

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**



**<<Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΙΡΚΑΔΙΚΑ  
ΟΜΟΛΟΓΟΥ ΤΗΣ ΕΣΠΕΡΙΝΗΣ ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ>>**

**ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΥ ΙΩΑΝΝΑ**

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2017

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΙΡΚΑΔΙΚΑ ΟΜΟΛΟΓΟΥ  
ΤΗΣ ΕΣΠΕΡΙΝΗΣ ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ>>**

**ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΥ ΙΩΑΝΝΑ**

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2017

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής του τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων ,στο ΤΕΙ Πελοποννήσου.

#### **ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

Δελής Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής

#### **Τριμελής Επιτροπή**

- Δελής Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής
- Κάρτσωνας Επαμεινώνδας, Επίκουρος Καθηγητής
- Κώτσιρας Αναστάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

#### **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Κωνσταντίνο Δελή, Επίκουρο Καθηγητή του εργαστηρίου Γενετικής του τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Πελοποννήσου, ο οποίος ανέλαβε την εποπτεία της παρούσας πτυχιακής εργασίας και συνέβαλλε στην ομαλή διεξαγωγή και περάτωση της εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Τομάτα.....	7
1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση.....	7
1.1.2 Καταγωγή- Ιστορικό- Εξάπλωση.....	7
1.1.3 Θρεπτική Αξία.....	8
1.1.4 Βοτανικά Χαρακτηριστικά.....	8
1.2 Κιρκάδιοι Ρυθμοί – Κιρκάδιο ρολόι.....	9
1.2.1 Περιγραφή του κιρκάδιου ρολογιού.....	9
1.2.2 Χαρακτηριστικά του Κιρκάδιου Ρυθμού.....	10
1.2.3 Δομή Κιρκάδιου Ρολογιού.....	11
1.3 Εσπερίνη-AtHesperin.....	12
1.4 ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ.....	16
1.5 Στοχευμένη με RNAi <<αντίστροφη γενετική>>: Δημιουργία διαγονιδιακών σειρών μετα-μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης (RNA gene silencing) για συγκεκριμένο γονίδιο.....	17
1.6 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	18
1.6.1 Περιγραφή <i>A.tumefaciens</i> .....	18
1.6.2 Δομή Τι πλασμιδίου.....	19
1.6.3 Μεταφορά του T-DNA από το Αγροβακτήριο στο φυτό.....	20
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1.....	ΥΛΙΚΑ ..... 21
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
Αποστείρωση σπερμάτων <i>Solanum lycopersicum</i> .....	23
Δειγματοληψία έκφυτων <i>Solanum lycopersicum</i> .....	23
Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.....	23
Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων.....	24
Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων( DNA,RNA) σε πήκτη αγαρόζης.....	25
Απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα ολικού RNA (DNάση).....	26
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR – Polymerase Chain Reaction).....	27

PCR για έλεγχο ύπαρξης DNA .....	27
Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcriptase) .....	29
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR) .....	29
Υποκλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα.....	31
Αντίδραση σύνδεσης-Λιγοποίηση (Ligation).....	31
Πρωτόκολλο Μετασχηματισμού .....	32
Απομόνωση πλασμιδίου από υγρή καλλιέργεια E.coli με την μέθοδο βρασμού.....	33
(Boiling prep).....	33
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA -Miniprep (Macherey nagel-nucleospin plasmid) .....	34
Πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	35
Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% .....	36
Απομόνωση τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης- NucleoSpin Extract II.....	36
Πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού .....	37
3.Αποτελέσματα.....	40
1.Ταυτοποίηση της AtHESP .....	40
2.Έκφραση Γονιδίου και Κυκλάδιος Ρυθμός.....	40
2.Μελέτη έκφρασης γονιδίου <i>Solyc08g75010</i> με τη μέθοδο Real time PCR.....	41
2.Κατασκευή του φορέα-φουρκέτα.....	42
a) Κλωνοποίηση του Αντι-νοηματικού ενθέματος .....	42
b) Κλωνοποίηση του νοηματικού ενθέματος.....	43
Υποκλωνοποίηση του φορέα-φουρκέτα στον τελικό φορέα .....	44
3.Μετασχηματισμός <i>A.tumefaciens</i> με τον pCambia1300 που φέρει την κασέτα αποσιώπησης .45	
Βιβλιογραφία .....	47

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο γενετικής του ΤΕΙ Πελοποννήσου, που είχε ως σκοπό να μελετήσει τη λειτουργία και την έκφραση της εσπερίνης στη τομάτα. Μέχρι τώρα είχε μελετηθεί η εσπερίνη μόνο στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και μέσω της εργασίας, καταφέραμε να βρούμε παρόμοιο γονίδιο στη τομάτα, που αποτελεί ένα φυτό με σημαντικό γεωργικό ενδιαφέρον. Εξετάστηκε η συσχέτιση της εσπερίνης με τον κερκάδιο ρυθμό και η έκφραση της στο γένωμα της τομάτας. Εφαρμόστηκε η τεχνική της <<αντίστροφης γενετικής>> και συγκεκριμένα η δημιουργία διαγονιδιακών σειρών μετα-μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης (RNA gene silencing) για το γονίδιο *hesp*, κατασκευάζοντας φορέα-φουρκέτα. Τέλος, έγινε προσπάθεια για τον μετασχηματισμό του *A.tumefaciens* με τον τελικό φορέα, pCambia1300, ο οποίος φέρει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει.

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Τομάτα

#### 1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση

Η τομάτα ανήκει στην οικογένεια των Σολανωδών (*Solanaceae*) και αποτελεί το δεύτερο πιο δημοφιλές λαχανικό μετά την πατάτα στην Ελλάδα. Σύμφωνα με προηγούμενη ταξινόμηση ανήκε στο γένος *Lycopersicon* (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Σήμερα, όμως, κατατάσσεται στο γένος *Solanum* (*Solanum lycopersicum* L.). Έχει διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων με  $2n=24$ . Η ονομασία της προέρχεται από τη λέξη *tomatl*, της διαλέκτου των Αζτέκων που σημαίνει διογκωμένος καρπός. (Ιμπραχίμ-Αβραάμ & Πετρόπουλος, 2014)

Καλλιεργούνται διάφορες ποικιλίες τομάτας κάποιες για την παραγωγή νωπών καρπών και κάποιες άλλες για την παραγωγή βιομηχανικής τομάτας οι οποίες διαθέτουν τα κατάλληλα μορφολογικά χαρακτηριστικά για πλήρως μηχανοποιημένη καλλιέργεια.

#### 1.1.2 Καταγωγή- Ιστορικό- Εξάπλωση

Είναι φυτό ιθαγενές της Ν.Αμερικής. Αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι η χώρα καταγωγής της είναι το Περού, σήμερα, όμως, σύμφωνα με τις πληροφορίες του Jenkins (1948) δεχόμαστε ότι η καλλιεργούμενη τομάτα προέρχεται από το Μεξικό, απ' όπου αρχικά μεταφέρθηκε περίπου τον 16<sup>ο</sup> αιώνα στην Ευρώπη και στην συνέχεια διασκορπίστηκε σε άλλα μέρη της γης. (ΟΛΥΜΠΙΟΥ, 2001)

Αρχικά καλλιεργήθηκε σαν καλλωπιστικό φυτό και όχι σαν λαχανικό, γιατί πίστευαν ότι οι καρποί ήταν δηλητηριώδεις, όπως συμβαίνει με τους καρπούς άλλων ειδών της οικογένειας των σολανωδών, οι οποίοι περιέχουν το αλκαλοειδές σολανίνη. Μετά το ξεπέραςμα αυτής της αντίληψης άρχισε κανονικά η καλλιέργειά της. (ΚΟΜΝΑΚΟΥ, 1988)

Στην Ελλάδα η τομάτα εισήχθη για πρώτη φορά το 1818, αλλά εντατικά και σε μεγάλη έκταση καλλιεργήθηκε αμέσως μετά τον πρώτο παγκόσμιο πόλεμο (1825). Η καλλιέργεια της βιομηχανικής τομάτας έκανε εμφάνιση το 1920 στην Αμερική και στην Ευρώπη όπου αποτέλεσε σημαντική εξέλιξη στον τομέα των ποικιλιών, υβριδίων καθώς και στις τεχνικές και τα μέσα καλλιέργειας. Η τομάτα αποτελεί ένα βασικό εργαλείο στα χέρια των βελτιωτών διότι μπορεί να διασταυρωθεί με μικρή ή μεγάλη δυσκολία, με όλα τα άλλα είδη του γένους και να δημιουργήσει υβρίδια. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η μεταφορά και ενσωμάτωση επιθυμητών χαρακτηριστικών στις καλλιεργούμενες ποικιλίες και υβρίδια. (ΟΛΥΜΠΙΟΥ, 2001)

Τόσο στην Ελλάδα όσο και παγκοσμίως η καλλιέργεια της είναι αρκετά διαδεδομένη και πολύ δημοφιλής. Γι' αυτό τον λόγο δεν είναι τυχαίο που καταλαμβάνει την τρίτη θέση στην διεθνή κλίμακα μετά την πατάτα και την γλυκοπατάτα. (ΟΛΥΜΠΙΟΥ, 2001)

### 1.1.3 Θρεπτική Αξία

Ένας λόγος που καθιστά την τομάτα τόσο διαδεδομένο λαχανικό είναι η θρεπτική της αξία. Οι καρποί του είναι πλούσιοι σε βιταμίνες A, B1, B2, C, D, κυρίως όμως σε A και C και άλατα, προπαντός, σιδήρου, ασβεστίου, φωσφόρου, καλίου, νατρίου και μαγνησίου. Είναι φτωχό σε θερμίδες (176-230/κιλό). (ΚΟΜΝΑΚΟΥ, 1988) Έχουν ελκυστικό χρώμα και άρωμα, καθώς επίσης αποτελούν σημαντική πηγή λυκοπενίου. Η θρεπτική αξία των καρπών της είναι συγκριτικά χαμηλότερη σε σχέση με άλλα λαχανικά, αλλά το γεγονός ότι καταναλώνεται σε μεγάλες ποσότητες την καθιστούν ιδιαίτερα σημαντική για την διατροφή του ανθρώπου. (Ιμπραχίμ-Αβραάμ & Πετρόπουλος, 2014)

### 1.1.4 Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Είναι ποώδες λαχανικό, πολυετές. Στις περιοχές μας όμως καλλιεργείται ως ετήσιο. Η ρίζα του είναι πασσαλώδης και αναπτύσσεται σε βάθος, όταν στο φυτό δεν μεσολαβήσει μεταφύτευση.

Τα φύλλα είναι σύνθετα και, όπως ο βλαστός, έχουν πολλά τριχίδια, που όταν σπάσουν αφήνουν την χαρακτηριστική μυρωδιά της τομάτας.

Τα άνθη(4-12) είναι πολλά μαζί και σχηματίζουν ταξιανθία. Το άνοιγμα τους δεν είναι ταυτόχρονο. Είναι ερμαφρόδιτα και αυτογονιμοποιούνται. Σε σπάνιες περιπτώσεις γίνεται σταυροεπικονίαση και διασταύρωση ποικιλιών. Τα θηλυκά μέρη του άνθους είναι επιδεκτικά γονιμοποίησης με το άνοιγμα του άνθους, ενώ τα αρσενικά μέρη κατά 2-8 ώρες αργότερα. Η γονιμοποίηση γίνεται δύο περίπου ημέρες μετά την επικονίαση ή 3-4 ημέρες μετά το άνοιγμα του άνθους. (ΟΛΥΜΠΙΟΥ, 2001)

Ο καρπός είναι ράγα. Ωριμάζει σε κανονικές κλιματικές συνθήκες 45, περίπου, ημέρες μετά τη γονιμοποίηση και σε διπλάσιο ή και περισσότερο σε μη ευνοϊκές κλιματικές συνθήκες. (ΟΛΥΜΠΙΟΥ, 2001) (ΚΟΜΝΑΚΟΥ, 1988)



## 1.2 Κιρκάδιοι Ρυθμοί – Κιρκάδιο ρολόι

### 1.2.1 Περιγραφή του κιρκάδιου ρολογιού

Η καθημερινή περιστροφή της γης γύρω από τον άξονά της κάθε 24 ώρες, που έχει σαν αποτέλεσμα την ημέρα και τη νύχτα, καθορίζει τους ρυθμούς των περισσότερων έμβιων όντων. Συνεπώς, ο μεταβολισμός, η φυσιολογία και η συμπεριφορά των περισσότερων οργανισμών αλλάζει μεταξύ ημέρας και νύχτας. Αυτές οι βιολογικές ταλαντώσεις χαρακτηρίζονται ως ημερήσιοι ρυθμοί. Οι περισσότεροι οργανισμοί έχουν μια έμφυτη ικανότητα να αντιλαμβάνονται το χρόνο. Πράγματι, οι περισσότεροι οργανισμοί δεν ανταποκρίνονται στην ανατολή του ηλίου αλλά ρυθμίζουν την βιολογία τους σύμφωνα με την αυγή. Οι ημερήσιοι ρυθμοί των οργανισμών παραμένουν, ακόμα και όταν στερούνται εξωγενή χρονικά ερεθίσματα, δείχνοντας ότι παράγονται από ένα ενδογενές βιολογικό κιρκάδιο ρολόι. Μέχρι πρόσφατα, οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους οι οργανισμοί λειτουργούν σε αυτή την τέταρτη διάσταση, τον χρόνο, παραμένουν άγνωστοι. Ωστόσο, πάνω από 30 χρόνια, οι προσεγγίσεις της μοριακής γενετικής αποκάλυψαν τη μοριακή βάση του κιρκάδιου ρολογιού. (McClung, 2009)

Τα κιρκάδια ρολόγια παρατηρούνται σε ένα ευρύ φάσμα πολύ διαφορετικών μεταξύ τους οργανισμών, από τα κυανοβακτήρια και τους μύκητες μέχρι τα φυτά, τα έντομα και τα θηλαστικά. Σύμφωνα με μελέτες αποδείχθηκε ότι ο μοριακός μηχανισμός του ρολογιού είναι συντηρημένος ακόμα και σε περιπτώσεις που συγκεκριμένα γονίδια δεν είναι. Αν και ο κεντρικός πυρήνας του μηχανισμού του ρολογιού αποτελείται από έναν βρόγχο αρνητικής ανατροφοδότησης, σχετικά πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι για να παραχθεί ένα κιρκάδιο ρολόι, χρησιμοποιούνται διαφορετικά επίπεδα ρύθμισης. Για παράδειγμα, το ρολόι στη *Drosophila* και στα σπονδυλωτά, βασίζεται στη μεταγραφική ενεργοποίηση και στην καταστολή κεντρικών γονιδίων του ρολογιού. Σήμερα είναι σαφές ότι τα πρωτεϊνικά προϊόντα αυτών των γονιδίων ελέγχονται όχι μόνο σε μεταγραφικό επίπεδο, αλλά και σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο, με φωσφορυλίωση, με αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, με ενδοκυτταρικό εντοπισμό και με αποικοδόμηση, γεγονότα που ρυθμίζονται και τα ίδια ρυθμικά. (Baggs & Green, 2003)

Συγκεκριμένα στα φυτά οι κιρκάδιοι ρυθμοί συμπεριλαμβάνουν την κίνηση φυτικών οργάνων, όπως φύλλων και πετάλων, το άνοιγμα των στοματίων, καθημερινές ταλαντώσεις σε μεταβολικές δραστηριότητες όπως η φωτοσύνθεση και η αναπνοή. Για παράδειγμα ορισμένα φυτά χαμηλώνουν τα φύλλα τους κατά τη διάρκεια της νύχτας (περιορίζοντας τις

θερμικές απώλειες) και τα ανυψώνουν και πάλι κατά τη διάρκεια της ημέρας (για αποτελεσματικότερη δέσμευση της ηλιακής ακτινοβολίας). Οι κirkάδιοι ρυθμοί χωρίζονται στους σχετικά μη-εμφανείς, όπως αυτοί της φωτοσύνθεσης, μέχρι τους συγκριτικά εμφανείς, όπως οι ρυθμοί της κίνησης των φύλλων.

