωματικής ως προς αυτό αλυσίδας
- και τέλος, ένα μίγμα των τεσσάρων δεοξυ-νουκλεοτιδίων dNTPs=dATP+dCTP+dGTP+dTTP.

Το επόμενο βήμα ήταν να θερμανθεί το μίγμα στους 94°C για 5 λεπτά. Σε αυτή την θερμοκρασία, τα δίκλιωνα μόρια του DNA διαχωρίζονται πλήρως, σχηματίζοντας μονόκλωνες αλυσίδες που κατόπιν θα αποτελέσουν μήτρες αντιγραφής για την πολυμεράση. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία του μίγματος ελαττώθηκε σε τέτοιο βαθμό ώστε τα ολιγονουκλεοτίδια να υβριδιστούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες, στο μονόκλωνο πλέον πλασμιδίο. Στο σημείο αυτό είχαν δημιουργηθεί οι κατάλληλες προϋποθέσεις για την επαγωγή της δράσης της πολυμεράσης και η θερμοκρασία ανυψώθηκε στους 72°C. Κατόπιν, η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή για περίπου 5 λεπτά, ώστε να υπάρχει χρόνος για την αντιγραφή. Στο τέλος αυτής της περιόδου, η αντίδραση θερμάνθηκε στους 94°C, για λίγα δευτερόλεπτα αυτή τη φορά, έτσι ώστε τα μικρά δίκλιωνα μόρια cDNA που παρήχθησαν (η αρχική αλυσίδα και η νεοσυντηθείσα συμπληρωματική), να αποδιαταχθούν και να αποτελέσουν μόρια έναρξης για ένα ακόμα κύκλο αντιγραφής, με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω.

Στην παρούσα μελέτη, η PCR έγινε αυτοματοποιημένα, με την χρήση κυκλικού εναλλακτική θερμότητας, ο οποίος προγραμματίστηκε κατάλληλα για τις θερμοκρασίες και τους χρόνους της αντίδρασης (SB.5.7). Η ακολουθία-στόχος που παράχθηκε αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 6).



*Εικόνα 6. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης (1) των προϊόντων PCR, όπου χρησιμοποιήθηκε ως DNA μήτρα ο pBluescript KS κλώνος της συνθάσης της β-αμυρίνης που κατασκευάστηκε.
M: δείκτης μοριακών βαρών.*

Γ.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΤΗΣ β-ΑΜΥΡΙΝΗΣ, ΣΕ ΩΡΙΜΑ ΦΥΜΑΤΙΑ *Lotus japonicus*, ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΟΥ *In-situ* ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ.

Γ.2.1. Προετοιμασία λεπτών τομών φυματίων

Σπόροι *Lotus japonicus* εν Gifu σκαριφαρίστηκαν σε πυκνό θειικό οξύ για 3 λεπτά και πλύθηκαν με αποστειρωμένο παγωμένο νερό (§B.2.1). Κατόπιν μεταφέρθηκαν σε τριβλία Petri, πάνω σε υγρό διηθητικό χαρτί και έμειναν στο σκοτάδι, για 4 ημέρες, σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να προβλαστήσουν. Τα υγιή έκφυτα μεταφέρθηκαν σε δοχεία με αποστειρωμένο περλίτη και εμβολιάστηκαν με το *Mesorhizobium loti* στέλεχος N2P2235, την ημέρα της σποράς. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θάλαμο υπό συγκεκριμένη φωτοπερίοδο και θερμοκρασία και ποτίστηκαν με κατάλληλο **θρεπτικό διάλυμα**¹, το οποίο περιείχε τις απαραίτητες ποσότητες **ιχνοστοιχείων**² (§B.2.2). Τα φυμάτια συλλέχθηκαν με το πέρας 21 ημερών από την ημέρα της σποράς, μονιμοποιήθηκαν (§B.3.1), διαφανοποιήθηκαν (§B.3.2) κι εγκλείστηκαν σε παραφίνη (§B.3.3), προτού τεμαχιστούν σε πάχος 7μm (§B.3.4) και τοποθετηθούν σε αντικειμενοφόρους πολύ-L-λυσίνης. Ακολούθησε η απομάκρυνση της παραφίνης (§B.3.5) και οι αντικειμενοφόροι με τις τομές φυλάχτηκαν στους -20°C.

Γ.2.2. Σχεδιασμός και σύνθεση του RNA ανιχνευτή (In-vitro transcription)

Η *in-vitro* μεταγραφή ενός cDNA προϋποθέτει ότι ο πλασμιδιακός φορέας, στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί, έχει καταστεί γραμμικό δίκλωνο μόριο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ενζύμων περιορισμού, τα οποία αναγνωρίζουν θέσεις στον πολυσύνδεσμο του πλασμιδίου, ο οποίος βρίσκεται χωρισμένος εκατέρωθεν του cDNA. Η επιλογή των κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων εξαρτάται από τη φορά υποκλωνοποίησης του ένθετου cDNA στον πλασμιδιακό φορέα και καθορίζει το αν η μεταγραφή είναι δυνατόν να γίνει από τον T3 ή τον T7 προαγωγέα.

