

Agrobacterium tumefaciens

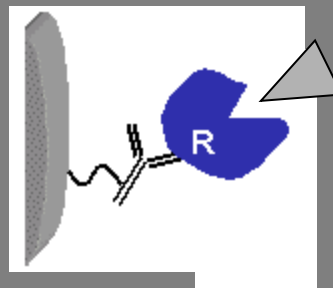
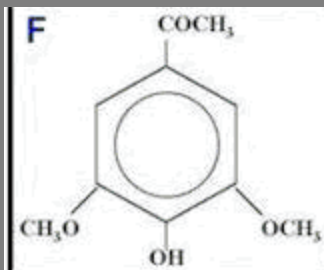
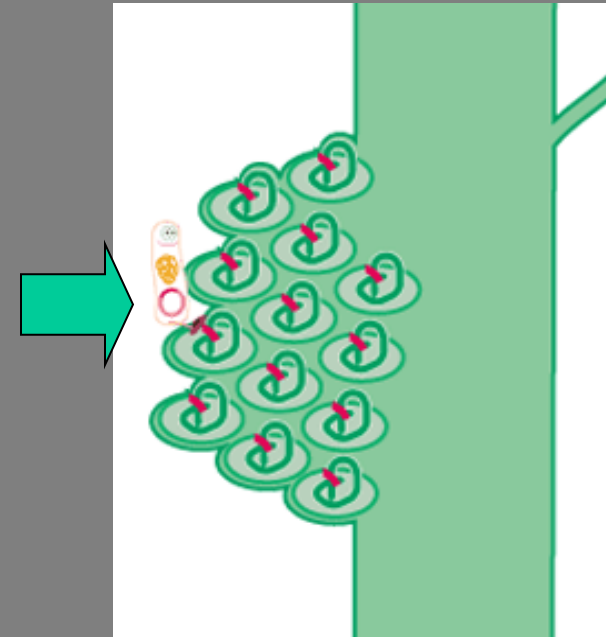
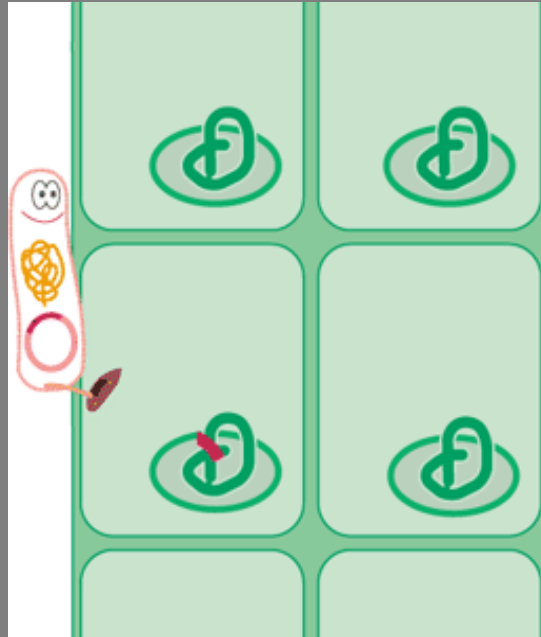
- Gram-αρνητικό βακτήριο της ριζόσφαιρας
- παθογόνο: υπεύθυνο για την ασθένεια του 'κορωνοτού κάλλου', η οποία εξαρτάται από την παρουσία του Ti (tumour-inducing) πλασμιδίου στο *A. tumefaciens*,



<http://www.sciencemag.org/plantgenomes/feature.html>

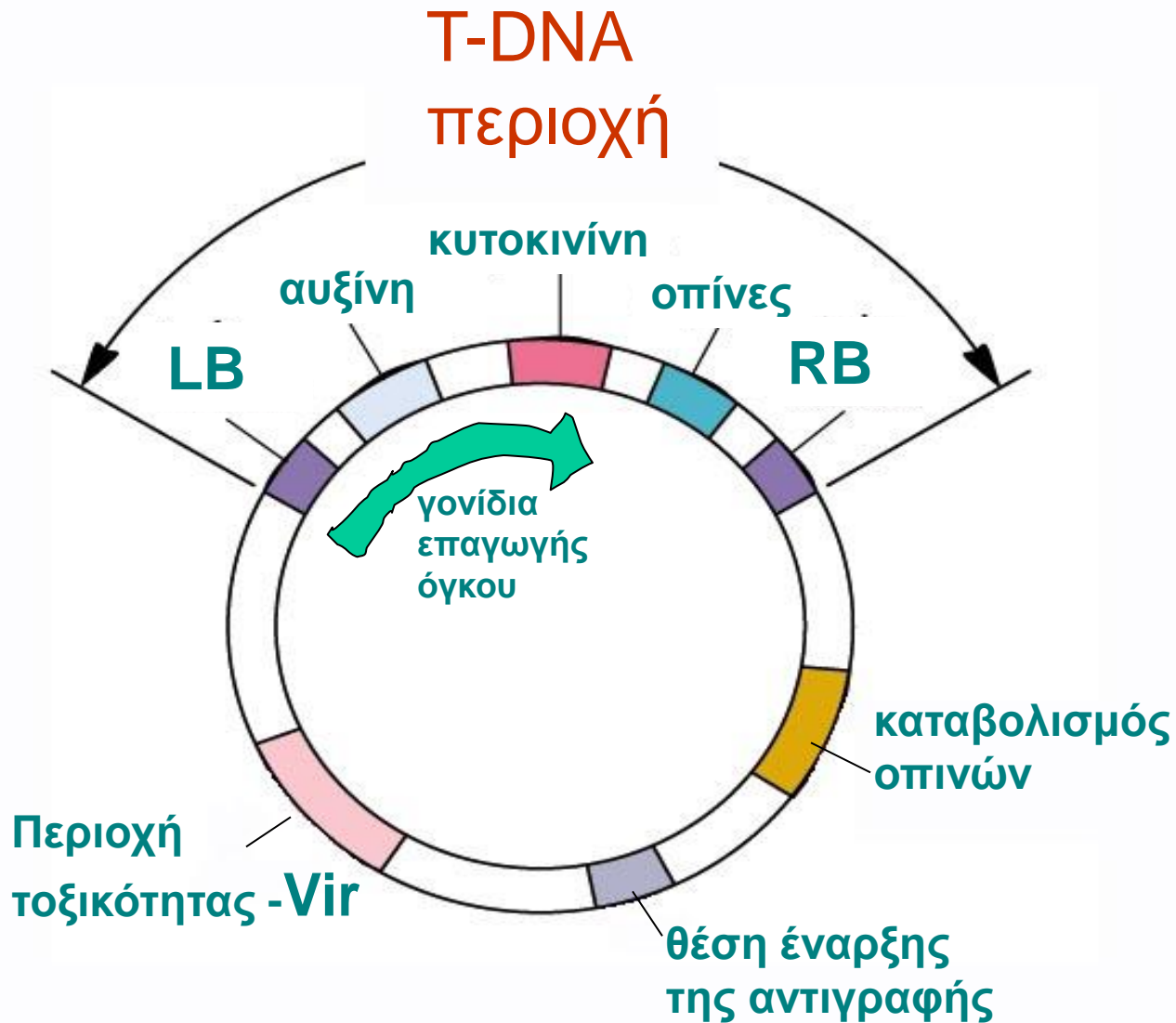
Η βιολογία του *A. tumefaciens*

- Το *A. tumefaciens* τρέφεται με εκκρινόμενες ουσίες της ρίζας του φυτού
- μολύνει μέσω τραυματισμένων ιστών του φυτού:
το φυτό παράγει στις θέσεις τραυματισμού ενώσεις (μόρια-σινιάλα), όπως η ακετοσυριγγόνη



Το βακτηριακό Τι πλασμίδιο παράγει και υποδοχείς για αυτές τις ενώσεις και το βακτήριο κινείται χημειοτακτικά προς αυτές

Το Ti πλασμίδιο



Το T-DNA

το T-DNA οριοθετείται από ευθέως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 25 bp

επαναλαμβανόμενα συνοριακά Left Border- LB

Right Border- RB

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι πλασμιδίων

Νοπαλίνης (ένα συνεχές τμήμα 22 Kb)

TG(G/A)CAGGATATAT(-/T)G(T/G)(G/C)G(T/G)GTAAAC

Οκτοπίνης (δύο τμήματα 14 και 7 Kb: TL και TR)

(C/T)GGCAGGATATA(T/A)C(A/C)(A/G)TTGTAA(A/T)T

TAAGTCGCTGTGTATGTTTGTTTG ("overdrive" / ενισχυτής)

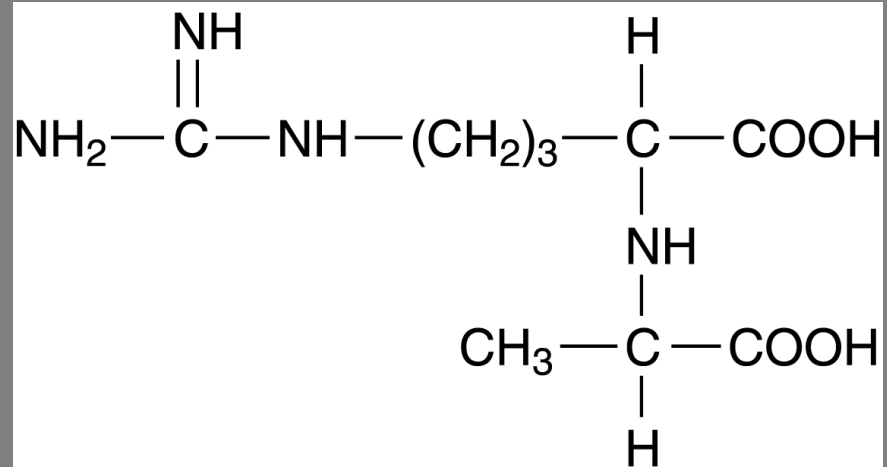
Το T-DNA

Γονίδια *onc* (*oncogenes*)

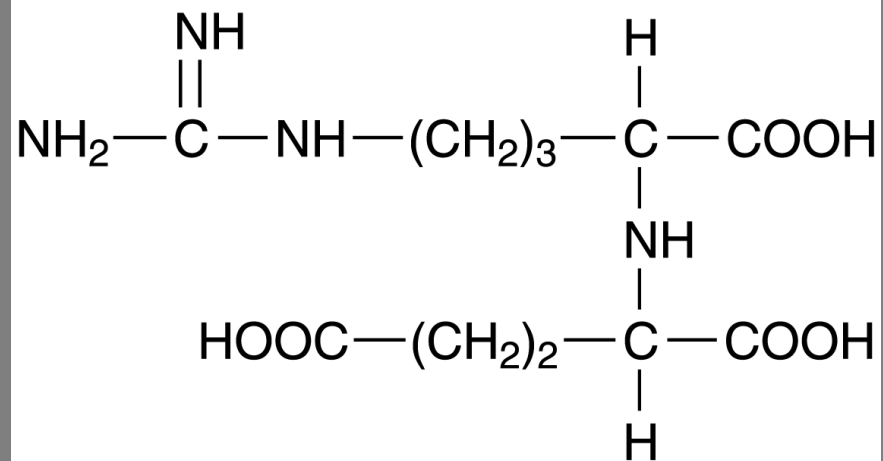
- Γονίδια *auxA* (*tms1/ iaaM*) και *auxB* (*tms2/ iaaH*) : παραγωγή της αυξίνης, ινδολυλ οξικό οξύ (IAA)
- Γονίδια *cyt* (*tmr/ ipt*) : κωδικοποιεί για την ισοπεντενυλική τρανφεράση (παραγωγή ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ)

Γονίδια παραγωγής οπινών (*ocs*)

οπίνες: παράγωγα αμινοξέων / αγροπίνες: παράγωγα σακχάρων
οκτοπίνη ή νοπαλίνη (και μαννοπίνη, αγροπίνη, φρουκτοπίνη)



Octopine



Nopaline

Γονίδια *vir*

6 οπερόνια:

αρ. κιστρονίων

virA

1

virB

11

virC

2

virD

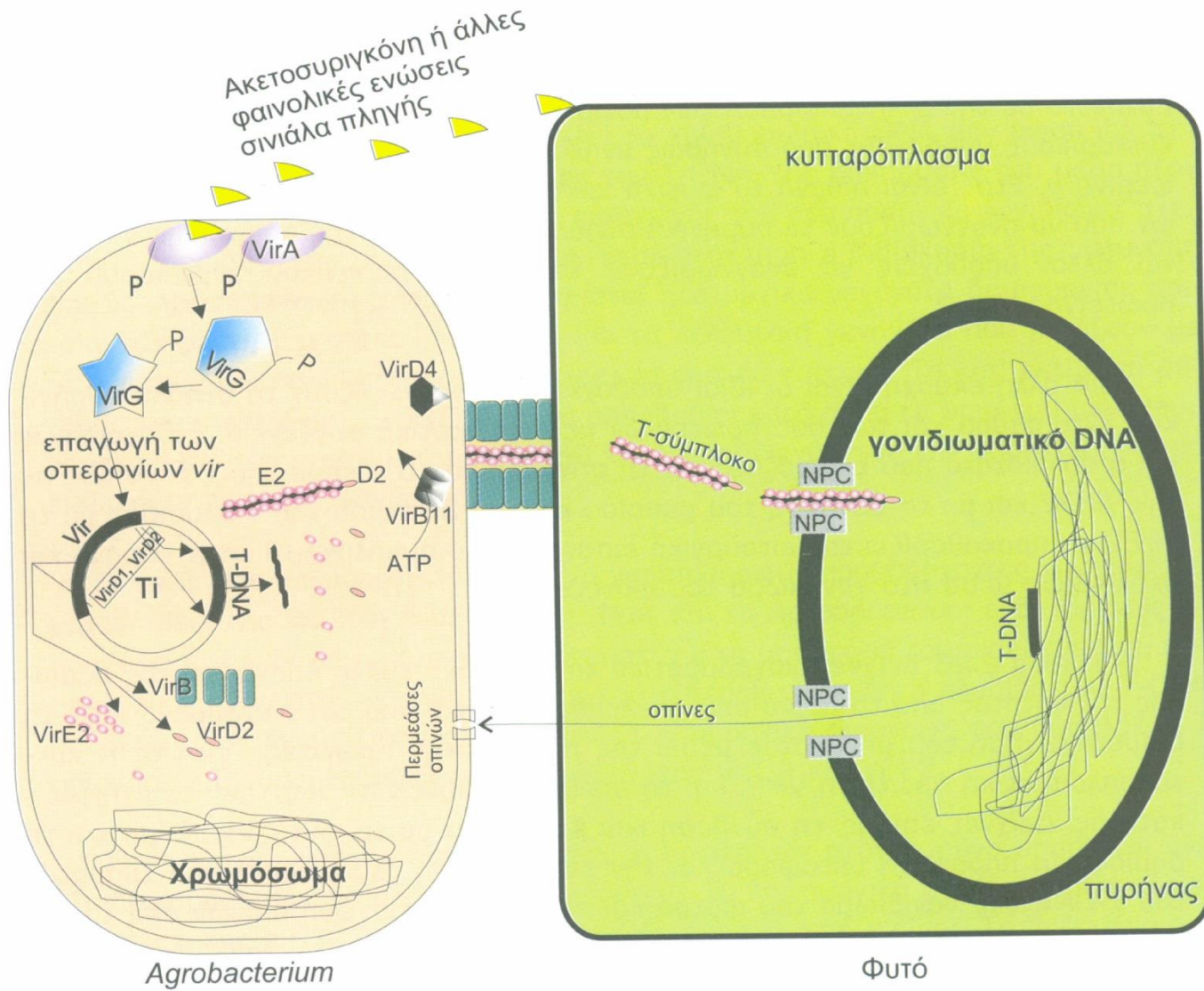
4

virE

2

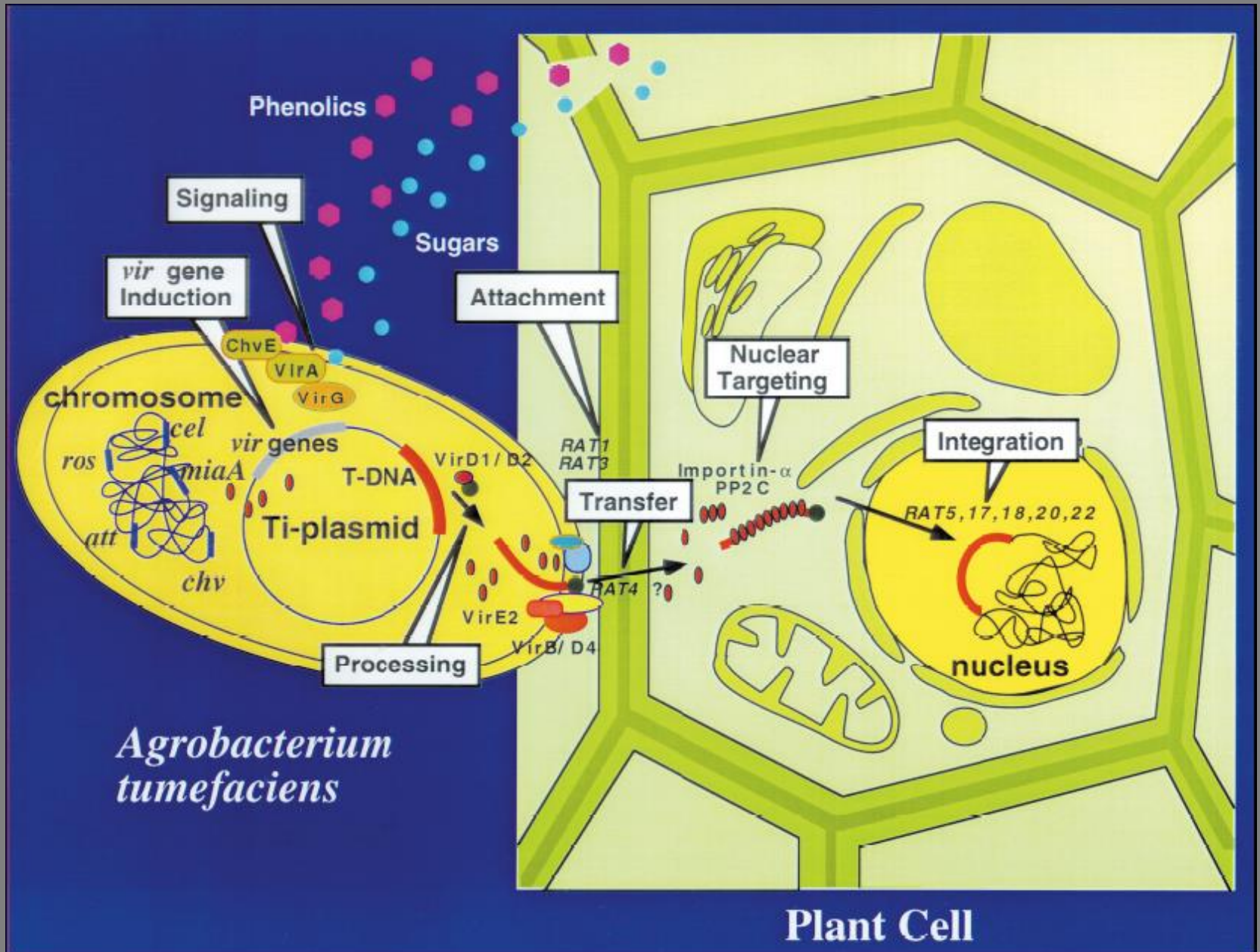
virG

1



Διαδικασία μεταφοράς και ενσωμάτωσης του T-DNA

- ✚ **Χημειοτακτική αναγνώριση** θέσεων τραυματισμού του φυτού από όπου εκκρίνονται μόρια-σινιάλα. **Προσκόληση** και αποικισμός με τη μεσολάβηση των *attR* (πολυσακχαρίτης), *chvA & B, chvB* (κυκλικές β-1,2-γλυκάνες, *pSCA* (σουκινογλυκάνη) χρωμοσωμικών γονιδιακών τόπων
- ✚ **Επαγωγή της περιοχής τοξικότητας *vir***: Η *virA* πρωτεΐνη (μεμβρανική κινάση-υποδοχέας) αυτοφωσφορυλιώνεται και ενεργοποιεί την *virG* και η τελευταία όλα τα υπόλοιπα γονίδια του ρεγουλόνιου
- ✚ **Δημιουργία- παραγωγή του T-DNA συμπλόκου**: αποκοπή από το *Ti* πλασμίδιο μονόκλωνης αλυσίδας (T-DNA strand) στα συνοριακά (LB & RB) από τις D1/D2, σύνδεση με D2/E2
- ✚ **Μεταφορά του T-DNA/D2 και της *virE2* στο κύτταρο ξενιστή** μέσω ειδικού μεμβρανικού συστήματος έκκρισης
- ✚ **Μεταφορά του T-DNA strand/D2 στον πυρήνα** (σινιάλο πυρηνικού εντοπισμού D2, E2). **Ενσωμάτωση στην χρωματίνη** (*VirE2* σε συνεργασία με *VIP1 & 2* του φυτού και *importins, cyclophilins*) με "ανορθόδοξο ανασυνδυασμό" (*illegitimate recombination*)



Διαδικασία μεταφοράς και ενσωμάτωσης του T-DNA

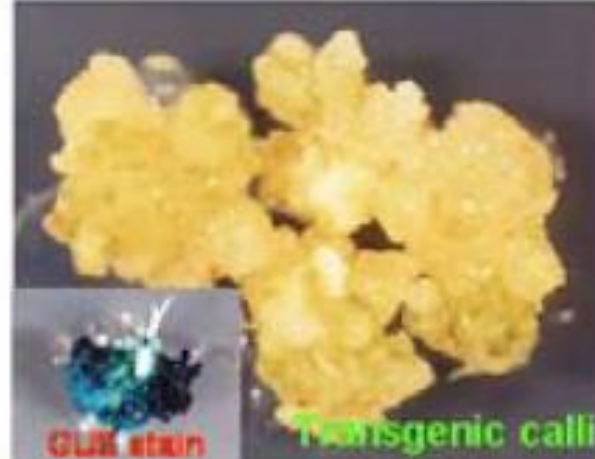
- ❖ *Vir* γονίδια: Είναι ενεργά *in trans*
- ❖ Η μεταφορά του T-DNA γίνεται με πολικότητα:
Από το δεξιο συνοριακό (RB) προς το αριστερό συνοριακό (LB)

Μεταμόρφωση φυτών μέσω του *Agrobacterium*

✓ Σταθερός μετασχηματισμός φυτών

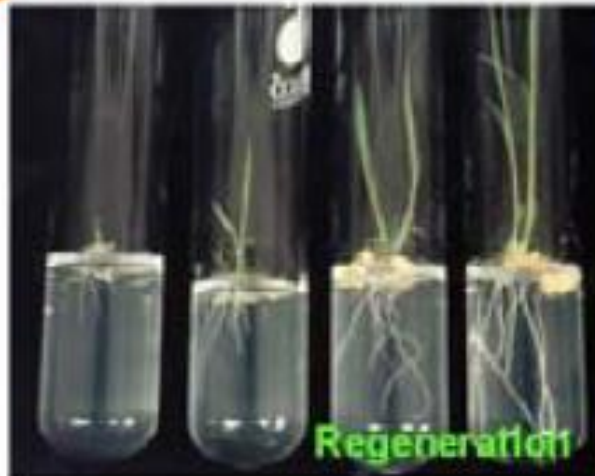
- ✚ Κλωνοποίηση του γονιδίου (ή τμήματός του) στη πολυδύναμη θέση κλωνοποίησης του κατάλληλου φορέα
- ✚ Εισαγωγή του γονιδίου σε ένα κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens*
- ✚ Συν-καλλιέργεια του τροποποιημένου γενετικά *A. tumefaciens* με τα κατάλληλα έκφυτα φυτών από τα οποία μπορεί να προέλθουν ολόκληρα φυτά
- ✚ Καλλιέργεια έκφυτου, αρχικώς στην παρουσία κάποιου βακτηριοστατικού παράγοντα που παρεμποδίζει την ανάπτυξη του *Agrobacterium* αλλά όχι των φυτικών κυττάρων (π.χ. cefotaxime) και σε παράγοντα επιλογής για την επιλογή των μεταμορφωμένων φυτικών κυττάρων/ τμημάτων
- ✚ Επιλογή των αναγεννημένων φυτών για την έκφραση των δεικτών επιλογής ή αναφοράς
- ✚ Ανάπτυξη των απογόνων των μεταμορφωμένων φυτών και καθορισμός της κληρονομικότητας του εισαχθέντος γονιδίου

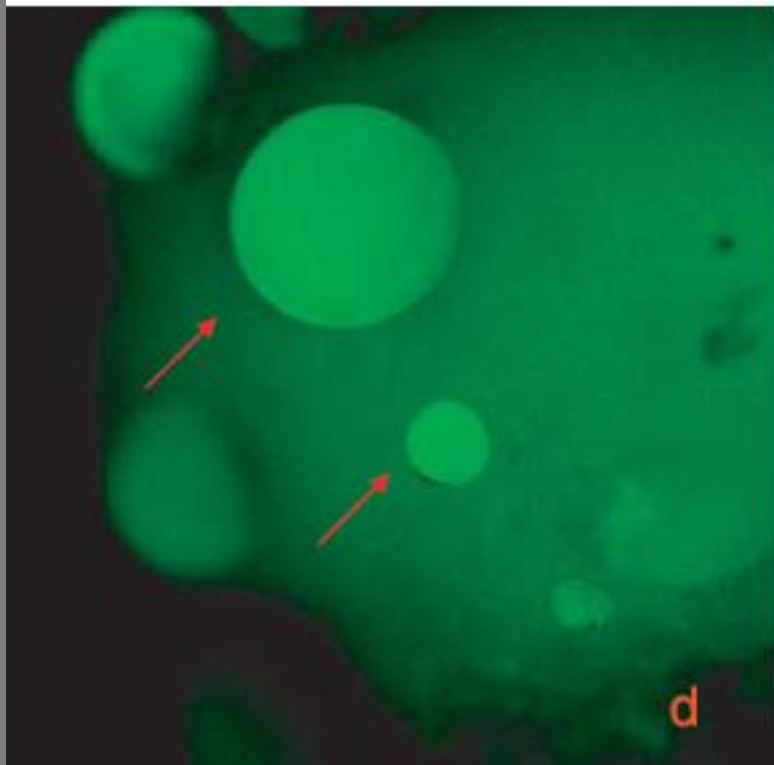
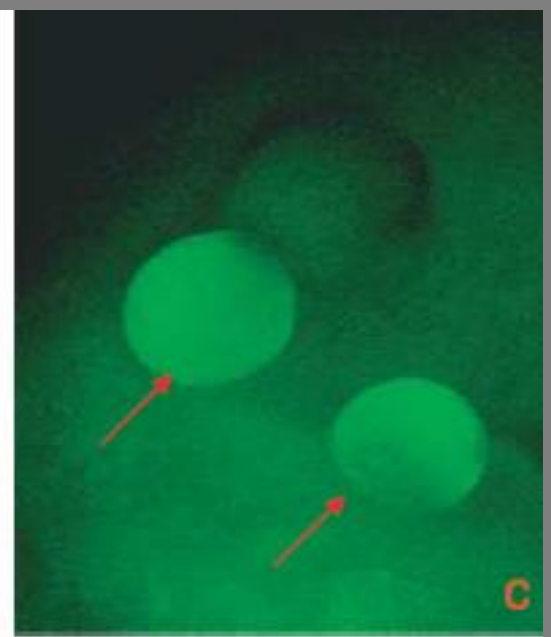
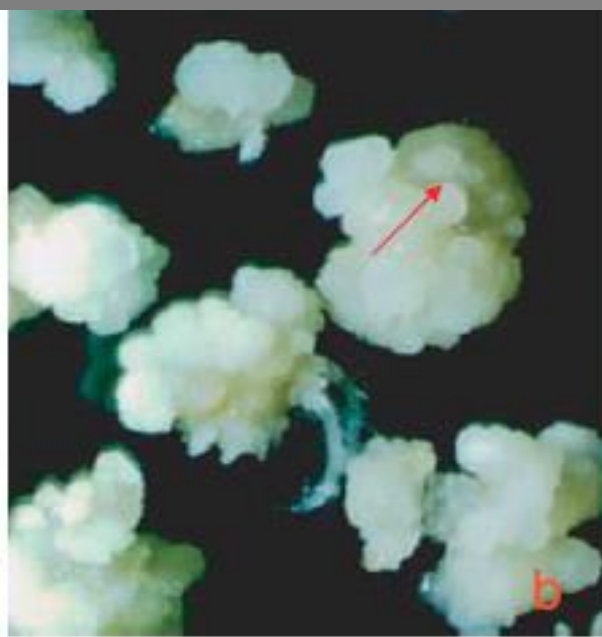
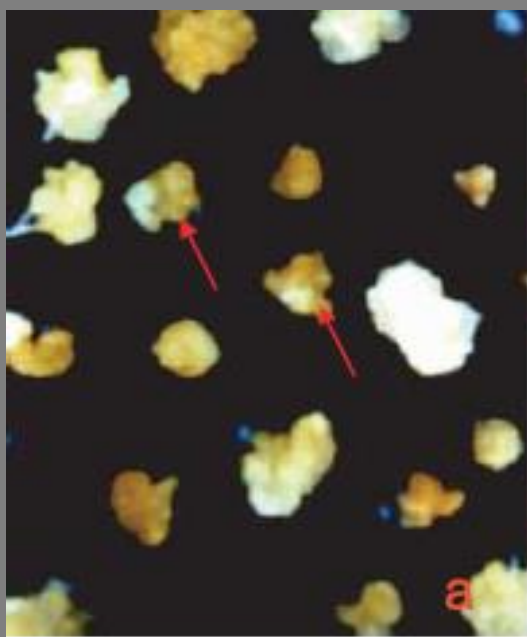
Agrobacterium-Mediated Rice Transformation