### 1.2.2 Χαρακτηριστικά του Kirkάδιου Ρυθμού

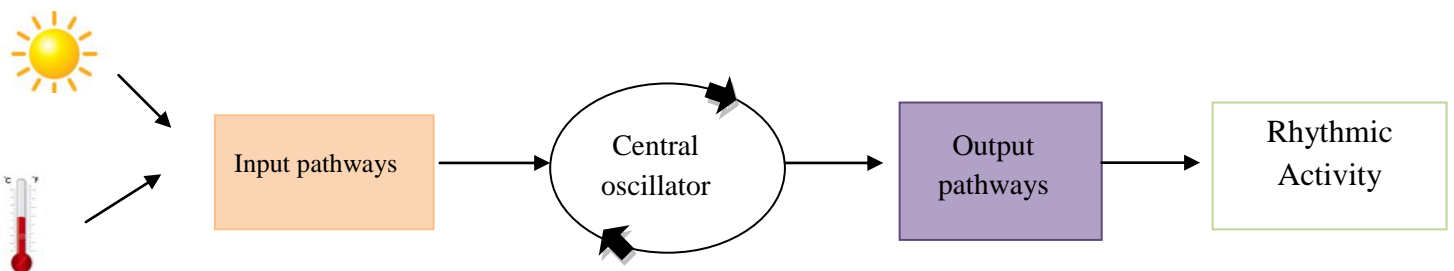
Οι κirkάδιοι ρυθμοί αποτελούν το υποσύνολο των βιολογικών ρυθμών και έχουν περίοδο που ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί ένας κύκλος 24 ωρών. (κυκλικό φαινόμενο). Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό ο Franz Halberg εμπνεύστηκε το 1959 και δημιούργησε τον όρο "*circadian*" (kirkάδιος) που προέρχεται από τις λατινικές λέξεις "*circa*" (κύκλος) και "*dies*" (ημέρα). Δεύτερο χαρακτηριστικό τους είναι ότι παράγονται ενδογενώς και ότι είναι αυτοσυντηρούμενοι με αποτέλεσμα να αντέχουν σε συνεχείς περιβαλλοντικές συνθήκες (σε συνεχές φως ή σκοτάδι και σε συνεχή θερμοκρασία). Κάτω από αυτές τις ελεγχόμενες συνθήκες, ο οργανισμός στερείται εξωτερικά χρονικά ερεθίσματα και παρατηρείται απώλεια συγχρονισμού με τον 24ωρο κύκλο. Επιπλέον ένα άλλο χαρακτηριστικό των κirkάδιων ρυθμών είναι ότι η περίοδος παραμένει σχετικά σταθερή σε μια κλίμακα περιβαλλοντικών θερμοκρασιών (Pittendrigh, 1954). Συνεπώς, το ρολόι δεν επηρεάζεται από τις μεταβολές στον κυτταρικό μεταβολισμό.

Εάν ένα φυτό διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ειδικό θάλαμο κάτω από τεχνητά σταθερές συνθήκες φωτός, θερμοκρασίας και υγρασίας, μπορεί να παρεκκλίνει από την 24ωρη περίοδο (ενός κirkάδιου κύκλου). Ο κirkάδιος ρυθμός συνεχίζει να εκφράζεται τουλάχιστον για μία χρονική περίοδο ως 17ελευθέρως-τρέχουσα, η οποία μπορεί να ποικίλει από 21-27 ώρες ανάλογα με την απόκριση. Επομένως, το φυτό αποκομμένο από τις περιβαλλοντικές συνθήκες αποσυγχρονίζεται. Η απόκλιση από την περίοδο των 24 ωρών δεν σημαίνει ότι το βιολογικό ρολόι μετακινήθηκε εσφαλμένα. Τα ρολόγια ελεύθερου ρυθμού κρατούν ακριβή ώρα αλλά δεν είναι συγχρονισμένα με τον εξωτερικό κόσμο. Το φυτό επανασυγχρονίζεται αν επανέλθει στις φυσιολογικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα φυτά χρειάζονται κάποια "σήματα" για να συγχρονίσουν το εσωτερικό τους ρολόι με τον εξωτερικό κύκλο ημέρας-νύχτας που διαρκεί ακριβώς 24ώρες. Αυτά τα σήματα ή αλλιώς περιβαλλοντικά χρονικά ερεθίσματα (όπως, φως, θερμοκρασία) ονομάζονται Zeitgebers/χρονοδότες (Γερμανική λέξη) τα οποία συγχρονίζουν το ενδογενές σύστημα χρόνου με μια περίοδο 24 ωρών, ανταποκρινόμενοι στην εξωγενή περίοδο της περιστροφής της Γης. Κατά τη διάρκεια της ημέρας παράγονται ερεθίσματα, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν την επανεκκίνηση του ρολογιού. Ένας παλμός φωτός πριν από την αυγή θα

προχωρήσει τη φάση του ρολογιού, όμως ο ίδιος παλμός φωτός μετά το σούρουπο θα την καθυστερήσει. Αν ο ίδιος παλμός φωτός δοθεί το μεσημέρι τότε δεν θα έχει κανένα απολύτως αποτέλεσμα. Με βάση τα παραπάνω αντιλαμβανόμαστε ότι το ρολόι λειτουργεί με την δική του ευαισθησία απέναντι στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. (McClung, 2009)

### 1.2.3 Δομή Κιρκάδιου Ρολογιού

Οι κιρκάδιοι ρυθμοί διέπονται από ένα ενδογενές σύστημα καταγραφής του χρόνου, το κιρκαδικό ρολόι, το οποίο χωρίζεται σε τρία κύρια δομικά συστατικά:



1) Μονοπάτια εισόδου (input pathways), αφορά το πώς οι εξωτερικοί παράγοντες συντονίζουν το δεύτερο συστατικό με το περιβάλλον. Συγκεκριμένα, για να μπορέσει να λειτουργήσει σωστά το ρολόι θα πρέπει να διαθέτει ένα μηχανισμό που θα του επιτρέπει να συγχρονίζεται με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και να αυτορυθμίζεται με βάση αυτές. Για να το καταφέρει αυτό συντονίζεται από συγκεκριμένους παράγοντες, οι οποίοι αναμεταδίδουν πληροφορίες σχετικά με την ώρα της ημέρας. Οι χρονοδότες (Zeitgebers) αυτοί, είναι οι κύκλοι φωτός/νύχτας και οι κύκλοι θερμοκρασίας. Το φως αποτελεί το καλύτερο ερέθισμα συντονισμού των φυτών. Τα φυτά αντιλαμβάνονται το φωτεινό σήμα μέσω των φωτοϋποδοχέων, στα οποία υπάρχουν τρεις κύριες οικογένειες :α) τα φυτοχρώματα, β) τα κρυπτοχρώματα και γ) οι φωτοτροπίνες. (Harmer, et al., 2001)

2) Κεντρικός ταλαντωτής ή βηματοδότης( central oscillator), αποτελεί θα λέγαμε την καρδιά του ρολογιού. Αποτελείται από αυτορυθμιζόμενους βρόγχους θετικής/αρνητικής επανατροφοδότησης που αποτελούνται από συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες. Στο *Arabidopsis thaliana* κάποιοι από τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες είναι οι CCA1 (Circadian Clock Associated 1) και LHY (Late Elongated Hypocotyl) που αποτελούν τα αρνητικά στοιχεία του βρόγχου και ο APRR1/TOC1 (Arabidopsis Pseudo Response Regulator 1/Timing Of CAB expression 1) ή σκέτο παράγοντας TOC1, ο οποίος αποτελεί το θετικό παράγοντα του βρόγχου. Οι

CCA1 και LHY έχουν μέγιστα επίπεδα έκφρασης των mRNAs τους την αυγή(πρωινά γονίδια) ενώ ο TOC1 παρουσιάζει μέγιστο κατά τη δύση( απογευματινό γονίδιο).

3) Μονοπάτια εξόδου(output pathways) είναι οι εκροές του κεντρικού ταλαντωτή, δηλαδή είναι οι εμφανείς ρυθμοί κάτω από τον έλεγχο του κερκάδιου συστήματος. Τα μονοπάτια αυτά οδηγούν σε φυσιολογικούς και βιοχημικούς ρυθμούς των φυτών. (Harmer, 2009) (Más, 2005) (Gardner, et al., 2006)

### 1.3 Εσπερίνη-AtHesperin

Η Εσπερίνη (*AtHESP*) αποτελεί μια αποαδενυλάση η οποία έχει εντοπιστεί στο *Arabidopsis thaliana* και είναι ένα γονίδιο που παρουσιάζει ομοιότητα με τη Nocturnin (NOC) των θηλαστικών και βρίσκεται υπό τον έλεγχο του κερκάδιου ρολογιού. Με αφορμή την εντόπιση της Εσπερίνης στο *A.thaliana* πραγματοποιήθηκε η παρών πτυχιακή εργασία για την μελέτη και εύρεση του ίδιου γονιδίου στο φυτό της τομάτας. Οι αποαδενυλάσες (deadenylases) είναι ένζυμα, γνωστά και ως εξωριβονουκλεάσες, εξαρτώμενα από το μαγνήσιο ( $Mg^{2+}$ ) που αποικοδομούν την πολύ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας 5'-AMP. Οι αποαδενυλάσες υπάρχουν τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα Η υπερέκφραση της *AtHESP* στα φυτά επηρεάζει την έκφραση και την ρυθμικότητα των βασικών γονιδίων του κεντρικού ταλαντωτή *TOC1* και *CCA1*. Η μελέτη έχει αποδείξει μια εξελικτική δραστηριότητα στη βράχυνση της πολύ(A) ουράς στα φυτά και προτείνει ότι η αποαδενυλίωση είναι ένας μηχανισμός που εμπλέκεται στην ρύθμιση του κερκάδιου ρυθμού. (Delis, et al., 2015)

Παρόλο που το φυτό *A.thaliana* μπορεί να έχει έως 26 αποαδενυλάσες, δεν έχει μελετηθεί εκτενώς η διαδικασία της αποαδενυλίωσης στα φυτά, ενώ ένα ένζυμο αποικοδόμησης της πολύ(A) που σχετίζεται με το ρολόι εξακολουθεί να είναι ασαφές. Σε έρευνα που έχει γίνει έχει εντοπιστεί μία ομόλογη της Νοκτουρίνης αποαδενυλάσης στο φυτό *A.thaliana* που μεταγράφεται σε υψηλότερα επίπεδα το βράδυ. Λόγω του προφίλ έκφρασης αναφέρεται ως *A.thaliana* Hesperin (*AtHESP*) από την Ελληνική λέξη Έσπερος ,το Αστέρι της Νύκτας. Η *AtHESP* είναι ένας νέος μεταγραφικός ρυθμιστής του κερκαδικού ρυθμού που δραστηριοποιείται στην αποικοδόμηση της πολύ(A) ουράς και επηρεάζει ρυθμικά την έκφραση του mRNAs του πυρήνα ταλαντωτή στα φυτά, ενώ είναι επίσης εμφανής ένας αρνητικός ρόλος στην απόκριση των φυτών κατά της οξειδωτικής καταπόνησης.

Η AtHESP αποδεικνύεται ότι είναι ομόλογη προς τη κίρκαδικά ελεγχόμενη αποαδενυλάση NOC που εντοπίζεται σε θηλαστικά και άλλους οργανισμούς και εμφανίζεται και στα φυτά. Το γονίδιο κωδικοποιεί το 3' άκρο πολύ (A) εξώριβονουκλεάσης και η AtHESP ανήκει στην υπεροικογένεια των EEP (Exonucleases-Endonucleases Phosphatase) των αποαδελυνασών. Το γονίδιο ρυθμίζεται από το κίρκαδιο ρολόι και ταυτόχρονα επηρεάζει τη μεταγραφή των κίρκαδικών ταλαντωτών, αναφερόμενοι στην αποαδενυλίωση και στην αλλαγή του mRNA ως μηχανισμό ρύθμισης του κίρκαδικού ρυθμού. Επιπλέον πιθανολογείται ο ρόλος του AtHESP στην αντίδραση των φυτών στην οξειδωτική καταπόνηση.

Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του ομόλογου της NOC από άλλους οργανισμούς εξακολουθεί να είναι υποτυπώδης. Η AtHESP δείχνει μια μεγάλη ομοιότητα με CNOT6 και CNOT6L αποαδενυλασών της υπεροικογένειας των EEP. Μελέτες σε ζύμη με CCR4 αποαδενυλασών (ομόλογο του CNOT6) έχουν δείξει ότι η πολύ(A) ουρά είναι το προτιμότερο υπόστρωμα, ενώ οι πολύ (U), πολύ (C), και πολύ(G) ήταν περισσότερο ανασταλτικές στη διαδικασία αποικοδόμησης. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι το AtHESP προτιμά πολύ (A). Πολύ(A) είναι επίσης το προτιμώμενο υπόστρωμα για την PARN που ανήκει στην υπεροικογένεια των DEDD αποαδενυλασών, ακολουθούμενη από την πολύ (U) η οποία αποικοδομείται λιγότερο αποτελεσματικά, ενώ η πολύ (C) και πολύ(G) είναι ασθενή υποστρώματα.