Στην παρούσα εργασία το 5' άκρο του ενθέτου cDNA βρίσκονταν στην πλευρά του T7 προαγωγέα ενώ το 3' άκρο στην πλευρά του T3. Συνεπώς, μετά από μελέτη

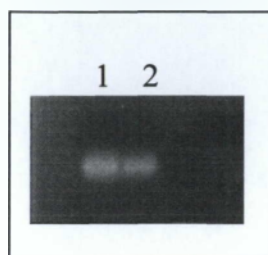
του χάρτη του πλασμιδίου pBluescript , χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Kpn, για την πέψη του πλασμιδίου από την πλευρά του 5' άκρο του ένθετου cDNA, ώστε να περιλαμβάνεται και ο προαγωγέας της T7 RNA πολυμεράσης. Αν λοιπόν το συγκεκριμένο δείγμα μεταγραφεί από τον T3 προαγωγέα, θα παραχθεί αντιπληροφοριακό RNA (antisense RNA), το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τον RNA:RNA *in-situ* υβριδισμό. Αντιστοίχως, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Xho για την πέψη του πλασμιδίου από την πλευρά του 3' άκρο του cDNA, ώστε να περιλαμβάνεται και ο προαγωγέας της T3 RNA πολυμεράσης. Αν η μεταγραφή γίνει χρησιμοποιώντας τον T7 προαγωγέα, θα παραχθεί πληροφοριακό RNA (sense RNA), το οποίο στην ουσία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας για τον έλεγχο της εξειδίκευσης του υβριδισμού. Μετά από την πέψη του πλασμιδίου (§B.5.1) ακολούθησε καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο (§B.5.2) προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν υπάρχουσες ριβονουκλεάσες οι οποίες θα υδρόλυαν το παραγόμενο RNA. Τα δύο δείγματα γραμμικού πλασμιδιακού DNA κατακρημνίστηκαν στους -20°C με την προσθήκη ποσότητας αιθανόλης, ίσης με 2,5 φορές του όγκου τους και επαναδιαλύθηκαν σε ποσότητα νερού τόση, ώστε η τελική συγκέντρωσή τους σε DNA να είναι 0,2 μg/μl.

Για την αντίδραση της μεταγραφής (*in-vitro* transcription) χρησιμοποιήθηκαν:

- σημασμένα με Dig-UTP ριβονουκλεοτίδια, με τα οποία η RNA πολυμεράση θα συνέθετε τις συμπληρωματικές RNA αλυσίδες
- διάλυμα αντίδρασης της πολυμεράσης, το οποίο εξασφάλισε συνθήκες άριστες για την δράση της
- αναστολέας της δράσης των RNασων, για να αποφευχθεί η υδρόλυση του παραγόμενου RNA
- η T3 RNA πολυμεράση, στο δείγμα που υπέστη πέψη με το ένζυμο Kpn, για την παραγωγή αντιπληροφοριακού RNA
- η T7 RNA πολυμεράση, για την παραγωγή πληροφοριακού RNA, στο δείγμα που υπέστη πέψη με το ένζυμο Xho.

Η προσθήκη DNάσης, καθαρής από ριβονουκλεάσες, εξασφάλισε την καταστροφή του DNA που υπήρχε στα δείγματα. Η αντίδραση τερματίστηκε με EDTA, το RNA κατακρημνίστηκε και επαναδιαλύθηκε σε αποστειρωμένο νερό και μέρος του

αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, ώστε να ελεγχθεί η ποιότητά του (§B.6.3.2) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης του πληροφοριακού (*sense*, στήλη 1) και αντιπληροφοριακού (*antisense*, στήλη 2) RNA, το οποίο παρήχθη με *in-vitro* μεταγραφή του *pBluescript* κλώνου.

Γ.2.3. Υδρόλυση του σημασμένου RNA ανιχνευτή και προετοιμασία του μίγματος υβριδισμού

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η διείσδυση του Dig-RNA ανιχνευτή στις λεπτές τομές των φυματίων, υδρολύεται ένα μέρος του σε διάλυμα NaHCO_3 80mM/ Na_2CO_3 120mM, στους 60°C για 1 ώρα (§B.6.2.3). Η υδρόλυση τερματίστηκε με την προσθήκη οξικού οξέος και οξικού νατρίου και ο ανιχνευτής κατακρημνίστηκε με γλυκογόνο και αιθανόλη. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ανιχνευτή σε ποσότητα αποστειρωμένου νερού τόση ώστε η τελική του συγκέντρωση να κυμαίνεται μεταξύ 0,1-0,5 μg ανά 10 μl . Προστέθηκε φορمامίδιο, το μίγμα επώαστηκε για 10 λεπτά στους 60°C και μεταφέρθηκε αμέσως στον πάγο. Έπειτα, στο μίγμα του ανιχνευτή, προστέθηκε το μίγμα υβριδισμού (οι ποσότητες που αναφέρονται στην §B.6.2.3 είναι για μια αντικειμενοφόρο). Το νέο μίγμα αναμίχθηκε πολύ καλά, έμεινε για 3 λεπτά στους 60°C και χρησιμοποιήθηκε αμέσως για τον υβριδισμό.

Στην ουσία, με την επεξεργασία αυτή, εξασφαλίστηκε η αποδιάταξη του RNA ανιχνευτή (αρχικά με την υδρόλυση και έπειτα με την προσθήκη του φορمامιδίου), εμποδίστηκε η δράση των νουκλεασών που τυχόν υπήρχαν (με την παρουσία του TE που περιέχει το σύμπλοκο EDTA) και ρυθμίστηκαν οι συνθήκες υβριδισμού με τα άλατα Denhardt's και NaCl.