+

co-cultivation
and selection

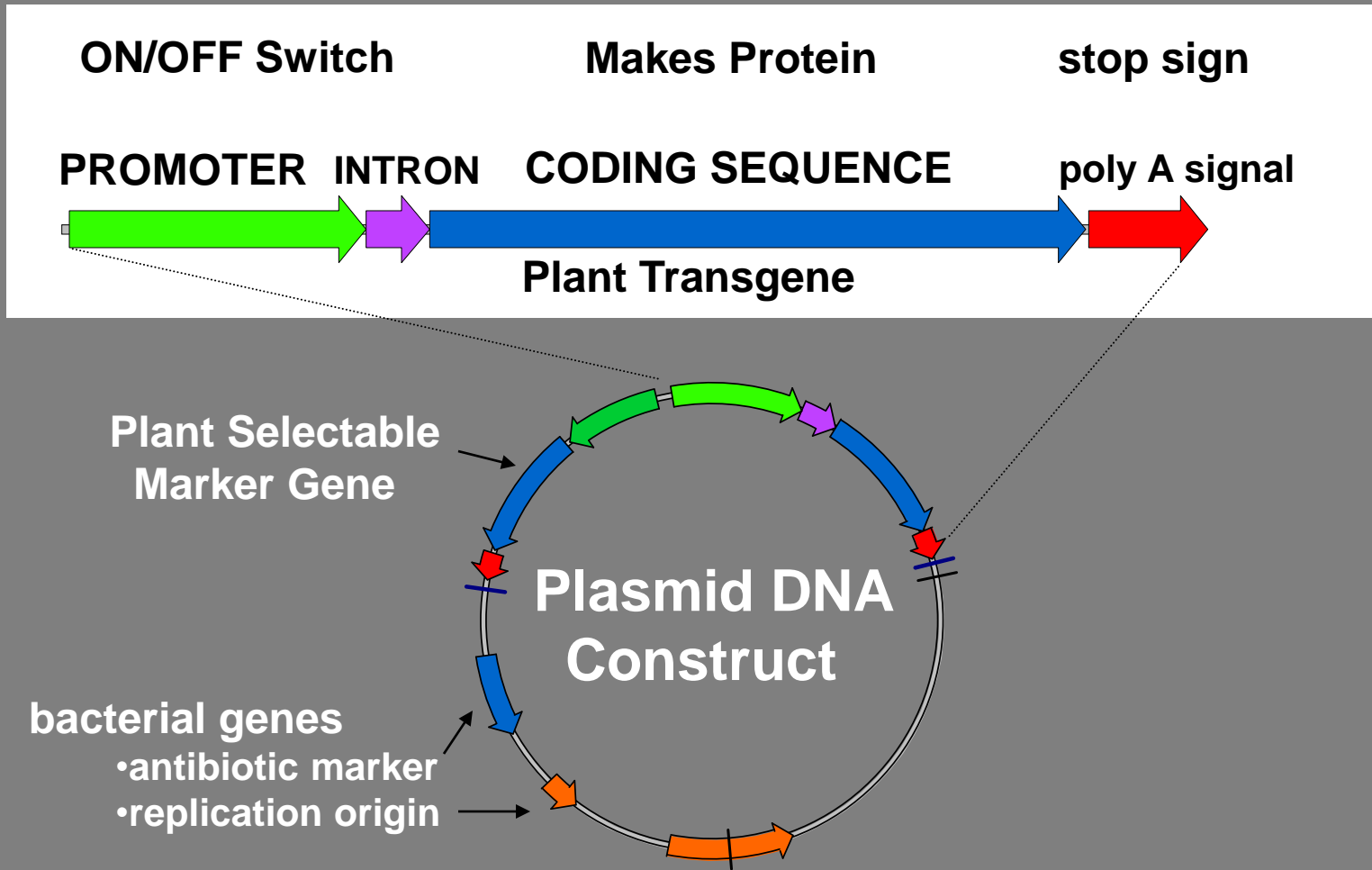




Παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη κατά το σχεδιασμό και την εφαρμογή πρωτόκολλου μεταμόρφωσης φυτών

- ✚ τύπος και ποιότητα αρχικού φυτικού ιστού (κυρίως κύτταρα υπό διαίρεση)
- ✚ πλασμιδιακός φορέας για τη μεταφορά του "ξένου" γονιδίου στο γονιδίωμα του φυτού
- ✚ στέλεχος *Agrobacterium*
- ✚ disarmed strains π.χ. LBA4404
- ✚ υπερμολυσματικά στελέχη π.χ. A281/ EHA101

Building the Transgenes



Φορείς μεταμόρφωσης φυτών μέσω *Agrobacterium*

- Συν-εισερχόμενοι φορείς (σύστημα *cis*)- *Co-integrative vectors*

Τα νέα γονίδια βρίσκονται σε ένα μικρότερο πλασμίδιο του *E.coli*. Εισάγονται στο Ti πλασμίδιο με ανασυνδυασμό σε μία ομόλογη τεχνητή περιοχή του T-DNA

- Δυαδικό σύστημα (σύστημα *trans*)- *Binary vectors*

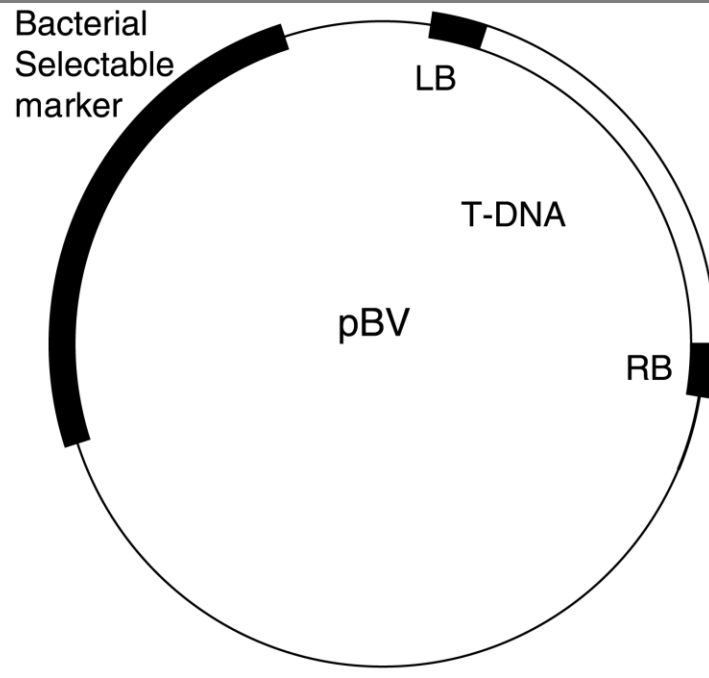
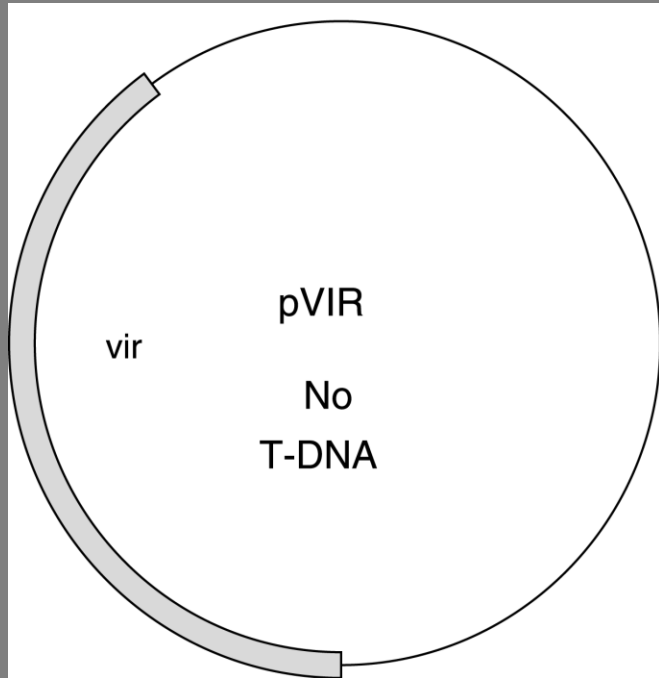
Το γονίδιο προς μεταφορά στο φυτικό γονιδίωμα και τα *vir* γονίδια βρίσκονται σε διαφορετικά πλασμίδια, τα οποία συνυπάρχουν ανεξάρτητα και αυτόνομα μέσα στο *Agrobacterium*

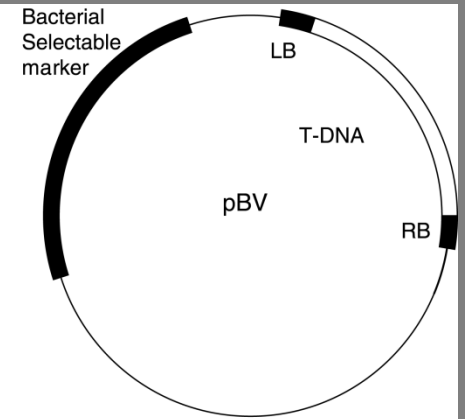
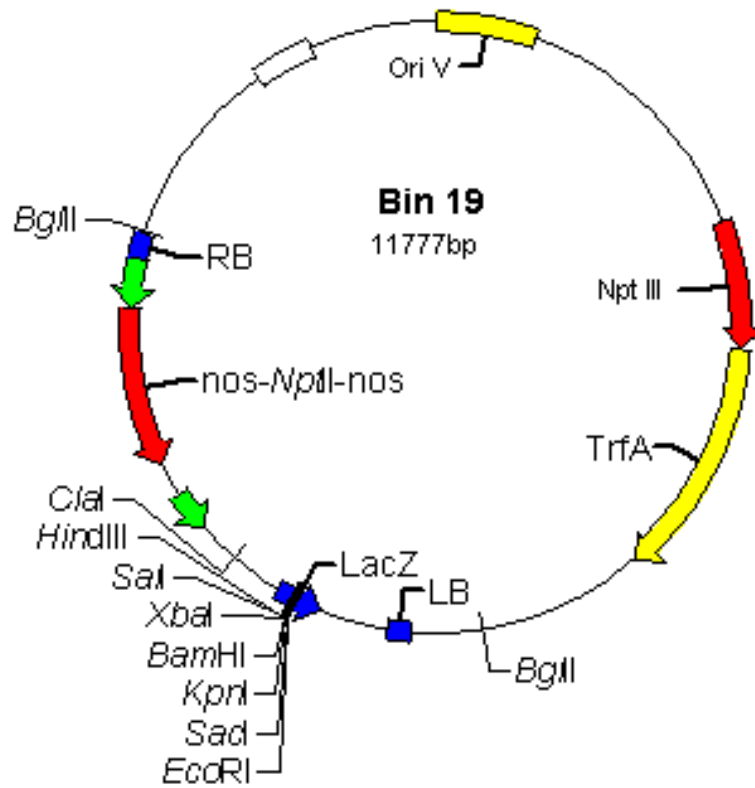
Το Ti-πλασμίδιο περιέχει τα *vir* γονίδια. Ο φορέας μεταφοράς περιέχει τους δείκτες επιλογής και τα ξένα γονίδια