Η αλλοστερική συμπεριφορά της AtHESP μπορεί να γίνει καλύτερα κατανοητή λαμβάνοντας υπόψη το βασικό ρόλο της πολύ (A) ουράς στην σταθερότητα του mRNA. Οι αποαδενυλάσες είναι εξαιρετικά ρυθμιζόμενα ένζυμα και η δραστηριότητά τους επηρεάζεται από ποικιλία παραμέτρων, όπως ο υποκυτταρικός εντοπισμός, μετά-μεταφραστική τροποποίηση, τα cis-δρώντα στοιχεία του στόχου mRNAs και τα trans- δρώντα στοιχεία των ρυθμιστικών παραγόντων. Η PARN, που είναι μια αποαδενυλάση που εκτεταμένα έχει μελετηθεί, είναι όντως μια αλλοστερικά ρυθμιζόμενη αποαδενυλάση με υπάρχουσες ολιγομερείς δομές και η δραστηριότητα της διαμορφώνεται από cis στοιχεία, όπως 5' cap, AU-rich και κυτταροπλασματικά στοιχεία πολυαδενυλίωσης του mRNA, και trans παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων και των παραγόντων πρωτεΐνης, όπως και σε άλλα μικρά μόρια, όπως τα νουκλεοτίδια και νουκλεοτιδικά ανάλογα. Ωστόσο, μπορεί επίσης να συσχετιστεί μέσα σε ενεργό τετραμερές και υψηλής τάξης ολιγομερές, τόσο *in vitro* όσο και σε ζωντανά κύτταρα. Αποτελέσματα έρευνας έδειξε ότι η AtHESP είναι ολιγομερές και αυτή η συμπεριφορά μάλλον δείχνει να αντιπροσωπεύει έναν ρυθμιστικό μηχανισμό. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι οι αποαδενυλάσες δρουν συντονισμένα και πολλές αποαδενυλάσες μαζί

μπορεί να επιδρούν στο ίδιο mRNA, με διακριτούς αλλά επικαλυπτόμενους τρόπους. Επομένως, η ποικιλομορφία των αποαδενυλασών, η πολυπλοκότητα των συνεργών δέσμησης, όπως επίσης και η ρύθμισή τους δημιουργούν ολά μαζί ένα πολύπλοκο δίκτυο για να ρυθμίζουν με ακρίβεια την ενδοκυτταρική mRNA ομοιόσταση. Αναμένεται ότι η αναγνώριση των συνεργών δέσμησης της AtHESP θα συμβάλει στην κατανόηση της αλλοστερικής συμπεριφοράς της, ενώ ο καθορισμός των διακριτών περιοχών αναμένεται να προσφέρει τη δομική βάση για τις ρυθμιστικές απαιτήσεις της.

Η AtHESP συμβάλλει στον έλεγχο της κερκάδιας γονιδιακής έκφρασης και τα αποτελέσματα έρευνας έχει δείξει ότι η αποαδενυλίωση και ο κύκλος εργασιών του mRNA είναι ένας μηχανισμός που επηρεάζει τους κερκάδιους ταλαντωτές μεταγραφής. Η ρύθμιση της μεταγραφικής συσσώρευσης των γονιδίων του ρολογιού (TOC1 / CCA1 / LHY) είναι σημαντικά διαταραγμένη σε μεταλλαγμένα φυτά *hesp* που αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενους κύκλους φως/σκοτάδι. Η ρυθμική έκφραση του γονιδίου μπορεί να είναι σύνθετη, συμπεριλαμβανομένου όχι μόνο του κερκαδιανού κανονισμού, αλλά και διαφόρων συστηματικών και περιβαλλοντικών συνθηκών (π.χ. η ανάπτυξη, η καταπόνηση) ερεθίσματα, όπως έχουν προταθεί για το *Nox* των θηλαστικών. Ο βασικός ρυθμιστικός μηχανισμός της υποκείμενης αποαδενυλίωσης μέσω HESP. Σε έρευνα υπερέκφρασης της AtHESP έχουν παρακολουθηθεί τα επίπεδα έκφρασης του *TOC* και *CCA1* σε περιβάλλον με αυξημένα επίπεδα AtHESP. Σε αυτές τις διαγονιδιακές σειρές φυτού έχουν ανιχνευθεί αυξημένα επίπεδα *TOC* και *CCA*, αλλά διατηρήθηκε η κυκλική μορφή έκφρασης. Αυτή η έλλειψη αναστροφής φάσης της συσσώρευσης mRNA του *TOC1* ή *CCA1*, υποδεικνύει ότι κανένα από τα γονίδια δεν είναι άμεσοι στόχοι της δραστηριότητας της αποαδενυλάσης της AtHESP. (Delis, et al., 2015) Έτσι, η AtHESP μπορεί να επηρεάσει τον κερκάδιο ρυθμό στο *Arabidopsis* με την αποαδενυλίωση ένα ή περισσότερων άγνωστων γονιδίων. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα πρόσφατα μοντέλα που περιγράφουν το κερκάδιο ρολόι σε φυτά περιλαμβάνουν 3 ή 4 πολλαπλούς βρόχους δυνατότητας αλληλεπίδρασης, το παγκόσμιο σύστημα βιολογίας, θα πρέπει επιδιώξει να εντοπίσει τους mRNAs στόχους της AtHESP. Εναλλακτικά, η υπερέκφραση της AtHESP μπορεί να μην είναι επαρκής για να διαταράξει τα σύμπλοκα που δημιουργούνται, και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η AtHESP μπορεί να δρα σε συνεννόηση με άλλους συνεργούς, συμπεριλαμβανομένων και των άλλων αποαδενυλασών, για να ρυθμίσουν σωστά το κερκάδιο ρολόι.

Παρότι οι αποαδενυλάσες στα φυτά δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς όπως σε άλλους οργανισμούς, είναι ξεκάθαρο ότι το Arabidopsis χρησιμοποιεί διαφορετικές αποαδενυλάσες για να στοχεύσει συγκεκριμένα mRNAs και διάφορες αναπτυξιακές και φυσιολογικές διαδικασίες. Δύο γονίδια PARN αναγνωρίστηκαν στο Arabidopsis, μία εκ των οποίων, At1g55870 (AtPARN), είναι μια κυτταροπλασματική αποαδενυλάση απαραίτητη για εμβρυογένεση, που επηρεάζει ένα υποσύνολο των εμβρυϊκών μεταγραφών. Επιπλέον, CAF1 γονίδια είναι παρόντα σε Arabidopsis, που ορισμένα από αυτά συνδέονται με την καταπόνηση των φυτών. Τα CAF1 έχουν επίσης συνδεθεί με την αντίσταση των φυτών σε μυκητιακές και βακτηριακές λοιμώξεις, που σημαίνει ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις παθογόνου-φυτού. Η ύπαρξη πολλαπλών αποαδενυλασών μπορεί να έχουν και διαφορετικές ανάγκες για την έκφραση των ειδικών mRNAs σε διαφορετικούς χρόνους σε κύτταρα ή ιστούς, αλλά και από την παρουσία ειδικών mRNAs σε διαφορετικές χρονικές περιόδους.

Η AtHESP πιθανόν να παίζει ρόλο στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών, ως απάντηση στο στρες. Η υπερέκφραση του γονιδίου σε διάφορα φυτά έχουν μια σοβαρή, αν και αναστρέψιμη καθυστέρηση και οι φαινότυποι με το μεταλλαγμένο HESP γονίδιο φαίνεται να προστατεύονται καλύτερα έναντι της οξειδωτικού στρες. Έχει αναφερθεί ο ρόλος των πρωτεϊνών NOC που είναι ομόλογες με την AtHESP, που εκτείνεται σε ενώσεις για το μεταβολισμό των λιπιδίων και για τη λειτουργία τους στην κατάλληλη θέση μορφογένεσης και στάδιο της νύμφης σε θηλαστικά και Drosophila, αντίστοιχα. Είναι ενδιαφέρον να θεωρήσουμε ότι η AtHESP μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση τόσο του κερκαδικού ρολογιού όσο και στις διαδικασίες γύρω από αυτό, όπως η απόκριση σε μηχανισμούς έναντι των αβιοτικών ή / και βιοτικών καταπονήσεων όπως έχει ήδη περιγραφεί προηγουμένως για άλλα συστατικά του ρολογιού στα φυτά. Η διευκρίνιση των μηχανισμών της τροποποίησης αυτής της καινοτόμας αποαδενυλάσης στη ρύθμιση και απορρύθμιση του κερκαδικού ρολογιού στα φυτά ή / και στην ανάπτυξη και στο μεταβολισμό των φυτών, ειδικά κάτω από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες αποτελεί μια ελκυστική πρόκληση.

(Delis, et al., 2015)

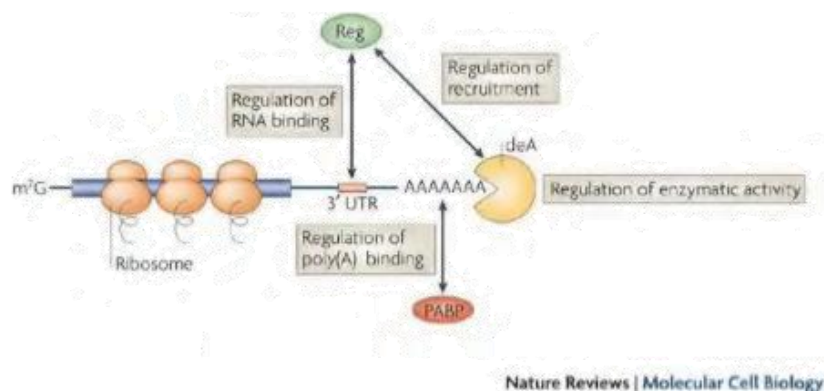
## 1.4 ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ

Η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA παίζει σημαντικό ρόλο:

- α) στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης,
- β) στον έλεγχο της βιοσύνθεσης του mRNA, και
- γ) στην αντιϊκή προστασία (Moraes, et al., 2006)

Τα μόρια mRNA των περισσότερων ευκαρυωτικών οργανισμών φέρουν μία ουρά πολυ(A). Οι πολυ (A) ουρές με προκαθορισμένο μήκος συντελούν στην έξοδο του mRNA από τον πυρήνα, του προσδίδουν σταθερότητα και έναυσμα για μετάφραση όταν αυτό φτάνει στο κυτταρόπλασμα. Στον πυρήνα με τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι πολυ(A) ουρές στο κατάλληλο μήκος. Στο κυτταρόπλασμα με τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης σηματοδοτείται η αποικοδόμησή του.

Η αποικοδόμηση του mRNA αρχίζει με τη βράχυνση της πολυ (A) ουράς στο 3' άκρο του από διάφορα ένζυμα που χαρακτηρίζονται ως αποαδενυλάσες (και η διαδικασία ονομάζεται αποαδενυλίωση). Μετά την αποαδενυλίωση ένα ένζυμο αποτελούμενο από δύο υπομονάδες την Dcp1p και Dcp2p αφαιρεί την καλύπτρα και με τον τρόπο αυτό εκθέτει το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από μία 5'-3' εξωνουκλεάση, την Xrn1p. Εναλλακτικά, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'-5' από ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών, το κυτταροπλασματικό εξώσωμα. Τέλος, η καλύπτρα υδρολύεται από το DcpS. (Balatsos, et al., 2006)



(Goldstrohm & Wickens, 2008)



### 1.5 Στοχευμένη με RNAi <<αντίστροφη γενετική>>: Δημιουργία διαγονιδιακών σειρών μετα-μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης (RNA gene silencing) για συγκεκριμένο γονίδιο.

Οι δυο βασικοί τρόποι με τους οποίους μπορούν να μελετηθούν γονίδια άγνωστης λειτουργίας, τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη των φυτών είναι η μεθοδολογία <<προς τα εμπρός γενετικής>> (forward genetics) και η μεθοδολογία της <<αντίστροφης γενετικής>> (reverse genetics). Η <<προς τα εμπρός γενετική>> είναι η μεθοδολογία που έχει σαν απαρχή το φαινότυπο ενός φυτού (συνήθως μετά από πραγματοποίηση μεταλλαξιγένεσης) και οδεύει προς την απομόνωση και το χαρακτηρισμό του αντίστοιχου γονιδίου. Η <<αντίστροφη γενετική>> από την άλλη, γνωρίζει την νουκλεοτιδική ακολουθία ενός γονιδίου και εφαρμόζει προηγμένες τεχνικές μοριακής βιολογίας και γενετικής, προκειμένου να μελετήσει τον ενδεχόμενο φαινότυπο των μεταλλαγμένων ή/και διαγονιδιακών φυτών. Η επιλογή του κατάλληλου τρόπου εξαρτάται από τα ερωτήματα που θέλει να απαντήσει ο ερευνητής και από την πληροφορία που διαθέτει σχετικά με το υπό μελέτη χαρακτηριστικό.

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η Αντίστροφη Γενετική δεδομένου ότι γνωρίζαμε τη νουκλεοτιδική ακολουθία του γονιδίου στόχου αλλά δε γνωρίζαμε τη λειτουργία του. Επιπλέον, εξαιτίας ότι δεν είναι δυνατή πάντα η εύρεση μεταλλαγμένων σειρών από τις <<τράπεζες>> γενετικού υλικού, οδηγηθήκαμε στην <<μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση>> μέσω του μηχανισμού του RNAi.

Ο μηχανισμός της Γονιδιακής σίγησης ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στο φυτό *Petunia hybrid* σε μια προσπάθεια αλλαγής του χρώματος των ανθέων. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του γονιδίου της συνθάσης της χαλκόνης (CHS) για να επιτύχουν την παραγωγή φυτών με σκούρα μωβ άνθη, είχε σαν αποτέλεσμα να πάρουν άνθη άχρωμα, φαινόμενο που ονομάστηκε συν-καταστολή, αλλά αργότερα επιβεβαιώθηκε ότι οφειλόταν στο μηχανισμό της <<RNA σίγησης>>, καθώς το διαγονίδιο καταστέλλει την δράση και του ενδογενούς γονιδίου. Με το επιπλέον γονίδιο, το οποίο πιθανώς είχε εισέλθει σε πολλαπλά αντίγραφα τα οποία μεταγραφόταν σε αντίθετη φορά, ενεργοποίησαν τον RNAi μηχανισμό.