Γ.2.4. Προϋβριδισμός

Πριν την τοποθέτηση του μίγματος υβριδισμού, οι αντικειμενοφόροι με τις τομές έμειναν σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια ενυδατώθηκαν σε σειρά διαλυμάτων αιθανόλης μειωμένης συγκέντρωσης (§B.6.3). Επώαστηκαν σε διάλυμα πρωτεΐνης K, η οποία καταστρέφει πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια από τις μεμβράνες των φυτικών κυττάρων, προκειμένου να διεισδύσει ευκολότερα στο κύτταρο ο ανιχνευτής, ενώ ταυτόχρονα εξασφαλίζει την απομάκρυνση πρωτεϊνών από το RNA-στόχο του κυττάρου. Έπειτα, οι τομές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα τριαιθανολαμίνης και οξικού ανυδρίτη, με σκοπό την εξουδετέρωση των θετικών ή αρνητικών τους φορτίων. Ακολούθως ξεπλύθηκαν σε διάλυμα SSC, για να εξασφαλιστεί η μείωση των μη ειδικών δεσμεύσεων πάνω στο RNA-στόχο και αφυδατώθηκαν με την αντίστροφη σειρά αλκοολών. Τέλος, οι ιστοί έμειναν να στεγνώσουν και να αφυδατωθούν πλήρως σε κενό αέρος, για 1 ώρα τουλάχιστον.

Γ.2.5. Υβριδισμός και Πλύσεις

Πάνω σε κάθε αντικειμενοφόρο τοποθετήθηκαν 100 μl μίγματος υβριδισμού και οι τομές καλύφθηκαν με καλυπτρίδες. Ο σημασμένος Dig-RNA ανιχνευτής, που υπάρχει στο μίγμα, αναμένεται να υβριδιστεί με το RNA που τυχόν υπάρχει στις τομές των φυματίων.

Ο υβριδισμός έγινε σε σφραγισμένο δοχείο, στον πάτο του οποίου υπήρχε διηθητικό χαρτί 3MM εμποτισμένο με 2XSSC, ώστε να διατηρείται η υγρασία και να μην εξατμιστεί η μικρή ποσότητα του μίγματος υβριδισμού. Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές επώαστηκαν στους 42°C για τουλάχιστον 12 ώρες (§B.6.4). Μετά το τέλος του υβριδισμού, οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 4X SSC/5mM DTT έως ότου αποκολληθούν οι καλυπτρίδες. Ακολούθησε η ίδια διαδικασία για 4 ακόμη ξεπλύματα των 10 λεπτών και οι αντικειμενοφόροι μεταφέρθηκαν σε δοχείο χρώσης, το οποίο περιείχε διάλυμα RN1 και παρέμειναν στους 37°C για 30 λεπτά. Στο διάλυμα προστέθηκε DTT σε τελική συγκέντρωση 5mM (διάλυμα RN2) και οι τομές ξεπλύθηκαν για 20 λεπτά 4 φορές. Τέλος οι τομές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 2X SSC/1mM DTT, για 30 λεπτά υπό ήπια ανάδευση,

ούτως ώστε να εξασφαλιστεί η απομάκρυνση των μορίων που υβριδίσαν χαλαρά με το RNA των τομών (§B.6.5).

σημείωση: Στο διάλυμα RN1 περιέχεται ένα υδρολυτικό ένζυμο, η **RNάση-A**, το οποίο καταστρέφει τα **μονόκλιωνα** RNA που δεν έχουν υβριδίσει.

Γ.2.6. Ανοσολογική ανίχνευση του σήματος υβριδισμού. Μικροσκοπική παρατήρηση των τομών.