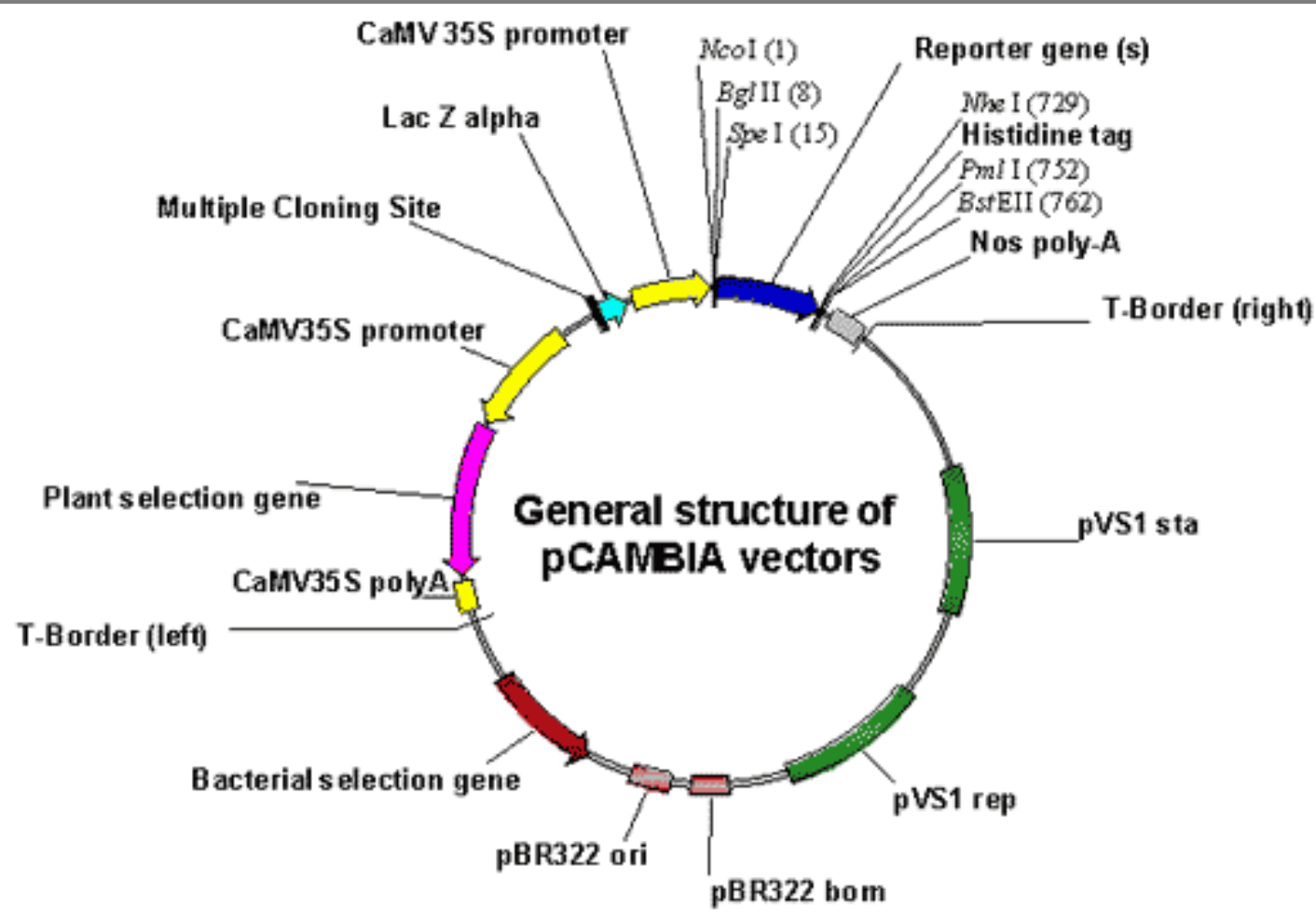
Είναι πολύ απλούστεροι στην κατασκευή τους και στο χειρισμό τους

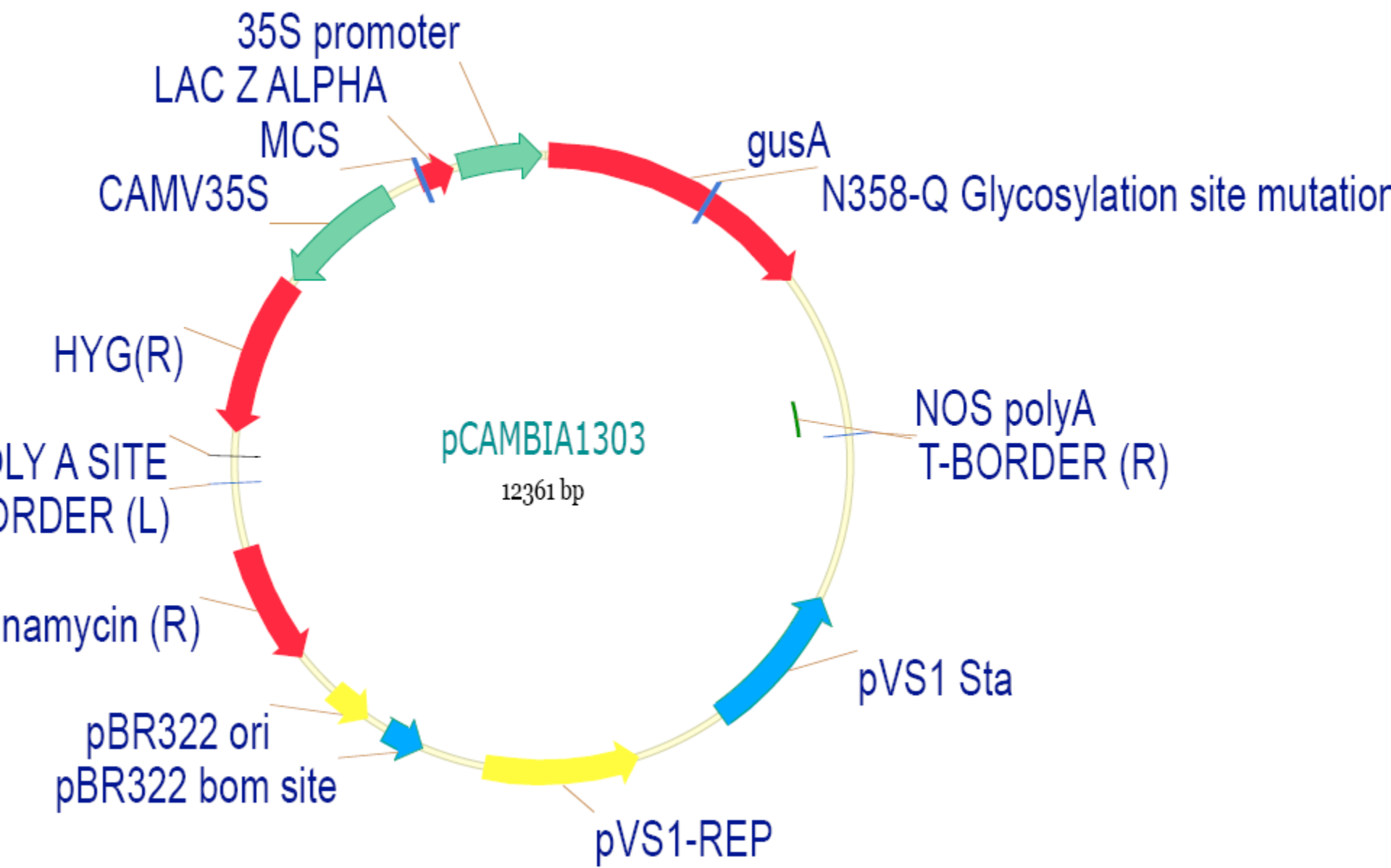
Χαρακτηριστικά προκαρυωτικών φορέων -πλασμιδίων

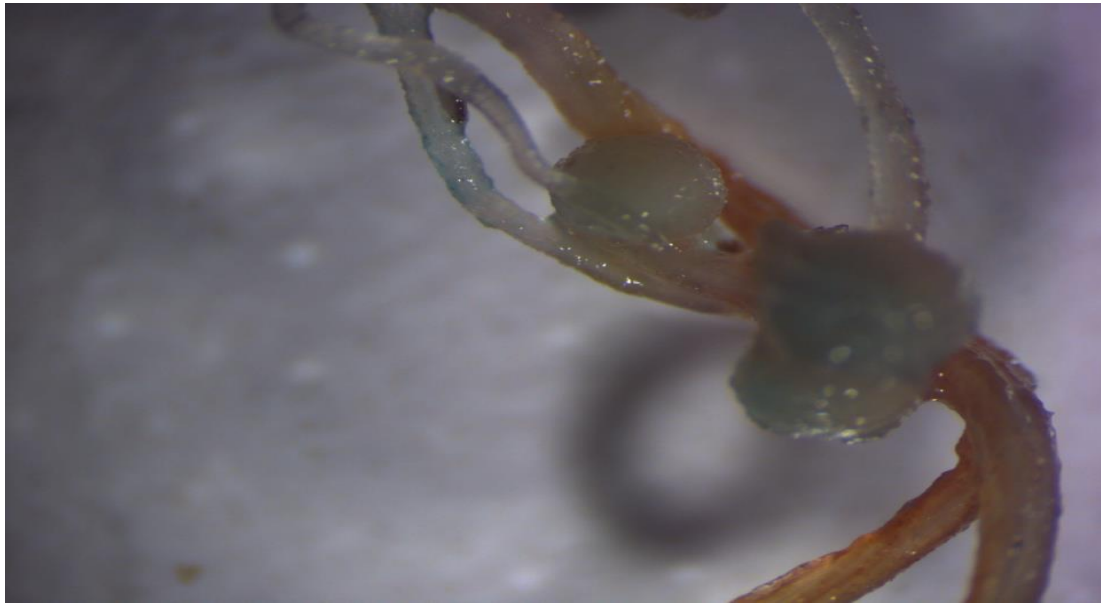
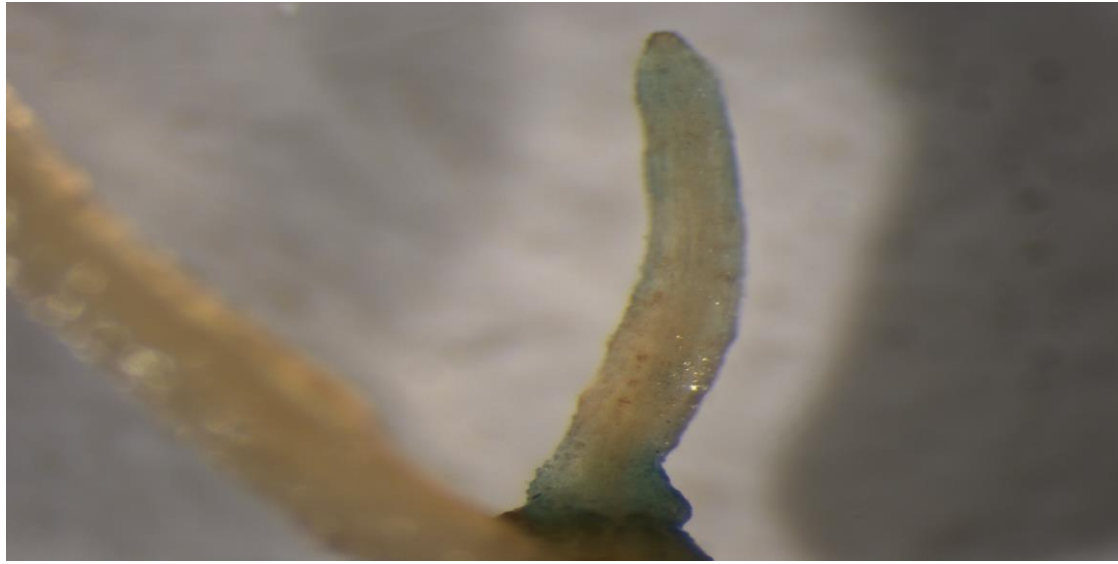
1. Ικανοί για αυτόνομο διπλασιασμό, ανεξάρτητα απο το βασικό βακτηριακό χρωμόσωμα, δηλαδή κατέχουν μια "αρχή διπλασιασμού"- origin of replication (ori).
2. Μικροί και άρα εύκολοι στο χειρισμό
3. Υπάρχουν σε πολλαπλά αντίγραφα στο κύτταρο ξενιστής
4. Μη τοξικοί στα κύτταρα ξενιστές
5. Διαθέτουν "χώρο" για το ξένο ένθετο DNA σε πολυδύναμες θέσεις κλωνοποίησης
6. Διαθέτουν μοναδικές θέσεις αναγνώρισης ενδονουκλεασών περιορισμού έτσι ώστε να είναι δυνατή η δημιουργία μεγάλου αριθμού ανασυνδυασμένων μορίων
7. Διαθέτουν δείκτες για την επιλογή των μεταμορφωμένων κυττάρων π.χ. γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά
8. Διαθέτουν συστήματα (δείκτες) που επιτρέπουν την αναγνώριση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (π.χ. *lacZα* : α-συμπληρωματικότητα)











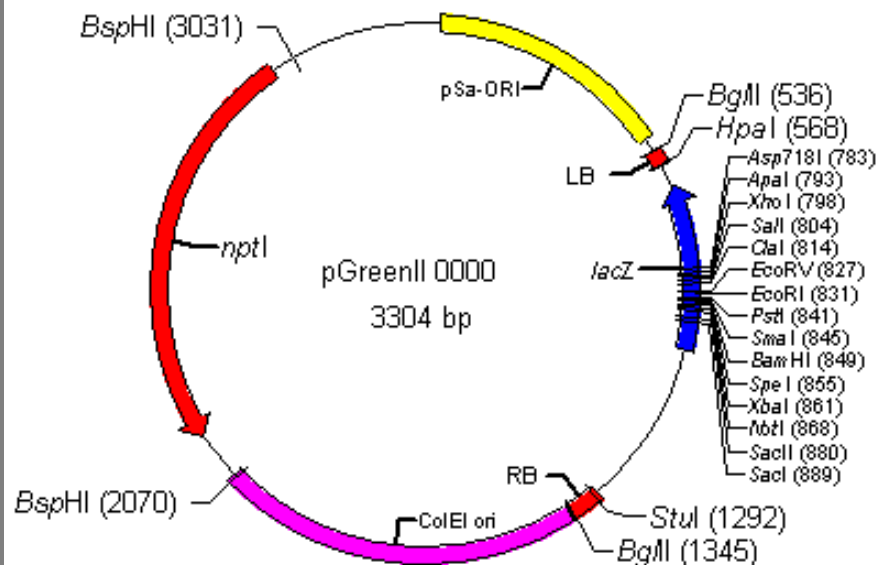
Φορείς μεταμόρφωσης φυτών μέσω *Agrobacterium*

• Τριαδικό σύστημα (σύστημα *trans*)- Τύπος διαδικού φορέα

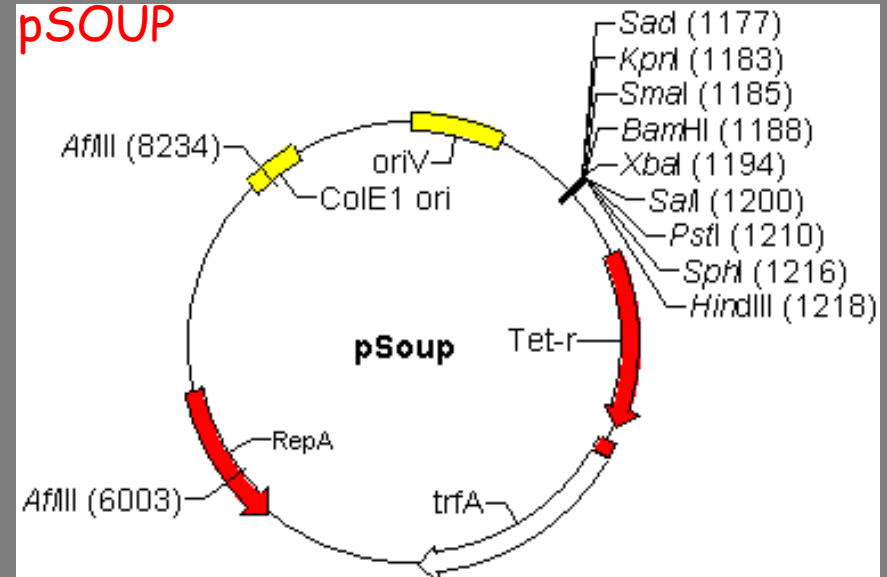
Υπάρχει ένα επιπλέον βοηθητικό πλασμιδίο, το οποίο περιέχει ένα γονίδιο για την αντιγραφή και επιβίωση του δυαδικού φορέα (του πλασμιδίου μεταφοράς)