Ο μηχανισμός του RNA interference είναι ο εξής:

1. Το ένζυμο DICER διασπά το δίκλωνο RNA (ds RNA) σε μικρά τμήματα, γνωστά ως μικρά RNA παρεμβολής (RNAs-short-interfering RNAs). Αυτά τα δίκλιωνα ολιγοριβονουκλεοτίδια έχουν μήκος 21-22 nt και χαρακτηριστικό τους είναι μία προεξοχή δύο νουκλεοτιδίων σε κάθε 3 άκρο του με αντίθετη φορά.

2. Τα siRNAs ενώνονται με ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το RISC (RNA INDUCED SILENCING COMPLEX). Το siRNA θεωρείται ότι dsRNA 5'- siRNA 4. λειτουργεί ως οδηγός για να συναντήσει το σύμπλοκο το mRNA με τη συμπληρωματική αλληλουχία. Κατόπιν, πραγματοποιείται ενδονουκλεοτιδική διάσπαση του mRNA με αποτέλεσμα να μην μπορεί να παραχθεί η συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

Το πρώτο στάδιο του RNAi μηχανισμού (διάσπαση του dsRNA στα siRNAs) μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα, όμως το δεύτερο στάδιο(κατακερματισμός του ομόλογου mRNA) συμβαίνει αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα, καθώς το ώριμο mRNA είναι αυτό που διασπάται. Το τελικό, λοιπόν, αποτέλεσμα αυτού του μηχανισμού που πυροδοτείται από την παρουσία δίκλωνου RNA στο κύτταρο είναι η διάσπαση ομόλογου mRNA με τα siRNAs, τερματίζοντας έτσι την έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου. Η διάσπαση του mRNA γίνεται στην μέση περίπου του τμήματος που βρίσκει ομολογία το siRNA με το mRNA. Όσο πιο μεγάλο είναι το dsRNA τόσο πιο αποτελεσματική είναι η αποσιώπηση του γονιδίου. Ο αριθμός των siRNAs που προκύπτουν από την διάσπαση του δίκλωνου RNA είναι dsRNA/21. Τα siRNAs είναι δίκλιωνα τμήματα RNA μήκους 21-22 nt και έχουν ένα 5'-φωσφορικό άκρο και στο 3'υδροξυλικό-άκρο έχουν μία προεξοχή δύο νουκλεοτιδίων. Το RISC ή αλλιώς siRNP (small interfering ribonucleoprotein particle) αποτελείται από πολλές πρωτεΐνες, οι περισσότερες από τις οποίες δεν είναι γνωστές προσδένει ένα siRNA την φορά και προκαλεί διάσπαση του ομόλογου mRNA. (Καλαντίδης, et al., 2009)

## 1.6 *Agrobacterium tumefaciens*

### 1.6.1 Περιγραφή *A.tumefaciens*

Το *A.tumefaciens* είναι ένα Gram(αρνητικό), αερόβιο βακτήριο εδάφους, που ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae. Το βακτήριο είναι υπεύθυνο για την πρόκληση της ασθένειας του κορονωτού κάλου σε πολλά δικοτυλήδονα φυτά ,καθώς και σε ορισμένα Γυμνόσπερμα. Ο κάλλος αποτελεί μια συμπαγή μάζα αδιαφοροποίητων κυττάρων. Το 1988 οι Binns και Thomashaw μέσα από την εργασία τους αποκάλυψαν ότι το *A.tumefaciens* έχει την ικανότητα μεταφοράς ενός συγκεκριμένου τμήματος του DNA του ογκογενετικού πλασμιδίου του (Ti, tumor-inducing), το οποίο ονομάστηκε μεταφερόμενο-DNA (T-DNA, transfer-DNA), στον πυρήνα των προσβεβλημένων κυττάρων , ενσωματώνοντάς το στο

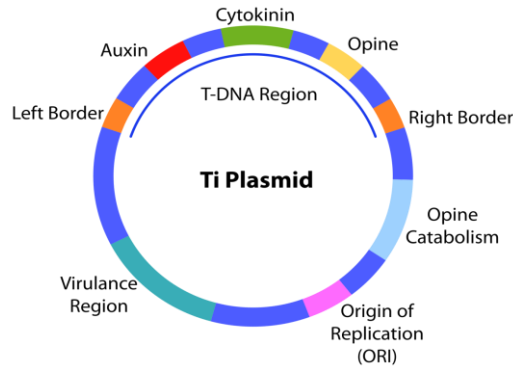
γένωμα του ξενιστή. Η ανακάλυψη αυτή έδωσε μια νέα προοπτική στη μελέτη του *A.tumefaciens*, σχετίζοντας πλέον το Αγροβακτήριο με τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών.

Τα κύτταρα του κορονωτού κάλλου παράγουν απο μόνα τους αυξίνη και γιββερελλίνη με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται υπέρμετρα πολλαπλασιάζονται υπέρμετρα(νεοπλασματικές υπερπλασίες). Επιπλέον, έχουν την δυνατότητα παραγωγής και οπινών ,που συντίθενται από συμπύκνωση σακχάρων και αμινοξέων και αποτελούν την τροφή του αγροβακτηρίου. Τα παραπάνω, τα αποκτούν τα κύτταρα του κάλλου εξαιτίας ένθεσης τμήματος Ti πλασμιδίου, του T-DNA.Έχουν βρεθεί τρία είδη Ti πλασμιδίων: της οκτοπίνης, της νοπαλίνης και της αγροπίνης, ανάλογα με την οπίνη που «αναγκάζουν» το φυτό να παράγει.Επίσης, στο Ti πλασμίδιο υπάρχουν και γονίδια για ένζυμα καταβολισμού των οπινών. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται, γενετικός αποικισμός.

### 1.6.2 Δομή Ti πλασμιδίου

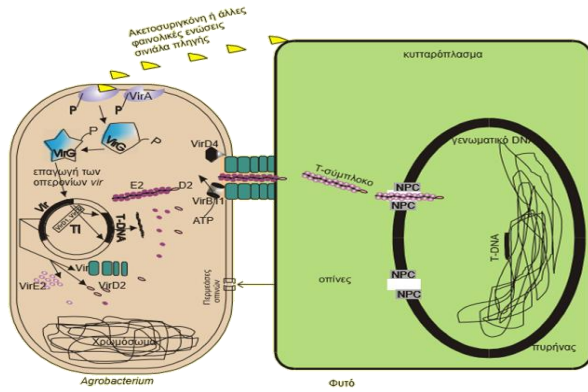
Τα Ti πλασμίδια του Αγροβακτηρίου έχουν μέγεθος από 200-800kb, ενώ η περιοχή του T-DNA έχει μέγεθος 10-30kb. Κάποια Ti πλασμίδια μπορεί να περιέχουν παραπάνω από μια T-DNA περιοχή. Το πλασμίδο Ti πέρα από το τμήμα T-DNA περιέχει και τη μολυσματική περιοχή των vir γονιδίων, μεγέθους 30kbp, που είναι οργανωμένη σε έξι οπερόνια, κάποια από τα οποία (virA, virB, virD, virG) είναι απαραίτητα για την μεταφορά του T-DNA και κάποια άλλα (virC και virE)συντελούν στην αύξηση της ικανότητας μεταφοράς του. Επίσης, περιέχει τα γονίδια για τον καταβολισμό των οπινών καθώς και τα συζευκτικά γονίδια μεταφοράς πλασμιδίων από βακτήριο προς βακτήριο.

Το T-DNA αποτελείται από τα ογκογενετικά γονίδια , τα οποία κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση αυξινών και κυτοκινινών και είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό όγκων καθώς και τα γονίδια που κωδικοποιούν για τη σύνθεση οπινών. Ιδιαίτερης σημασίας είναι το γεγονός ότι κανένα από τα γονίδια που υπάρχουν στο T-DNA δεν χρειάζεται για την μεταφορά και ενσωμάτωση τους στο γονιδίωμα των ξενιστών. Αντιθέτως, βασικό ρόλο παίζουν τα δυο επαναλαμβανόμενα συνοριακά όρια , εκατέρωθεν του T-DNA, το αριστερό(LB-Left Border)και το δεξιό(RB-Right Border)όριο, μήκους 25bp το καθένα.Τα συνοριακά αυτά είναι απαραίτητα για την καθοδήγηση και ενσωμάτωση του T-DNA στο γένωμα του ξενιστή.Η θέση ενσωμάτωσης του στο φυτικό γένωμα είναι τυχαία, αλλά ευνοούνται οι μεταγραφικά ενεργές περιοχές, καθώς είναι πιο εύκολα προσβάσιμες.



### 1.6.3 Μεταφορά του T-DNA από το Αγροβακτήριο στο φυτό

Η διαδικασία εξαγωγής του T-DNA από το πλασμίδιο και η μεταφορά του κι ενσωμάτωση του στο φυτικό κύτταρο, είναι αποτέλεσμα μιας συνδυασμένης δράσης μεταξύ των γονιδίων του βακτηριακού χρωμοσώματος(chv), των vir πρωτεϊνών, που μεταγράφονται από τα γονίδια της vir περιοχής και αλληλεπιδρούν με τα συνοριακά και των φυτικών πρωτεϊνών του ξενιστή. Το *Agrobacterium* μπορεί να μολύνει μόνο πληγωμένους ιστούς, καθώς τα παραγόμενα φαινολικά, όπως η ακετοσυριγκόνη(As, acetosyringone)που απελευθερώνονται από τα τραυματισμένα φυτικά κύτταρα δρουν ως χημειοτακτικές ουσίες. Οι τελευταίες συνδέονται με τις VirA και VirG οι οποίες επάγουν την έκφραση των οπερονίων των υπολοίπων γονιδίων τοξικότητας. Με την βοήθεια των VirD1 και VirD2, οι οποίες τέμνουν το T-DNA εξειδικευμένα στο RB και στο LB, παράγεται ss T-DNA. Η ενδιάμεση αλληλουχία του T-DNA μπορεί να αντικατασταθεί, όμως τα συνοριακά είναι απαραίτητα για την μεταφορά αλληλουχίας από το *Agrobacterium* στο φυτό. Η πρωτεΐνη VirD2 συνδέεται με το 5'άκρο του μονόκλωνου T-DNA και δρα ως οδηγός για την μεταφορά του στο φυτικό κύτταρο. Επιπλέον, η VirE2 περικλείει την αλυσίδα του T-DNA και το προστατεύει από νουκλεάσες. Τα προϊόντα του οπερονίου VirB σχηματίζουν το κανάλι στην επιφάνεια βακτηρίου-φυτού για να διέλθει το DNA. Το νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο με ενεργή μεταφορά διέρχεται τους πυρηνικούς πόρους και ενσωματώνεται στο φυτικό γένωμα. Τέλος, η ενσωμάτωση του T-DNA στο φυτικό γονιδίωμα γίνεται με ανορθόδοξο ανασυνδυασμό, γεγονός που σημαίνει ότι πραγματοποιείται μεταξύ περιοχών που έχουν ελάχιστη ή καμία ομοιότητα.



(Χατζόπουλος, 2001)

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΥΛΙΚΑ

- **Θρεπτικά Υλικά**  
LB Agar  
MS(Murashige & Skoog Medium)  
CCM(Co-Culture Medium)  
TSIM(Tomato Shoot Induction Medium)  
TSEM(Tomato Shoot Elongation Medium) [για την παρασκευή τους βλ. (Orozco-Cardenas, et al., n.d.)]
- **Πρωτεΐνες και ένζυμα**  
KAPA Taq polymerase (KAPABIOSYSTEMS)  
DNase  
Λιγάση T4  
EcoRI  
XhoI  
HindIII  
XbaI  
PstI  
SacI
- **Πλασμίδια**  
pGEM-T Easy Vector  
p-HANNIBAL  
pCAMBIA1300
- **Συσκευές**  
-Συσκευή υγρής αποστείρωσης,  
-Τράπεζα οριζόντιας νηματικής ροής,

- ζυγός ακριβείας( με τέσσερα δεκαδικά),
- όργανο μέτρησης pH,
- θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας
- μεταλλικές λαβίδες,
- νυστέρια,
- πιπέτες ακριβείας,
- ποτήρια ζέσεως
- τρυβλία, magenta boxes
- θάλαμος ανάπτυξης φυτών
- παραφίλμ (ένα θερμοπλαστικό εύκαμπτο πλαστικό ανθεκτικό στην υγρασία που κρατάει έξω από το τρυβλίο τους διάφορους μικροοργανισμούς που μολύνουν τα έκφυτα) κ.α.

### Αντιβιοτικά:

Αντιβιοτικό	Stock διαλύματα			Συγκέντρωση στο θρεπτικό διάλυμα
	Συγκέντρωση	Διαλύτης	Θερμοκρασία φύλαξης	
Αμπικιλίνη(Amp)	100mg/ml	ddH <sub>2</sub> O	-20°C	100μg/ml
Καναμυκίνη(Kan)	50 mg/ml	ddH <sub>2</sub> O	-20°C	50μg/ml
Ριφαμικίνη(Rif)	25 mg/ml	μεθανόλη	-20°C	50μg/ml
Σεφοταξάμη(Cef)	200 mg/ml	ddH <sub>2</sub> O	-20°C	200μg/ml

\*Εξαρτάται πάντα από το βακτηριακό είδος και στέλεχος. Στον συγκεκριμένο πίνακα παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που απαιτούσαν για να αναπτυχθούν τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν

\*\* Τα διαλύματα των αντιβιοτικών αποστειρώθηκαν με φιλτράρισμα από φίλτρο 0,22 μm (Whatman)

\*\*\*Χρησιμοποιήθηκαν και άλλα αντιβιοτικά για το μετασχηματισμό στο *A.tumefaciens* που αναφέρονται στα Αποτελέσματα-συζήτηση.

### Διαλύματα

#### 1. Θρεπτικό διάλυμα LB

Για την Παρασκευή μισού λίτρου διαλύματος προστίθενται:

-Cazein 5gr,NaCl 2,5gr, yeast extract 2,5gr, dH<sub>2</sub>O,

Για την παρασκευή θρεπτικού μέσου τρυβλίων προστίθενται στα παραπάνω 7,5gr άγαρ.