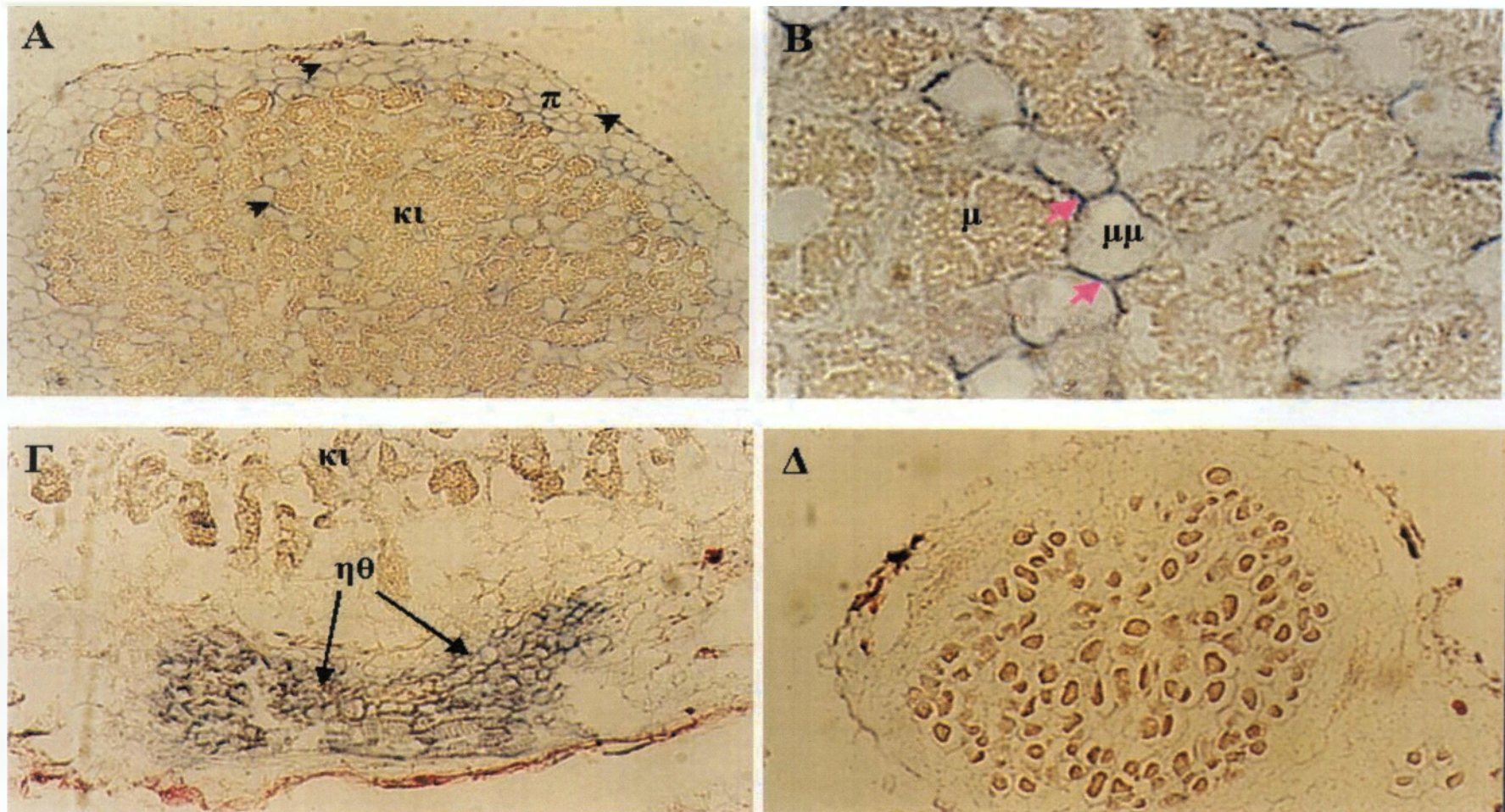
Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές, αρχικά μεταφέρθηκαν σε δοχείο χρώσης που περιείχε διάλυμα DET1 προκειμένου να εξισορροπηθούν. Έπειτα, στο δοχείο προστέθηκε 0,5% (w/v) “αντιδραστηρίου μπλοκαρίσματος”, το οποίο μείωσε τις θέσεις των μη ειδικών δεσμεύσεων για το αντίσωμα που θα προστεθεί παρακάτω (DET2). Οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίστηκαν για 30 λεπτά σε διάλυμα DET3, στο οποίο προστέθηκε 0,1% (w/v) BSA. Κατόπιν, στο διάλυμα αυτό προστέθηκε σε αραιώση 1:500 anti-DIG αντίσωμα και οι τομές παρέμειναν για επώαση 2 ωρών. Οι πλύσεις που ακολούθησαν, πριν την εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα DET4, αφορούσαν στην απομάκρυνση του μη δεσμευμένου αντισώματος. Στη συνέχεια, σε κάθε αντικειμενοφόρο προστέθηκαν 500μl διαλύματος χρωματικής αντίδρασης. Οι τομές παρέμειναν σε αυτό το διάλυμα, στο σκοτάδι, για 4 έως 16 ώρες, χρονικό διάστημα που εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου και την ποιότητα του υβριδισμού. Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές ελέγχονταν στο μικροσκόπιο ανά τακτά χρονικά διαστήματα, έως ότου έγινε εμφανές το θετικό σήμα του υβριδισμού, οπότε και τερματίστηκε η αντίδραση με την προσθήκη διαλύματος TE. Ακολούθησε αφυδάτωση των τομών σε διαλύματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων αιθανόλης, μονιμοποίηση τους με DPX και τοποθέτηση καλυπτρίδων. Οι τομές παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 8, έντονο σήμα υβριδισμού ανιχνεύεται στο παρέγχυμα καθώς και στα μη μολυσμένα κύτταρα των ωρίμων φυματίων *Lotus* (Εικ.8, A και B). Αντίθετα έκφραση του γονιδίου της β-αμυρίνης δε παρατηρείται, τουλάχιστον σε ανιχνεύσιμα επίπεδα, στα μολυσμένα κύτταρα του κεντρικού ιστού (Εικ.8, B). Η εικόνα αυτή είναι μεγέθυνση μέρους της προηγούμενης στην οποία φαίνονται καλύτερα τα μολυσμένα και μη μολυσμένα κύτταρα της συμβιωτικής

περιοχής του φυματίου. Σήμα υβριδισμού ανιχνεύεται και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες των φυματίων (Εικ. 8, Γ).

Στις τομές που υβριδίστηκαν με το σημασμένο πληροφοριακό RNA δεν ανιχνεύτηκε σήμα, όπως άλλωστε αναμένονταν (Εικ. 8, Δ). Το γεγονός αυτό φανερώνει την απουσία μη ειδικών δεσμεύσεων του ανιχνευτή λόγω υψηλής αυστηρότητας των συνθηκών υβριδισμού ή άλλων χημικών και φυσικών χαρακτηριστικών των ιστών που εξετάζονται. Κατά συνέπεια επιβεβαιώνεται με τον τρόπο αυτό η εξειδίκευση των υβριδισμών και η ορθότητα των παρατηρήσεων.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη έγινε επιτυχώς εντοπισμός της έκφρασης του γονιδίου της συνθάσης της β -αμυρίνης με την τεχνική του *in-situ* υβριδισμού σε φυμάτια του *Lotus japonicus*. Η αδυναμία των Iturbe-Ormaetxe κ.α (2003) να ανιχνεύσουν έκφραση της συνθάσης της β -αμυρίνης σε ιστούς φυματίων με την τεχνική του Northern υβριδισμού πιθανότατα οφείλεται στην μικρότερη ευαισθησία της τεχνικής σε σύγκριση με την τεχνική του *in-situ* υβριδισμού. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται υποστηρίζουν την υπόθεση των Hernandez και Cook (1996) ότι το φυτό έχει την ικανότητα να παράγει β -αμυρίνη σε ιστούς φυματίων και πιο συγκεκριμένα στα μη μολυσμένα κύτταρα του κεντρικού ιστού του φυματίου. Παρόμοιες αναφορές έχουν γίνει για την έκφραση συνθάσης της β -αμυρίνης στις ρίζες και φύλλα του μπιζελιού και της μηδικής *Medicago truncatula* (Iturbe-Ormaetxe κ.α 2003). Η β -αμυρίνη έχει εντοπισθεί στην περιβακτηριακή μεμβράνη των βακτηριοειδών. Ομοίως, είναι πιθανόν να παίζει δομικό ρόλο και σε άλλες μεμβράνες κυττάρων του φυματίου. Μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί παρουσία τριτερπενοειδών σαπωνινών (πρόδρομο μόριο των οποίων είναι η β -αμυρίνη) αλλά πληροφορίες για την παρουσία σαπωνινών όχι μόνο στα φυμάτια αλλά και στις ρίζες και φύλλα αυτού του φυτού είναι πολύ περιορισμένες. Μια περισσότερο λεπτομερής ανάλυση του περιεχομένου σε τριτερπενια των φυματίων αλλά και των άλλων ιστών του φυτού θα επιτρέψει την εκτίμηση του φυσιολογικού ρόλου του γονιδίου της συνθάσης της β -αμυρίνης.