Π.χ. pGREEN

και

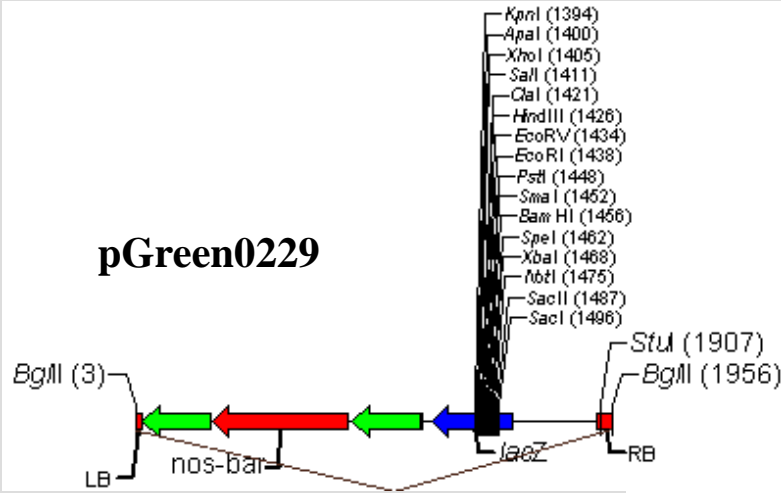


pSOUP

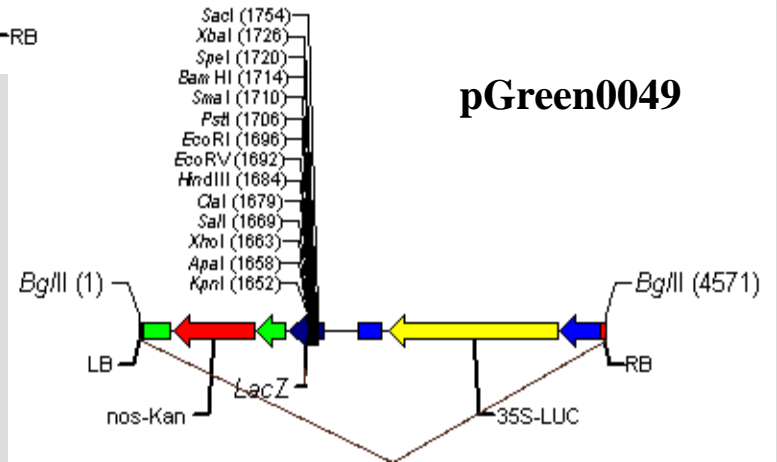


Το pSoup εισάγεται μαζί με τον pGreen φορέα στο *Agrobacterium* ή μπορεί να προϋπάρχει σε "ικανά" κύτταρα

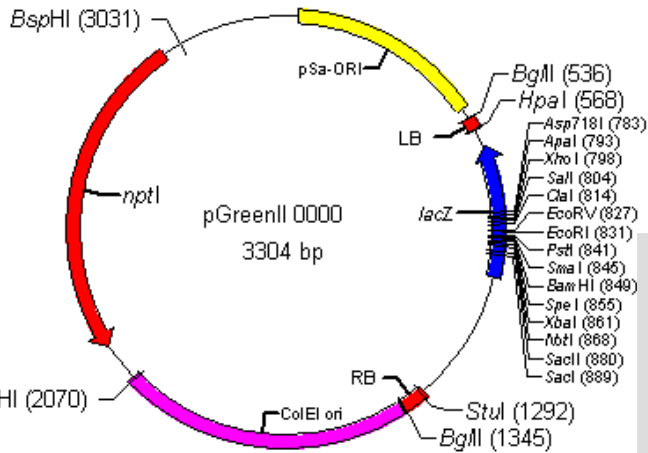
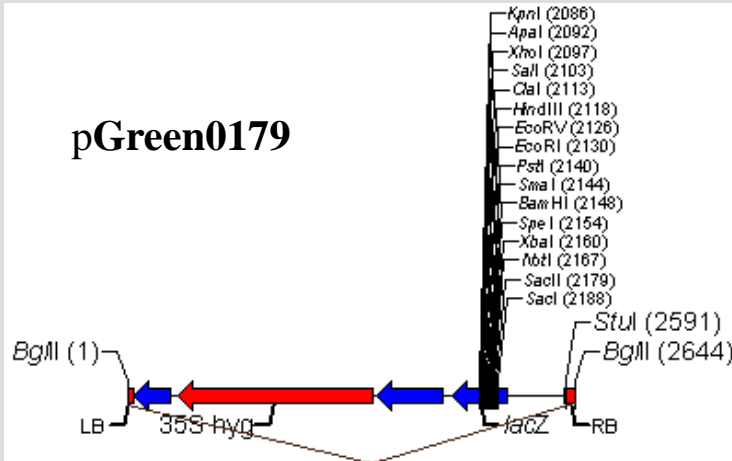
pGreen0229



pGreen0049



pGreen0179



18/09/2000

Table 1. A selection of binary Ti vectors published in the peer-reviewed literature^a

Vector ^b	Size (kb)	Unique restriction sites in T-DNA	LacZ	Bacterial selection on	Selectable marker at	Replication origin		Mobilization
						<i>Agrobacterium</i>	<i>E. coli</i>	
pBIN19	11 777	9	Yes	Kanamycin	RB	pRK2	pRK2	Yes
pC22	17 500	2	No	Ampicillin, streptomycin and spectinomycin	RB	pRi	ColE1	Yes
pGA482	13 200	7	No	Tetracycline	RB	pRK2	ColE1	Yes
pPCV001	9200	6	No	Ampicillin	RB	pRK2	ColE1	Yes
pCGN1547	14 440	5	Yes	Gentamicin	LB	pRi	ColE1	Yes
pJJ1881	25 700	4	No	Tetracycline	LB	pRK2	pRK2	Yes
pPZP111	8909	9	Yes	Chloramphenicol	LB	pVS1	ColE1	Yes
pGreen0029	4632	18	Yes	Kanamycin	LB	pSa	pUC	No

^aIn the cases of families of binary vectors only those which confer kanamycin resistance on transgenic plants are described. Sizes are based on restriction enzyme digestion patterns or on nucleotide sequence.

^bSee Box 1 for e-mail addresses for obtaining most of the plasmids listed.

Abbreviations: LacZ, β galactosidase α subunit gene for α -lac complementation; LB, left border; RB, right border. Mobilization refers to the ability of the plasmid to be transferred from *E. coli* to *Agrobacterium* by conjugation.

Table 2. Disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strains defined by the *Agrobacterium* chromosomal background and the Ti plasmid they harbour^a

<i>Agrobacterium</i> strain ^a	Chromosomal		Ti plasmid	Opine ^b	Ref.	
	Background	Marker gene ^c	Marker gene ^c			
LBA4404	TiAch5	rif	pAL4404	spec and strep	Octopine	3
GV2260	C58	rif	pGV2260 (pTiB6S3ΔT-DNA)	carb	Octopine	32
C58C1	C58	–	Cured	–	Nopaline	33
GV3100	C58	–	Cured	–	Nopaline	34
A136	C58	rif and nal	Cured	–	Nopaline	35
GV3101	C58	rif	Cured	–	Nopaline	34
GV3850	C58	rif	pGV3850 (pTiC58Δonc. genes)	carb	Nopaline	36
GV3101::pMP90	C58	rif	pMP90 (pTiC58ΔT-DNA)	gent	Nopaline	6
GV3101::pMP90RK	C58	rif	pMP90RK (pTiC58ΔT-DNA)	gent and kan	Nopaline	6
EHA101	C58	rif	pEHA101 (pTiBo542ΔT-DNA)	kan	Nopaline	37
EHA105	C58	rif	pEHA105 (pTiBo542ΔT-DNA)	–	Succinamopine	38
AGL-1	C58, RecA	rif, carb	pTiBo542ΔT-DNA	–	Succinamopine	39

^aSee Box 1 for e-mail addresses for obtaining most of the strains listed.

^bGrouped according to the opine catabolism of the original progenitor wild-type strain and/or non-disarmed parental Ti plasmid. This generally accepted classification of *Agrobacterium* strains does not necessarily imply that their disarmed counterparts still make opines.

^cAntibiotic resistance gene used to select for that strain of *Agrobacterium* or Ti plasmid.

Abbreviations: rif, rifampicin resistance; gent, gentamicin resistance; nal, nalidixic acid resistance; kan, kanamycin resistance gene for bacteria (*nptI* or *nptIII*); carb, carbenicillin and ampicillin resistance; spec and strep, spectinomycin and streptomycin resistance; –, no marker gene present.

Παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη κατά το σχεδιασμό και την εφαρμογή πρωτόκολλου μεταμόρφωσης φυτών

✚ Καταλληλότητα του φορέα για τη μεθοδολογία μετασχηματισμού του φυτού

- Γονίδιο επιλογής
- Συμβατότητα *Agrobacterium* στελέχους με το φορέα
- Επίδραση των αντιβιοτικών στην ιστοκαλλιέργεια και τα έκφυτα του φυτού

✚ Πόσα είδη φυτών

- Καταλληλότητα γονιδίων επιλογής για όλα τα είδη
- Διαφορετικά στελέχη *Agrobacterium* και ένας φορέας

✚ Πόσα γονίδια θέλω να εισαγω στο φυτό;

- Διαφορετικά γονίδια σε διαφορετικές σειρές φυτών;
- Πολλαπλά γονίδια στην ίδια σειρά (transgene stacking); Πως;
 - Διασταύρωση ανεξάρτητων σειρών;
 - Διαφορετικά γονίδια επιλογής και γονίδια αναφοράς;
 - Πολλαπλοί κύκλοι γενετικού μετασχηματισμού;
- Απαιτούνται περισσότερα του ενός γονίδια επιλογής ή απομάκρυνση του γονιδίου επιλογής (π.χ. συν-μετασχηματισμός και διαχωρισμός γονιδίων κατά τη μείωση);
- Εισαγωγή πολλαπλών γονιδίων σε ένα φορέα;
- Γονίδια επιλογής και στο RB και στο LB;
- Συγκεκριμένες μοναδιαίες θέσεις αναγνώρισης ενδονουκλεασών περιορισμού;

✚ Σε τι είδους εφαρμογή θα χρησιμοποιήσω το φορέα;

- Συνεχή ή υπό ρύθμιση έκφραση;
- Για "επισήμανση" γονιδίου με εισαγωγή T-DNA ή με μεταλλάξη με χρήση μεταθετού στοιχείου;
- Για "παγίδευση" προαγωγέα;
- Μελέτη ποσοτικής έκφρασης του διαγονιδίου;
- Μεταφορά μεγάλου τμήματος DNA (>50 Kb);
- Ανάλυση των παρακείμενων του T-DNA αλληλουχίων του φυτού;

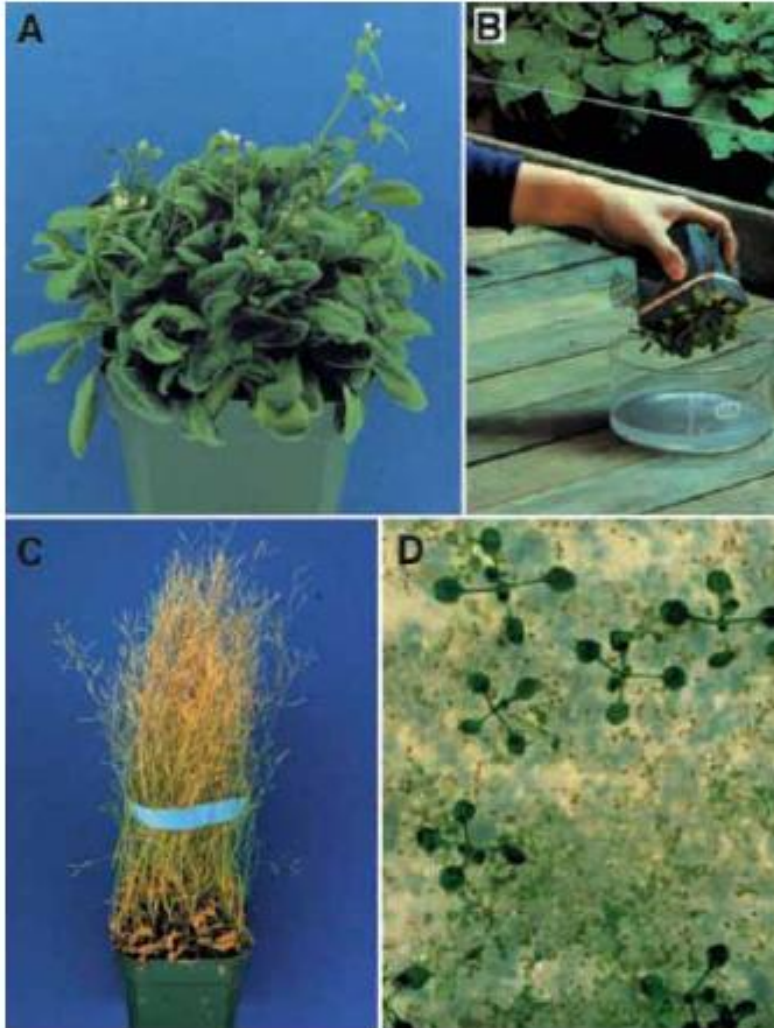
Μεταμόρφωση φυτών *in planta*

❖ “Floral-dip”

• *Arabidopsis thaliana*

✓ Σταθερός μετασχηματισμός φυτών

Μετασχηματισμός του *Arabidopsis thaliana*



A. Ανάπτυξη φυτών

B. Εμβάπτιση σε *Agrobacterium*

C. Συλλογή σπερμάτων

D. Επιλογή μετασχηματισμένων φυτών



Δοκιμές (Συστήματα) παροδικής έκφρασης γονιδίων

- ↳ Λειτουργία γονιδίου
- ↳ Ανάλυση προαγωγέων
- ↳ Συμπληρωματικότητα διαγονιδίων
- ↳ Παραγωγή πρωτεϊνών