#### 2. Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης

-1X TAE(δημιουργία μέσω αραιώσης 50X TAE: 24,2%(w/v) Tris, 57,1ml/lit acetatic acid, 100ml 0.5M EDTA)

-2% κ.β. αγαρόζη

-Loading Buffer (10x): 0,25% μπλε βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 35% γλυκερόλη

3. Διαλύματα για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο του βρασμού

i. STET Buffer (8% sucrose , 0,5% Triton X-100 , 10 mM Tris, 50 mM EDTA) ,pH=8,0

ii. Lysozyme (50mg λυσοζύμης διαλύονται σε 1ml dH<sub>2</sub>O)

## 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### Αποστείρωση σπερμάτων *Solanum lycopersicum*

Εμβάπτιση σε διάλυμα αιθανόλης (EtOH) 70% για 2 λεπτά και σε διάλυμα υποχλωρίου του νατρίου (NaOCl) 5% για 15 λεπτά. Ακολούθως, τα σπέρματα ξεπλένονται 6 φορές με αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό. Τέλος, τα σπέρματα απλώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MS. Τα τρυβλία αφήνονται σε φωτοπερίοδο 16/8 (16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι) για 7 ημέρες.

### Δειγματοληψία έκφυτων *Solanum lycopersicum*

Μετά από 7 ημέρες πραγματοποιούμε τη δειγματοληψία των έκφυτων (υπέργειο τμήμα). Η δειγματοληψία πραγματοποιείται σε διαφορετικές ώρες του 24ώρου. Λαμβάνονται δείγματα : 2 ώρες πριν το σκοτάδι, 30 λεπτά πριν το σκοτάδι, 30λεπτά μετά το σκοτάδι, 2ώρες μετά το σκοτάδι, 6 ώρες μετά το σκοτάδι, 30 λεπτά πριν το φως, 30λεπτά μετά τα φώς και 4 ώρες μετά το φώς. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80°C.

### Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς

1. Φυτικοί ιστοί που έχουν διατηρηθεί στους -80°C ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτριβήσεως παρουσία υγρού αζώτου.
2. Μετά την εξάτμιση του υγρού αζώτου προστίθενται ρυθμιστικό διάλυμα (REB buffer) 800μl και 600μl φαινόλης/χλωροφόρμιου σε αναλογία 2:1.

3. Στη συνέχεια το δείγμα αναδεύεται καλά για 30 δευτερόλεπτα με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα erpendorf και προστίθενται 600μl φαινόλης/χλωροφόρμιου σε αναλογία 1:1. Το δείγμα αναδεύεται καλά για 30 δευτερόλεπτα με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και προστίθενται 500μl χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 49:1. Το δείγμα αναδεύεται καλά για 30 δευτερόλεπτα με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Το δείγμα μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και προστίθενται 800μl χλωριούχου λιθίου συγκέντρωσης 8M (LiCl 8M).
7. Το διάλυμα αφήνεται για ένα βράδυ στους 4°C.
8. Το ολικό RNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
9. Το ίζημα των νουκλεϊνικών οξέων επαναδιαλύεται σε 200μl νερό και το RNA κατακρημνίζεται εκλεκτικά με την προσθήκη 1/10 του διαλύματος οξικού νατρίου (NaAc PH 5.3) και 2,5 x του όγκου του διαλύματος αιθανόλης.
10. Έπειτα αφήνουμε τα δείγματα μας στους -80°C για 20 λεπτά.
11. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 40°C.
12. Το ίζημα ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη
13. Γίνεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά και επαναδιάλυση σε νερό.

#### Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA βασίστηκε στη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των προς εξέταση δειγμάτων στα 260nm και 280 nm. Η μέτρηση στα 260nm μας επιτρέπει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης τόσο του RNA όσο και του DNA σύμφωνα με το νόμο των Beer-Lambert. Σε καθαρά δείγματα RNA, όπου



δεν υπάρχουν προσμίξεις, ο λόγος O.D260/O.D280 ισούται με 2. Ισχύει ότι οπτική απορρόφηση στα 260nm ίση με τη μονάδα, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση RNA ίση με 40μg/ml. Έτσι ο προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης του RNA υπολογίζεται από την εξίσωση :  $[RNA]mg/ml = 40mg/ml \times O.D260$  του δείγματος  $\times$  συντελεστή αραίωσης Σε καθαρά δείγματα DNA, όπου δεν υπάρχουν προσμίξεις, ο λόγος O.D260/O.D280 ισούται με 1,8. Όταν η τιμή του πρώτου λόγου κυμαίνεται μεταξύ 1,8 – 2,0 και του δεύτερου στο 0,5, τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας Επίσης ισχύει ότι οπτική απορρόφηση στα 260nm ίση με τη μονάδα, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA ίση με 50μg/ml. Έτσι ο προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης του DNA υπολογίζεται από την εξίσωση :  $[DNA]mg/ml = 50mg/ml \times O.D260$  του δείγματος  $\times$  συντελεστή αραίωσης

### Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων( DNA,RNA) σε πήκτη αгарόζης

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αгарόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος του μεγέθους των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πήκτη αгарόζης με τη βοήθεια μιας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων. Η χρωστική ονομάζεται MidoriGreen (NIPPON GENETICS) και φθορίζει υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η αναλυτική ικανότητα της πήκτης αгарόζης είναι ανάλογη της περιεκτικότητάς της σε αгарόζη. Η συνήθης συγκέντρωση κυμαίνεται από 0.7%-2% αгарόζη. Για την πιστοποίηση του μεγέθους χρησιμοποιείται μάρτυρας DNA γνωστού μοριακού βάρους.

1. Κατάλληλη ποσότητα αгарόζης προστίθεται σε 1x TAE.
2. Θέρμανση του μείγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αгарόζη και το διάλυμα να γίνει διάφανο.
3. Το διάλυμα κρυνώνει μέχρι περίπου τους 50°C και έπειτα προσθήκη της χρωστικής MidoriGreen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
4. Η πήκτη τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης ,εφαρμόζεται η ειδική χτένα ώστε να δημιουργηθούν υποδοχείς για τοποθέτηση δειγμάτων και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

5. Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται κατάλληλη ποσότητα χρωστικής[loading buffer (10x) ]
6. Μετά την πήξη, απομακρύνεται η χτένα και προστίθεται στη συσκευή κατάλληλος όγκος διαλύματος 1x TAE που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης.
7. Τα δείγματα τοποθετούνται με πιπέτα στις ειδικές θέσεις της πηκτής και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 70-80V, ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού και την περιεκτικότητά της σε αгарόζη.

#### Απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα ολικού RNA (DNάση)

Με αυτή τη μέθοδο απομακρύνεται το γονιδιωματικό DNA που, ίσως, συνυπάρχει με το RNA που απομονώθηκε από τον ιστό. Ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- Λαμβάνεται δείγμα RNA 10 mg και μεταφέρεται σε σωλήνα eppendorf, στον οποίο προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης 3μl 10X, RNA DNάση ελεύθερης από RNάσες 1U/μg, αναστολέα RNασών 0,5μl και ddH<sub>2</sub>O μέχρις όγκου 10μl
- Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 45 λεπτά.
- Προστίθενται 170μl ddH<sub>2</sub>O και γίνεται ανάμιξη με ίσο όγκο (200μl) φαινόλης Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 13.000rpm.
- Στη συνέχεια προσθέτουμε 100μl φαινόλη και 100μl χλωροφόρμιο, φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά, 13.000rpm και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα eppendorf. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται και κατά την ανάμιξη με 200μl χλωροφόρμιο.
- Η κατακρήμνιση του RNA γίνεται με προσθήκη 1/20 του όγκου του διαλύματος CH<sub>3</sub>COONa, 3M, pH=5,3, και προσθήκη 2,5 όγκων αιθανόλης 100%. Το δείγμα διατηρείται στους -80°C για 45 λεπτά.
- Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, 14.000rpm, στους 4°C.
- Ακολουθεί προσθήκη 400μl αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, 14.000rpm, στους 4°C. Πετάμε το υπερκείμενο.
- Αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει και το επαναδιαλύουμε σε 10μl ddH<sub>2</sub>O

## Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR – Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός αλληλουχιών DNA με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μια θερμοκρασία στην άλλη. Η τεχνική προϋποθέτει ότι γνωρίζουμε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός τμήματος του επιθυμητού γονιδίου. Αυτό είναι απαραίτητο γιατί για την PCR χρειάζονται εκκινητές συμπληρωματικοί σε αλληλουχίες του γονιδίου ή των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν. (Madigan, et al., 2005)

Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής:

- 1) Στάδιο Αποδιάταξης (denaturation step):** Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93–95°C) ώστε να αποδιαταχθεί το DNA
- 2) Θερμοκρασία υβριδισμού (annealing step):** προκειμένου οι εκκινητές να υβριδίσουν με το DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητά του σε G και C. Ένας τρόπος υπολογισμού της θερμοκρασίας του εκκινητή είναι μέσω του τύπου  $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$ . Η θερμοκρασία του υβριδισμού είναι τελικά 5°C κάτω από τον μέσο όρο των τιμών  $T_m$  των δύο εκκινητών της αντίδρασης.
- 3) Θερμοκρασία επιμήκυνσης (extension step) :** σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, με τη δράση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω επαναλαμβάνεται για 25–30 κύκλους συνήθως. Κατά τη διάρκεια των κύκλων η παραγωγή των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό, εφόσον βέβαια δεν παρουσιαστούν περιοριστικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα έλλειψη νουκλεοτιδίων.

## PCR για έλεγχο ύπαρξης DNA

Πραγματοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στο ολικό RNA που απομονώθηκε για να διαπιστωθεί τυχόν ύπαρξη DNA. Για αυτό το σκοπό θα ενισχυθεί το γονίδιο της ουμπικουΐτινης το οποίο εκφράζεται σε όλους τους φυτικούς ιστούς.

Σε σωλήνα errendorf προστίθενται τα παρακάτω σε τελικό όγκο 20μl:

- ✓ 2μl 10X Kara Taq Buffer
- ✓ 0,4μl μίγμα dNTPs
- ✓ 1μl ολικό RNA
- ✓ -0,4μl εκκινητής έμπροσθεν
- ✓ 0,4μl εκκινητής ανάστροφος
- ✓ 0,08μl DNA πολυμεράση kara Taq (1Unit/μl)
- ✓ 15,72μl ddH<sub>2</sub>O

Σύμβολο Εκκινητή	Νουκλεοτιδική αλληλουχία εκκινητή
AtUBIrtF	TCCAGCGAAGATGAGACG
AtUBIrtR	CCGACACCATTGACAACG

Το μίγμα αναμιγνύεται με γρήγορη φυγοκέντρηση και τοποθετείται στη συσκευή PCR, προκειμένου να εκτελεστεί το παρακάτω πρόγραμμα:

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	2λεπτά
Αποδιάταξη	95 °C	30 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	56 °C	30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 °C	30 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72 °C	2λεπτά

Επανάληψη για 35 κύκλους

\* Μετά το τέλος της διαδικασίας το προϊόν της PCR αναλύεται σε πηκτική αγαρόζης.

### Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcriptase)

Το RNA των δειγμάτων μας που έχει απομονωθεί μετατρέπεται σε DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας την αντίδραση της cDNA σύνθεσης. Στην διαδικασία αυτή μετέχει η αντίστροφη μεταγραφάση, ένα ένζυμο που μπορεί να συνθέσει DNA με μήτρα το RNA. Κατά την διαδικασία αυτή το ένζυμο συνθέτει μια αλυσίδα DNA συμπληρωματική με το RNA και έτσι δημιουργείται ένα υβρίδιο DNA-RNA. Έπειτα παράγεται και η δεύτερη αλυσίδα DNA. Έτσι το αρχικό RNA παίρνει την μορφή δίκλωνου DNA. Η διαδικασία είναι η εξής:

1. Σε σωλήνα eppendorf προστίθενται 1-2  $\mu\text{g}$  ολικού RNA, 1 $\mu\text{l}$  Oligo dT (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 1 $\mu\text{l}$  μίγμα dNTPs (10mM) και ddH<sub>2</sub>O έως τελικού όγκου 12 $\mu\text{l}$
2. Τα δείγματα αποδιατάσσονται με θέρμανσή τους στους 65<sup>0</sup>C για 5 λεπτά, οπότε και πραγματοποιείται ο υβριδισμός εκκινητή –RNA. Το δείγμα μεταφέρεται αμέσως σε πάγο για να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση
3. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση και προστίθενται 4 $\mu\text{l}$  5x first-strand buffer, 1 $\mu\text{l}$  (40units) RNase OUT παρεμποδιστή ριβονουκλεάσης και 2 $\mu\text{l}$  0.1M DTT
4. Η αντίδραση προθερμαίνεται στους 42<sup>0</sup>C για 2 λεπτά πριν την προσθήκη 1 $\mu\text{l}$  (200 units) SuperScript II αντίστροφης μεταγραφάσης.
5. Το μείγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 42<sup>0</sup>C για 50 λεπτά και ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση στους 70<sup>0</sup>C για 15 λεπτά.

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR)

Το Real Time PCR ή ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) είναι μία μέθοδος, η οποία βασίζεται στην κλασική PCR και χρησιμοποιείται για να ενισχύσει τμήματα DNA, ενώ παράλληλα επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Συγκεκριμένα επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλαπλών τμημάτων DNA σε απόλυτο αριθμό με τη βοήθεια πρότυπων διαφόρων συγκεντρώσεων DNA. Η μέτρηση της ποσότητας

πραγματοποιείται σε ολόκληρη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στην προκειμένη περίπτωση ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR πραγματικού χρόνου, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μία καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που διευκολύνει την παρακολούθηση της αντίδρασης στο σύνολό της.