Εικόνα 8. *In-situ* υβριδισμός των mRNA της συνθάσης της β-αμυρίνης σε τομές ωρίμων φυματίων του φυτού *Lotus japonicus*. Το σήμα ανιχνεύεται με την χρωματική αντίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης, ως μπλε-μωβ ίζημα. Στην εικόνα τα σήματα υβριδισμού επισημαίνονται με βέλη.
 [A, B] Τομές ωρίμων φυματίων όπου έκφραση του γονιδίου της συνθετάσης της β-αμυρίνης εντοπίζεται στα μη μολυσμένα κύτταρα του κεντρικού ιστού. Σήμα υβριδισμού ανιχνεύεται επίσης και στα παρεγχυματικά κύτταρα.
 [Γ] Τομή ωρίμου φυματίου, στην οποία έντονο σήμα υβριδισμού εντοπίζεται στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες.
 [Δ] *In-situ* υβριδισμός ωρίμων τομών από φυμάτια, στα οποία χρησιμοποιήθηκε σημασμένο πληροφοριακό RNA (πείραμα ελέγχου).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τριτερπένια είναι φυσικές ενώσεις οι οποίες παράγονται κυρίως από τα ανώτερα φυτά. Όπως και οι στερόλες, συντίθενται από το μονοπάτι βιοσύνθεσης των ισοπρενοειδών, μέσω της κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλένιου. Στο συγκεκριμένο βιοχημικό μονοπάτι, κεντρικό ρόλο κατέχει το ένζυμο της συνθετάσης της β -αμυρίνης.

Έως σήμερα, ο ακριβής φυσιολογικός ρόλος των τριτερπενίων δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Κάποια φυτά συσσωρεύουν ποσότητες τριτερπενοειδών σαπωνίνων συνήθως στις ρίζες, ενώ πολλές από αυτές έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση και προστατεύουν τα φυτά από επιθέσεις παθογόνων. Επιπλέον, ορισμένες σαπωνίνες πιστεύεται ότι σχετίζονται με φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών, όπως είναι η σύνθεση της κυτταρίνης και ο γεωτροπισμός.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί ο βιολογικός ρόλος των ενώσεων αυτών στα φυτά. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές *Lotus japonicus*, το οποίο αποτελεί φυτό μοντέλο σε μελέτες σχετιζόμενες με τη συμβιωτική σχέση ψυχανθών-ριζοβίων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας την τεχνική του *in-situ* υβριδισμού, προσδιορίστηκε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τη συνθετάση της β -αμυρίνης, στα φυμάτια του παραπάνω ψυχανθούς.

Τα αποτελέσματα αυτής της πειραματικής προσέγγισης οδηγούν σε συμπεράσματα σχετικά με τον βιολογικό ρόλο των τριτερπενοειδών, κατά τη συμβίωση ψυχανθών-ριζοβίων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe, I., Sankawa, U. and Ebizuca, Y. 1989. Purification of 2,3-Oxidosqualene-beta amyryn cyclase from pea seedlings. *Chem. Pharm. Bull.* 37 : 536-538.
- Abe, I., Rohmer, M. and Prestwich, G.D. 1993. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chem. Rev.* 93: 2189-2206.
- Abe, I., and Prestwich G.D. 1995. Identification of the active site of vertebrate oxidosqualene cyclase. *Lipids* 30: 231-234.
- Ali, M.S., Ahmad, F., Ahmad, V.U., Azhar, I. and Usmanghani, K. 2001. Unusual achemical constituents of *Lotus garcinii* (Fabaceae). *Turkish J.Chem.* 25: 107-112 2001.
- Allen, O.N. and Allen, E.K. 1981. *The Leguminosae. A source Book of Characteristics Uses and Nodulation.* London: Macmillan Publishers Ltd.
- Baisted, D.J. 1971. Sterol and triterpene synthesis in the developing and germinating pea seed. *Biochem. J.* 124: 375-383.
- Bajaj, Y.P.S. 1990. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Volume 10. Legumes and Oilseed Crops I.* (Bajaj, Y.P.S. ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Barker, D.G., Bianchi, S., Blondon, κ.α. 1990. *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 8: 40-49.
- Bergensen, F.J. 1982. *Root nodules of legumes: structure and functions.* Research Studies Press, Willey:Chishester.
- Bisseling, T., Van den Bos, R.C. and Van Kammen, A. 1977. *J. Gen. Microbiol.* 101: 79-84.
- Brewin, N.J. 1991. Development of the legume root nodule. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 191-226.
- De Bruijn, F.J., Szabados, L. and Schell, J. 1990. Chimeric genes and transgenic plants are used to study the regulation of genes involved in symbiotic plant-microbe interactions (nodulin Genes). *Dev. Genet.* 11: 182-196.
- Calvert, H.E., Pence, M.K., Pierce, M., Malik, N.S.A. and Bauer, W.D. 1984. Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium* infections in soybean roots. *Can. J. Bot.* 62: 2375-2384.
- Corby, H.D.L. 1981. The systematic value of leguminous root nodules. In *Advances in Legume Systematics* (Polhill, R.M. and Raven, P.H., eds.), pp. 657-669.
- Diaz, C.L., Melchers, L.S. and Hooykaas, P.J.J. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature.* 338: 579-581.
- Franssen, H.J., Vijn, I., Yang, W.C. and Bisseling, T. 1992. Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.* 19: 89-107.
- Gamas, P., Niebel, F.D.C., Lescure, N. and Cullimore, J.V. 1996. Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 233-242.
- Grandmougin-Ferjani, A., Dalpe, Y., Hartmann, M.A., Laruelle, F. and Sancholle, M. 1999. Sterol distribution in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry.* 50: 1027-1031.
- Grant, W.F., Bullen, M.R. and De Nettancourt, D. 1962. The cytogenetics of *Lotus*. I. Embryo-cultured interspecific diploid hybrids closely related to *L. corniculatus* L. *Can. J. Genet. Cytol.* 4: 105-128.