Πλεονεκτήματα σε σχέση με σταθερό μετασχηματισμό

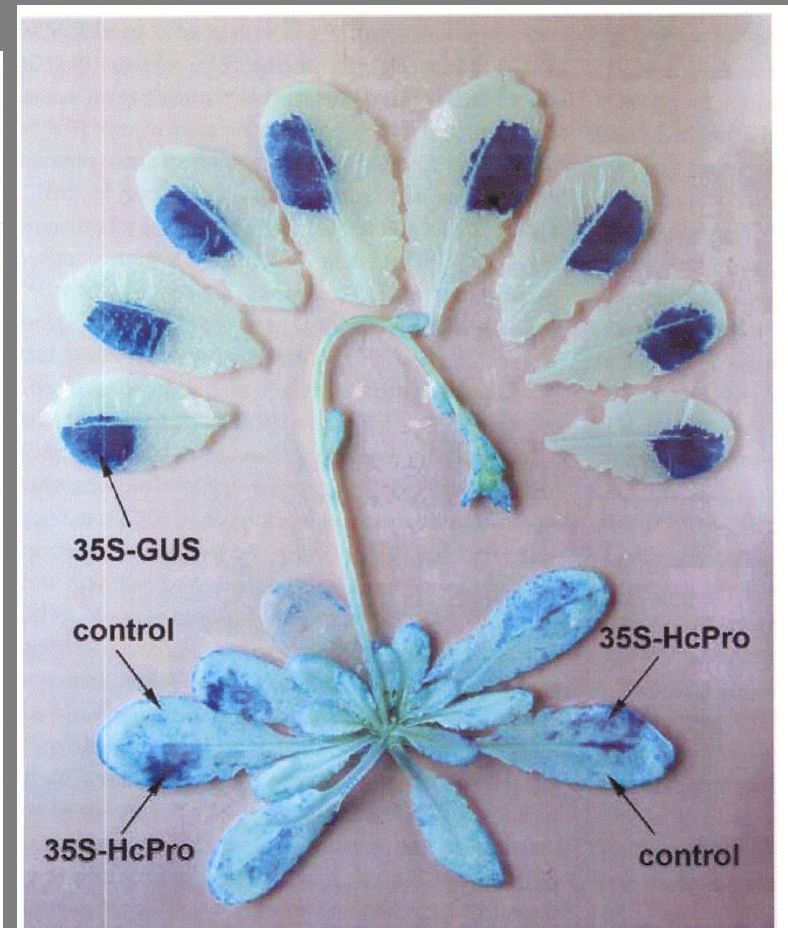
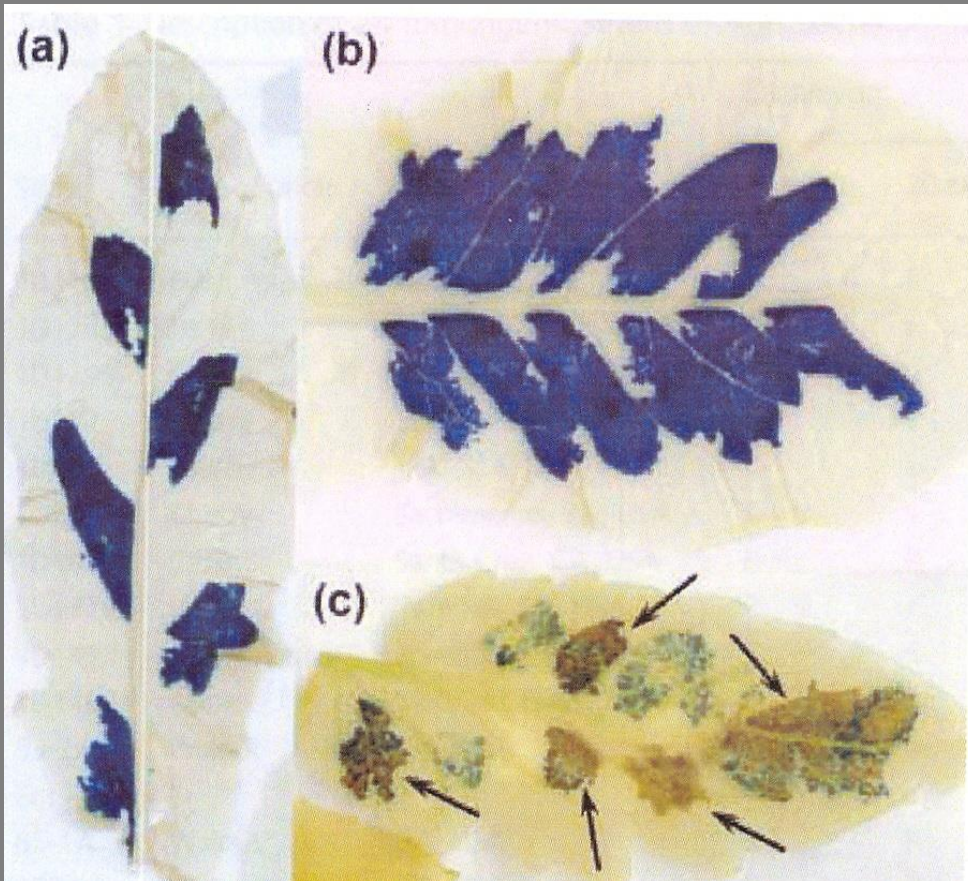
- ταχύτερη προσέγγιση του ζητήματος υπό μελέτη
- επιτρέπει την ανάλυση έκφρασης γονιδίων με επιβλαβείς επιδράσεις στην ανάπτυξη και αύξηση του φυτού
- ταυτόχρονη ανάλυση ανεξάρτητων μετασχηματισμένων κυττάρων χωρίς σωματοκλωνική ποικιλότητα
- εξασφαλίζει επαρκή ποσότητα ιστού για ανάλυση RNA και πρωτεϊνών
- εξασφαλίζει σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου

Μειονεκτήματα

- Αποτελεσματική μόνο σε ορισμένα είδη φυτών
- μελέτη γονιδίων με «μετρήσιμο» φαινότυπο σε σύντομο χρονικό διάστημα

“Agroinoculation”- “Agroinfiltration” (“vacuum- infiltration”)

Διείσδυση βακτηρίων *Agrobacterium*, μετασχηματισμένα με καταλληλο πλασμιδιακό φορέα, με ένεση στο υπεργείο τμήμα του φυτού (συνήθως φύλλα)



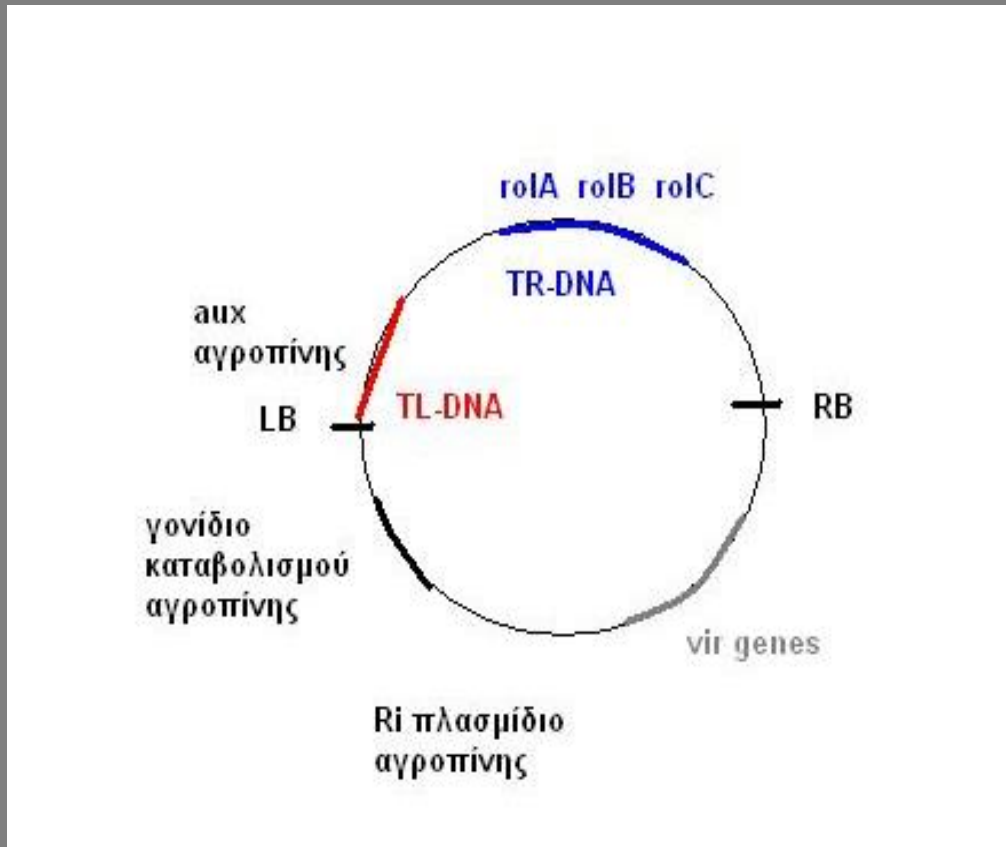
Agrobacterium rhizogenes: φαινόμενο "hairy roots"