Η αντίδραση προετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας της συσκευής PCR πραγματικού χρόνου. Όλες οι αντιδράσεις RT PCR πραγματοποιήθηκαν βάση συγκεκριμένου θερμοκρασιακού προγράμματος με τη συσκευή MX3005P της εταιρείας Stratagene

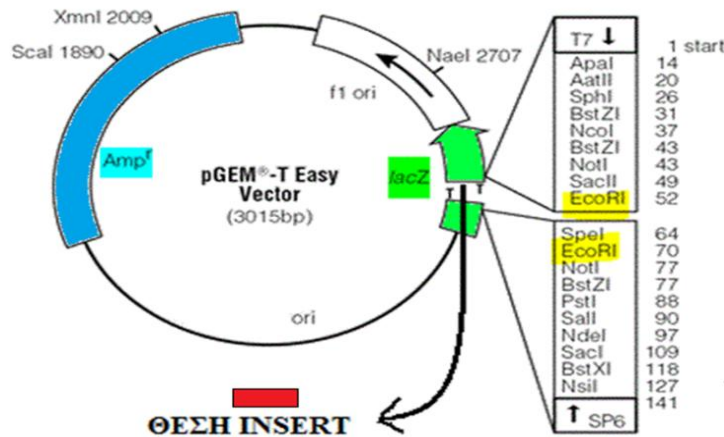


Συσκευή:MX3005P,Stratagene

- Τα cDNA-στόχοι ενισχύθηκαν με εξειδικευμένους εκκινητές που σχεδιάστηκαν στη μεταγραφόμενη περιοχή του γονιδίου με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν κοντά στην περιοχή του 3' άκρου του γονιδίου και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 150 έως 250 ζεύγη βάσεων.
- Η αντίδραση PCR περιλάμβανε το μίγμα της SYBR Green (KAPA SYBR FAST qPCR Kit), τους εξειδικευμένους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0.2μM ο καθένας και 1μl της μήτρας cDNA.
- Το πρόγραμμα του PCR περιλάμβανε 3 λεπτά επώαση στους 95°C και ακολούθησαν 40 κύκλοι με 95°C για 15 δευτερόλεπτα, 58°C για 20 δευτερόλεπτα και 72°C για 11 δευτερόλεπτα.

### Υποκλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα

Ο ένας από τους τρεις φορείς κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα ήταν το πλασμίδιο **pGEM -T Easy Vector**.



- Χαρακτηριστικά Φορέα , που τον κάνουν επιθυμητό για χρήση:

- Έχει μέγεθος περίπου 3,0 kb
- Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση τμημάτων
- Το γονίδιο Amp<sup>r</sup> που του προσδίδει ανθεκτικότητα στην **αμπικιλίνη**
- Οι προαγωγείς που αναγνωρίζονται από τις SP6 και T7 RNA πολυμεράσες βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής υποκλωνοποίησης
- Δίνει την δυνατότητα άμεσης κλωνοποίησης τμημάτων μέσω **TA cloning**, μέσω του **lacZ** γονιδίου που κωδικοποιεί για τα πρώτα 146 αμινοξέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης
- Περιέχει θέση έναρξης της αντιγραφής για το **E.coli**
- 

### Αντίδραση σύνδεσης-Λιγοποίηση (Ligation)

Η διαδικασία αυτή στηρίζεται στην ικανότητα της λιγάσης να καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού, με κατανάλωση ενέργειας. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η T4-λιγάση της Promega που έχει απομονωθεί από ανασυδρασμένο E.coli και συντήρηση στους 4°C. Η λιγοποίηση χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των κατασκευών μας στα επιθυμητά πλασμίδια, μέσω της σύνδεσης πλασμιδίου και ενθέματος που είχαν συνεκτικά άκρα.

Πρωτόκολλο:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
2xRapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5μl
pGEM-T Easy Vector(50ng)- Φορέας	0,5μl
PCR product- Ένθεμα	2 μl
T4 DNA Ligase	1 μl
ddH <sub>2</sub> O	1,5 μl

- \* Η ποσότητα του ενθέματος που προστέθηκε για να γίνει η εισχώρηση ενός ενθέματος στο πλασμίδιο, υπολογίστηκε με την χρήση του παρακάτω τύπου( διατηρώντας πάντα τη βέλτιστη αναλογία ενθέματος / φορέα 3/1):

$$\frac{ng \text{ of vector} * kb \text{ size of insert} * 3/1}{kb \text{ size of vector}} = ng \text{ of insert}$$

Πρωτόκολλο Μετασηματισμού

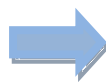
- \* Σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 100μl δεκτικά κύτταρα του στελέχους προσθέτονται 2μl πλασμιδίου DNA, παραμονή στον πάγο για 30min
- \* Υποβολή κυττάρων σε θερμική καταπόνηση (heat shock) στους 42°C για 1-2min
- \* Στον πάγο για 2min, με αυτόν τον τρόπο τα βακτήρια κλείνουν τα κύτταρά τους , ώστε να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου
- \* Προσθήκη 200L υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37°C για 45-50min
- \* Προσθήκη στα κύτταρα 10L 0,1M IPTG και 50L 2% X-Gal(β-γαλακτοσιδάση)



- \* Επίστρωση των κυττάρων με την βοήθεια γυάλινης πιπέτας σε τρυβλία (Hesp Ri1pGEM και Hesp Ri2 pGEM) με θρεπτικό υπόστρωμα LB και αντιβιοτικό στην συγκεκριμένη περίπτωση, την αμπικιλίνη.
- \* Επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 10min από την μια πλευρά για να στερεωθεί ,γύρισμα από την άλλη και επώαση για όλο το βράδυ στους 37°C
- \* Η φύλαξη των τρυβλίων γίνεται στο ψυγείο στους 4°C.
- \* Συμπεράσματα:Οι αποικίες που φέρουν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται μπλε, λόγω της δράσης της β-γαλακτοσιδάσης. Αντίθετα, οι αποικίες που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται λευκές. ( BLUE –WHITE SCREENING)

#### Απομόνωση πλασμιδίου από υγρή καλλιέργεια E.coli με την μέθοδο βρασμού (Boiling prep)

Σε 10 βαζάκια που περιέχει το καθένα 3ml υγρής καλλιέργειας LB, προσθέτουμε 5ml αντιβιοτικό Amp και με την βοήθεια της οδοντογλυφίδας εμβολιάζουμε τα πέντε βαζάκια με αποικία κυττάρων E.coli από το τρυβλίο Hesp Ri1 pGEM και τα άλλα πέντε από το τρυβλίο Hesp Ri2 pGEM. Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται στους 37°C (Run Temp) με συνεχή ανακίνηση για 12 ώρες και μετά το πέρας της ώρας στους 4 °C( Hold Temp).



#### Πρωτόκολλο:

1. Φυγοκέντρηση 2ml της υγρής καλλιέργειας στα 6.000 rpm για 4 min
2. Αδειάζω το υπερκείμενο
3. Προσθήκη 150μl STET Buffer ( βοηθάει να δράσει η λυσοζύμη και σπάει τις πρωτεΐνες)

4. Προσθήκη 1μl λυσοζύμη (δεν πρέπει να μείνει πολύ ώρα)
5. Ανακίνηση με σύρσιμο στο στατό
6. Τοποθέτηση δειγμάτων για 1min σε νερό που βράζει (αδρανοποιεί την λυσοζύμη)
7. Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 20min
8. Απομάκρυνση ιζήματος με οδοντογλυφίδα
9. Προσθήκη 180μl ισοπροπανόλης (καθιζάνει το πλασμίδιο)
10. Ανακίνηση με αναποδογύρισμα των erpendorffs
11. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 7min
12. Απόρριψη υπερκείμενου
13. Προσθήκη 300μl EtOH 70%
14. Ανακίνηση με σύρσιμο στο στατό
15. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 5min
16. Απόρριψη υπερκείμενου
17. Αφήνονται τα erpendorffs με ανοιχτά καπάκια για 15min για να εξατμιστεί εντελώς η αιθανόλη
18. Επαναδιάλυση σε 20μl ddH<sub>2</sub>O
19. Αποθήκευση DNA στους -20°C

#### Απομόνωση πλασμιδιακού DNA -Miniprep (Macherey nagel-nucleospin plasmid)

1. Μετά από φυγοκέντρηση 7,5ml υγρής καλλιέργειας, τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 250μl ρυθμιστικό διάλυμα A1 που περιέχει Rnase A.
2. Προστίθενται 250μl ρυθμιστικό διάλυμα A2 και γίνεται ελαφρά ανακίνηση του φυγοκεντρικού σωλήνα (erpendorf).
3. Προστίθενται επιπλέον 350μl ρυθμιστικό διάλυμα A3 και αμέσως αναποδογυρίζεται το erpendorf 4-6 φορές. Το εναιώρημα θολώνει.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένα λευκό ίζημα. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται με πιπέτα σε στήλη.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60sec και απορρίπτεται το υγρό που έχει διέλθει από το φίλτρο.
6. Η στήλη ξεπλένεται με 0,75ml ρυθμιστικό διάλυμα A4 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60sec.

7. Το διερχόμενο από το φίλτρο υγρό απορρίπτεται και επαναφυγοκεντρείται για 1 λεπτό μέχρι να απαλειφθεί το υπολειπόμενο διάλυμα ξεπλύματος. Εάν παραμείνει αιθανόλη από το διάλυμα A4 ίσως παρεμποδιστούν περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
8. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό φυγοκεντρικό σωλήνα 1,5ml.
9. Προκειμένου να ληφθεί το DNA, προστίθεται διάλυμα 50μl AE (10mM Tris - HCl, pH=8,5) ή νερό.
10. Το διάλυμα έκλυσης αφήνεται για 1 λεπτό και, τέλος, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό, οπότε και λαμβάνεται το καθαρό πλασμιδιακό DNA.

### Πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Στην παρούσα εργασία, οι πέψεις με ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιήθηκαν:

- (α) για την δημιουργία συνεκτικών άκρων μεταξύ ενθέματος και φορέα,
- (β) για διαγνωστικό σκοπό, ώστε να βρεθεί ο επιθυμητός κλώνος. (Στην τελευταία περίπτωση, πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες πέψεις από πλασμίδιο που απομονώθηκε με την μέθοδο του βρασμού.)

Ένζυμο περιορισμού	Αλληλουχία αναγνώρισης
EcoRI	G/AATTC
HindIII	A/AGCTT
XhoI	C/TCGAG
XbaI	T/CTAGA
SacI	GAGGCT/C
PstI	CTGCA/G

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και αλληλουχίες που αναγνωρίζουν. Με τις καθέτους φαίνεται η θέση περιορισμού

Στη συνέχεια παρουσιάζεται μια ενδεικτική πέψη που πραγματοποιήθηκε κατά το πείραμα. Πραγματοποιήσαμε πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pGEM-T Easy που περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την AtHESP, με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI. Αυτό το ένζυμο κόβει το πλασμίδιο αριστερά και δεξιά της περιοχής ένθεσης.

Τελικός όγκος 20μl και υλικά αντίδρασης:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Ένζυμο Περιορισμού (EcoRI)	1 μl
pGEM T-Easy DNA	2 μl
Buffer (10x)	2 μl
DddH <sub>2</sub> O	15 μl

- \* Δημιουργήθηκε master mix λόγω των πολλών δειγμάτων 5 για το Ri1 και 5 αντίστοιχα για το Ri2.

Τέλος ,επώαση δείγματος για 15 λεπτά στους 37°C.

#### Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%

Στο πήκτωμα αгарόζης που έχουμε φτιάξει φορτώνουμε τα δείγματά μας , αφού πρώτα έχουμε προσθέσει στο καθένα 0,5μl Rnase, ώστε να διασπαστεί το υπάρχον RNA και 2,2μl Loading Buffer.Στο πρώτο κενό-πηγαδάκι του gel μας προσθέτουμε 3μl DNA Ladder και στα υπόλοιπα προσθέτουμε τα 5 δείγματα Ri1 και Ri2 αντίστοιχα. Η συσκευή ρυθμίστηκε στα 80Vκαι μετά από περίπου 1h παρουσιάστηκε το αποτέλεσμα αφού μεταφέρθηκε το πήκτωμα στην ειδική τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Εκεί παρατηρήσαμε το πλασμιδίό μας (~ 300α.β.) και το insert μας(350α.β.).

#### Απομόνωση τμήματος DNA από πήκτωμα αгарόζης- NucleoSpin Extract II

Με βάση το πρωτόκολλο της Macherey-Nagel ακολουθήσαμε τα εξής βήματα:

1. Τοποθέτηση πηκτώματος αгарόζης σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας και με την βοήθεια νυστεριού προσεκτική αφαίρεση των τμημάτων που φέρουν τις επιθυμητές ζώνες ( επιλέγω ένα δείγμα από το Ri1 και ένα από Ri2)
2. Τοποθέτηση τμημάτων σε tubes(σωληνάκια) και ζύγισμα με ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας

3. Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος NTI σε αναλογία 2:1 (για κάθε 100 mg πηκτώματος προσθήκη 200  $\mu$ l Buffer NTI)
  - Επώαση σε υδατόλουτρο στους 50°C για 10min
  - Ανάδευση ανά 2-3min μέχρι να διαλυθεί πλήρως το πήκτωμα
4. Τοποθέτηση δειγμάτων σε στήλες διαχωρισμού NucleoSpin Extract II
  - Φυγοκέντρηση για 1min στους 11.000rpm και απομάκρυνση υπερκείμενου
5. Προσθήκη 600 $\mu$ l Buffer NT3(περιέχει αιθανόλη για να πραγματοποιηθεί το πλύσιμο της μεμβράνης),φυγοκέντρηση για 1min στους 11.000rpm και απομάκρυνση υπερκείμενου
6. Φυγοκέντρηση για 2min στους 11.000rpm ώστε να απομακρυνθεί εντελώς το NT3
7. Τοποθέτηση δειγμάτων σε 1.5 ml microcentrifuge tube
  - Προσθήκη 15-50 $\mu$ l Buffer NE ,επώαση για 1min σε θερμοκρασία δωματίου
  - Φυγοκέντρηση για 1min στους 11.000rpm
8. Αποθήκευση δείγματος στους -20°C.

#### Πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού

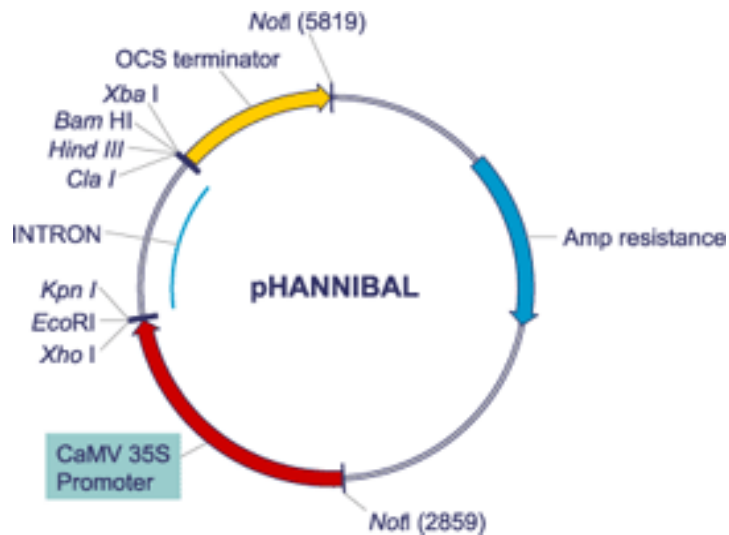
Ακολούθησε η πέψη του γονιδίου που κωδικοποιεί την AtHESP, το οποίο βγάλαμε από τον πλασμιδιακό φορέα pGEM -T Easy.