- Handberg, K. and Stougaard, J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*. 2 : 487-496.
- Haralampidis, K., Trojanowska, M. and Osbourn, A.E. 2001a. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnology*, 75: 31-49.
- Haralampidis, K., Bryan, G., Qi, X., Papadopoulou, K., Bakht, S., Melton, R. and Osbourn, A. 2001b. A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13431-13436.
- Hayashi, H., Huang, P.Y., Kiracosyan, A., Inoue, K., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., Kushiro, T., Shibuya, M. and Ebizuka, Y. 2001a. Cloning and characterization of a cDNA encoding beta-amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosynthesis in liquorice. *Biol. And Pharm. Bull.* 24: 912-916.
- Hayashi, H., Huang, P.Y., Kiracosyan, A., Inoue, K., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., Kushiro, T., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Yazaki, K. and Tanaca, S. 2001b. Molecular cloning and characterization of isomultiflorenol synthase, a new triterpene synthase from *Luffa cylindrica*, involved in biosynthesis of bryonolic acid. *Eur. J. Biochem.* 268: 6311-6317.
- Hernandez, L.E. and Cooke, D.T. 1996. Lipid composition of symbiosomes from pea root nodules. *Phytochemistry*, 42: 341-346.
- Herrera, J.B.R., Bartel, B., Wilson, W.K. and Matsuda, S.P.T. 1998. Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* lupeol synthase gene. *Phytochemistry*, 49: 1905-1911.
- Hinchee, M.A.W., Conner-Ward, D.V., Newell, C.A., MacDonell, R.E., Sato, S.J., Gasser, C.S., Fischhoff, D.A., Re, D.B., Fraley, R.T. and Horsch, R.B. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Biotechnology*, 6: 915-922.
- Hostettmann, K.A. and Marston, A. 1991. *Saponins* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK)
- Husselstein-Muller, T., Schaller, H. and Benveniste, P. 2001. Molecular cloning and expression in yeast of 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol.Biol.* 45: 75-92.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Haralampidis, K., Papadopoulou, K. and Osbourn, A.E. 2003. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Mol. Biol.* 51: 731-743.
- Jarvis, B.D.W., Pankhurst, C.E. and Patel, J.J. 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32 : 378-380.
- Jurzysta, M., Burda, S., Oleszek, W., Ploszynski, M., Small, E. and Nozzolillo, C. 1992. Chemical-composition of seed saponins as a guide to the classification of *Medicago* species. *Can. J. Bot.* 70: 1384-1387.
- Kinje, J.W. 1992. The *Rhizobium* infection process. In *Biological Nitrogen Fixation* (Stacey, G., Burris, R.H., Evans, H.J. eds.), Chapman & Hall: New York, pp. 349-398.
- Kushiro, T., Shibuya, M. and Ebizuka, Y. 1998a. Beta-amyrin synthase – Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *Eur. J. Biochem.* 256: 238-244.
- Kushiro, T., Shibuya, M. and Ebizuka, Y. 1998b. Molecular cloning of oxidosqualene cyclase cDNA from *Panax ginseng*. The isogene that encodes β -amyrin synthase. *Towards Natural Medicine Research in the 21st Century, Excerpta Medica*