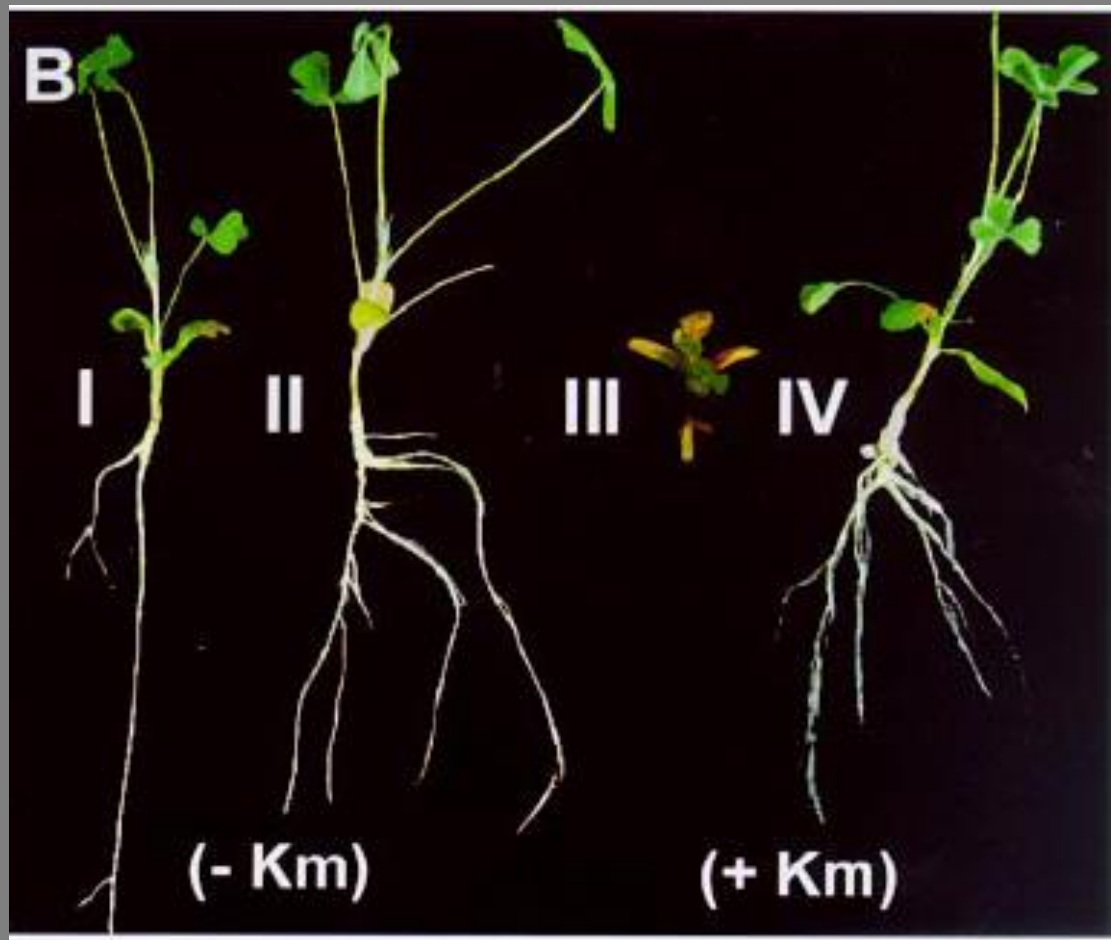
πλασμίδιο Ri

γονίδια *rolB* / *rolC*: με ρόλο στο μεταβολισμό φυτικών ορμονών

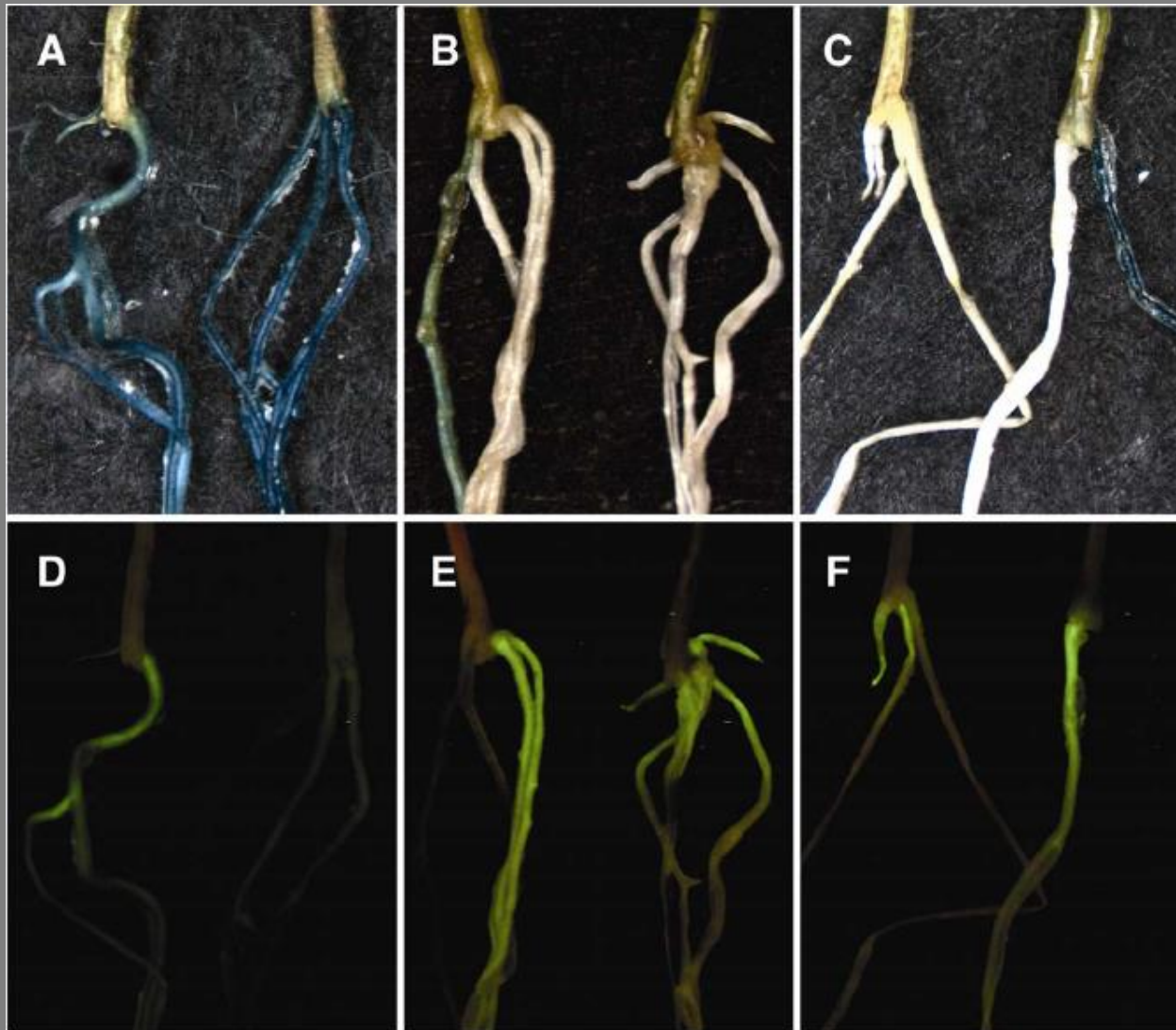


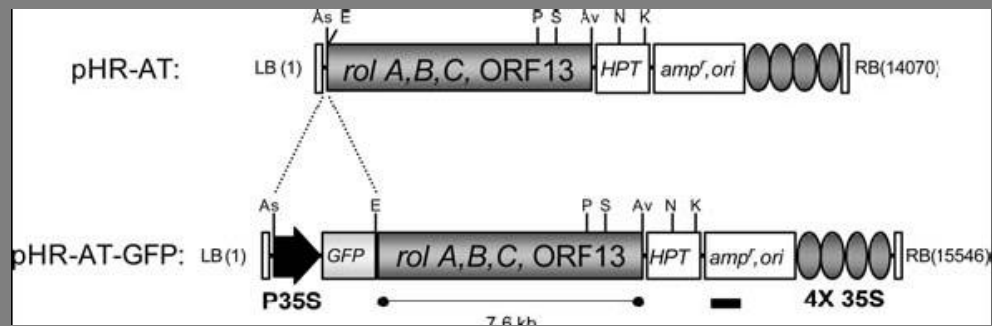
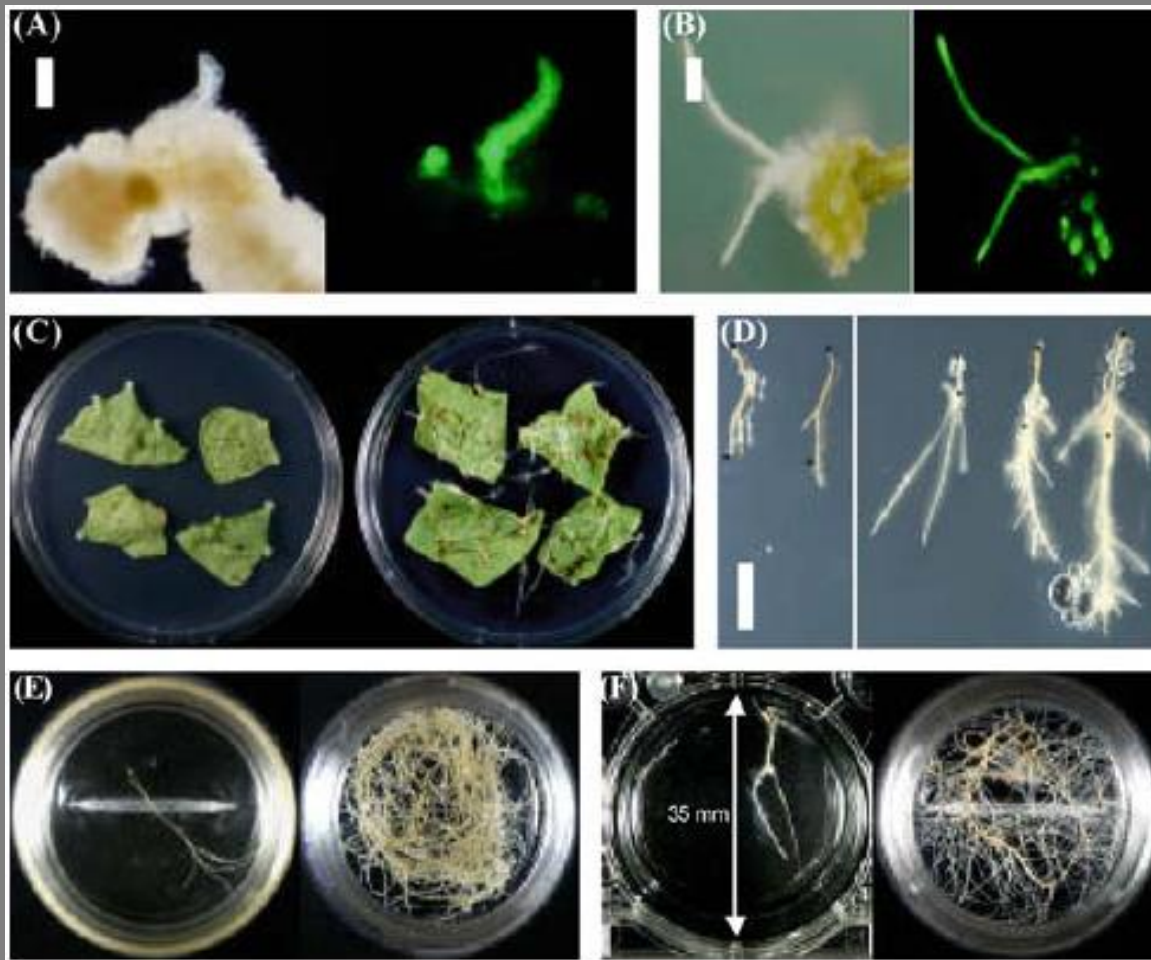
ευαισθητοποίηση στην ενδογενή αυξίνη





***Agrobacterium rhizogenes*: φαινόμενο “hairy roots”**





Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (στα φυτά)

- ◆ διαμόρφωση της χρωματίνης
(π.χ. μεθυλίωση, επηρεάζουν τη γ.ε. σε μεγάλη έκταση στο χρωμόσωμα)
- ◆ μεταγραφή (*cis*-στοιχεία, μεταγραφικοί παράγοντες)
- ◆ πυρηνικό RNA: τροποποίηση, *splicing*, *turnover*, μεταφορά
- ◆ κυτοπλασματικό RNA: "διάρκεια"
- ◆ μετάφραση
- ◆ μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις
- ◆ χωροθέτηση πρωτεϊνών
- ◆ "διάρκεια αναγέννησης" πρωτεϊνών

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (στα φυτά)

- ◆ διαμόρφωση της χρωματίνης

(π.χ. μεθυλίωση, επηρεάζουν τη γ.ε. σε μεγάλη έκταση στο χρωμόσωμα)

◆ μεταγραφή (*cis*-στοιχεία, μεταγραφικοί παράγοντες)

- ◆ πυρηνικό RNA: τροποποίηση, splicing, turnover, μεταφορά

- ◆ κυτοπλασματικό RNA: "διάρκεια"

- ◆ μετάφραση

- ◆ μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις

- ◆ χωροθέτηση πρωτεϊνών

- ◆ "διάρκεια αναγέννησης" πρωτεϊνών

- ◆ μεταγραφικοί παράγοντες στα φυτά
 - περιοχή δέσμευσης στο DNA
 - περιοχή "ολιγομερισμού" (δημιουργία ομο- και ετερο-διμερών που επηρεάζουν την εξειδίκευση, την δέσμευση στο DNA και την ενεργότητα)
 - περιοχή ελέγχου της μεταγραφής

κύριες κατηγορίες

TATA binding protein(S)- 2 στα φυτά και

TAF: TBP-associated factors

28 families & superfamilies- 12 plant specific

- APETALA2/ ethylene responsive element binding protein (AP2/EREBP) (144)
- WRKY (72)
- GT-box
- C2H2 Zinc finger (105)
- HD-ZIP (81)

- MYB-(R1)R2R3 (190)
- bHLH (basic helix loop helix) (139)
- HomeBox (89)
- bZIP (leucine zipper)
- MADS (81)
- NAC (109)

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (στα φυτά)

- ◆ διαμόρφωση της χρωματίνης

(π.χ. μεθυλίωση, επηρεάζουν τη γ.ε. σε μεγάλη έκταση στο χρωμόσωμα)

- ◆ μεταγραφή (*cis*-στοιχεία, μεταγραφικοί παράγοντες)

◆ πυρηνικό RNA:

τροποποίηση, *splicing*, *turnover*, μεταφορά

- ◆ κυτοπλασματικό RNA: "διάρκεια"
- ◆ μετάφραση
- ◆ μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις
- ◆ χωροθέτηση πρωτεϊνών
- ◆ "διάρκεια αναγέννησης" πρωτεϊνών

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (στα φυτά)

- ◆ διαμόρφωση της χρωματίνης
(π.χ. μεθυλίωση, επηρεάζουν τη γ.ε. σε μεγάλη έκταση στο χρωμόσωμα)
- ◆ μεταγραφή (*cis*-στοιχεία, μεταγραφικοί παράγοντες)
- ◆ πυρηνικό RNA: τροποποίηση, *splicing*, *turnover*, μεταφορά

- ◆ **ΚΥΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟ RNA: "διάρκεια"**
(*cis*-στοιχεία σε συνδυασμό με περιβαλλοντικά και ορμονικά σήματα)

- ◆ μετάφραση

- ◆ μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις
- ◆ χωροθέτηση πρωτεϊνών
- ◆ "διάρκεια αναγέννησης" πρωτεϊνών

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (στα φυτά)

- ◆ διαμόρφωση της χρωματίνης
(π.χ. μεθυλίωση, επηρεάζουν τη γ.ε. σε μεγάλη έκταση στο χρωμόσωμα)
- ◆ μεταγραφή (*cis*-στοιχεία, μεταγραφικοί παράγοντες)
- ◆ πυρηνικό RNA: τροποποίηση, *splicing*, *turnover*, μεταφορά
- ◆ κυτοπλασματικό RNA: "διάρκεια"
(*cis*-στοιχεία σε συνδυασμό με περιβαλλοντικά και ορμονικά σήματα)

◆ μετάφραση

(5' cap/ 3' poly A,

κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης:

μονοκότυλα (A/C)(A/G)(A/C)CAUGGC,

δικότυλα AA(A/C)AAUGGC και +4 μέχρι +11)

- ◆ μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις
(πεπτίδια σινιάλα, φωσφορυλίωση, γλυκοσυλίωση)
- ◆ χωροθέτηση πρωτεϊνών
- ◆ "διάρκεια αναγέννησης" πρωτεϊνών

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (στα φυτά)

- ◆ διαμόρφωση της χρωματίνης
(π.χ. μεθυλίωση, επηρεάζουν τη γ.ε. σε μεγάλη έκταση στο χρωμόσωμα)
- ◆ μεταγραφή (*cis*-στοιχεία, μεταγραφικοί παράγοντες)
- ◆ πυρηνικό RNA: τροποποίηση, *splicing*, *turnover*, μεταφορά
- ◆ κυτοπλασματικό RNA: "διάρκεια"
(*cis*-στοιχεία σε συνδυασμό με περιβαλλοντικά και ορμονικά σήματα)
- ◆ μετάφραση
(5' cap/ 3' poly A, κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης: μονοκότυλα (A/C)(A/G)(A/C)CAUGGC, δικότυλα AA(A/C)AAUGGC και +4 μέχρι +11)
- ◆ **μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις**
(πεπτίδια σινιάλα, φωσφορυλίωση, γλυκοσυλίωση)
- ◆ χωροθέτηση πρωτεινών
- ◆ "διάρκεια αναγέννησης" πρωτεινών

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (στα φυτά)

- ◆ διαμόρφωση της χρωματίνης
(π.χ. μεθυλίωση, επηρεάζουν τη γ.ε. σε μεγάλη έκταση στο χρωμόσωμα)
 - ◆ μεταγραφή (*cis*-στοιχεία, μεταγραφικοί παράγοντες)
 - ◆ πυρηνικό RNA: τροποποίηση, *splicing*, *turnover*, μεταφορά
 - ◆ κυτοπλασματικό RNA: "διάρκεια"
(*cis*-στοιχεία σε συνδυασμό με περιβαλλοντικά και ορμονικά σήματα)
 - ◆ μετάφραση
(5' cap/ 3' poly A, κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης: μονοκότυλα (A/C)(A/G)(A/C)CAUGGC, δικότυλα AA(A/C)AAUGGC και +4 μέχρι +11)
 - ◆ μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις
(πεπτίδια σινιάλα, φωσφορυλίωση, γλυκοσυλίωση)
-
- ◆ χωροθέτηση πρωτεϊνών
 - ◆ "διάρκεια αναγέννησης" πρωτεϊνών

◆ χωροθέτηση πρωτεϊνών

Ενδοπλασματικό δίκτυο

Κενοτόπιο

Πυρήνας

Υπεροξειδιοσώματα

Χλωροπλάστες

Μιτοχόνδρια

HDEL/KDEL/RDEL

LQRD (+ κατάλληλη δομή)

(NLS) περιοχή πλούσια σε Arg, Lys

SKL: (S/A/C)(K/R/H)L

Πεπτιδίο μεταφοράς (πλούσιο σε Ser, Thr)