Τελικός όγκος αντίδρασης 30 $\mu$ l και περιλαμβάνει τα εξής:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Buffer(10x)	3 $\mu$ l
BSA	0,3 $\mu$ l
Hind III	1 $\mu$ l
XbaI	1 $\mu$ l
DNA πλασμιδίου	5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	19,7 $\mu$ l

- \* Επώαση δειγμάτων (Insert 1 για το Ri1 και Insert2 για το Ri2) για 1ώρα στους 37°C, ώστε να δράσουν τα ένζυμα.

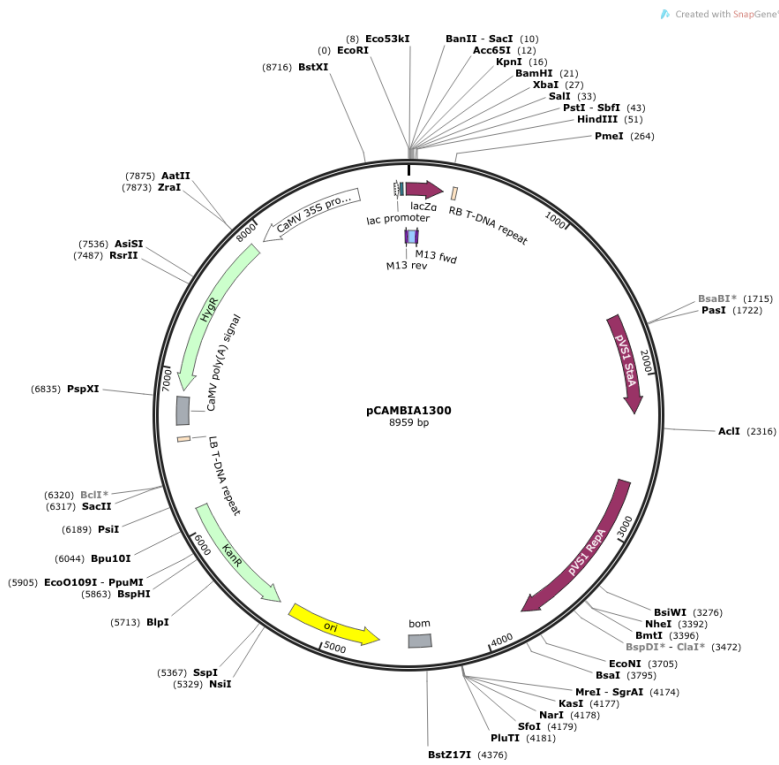
Στη συνέχεια ο δεύτερος φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pHANNIBAL:



- Χαρακτηριστικά Φορέα, που τον κάνουν επιθυμητό για χρήση:

- Αποτελεί έναν από τους κύριους φορείς που χρησιμοποιούνται για την γονιδιακή αποσιώπηση, καθώς δίνει την δυνατότητα δημιουργίας της φουρκέτας.
- Περιέχει ιντρόνιο από την κινάση της αποκαρβοξυλάσης του πυροσταφυλικού (Pdk), μεγέθους 880bp, εκατέρωθεν του οποίου υπάρχουν θέσεις περιορισμού που δίνουν την δυνατότητα ενσωμάτωσης της ίδιας αλληλουχίας δύο φορές με αντίθετη φορά
- Προηγείται ο ισχυρός φυτικός προαγωγέας CaMV 35S (του ιού του μωσαϊκού του καπνού) και στο τέλος της δεύτερης θέσης κλωνοποίησης υπάρχει αλληλουχία για τον τερματισμό της μεταγραφής(OCS terminator).
- Διαθέτει θέσεις περιορισμού δεξιά και αριστερά αυτής της κατασκευής, προκειμένου να μπορεί να αφαιρεθεί και να μπορεί να ενσωματωθεί σε τελικό φορέα.
- Προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και έχει μέγεθος 5.824bp.

Ο τελευταίος φορέας είναι ο pCambia1300:



- Χαρακτηριστικά Φορέα, που τον κάνουν επιθυμητό για χρήση:

- Αποτελεί δυαδικό φορέα για την μεταφορά και ενσωμάτωση τμημάτων στο φυτικό γένωμα με την βοήθεια βακτηρίων του γένους *Agrobacterium*.
- Έχει μέγεθος 8.958 bp και προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη για την επιλογή τόσο στα *E.coli*, όσο και στα *Agrobacterium*.
- Περιέχει αρχές έναρξης της αντιγραφής για την διατήρηση και αντιγραφή του πλασμιδίου και στις δύο οικογένειες βακτηρίων.
- Έχει δεξί και αριστερό συννοριακό άκρο (RB & LB), προκειμένου να γίνει η τομή και η ενσωμάτωση του ενδιαμέσου τμήματος από ένζυμα του *A.tumefaciens* στο φυτικό γένωμα.
- Στο ενδιαμέσο τμήμα υπάρχει γονίδιο που κωδικοποιεί για ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη, προκειμένου να γίνεται η επιλογή των μετασηματισμένων φυτών. Το γονίδιο της υγρομυκίνης βρίσκεται κάτω από την επίδραση του CaMV
- Τέλος υπάρχει σήμα για πολύ-αδενυλίωση, προκειμένου να εκφραστεί η πρωτεΐνη στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το MCS (Multiple Cloning Site), για την ένθεση της κατασκευής περιέχεται εντός της α- υπομονάδας του

γονιδίου lacZ. Το τελευταίο εκφράζεται κάτω από την επίδραση του προαγωγέα του ,Plac, και μπορεί να ανακτήσει την λειτουργικότητα της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από το γένωμα του E.coli. Αν ενσωματωθεί αλληλουχία στο MCS, διακόπτεται το lacZ, με συνέπεια να μην μπορεί να μεταβολιστεί το χημικό ανάλογο της λακτόζης, X-Gal. Παρατηρούμε, έτσι, άσπρες αποικίες, σε αντίθεση με τις μπλε όπου το X-Gal μεταβολίζεται.

- Αποτελεί έναν βελτιωμένο δυαδικό φορέα, καθώς έχει την θέση ένθεσης του goi κοντά στο 5' άκρο (RB) και το γονίδιο επιλογής στο 3' άκρο (LB)

### 3.Αποτελέσματα-Συζήτηση

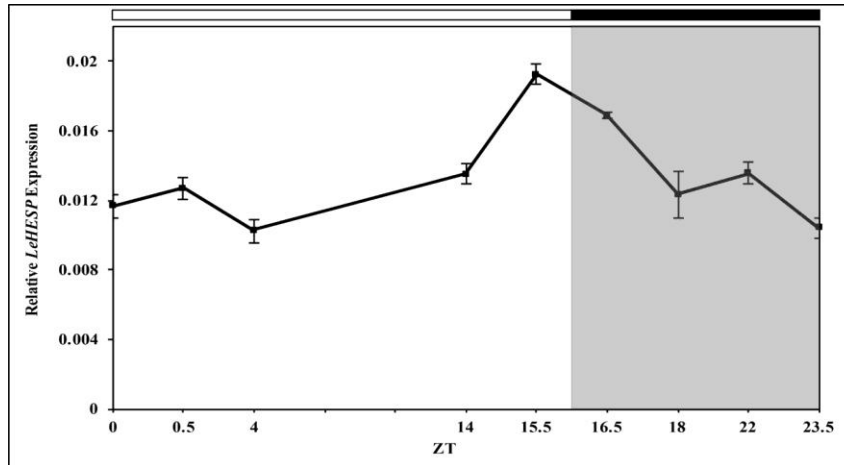
#### 1.Ταυτοποίηση της *AtHESP*

Για τη μελέτη του γονιδιώματος της *Solanum lycopersicum L.* και την ταυτοποίηση γονιδίων αποαδενυλάσης χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος BLAST της βάσης δεδομένων Sol Genomics (<https://solgenomics.net/>). Με αφορμή το γονίδιο *ATIG31500* (*AtHESP*), το οποίο σε άλλη έρευνα μελετήθηκε και βρέθηκε στο *A.thaliana*, κωδικοποιεί μια λειτουργική αποαδενυλάση, η οποία σχετίζεται με το κερκάρδιο ρολόι. Βασιζόμενοι στην έρευνα αυτή (Delis, et al., 2015) στηριχθήκαμε για να βρούμε πως εκφράζεται το ίδιο γονίδιο στην τομάτα. Μέσω της αναζήτησής μας *in silico* για αποαδενυλάση στη τομάτα, αναγνωρίσαμε και κλωνοποιήσαμε έναν πλήρη κλώνο cDNA που ανταποκρίνεται σε ένα πιθανό ομόλογο αποαδενυλάσης. Το αντίστοιχο γονίδιο της τομάτας που απομονώσαμε είναι το *Solyc08g75010*.

#### 2.Έκφραση Γονιδίου και Κερκάρδιος Ρυθμός

Αρχικά, για να διαπιστώσουμε αν πράγματι η έκφραση του γονιδίου επηρεάζεται από τον κερκάρδιο ρυθμό, μελετήσαμε την έκφρασή του σε φυτά που μεγάλωναν σε φωτοπερίοδο 16/8 (16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι) για 7 ημέρες. Οκτώ δείγματα πάρθηκαν στην διάρκεια ενός 24ώρου (2 ώρες πριν το σκοτάδι, 30 λεπτά πριν το σκοτάδι, 30λεπτά μετά το σκοτάδι, 2ώρες μετά το σκοτάδι, 6 ώρες μετά το σκοτάδι, 30 λεπτά πριν το φως, 30λεπτά μετά τα φώς και 4 ώρες μετά το φώς).





Με βάση την παραπάνω γραφική παράσταση παρατηρείται, ότι η έκφραση της *hesp* είναι σχετικά χαμηλή τις πρωινές ώρες ενώ επάγεται το μεσημέρι και το βράδυ. Η υπερέκφραση του γονιδίου παρατηρείται μισή ώρα πριν το σκοτάδι. Έτσι, αποδεικνύεται ότι το γονίδιο επηρεάζεται άμεσα από την εναλλαγή μέρας με νύχτας οπότε πιθανότατα η έκφρασή του είναι υπό την επίδραση του κερκάδιου ρυθμού.

## 2. Μελέτη έκφρασης γονιδίου *Solyc08g75010* με τη μέθοδο Real time PCR

Μετά τη σύνθεση του cDNA από τα δείγματά μας ακολούθησε μελέτη της έκφρασης του γονιδίου σε αυτά. Για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *HESP* επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου. Η μέθοδος της PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί σήμερα μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό DNA και RNA. Πρόκειται για μια πολύ ευαίσθητη τεχνική στην οποία ο πραγματικός χρόνος χρησιμοποιείται για να καθορίσει την έκφραση mRNA ενός γονιδίου καθώς και τα επίπεδα έκφρασης του που πολλαπλασιάζονται.

Το PCR γίνεται για τον έλεγχο της κανονικοποίησης της συγκέντρωσης του κυτταρικού γονιδιώματος. Η διαδικασία περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι και οι εκκινητές του γονιδίου *hesp* σχεδιάστηκαν με την χρήση του λογισμικού Beacon designer v7.01. Επίσης πραγματοποιήθηκε στη συσκευή MX 3005P system (Stratagene), χρησιμοποιώντας την KAPASYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems) και η χρήση των γονιδιακών εκκινητών έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

**Σύμβολο Εκκινητή**

**Νουκλεοτιδική αλληλουχία  
εκκινητή**

**Primer Forward**

GCTCGTTCACAGGCAATCC

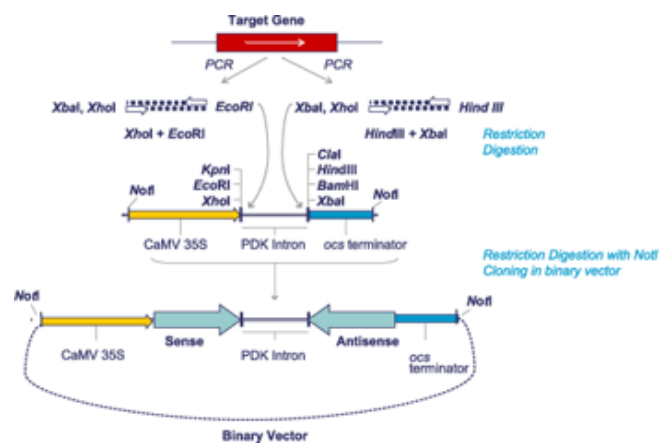
**Primer Reverse**

CGCCATCCAATCACGCCTC

## 2. Κατασκευή του φορέα-φουρκέτα

Με βάση τα Υλικά και Μέθοδοι που περιγράφηκαν παραπάνω ο pGEM και ο pHANNIBAL κόπηκαν με τα ίδια ένζυμα περιορισμού. Το τμήμα αυτό που προέκυψε από την πέψη του pGEM, από εδώ και στο εξής θα ονομάζεται ένθεμα, και μάλιστα θα γίνει διάκριση μεταξύ νοηματικού (Sense) και αντι-νοηματικού (Anti-Sense) ενθέματος, ανάλογα με την φορά που θα εισέλθει στον πλασμιδιακό φορέα pHannibal. Η διάκριση αυτή μπορεί να γίνεται αυθαίρετα, όμως έχει πρακτική σημασία. Θεωρούμε, ότι το ένθεμα που εισέρχεται παραπλεύρως του προαγωγέα 35S του pHannibal είναι το Sense, ενώ αυτό που εισέρχεται παραπλεύρως της ληκτικής ακολουθίας OCS είναι το Antisense.

Ο πλασμιδιακός φορέας pHannibal (βλ. Υλικά και μέθοδοι) δίνει την δυνατότητα να κλωνοποιηθεί το ίδιο τμήμα δύο φορές με αντίθετη κατεύθυνση στα άκρα ενός ιντρονίου. Η κατασκευή αυτή, αφού μεταγραφεί, θα δώσει δίκλωνο RNA που θα είναι ικανό να ενεργοποιήσει τον RNAi μηχανισμό. Το ιντρόνιο που θα παρεμβάλλεται μεταξύ των συμπληρωματικών περιοχών RNA σχηματίζει την θηλιά μεταξύ τους.