- International Congress Series 1157* (Ageta, H., Aimi, N., Ebizuka, Y., Fujita, T & Honda, G., eds.), pp. 421-427. Elsevier Science BV, Amsterdam, the Netherlands.
- Kushiro, T., Shibuya, M. and Ebizuka, Y. 1999a. Chimeric triterpene synthase. A possible model for multifunctional triterpene synthase. *J. Am Chem. Soc.* 121: 1208-1216.
- Kushiro, T., Shibuya, M. and Ebizuka, Y. 1999b. Cryptic regioselectivity in deprotonation step of triterpene biosynthesis catalyzed by new members of lupeol synthase. *Tetrahedron Letts.* 40: 5553-5556.
- Kushiro, T., Shibuya, M., Masuda, K. and Ebizuka, Y. 2000a. A novel multifunctional triterpene synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Tetrahedron Letts.* 41: 7705-7710.
- Larsen, K. 1955. Cyto-taxonomical studies in *Lotus* II. Somatic chromosomes and chromosome numbers. *Botanisk Tidsskrift*, 52: 8-17.
- Mellor, R.B. and Werner, D. 1990. Legume nodule biochemistry and function. In *Molecular Biology of Symbiotic nitrogen fixation* (Gresshoff, P.M. ed.) CRC press: Boca Raton, pp. 111-119.
- Morita, M., Shibuya, M., Kushiro, T., Masuda, K. and Ebizuka, Y. 2000. Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*) – New alpha-amyrin-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. *Eur. J. Biochem.* 267 : 3453-3460.
- Nes, W.D. and Heftmann, E. 1981. A comparison of triterpenoids with steroids as membrane components. *J. Nat. Prod.* 44: 377-400.
- Nes, W.D. and McKean, M.L. 1977. *Biochemistry of steroids and other isoprenoids.* University Park Press, Baltimore.
- Newcomb, W. 1981. Nodule morphogenesis and differentiation. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 13: 246-298.
- Ohana, P., Delmer, D.P., Carlson, R.W., Glushka, J., Azadi, P., Bacic, T. and Benziman, M. 1998. Identification of a novel triterpenoid saponin from *Pisum sativum* as a specific inhibitor of the diguanylate cyclase of *Acetobacter xylinum*. *Plant and Cell Physiol.* 39: 144-152.
- Palmer, M.A. and Bowden, B.N. 1977. Variation in sterol and triterpene content of developing *Sorghum bicolor* grain. *Phytochemistry*, 16: 459-463.
- Pankhurst, C.E., Hopcroft, D.H. and Jones, W.T. 1987. Comparative morphology and flavolan content of *Rhizobium loti* induced effective and ineffective root nodules on *Lotus* species, *Leuceana leucocephala*, *Carmichaelia flagelliformis*, *Ornithopus sativus* and *Clanthus puniceus*. *Can. J. Botany*, 65: 2676-2685.
- Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E. 1999. Compromised disease resistance in saponin –deficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12923-12928.
- Phillips, D.A., Dakora, F.D., Leon-Barris, M., Sande, E. and Joseph, C.M. 1993. Signals released from alfalfa regulate microbial activity in the rhizosphere. In *New Horizons in Nitrogen Fixation* (Palacios, R.E. ed.) Kluwer Academic Publishers: The Netherlands, pp. 197-202.
- Poralla, K., Hewelt, A., Prestwich, G.D., Abe, I., Reipen, I. and Sprenger, G. 1994. A specific amino acid repeat in squalene and oxidosqualene cyclases. *Trends Biochem. Sci.* 19: 157-8.
- Price, K.R., Johnson, I.T. and Fenwick, G.R. 1987. The chemistry and biological significance of saponins in food and feeding stuffs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 26: 27-135.

- Rae, A.L., Bonfante-Fasolo, P. and Brewin, N.J. 1992. Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *The Plant Journal*. 2: 385-395.
- Rahman, A., Ahamed, A., Amakawa, T., Goto, N. and Tsurumi, S. 2001. Chromosaponin I specifically interacts with AUX1 protein in regulating the gravitropic response of *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol*. 125: 990-1000.
- Robertson, J.C., Lyttleton, P., Bullivant, S. and Grayston, G.F. 1978. Membranes of lupin root nodules: 1. The role of Golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. *J. Cell. Sci.* 30: 129-149.
- Roth, L.E. and Stacey, G. 1989. Bacterium release into host cells of nitrogen fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur. J. Cell Biol.* 49: 13-23.
- Scheres, B., Van Engelen, F., Van der Knaap, E., Van de Wiel, C., Van Kammen, A. and Bisseling, T. 1990. Sequential induction of nodulin gene expression in developing pea nodules. *Plant Cell*. 2: 687-700.
- Shibuya, M., Zhang, H., Endo, A., Shishikura, K., Kushiro, T. and Ebizuka, Y. 1999. Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases. *Eur. J. Biochem.* 266: 302-307.
- Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B.J.J. and Kinje, J.W. 1992. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.* 6: 2897-2903.
- Stougaard, J., Marcker, K.A., Otten, L. and Schell, J. 1986. Nodule-specific expression of a chimeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature*, 321: 669-674.
- Sugden, B., de Troy, B., Roberts, R.J. and Sambrook, J. 1975. *Analytical Biochemistry*, 68: 36.
- Swanson, E.B., Somers, D.A. and Tomes, D.T. 1990. Birdsfoot Trefoil (*Lotus corniculatus* L.). In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Volume 10. Legumes and Oilseed Crops I. (Bajaj, Y.P.S., eds.). Berlin: Springer-Verlag.
- Threlfall, D. and Whitehead, I.M. 1990. Redirection of terpenoid biosynthesis in elicitor-treated plant cell suspension cultures. In *Plant Lipid Biochemistry* (P.J. Quinn and J.L. Harwood, eds.), Portland Press, London, pp. 344-346.
- Udvardi, M.K., Yang, L.J.O. and Day, D.A. 1990. Sugar and amino acid transport across symbiotic membranes from soybean nodules. *Mol. Plant-microbe Inter.* 3: 334-340.
- Vance, C.P. 1983. *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease? *An. Rev. Microbiol.* 37: 399-424.
- Vincent, J.M. 1980. Factors controlling the legume-*Rhizobium* symbiosis. In *Nitrogen Fixation II* (Newton, W.E., Orme-Johnson, W.H. eds.), University Park Press: Baltimore, pp. 103-129.
- Werner, D., Bassarab, S., Humbeck, C., Kape, R., and Kimmback, A. 1988. Nodule proteins and compartments. In *Nitrogen Fixation: Hundred Years After* (Bothe, H., de Bruijn, F.J., Newton, W.E. eds.), Gustav Fischer: Stuttgart, pp. 507-515.
- Yang, W.C., Katinakis, P., Hendrikis, P., Smolders, A., de Vries, F., Spee, J., Van Kammen, A., Bisseling, T. and Franssen, H. 1993. Characterization of GmENOD40, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. *The Plant Journal*. 3: 573-585.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Κατάλογος Υδατικών Διαλυμάτων