### a) Κλωνοποίηση του Αντι-νοηματικού ενθέματος

Γίνεται αντιληπτό ότι στο τελικό προϊόν υπάρχουν θέσεις αναγνώρισης από δύο ένζυμα περιορισμού σε κάθε άκρο. Με βάση τις θέσεις για ένθεση που προσφέρει ο pHannibal στα δύο άκρα του ιντρονίου και τις θέσεις που έχουν ενσωματωθεί στο ένθεμα (EcoRI, HindIII στο ένα άκρο και XbaI, XhoI στο άλλο άκρο), προκύπτει ότι υπάρχει συγκεκριμένος συνδυασμός πέψεων. Συνεπώς, πέψη με EcoRI & XhoI δίνει την δυνατότητα να ενσωματωθεί το νοηματικό ένθεμα, ενώ πέψη με HindIII & XbaI δίνει την δυνατότητα να ενσωματωθεί το αντι-νοηματικό. Εξαιτίας, όμως, των διπλών θέσεων αναγνώρισης σε κάθε

άκρο προσφέρεται η δυνατότητα οι δύο κλωνοποιήσεις να γίνουν με αντίθετη φορά. Το άκρο, λοιπόν, που περιέχει τις θέσεις περιορισμού για EcoRI και HindIII, όταν κοπεί με το κάθε ένζυμο χωριστά και εισέλθει στον pHannibal, λόγω δομής του τελευταίου, θα εισέλθει με αντίθετη κατεύθυνση.

Προσοχή χρειάζεται στη χρονική σειρά της κλωνοποίησης, καθώς μετά την πέψη και κλωνοποίηση του αντι-νοηματικού ενθέματος, οι θέσεις του νοηματικού ενθέματος(εξωτερικές) έχουν χαθεί. Συγκεκριμένα, πρέπει να προηγηθεί η κλωνοποίηση του αντι-νοηματικού ενθέματος. Αυτό γίνεται γιατί οι θέσεις ένθεσης (XbaI,HindIII) είναι εσωτερικές των θέσεων για εισχώρηση του νοηματικού(EcoRI ,XhoI) στο τελικό προϊόν. Έτσι, για την κλωνοποίηση του αντι-νοηματικού ενθέματος έγινε πέψη με XbaI και HindIII του προϊόντος PCR, που περιέχει το ένθεμα. Με τα ίδια ένζυμα που προετοιμάστηκε και ο πλασμιδιακός φορέας pHannibal.

Ακολούθησαν: 1.Η αντίδραση της λιγοποίησης (Ligation), 2.ο μετασχηματισμός του πλασμιδίου με δεκτικά κύτταρα και 3.η απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το pHAhespAnt απομονώθηκε και ακολούθησε Πέψη με XbaI/HindIII και με HindIII/EcoRI για να επιβεβαιωθεί ότι το πλασμίδιο pHAhespAnt έχει ακέραιες θέσεις

#### **b) Κλωνοποίηση του νοηματικού ενθέματος**

Προκειμένου να ολοκληρωθεί ο φορέας-φουρκέτα, σειρά είχε η κλωνοποίηση του νοηματικού ενθέματος στον pHannibal που ήδη περιέχει το αντί- νοηματικό ένθεμα. Η διαδικασία ήταν ακριβώς η ίδια με την διαφορά ότι εδώ ως ενδονουκλεάσες χρησιμοποιήθηκαν οι EcoRI και XhoI και είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία της pHAhesp Sense κατασκευής.

(Για να επιβεβαιωθεί η ακεραιότητα της κατασκευής πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις)

Με τον τρόπο αυτό ολοκληρώθηκε η δημιουργία της επιθυμητής κατασκευής, δηλαδή να είναι το ένθεμα δύο φορές κλωνοποιημένο με αντίθετη φορά στα άκρα του ιντρονίου του φορέα pHannibal. Το επόμενο στάδιο ήταν να κλωνοποιηθεί το τμήμα του pHannibal που απαιτείται για την αποσιώπηση στον τελικό φορέα, pCambia 1300. Το τμήμα του pHannibal περιλαμβάνει πέρα από τα ενθέματα και το ιντρόνιο, τον ισχυρό εκκινητή και την αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής OCS.

Ο λόγος για τον οποίο πρέπει να χρησιμοποιηθεί και τρίτος φορέας για να γίνει η ενσωμάτωση της κασέτας στο φυτικό γένωμα, είναι ότι το *A.tumefaciens* αναγνωρίζει, τέμνει και μεταφέρει μία αλληλουχία μέσα στο φυτικό γένωμα μόνον όταν περιβάλλεται από το δεξί και αριστερό συνοριακό άκρο (RB&LB) και ο φορέας pCambia1300 διαθέτει το χαρακτηριστικό αυτό.

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν:

Σύμβολο Εκκινητή	Νουκλεοτιδική αλληλουχία εκκινητή
<b>Sense Primer (RNAiHesp2)</b>	GGACTCGAGTCTAGACACCTGCACCTCTGTCACC
<b>Anti-sense Primer (RNAiHesp2)</b>	GGAGAATTCAAGCTTCGCATCCATCACGCTTCTG
<b>Sense Primer (RNAiHesp3-2)</b>	AGGACTCGAGTCTAGACACGCTTAGCTCAATCAAGTTAC
<b>Anti-sense Primer (RNAiHesp3-2)</b>	AGGAGAATTCAAGCTTTGAAGTGTGGTTCTCCTCTGG

- \* Οι εκκινητές RNAiHesp3-2 δεν λειτούργησαν οπότε στο πείραμα δουλέψαμε μόνο με τους RNAiHesp2
- \* Λειτούργησε μόνο το hesp Ri2

#### Υποκλωνοποίηση του φορέα-φουρκέτα στον τελικό φορέα

Αρχικά έγινε πέψη με SacI & PstI της pHANhesp Sense αλλά και του φορέα pCambia1300. Η κασέτα pHANhespSense ανακτήθηκε από την πηκτή αγαρόζης και συνδέθηκε με τον pCambia1300κομμένο με τα ίδια ένζυμα περιορισμού Οι μετασηματισμένοι κλώνοι ελέγχθηκαν με διαγνωστικές πέψεις με SacI/HindIII Με την διπλή αυτή πέψη, αναμένεται από πλασμίδιο pCamHesp στο οποίο να έχει κλωνοποιηθεί η κασέτα να προκόψουν τα εξής τμήματα:

- Προκύπτει ο pCambia1300
- Η περιοχή μεταξύ θέσης κλωνοποίησης SacI και νοηματικού ενθέματος, συμπεριλαμβανομένου και αυτού, καθώς διατηρείται η θέση αναγνώρισης HindIII
- Η περιοχή μεταξύ αντί-νοηματικού ενθέματος, συμπεριλαμβανομένου και αυτού και του MCS
- Τέλος προκύπτει και το ιντρόνιο.

### 3.Μετασηματισμός *A.tumefaciens* με τον pCambia1300 που φέρει την κασέτα αποσιώπησης

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως τρόπος δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών στη τομάτα η απευθείας συγκαλλιέργεια εκφύτων με διάλυμα Αγροβακτηρίου και συγκεκριμένα φορέας του DNA ,το *Agrobacterium tumefaciens*. Συνεπώς, ο επόμενος στόχος ήταν να μετασηματιστεί κατάλληλο στέλεχος *A.tumefaciens* (*AgroCV3101*) με τον pCambia1300HespRi2, τον πλασμιδιακό φορέα που φέρει την κατασκευή για την αποσιώπηση του γονιδίου της συνθάσης της εσπερίνης. Η μέθοδος αυτή θεωρείται η πιο κοινή και αποτελεσματική για την μεταφορά γονιδίων στη τομάτα (Orozco-Cardenas, et al., n.d.).

Ο μετασηματισμός πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο (Orozco-Cardenas, et al., n.d.) χωρίς όμως να ολοκληρωθεί ποτέ , εξαιτίας προβλημάτων που προέκυψαν κατά την ιστοκαλλιέργεια, στο στάδιο των κάλλων. Συνεπώς , θα γίνει μια πολύ μικρή αναφορά στο κομμάτι αυτό, του πειράματος.

#### Πρωτόκολλο:

1.Προετοιμασία Σπόρων: Αποστείρωση σπόρων (κατσαρή Σαντορίνης) με την βοήθεια χλωρίνης (10%) και Tween-20 και τοποθέτηση magenta boxes σε ειδικό θάλαμο(7-10days).

#### 2.Προετοιμασία *Agrobacterium* Culture:

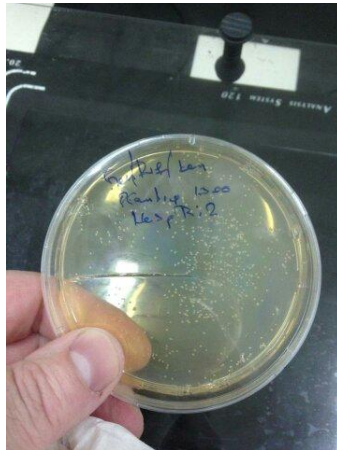
- Αρχικά έχουμε το Αγροβακτήριό μας μέσα στο οποίο βρίσκεται το γονίδιο που μας ενδιαφέρει (-80°C)
- Κάνουμε streak το αγροβακτήριο μας σε υπόστρωμα LB. Τα κύτταρα απλώθηκαν σε τρυβλία και πραγματοποιήθηκε **τριπλή επιλογή** με ριφαμπικίνη (25μg/ml), gentamycin (10μg/ml), καναμυκίνη(50 μg/ml), (2days/28°C)
- Υγρή καλλιέργεια σε LB ομοίως με το προηγούμενο
- Στη συνέχεια σε Falcon tube βάζουμε κάποια ποσότητα από την καλλιέργεια βακτηρίου+AIM(10min φυγοκέντρηση ,κρατάμε μόνο το βακτήριο)
- Στον falcon που είναι το βακτήριο μας προσθέτουμε AIM και acetosyringone

3.Κόψιμο Κοτυληδόνων: Μόλις έχουν αποκτήσει σκούρο πράσινο χρώμα τις κόβουμε στην μέση και τις βάζουμε σε τρυβλία με υπόστρωμα CCM και διηθητικό χαρτί (Whatman filter paper ) για 2 μέρες στ θάλαμο

4.Βάζουμε στο falcon με το Αγροβακτήριο ,AIM ,την acetosyringone και τις κοτύλες για 20 λεπτά μέσα στο shaker

5.Βάζουμε τις κοτύλες σε διηθητικό χαρτί και στην συνέχεια σε τρυβλία CCM:(στον θάλαμο για 2 μέρες)

6.Επιλογή διαγονιδιακών κάλλων και επαγωγή βλαστών: Παίρνουμε τις κοτύλες και τις βάζουμε σε καινούργιο υπόστρωμα που περιέχει θρεπτικά στοιχεία, αντιβιοτικά και ζεατίνη (αλλαγή 2φορές την βδομάδα όχι διηθητικό χαρτί)



Μετασηματισμός πλασμιδίου pCambia με *A.tumefaciens* ( Blue - White Screening)

### Συμπεράσματα:

- Το γονίδιο *Solyc08g75010*, είναι ομόλογο του γονιδίου *AT1G31500* που μελετήθηκε στο *A.thaliana* και αποτελεί το δεύτερο γονίδιο που βρέθηκε.
- Φαίνεται να επηρεάζεται από το κερκαδικό ρολόι ,συνεπώς να εκφράζεται κερκάδια.
- Τέλος, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να φέρει παρόμοια φυσιολογία με το γονίδιο της *hesp* του *A.thaliana*.

## Βιβλιογραφία

- Baggs, J. E. & Green, C. B., 2003. Nocturnin, a Deadenylase in *Xenopus laevis*: A Mechanism for Posttranscriptional Control of Circadian-Related mRNA. *Current Biology*, 4 Φεβρουάριος, Issue 13, pp. 189-198.
- Balatsos, N. A. A. και συν., 2006. *Inhibition of mRNA Deadenylation by the Nuclear Cap Binding Complex (CBC)*. 281 επιμ. σ.λ.: The Journal of Biological Chemistry.
- Delis, C. και συν., 2015. AtHESPERIN: a novel regulator of circadian rhythms with poly(A)-degrading activity in plants. *RNA Biology*, 30 Νοέμβριος, pp. 68-82.
- Gardner, M. J. και συν., 2006. How plants tell the time. *Biochemical Journal*, 1 Ιούλιος, Issue 397, pp. 15-24.
- Goldstrohm, A. C. & Wickens, M., 2008. *Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control*. σ.λ.: Nature Reviews MOLECULAR CELL BIOLOGY.
- Harmer, S. L., 2009. *The Circadian System*, California: Annu Rev Plant Biol..
- Harmer, S. L., Panda, S. & Kay, S. A., 2001. *Molecular Bases of Circadian Rhythms*. σ.λ.: Annual Review of Cell and Developmental Biology.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J., 2005. *ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ*. σ.λ.: ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ.
- Más, P., 2005. *Circadian clock signaling in Arabidopsis thaliana: from gene expression to physiology and development*, ΙΣΠΑΝΙΑ: s.n.
- McClung, C., 2009. Plant Circadian Rhythms. *The Plant Cell*.
- Moraes, K. C., Wilusz, C. J. & Wilusz, J., 2006. *CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase*. σ.λ.: The RNA Society.
- Orozco-Cardenas, M. L., Garcia, D. & Narvaez-Vasquez, J., n.d. *Tomato ( Solanum lycopersicum)*. California: Plant Transformation Research Center.
- Ιμπραχίμ-Αβραάμ, Χ. & Πετρόπουλος, Σ., 2014. *Γενική Λαχανοκομία & Υπαίθρια Καλλιέργεια Λαχανικών*. Βόλος: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
- Καλαντίδης, Κ. και συν., 2009. *ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ*. Αιγάλεω: ΕΜΒΡΥΟ.
- ΚΟΜΝΑΚΟΥ, Ι., 1988. *Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΣΤΟ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟ*. ΠΑΤΡΑ: Π.ΚΟΥΛΗ-ΗΦΑΙΣΤΟΥ 11.
- ΟΛΥΜΠΙΟΥ, Χ. Μ., 2001. *Η ΤΕΧΝΙΚΗ της ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ των ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ στα ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑ*. ΑΘΗΝΑ: ΑΘ.ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ.