1	ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΦΥΤΩΝ	0,072%(W/V) K ₂ HPO ₄ [USB], 0,024%(W/V) KH ₂ PO ₄ [USB], 0,025%(W/V) MgSO ₄ ·7H ₂ O [BDH], 0,025%(W/V) Ca ₂ SO ₄ [SIGMA], 0,003%(W/V) FeCl ₃ [BDH], 0,1ML/LT ΔΙΑΛΥΜΑ ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΩΝ.
2	Διάλυμα Ιχνοστοιχείων	200mg/lt FeCl ₃ ·6H ₂ O [BDH], 200mg/lt MnSO ₄ ·H ₂ O [BDH], 15mg/lt CuSO ₄ ·5H ₂ O [BDH], 200mg/lt CoCl ₂ ·6H ₂ O [BDH], 200mg/lt H ₃ BO ₃ [BDH], 200mg/lt Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O [BDH], 200mg/lt ZnSO ₄ ·4H ₂ O [BDH]
3	Διάλυμα Μονιμοποίησης	4% paraformaldehyde [BDH] και 0,25%(v/v) glutaraldehyde σε Ρυθμιστικό Διάλυμα Μονιμοποίησης.
4	Ρυθμιστικό Διάλυμα Μονιμοποίησης 10X	Μητρικό Διάλυμα 100mM Φωσφορικών και 1M NaCl, pH=6,8. Για κάθε λίτρο αναμιγνύονται: 684ml Na ₂ HPO ₄ , 316ml NaH ₂ PO ₄ και 58,4ml NaCl.
5	X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside [PROMEGA]. Μητρικό Διάλυμα 20mg/lt σε διμεθυλ-φορμαμίδιο [BDH]. Φυλάσσεται στους -20°C.
6	IPTG	β-D-isopropyl-thiogalactopyranoside [PROMEGA]. Μητρικό διάλυμα 100mM σε νερό (500mg/20ml) αποστειρώνεται με φίλτρο 0,2μm [SCHLEICHER & SCHUELL] και φυλάσσεται στους 4°C.
7	STEL Ρυθμιστικό Διάλυμα	8% sucrose [MERCK], 5% Triton X-100 [BDH], 50Mm Tris- [BDH], 50mM EDTA [SERVA], 0,5mg/ml Lysozyme [USB], pH: 8,0.
8	TA Ρυθμιστικό Διάλυμα 10X	Για κάθε 10ml αναμιγνύονται: 3,3ml 1M Tris/Acetic [BDH] pH: 7,8 , 1,3ml 5M c [BDH], 1ml 1M MgAc [BDH], 4ml 0,1M Spermidine trichloride [USB]. Το διάλυμα αποστειρώνεται από φίλτρο και φυλάσσεται σε κλάσματα στους -20°C.
9	ΤΑΕ Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης 50X	24,2%(w/v) Tris- [BDH], 57,1ml/lt CH ₃ COOH [BDH], 100ml/lt 0,5M EDTA [SERVA].

10	Ρυθμιστικό Διάλυμα Φόρτωσης	0,25% Bromophenol blue [USB], 0,25% Xylene cyanol [USB], 40%(w/v) glycerol [BDH].
11	HYDRO	80mM NaHCO ₃ [USB], 120mM Na ₂ CO ₃ [USB].
12	50X Διάλυμα Denhardt's	1% Ficoll (Type 400) [PHARMACIA], 1% Polyvinylpyrrolidone [BDH], 1% Bovine serum albumin (Fraction V) [BOEHRINGER].
13	TE Ρυθμιστικό Διάλυμα	10mM Tris- [BDH], 1mM EDTA [SERVA].
14	Διάλυμα Πρωτεΐνάσης K	1μg/ml proteinase K [PROMEGA] σε 100mM Tris-HCl pH 7,5 [BDH], 50mM EDTA [SERVA].
15	SSC Διάλυμα 20X	175,3gr/lit NaCl [BDH], 88,2gr/lit Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O (trisodium citrate) [BDH].
16	RN1	Σε 500mM NaCl [BDH], 1mM EDTA [SERVA], 10mM Tris-HCl pH: 7,5 [BDH], προστίθενται 50mg/ml RNase-A [PROMEGA].
17	RN2	500mM NaCl [BDH], 1mM EDTA [SERVA], 10mM Tris-HCl pH: 7,5 [BDH], 50mg/ml RNase-A [PROMEGA], 5mM DTT [PROMEGA].
18	DET1	100mM Tris-HCl pH: 7,5 [BDH], 150mM NaCl [BDH].
19	DET2	100mM Tris-HCl pH: 7,5 [BDH], 150mM NaCl [BDH], 0,5%(w/v) Blocking reagent (αντιδραστήριο μπλοκαρίσματος) [BOEHRINGER].
20	DET3	100mM Tris-HCl pH: 7,5 [BDH], 150mM NaCl [BDH], 0,05% Tween 20 [BDH].
21	DET4	10mM Tris-HCl pH: 7,5 [BDH], 10mM NaCl [BDH], 50mM MgCl ₂ [BDH].
22	Διάλυμα Χρωματικής Αντίδρασης	10ml διαλύματος DET4, 35μl διαλύματος X-phosphate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, παρέχεται έτοιμο από την BOEHRINGER), 45μl διαλύματος NBT (4-nitrobluetetrazolium-chloride, παρέχεται έτοιμο από την BOEHRINGER).