Πεπτιδίο μεταφοράς (Ala, Leu, Arg, Ser)

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (στα φυτά)

- ◆ διαμόρφωση της χρωματίνης
(π.χ. μεθυλίωση, επηρεάζουν τη γ.ε. σε μεγάλη έκταση στο χρωμόσωμα)
- ◆ μεταγραφή (*cis*-στοιχεία, μεταγραφικοί παράγοντες)
- ◆ πυρηνικό RNA: τροποποίηση, *splicing*, *turnover*, μεταφορά
- ◆ κυτοπλασματικό RNA: "διάρκεια"
(*cis*-στοιχεία σε συνδυασμό με περιβαλλοντικά και ορμονικά σήματα)
- ◆ μετάφραση
(5' cap/ 3' poly A, κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης: μονοκότυλα (A/C)(A/G)(A/C)CAUGGC, δικότυλα AA(A/C)AAUGGC και +4 μέχρι +11)
- ◆ μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις
(πεπτίδια σινιάλα, φωσφορυλίωση, γλυκοσυλίωση)

- ◆ χωροθέτηση πρωτεϊνών

- ◆ "διάρκεια αναγέννησης" πρωτεϊνών

Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση "ξένων" γονιδίων (transgenes) στα φυτά

- ◆ *cis*- αλληλουχίες
- ◆ κωδική περιοχή του γονιδίου- δομή του γονιδίου
- ◆ θέση του εισαχθέντος γονιδίου
- ◆ αριθμός αντιτύπων του εισαχθέντος γονιδίου

Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση "ξένων" γονιδίων στα φυτά

Cis- αλληλουχίες

✓ 5' μη μεταγραφόμενες ρυθμιστικές αλληλουχίες (προαγωγέας)

✓ 5' μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες του οδηγού του mRNA

✓ Ένισχυτές (σε ποικίλες θέσεις, αποστάσεις από τον προαγωγέα και κατευθύνσεις)

✓ Αλληλουχία γύρω από το κωδικόνιο έναρξης

Αποδοτικότητα έναρξης και ρυθμού μετάφρασης

- ✓ 3' μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες του mRNA
(π.χ. DST σε SAUR (*small auxin-up RNA*) mRNA, AUUA)
- ✓ Η ληκτική αλληλουχία μεταγραφής
- ✓ Η θέση αναγνώρισης της πολυαδενυλίωσης

Σταθερότητα του μηνήματος

Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση "ξένων" γονιδίων στα φυτά

Cis- αλληλουχίες

✓ 5' μη μεταγραφόμενες ρυθμιστικές αλληλουχίες, οι οποίες ανταποκρίνονται σε περιβαλλοντικά και ορμονικά σήματα

Light-response element (LREs)

Auxin (AuREs)

Abscisic acid (ABREs)

Jasmonic acid (JASE)

αλλά και

legumin box (ιστοεξειδίκευση σε αποθηκευτικούς ιστούς= σπόροι)

Δομή γονιδίου

G+C περιεχόμενο:

- ✓ ένα υψηλό ποσοστό σε A+T παρεμβαίνει στην επεξεργασία του mRNA με αποτέλεσμα την μη έκφραση του ξενου γονιδίου
 - ✓ το εισαχθέν γονίδιο αναγνωρίζεται ως "ξένο" στο background του ομοιογενούς ως προς τη σύνθεση βάσεων DNA του φυτού
 - ✓ αλληλουχίες AUUUA (3' UTR) αποσταθεροποιούν το mRNA
 - ✓ δημιουργούνται νέες πιθανές θέσεις πολυαδενυλίωσης
 - ✓ αναγνωρίζονται "κρυφά" ("μυστικά"-cryptic) ιντρόνια (εσώνια)
- ⇒ ετάλλαξη έλλειψης

- Δομή Θέσης έναρξης της μετάφρασης
- Θέση ιντρονίων (κυρίως στα μονοκότυλα)-
Εναλλακτικό splicing ιντρονίων
- Ύπαρξη σπάνιων για τα φυτά κωδικονίων

Τροποποιήσεις δομής των γονιδίων, που αυξάνουν τη μεταφραστικότητα

- ✓ προσθήκη εξειδικευμένων για φυτά αλληλουχιών πριν το πρώτο κωδικόνιο μετάφρασης
- ✓ εισαγωγή κωδικονίων που συναντώνται σε γονίδια με μεγάλη έκφραση στη περιοχή μετά το κωδικόνιο μετάφρασης
- ✓ εισαγωγή του πεπτιδίου οδηγού του Ω ιού του μωσαϊκού του καπνού ανάμεσα στον προαγωγέα και το ξένο γονίδιο
- ✓ μεταλλαξιγένεση για την αλλαγή των κωδικονίων

παραδείγματα

cry1A(b)

	γονίδιο “άγριου-τύπου”	τροποποιημέν ο γονίδιο
N° αλλαγών βάσεων	0	390 (21%)
N° τροποποιημένων κωδικονίων	0	356 (60%)
% G+C περιεχόμενο	37	49
N° πιθανών θέσεων πολυαδενυλίωσης	18	1
No ATTTA αλληλουχιών	13	0

gfp

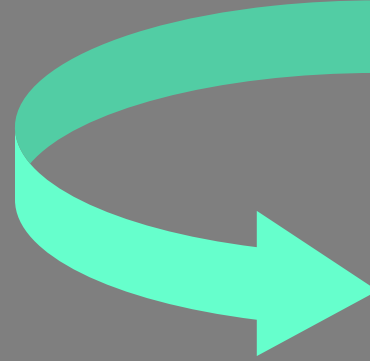
- αλλαγή των κωδικονίων \Rightarrow αφαίρεση “κρυφού” ιντρονίου
- εισαγωγή της αλληλουχίας *AACA* πριν το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης
- προσθήκη 5' πεπτιδίου-οδηγού και 3' σήματος διατήρησης στο ER \Rightarrow αποφυγή συσώρευσης της πρωτεΐνης στον πυρήνα

Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση "ξένων" γονιδίων (transgenes) στα φυτά

- ◆ *cis*- αλληλουχίες
- ◆ κωδική περιοχή του γονιδίου- δομή του γονιδίου
- ◆ **θέση του εισαχθέντος γονιδίου**
- ◆ αριθμός αντιτύπων του εισαχθέντος γονιδίου

Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση ετερόλογων γονιδίων στα φυτά

Θέση γονιδίου ("επίδραση θέσης" -positional effect)



ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

↳ Μεταγραφική σίγηση γονιδίου (TGS)

(μεθυλίωση, τροποποίηση διαμόρφωσης χρωματίνης, διαμερισματοποίηση πυρήνα,)

Παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη

- Αποφυγή εισαγωγής επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών ή αλληλουχιών με ομολογία με ενδογενείς αλληλουχίες
- Αποφυγή εισαγωγής πολλαπλών αντιτύπων του εισαχθέντος γονιδίου
- Σε περιπτώσεις εισαγωγής πολλαπλών γονιδίων →
 - * διαφορετικοί προαγωγοί με μη ομόλογες περιοχές
 - * έκφραση πολλαπλών πολυπεπτιδίων ως μία μόνο ένθεση

Παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη για την αποφυγή TGS (συνέχεια)

- ◆ Ανάλυση των γειτονικών περιοχών της θέσης ένθεσης του γονιδίου
- ◆ Τροποποίηση της δομής του γονιδίου ώστε να προσομοιάζει τις μεταγραφικά ενεργές περιοχές του οργανισμού-στόχου. Εισαγωγή αλληλουχιών-σινιάλων για λήξη της μεταγραφής
- ◆ προσθήκη συγκεκριμένων αλληλουχιών που μειώνουν μη επιθυμητές επιρροές της θέσης ένθεσης: π.χ. MARs (matrix-attachment regions): αλληλουχίες πλούσιες σε AT που επιτρέπουν στη χρωματίνη να παραμένει σε "ανοικτή" διαμόρφωση για έκφραση των γονιδίων ανεξάρτητα από τη θέση τους

◆ χρήση ενζύμων - recombinases- με εξειδίκευση θέσης από βακτηριοφάγους και ζύμες για ομόλογο ανασυνδυασμό και κατευθυνόμενη εισαγωγή των ξένων γονιδίων σε συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος (μεταγραφικά ενεργές/ "περιοχές πλούσιες σε γονίδια" (gene-rich regions))

◆ επιλογή των τροποποιημένων κυττάρων-οργανισμών για τη θέση ένθεσης του γονιδίου

Παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη για την αποφυγή μετα-μεταγραφικής σίγησης (PTGS) του ένθετου γονιδίου

- ◆ Αποκλεισμός παραγωγής dsRNA ή "ανώμαλων" RNA
- ◆ Αποφυγή εισαγωγής - επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών
- αλληλουχιών με ομολογία με ενδογενείς αλληλουχίες
- ◆ Αποφυγή συσσώρευσης μεταγραφημάτων σε μεγάλες συγκεντρώσεις
- ◆ Εισαγωγή αλληλουχιών-σινιάλων για λήξη της μεταγραφής
- ◆ Αλληλουχίες ομόλογες με γονιδιώματα ιών πρέπει να αποφεύγονται από UTRs
⇒ VIGS

Προαγωγείς

✓ Συστατικοί

✓ Ρυθμιζόμενοι κατά συνθήκη

Συστατικοί προαγωγείς στα διαγονιδιακά φυτά

προκαθορίζουν την έκφραση του γονιδίου σε όλους σχεδόν τους ιστούς σε παραπλήσια επίπεδα ανεξάρτητα από αναπτυξιακούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες

Παραδείγματα

35S από CaMV (ιός του μωσαϊκού του κουνουπιδιού): ιδανικός για την έκφραση των γονιδίων επιλογής και αναφοράς

nos (συνθάση της νοπαλίνης), **ocs** (συνθάση της οκτοπίνης), **mas** από *Agrobacterium*

ubiquitin I (καλαμπόκι) / **actin** (ρύζι) για μονοκότυλα

Ρυθμιζόμενοι κατά συνθήκη προαγωγείς

- ✓ Ιστοειδικοί
- ✓ Επαγώμενοι
- ✓ Αναπτυξιακοί

πλειοτροπικά
αποτελέσματα λόγω της
έντονης τροποποίησης της
φυσιολογίας του
οργανισμού

Ιστοειδικοί

Καθορίζουν την έκφραση των γονιδίων σε συγκεκριμένα φυτικά κύτταρα, ιστούς και όργανα του φυτού

-περιορίζουν τα καταστρεπτικά αποτελέσματα της έκφρασης σε υψηλά επίπεδα και σε όλους τους ιστούς

-διευκολύνουν τη συσσώρευση άρα και συγκομιδή των “προϊόντων” ή μεταβολιτών των εκραζομένων γονιδίων

✓ Ριζοειδικοί (*mas2*, *putrescine N methyltransferase*, *cyamine 6b hydroxylase*, *patatin*, *Sus4*)

✓ φωτοσυνθετικοί ιστοί (*rbcS*, *CAB*)

✓ seed specific (*Amy1a*, *BluB1*)

Επαγώμενοι

- ❖ η δράση τους μεταβάλλεται ανάλογα με τις συνθήκες επαγωγής
- ❖ επιτρέπουν την έκφραση γονιδίων σε περιορισμένη χρονική περίοδο

Διακρίνονται 2 κατηγορίες

(1) συστήματα που δεν προέρχονται από φυτά (ανεξάρτητα από τις φυσιολογικές διαδικασίες στο φυτό)

Παραδείγματα

προαγωγέας απόκρισης σε τετρακυκλίνη

(Ο TetR αναστολέας δεσμεύεται στον *tet* διαχειριστή (operator) και αποενεργοποιείται στην παρουσία τετρακυκλίνης- Ο TetR εκφράζεται συνεχώς από τον 35S και καταστέλλει την έκφραση του ξένου γονιδίου)

προαγωγέας απόκρισης σε αιθανόλη

(Ο AlcR παράγοντας (από τον *Aspergillus nidulans*) δεσμεύεται στις θέσεις αναγνώρισης που έχουν συμπεριληφθεί στην περιοχή του προαγωγέα παρουσία αιθανόλης και επάγει την έκφραση του ξένου γονιδίου)

- *προαγωγέας απόκρισης σε στεροειδή*

(χρησιμοποιούνται παράγοντες μεταγραφής με απόκριση σε γλυκοκορτικοστεροειδή- συνθετικό ανάλογο: δεξαμεθαζόνη- , οιστρογόνα και εκδυσόνη, θεσεις αναγνώρισης των οποίων έχουν συμπεριληφθεί στην περιοχή του προαγωγέα) *ΑΛΛΑ και απόκριση σε μη-στεροειδή ανταγωνιστή εκδυσόνης RH5992 (tebufenozone): ευρέως χρησιμοποιούμενο αγροχημικό*

- *προαγωγέας απόκρισης σε χαλκό*

(ρυθμιστικό σύστημα μεταλλοθειονίνης ζυμών)

(2) συστήματα που προέρχονται από φυτά ως αντίδραση σε περιβαλλοντικές συνθήκες

Χειμαιρικοί (συνήθως με το βασικό προαγωγέα του 35S και αλληλουχίες δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων που αποκρίνονται σε συγκεκριμένα περιβαλλοντικά σήματα) ή ολόκληροι προαγωγείς

- Π.χ. *προαγωγείς απόκρισης σε τραυματισμό (wound inducible)*

(αναστολών πρωτεϊνών -proteinase inhibitors-Παράγοντες που μιμούνται την αντίδραση σε τραυματισμό (μεθυλ-ιασμονικό οξύ) επίσης χρησιμοποιούνται)

- *προαγωγείς απόκρισης σε θερμικό shock (θερμοεπαγώμενοι)*

(στοιχεία θερμικού σοκ-heat-shock elements, HSEs *hsp81.1*)

- *προαγωγείς απόκρισης σε παθογόνα*

(*pathogenesis-related PR1*,

Αναπτυξιακοί

συστήματα που προέρχονται από φυτά και στηρίζονται στον αναπτυξιακό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης (σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια του φυτού)

Χειμαιρικοί ή ολόκληροι προαγωγείς

- *προαγωγέας απόκρισης στο απισζικό οξύ (ABA)* (στοιχεία αλληλουχίας σε χειμαιρικούς προαγωγείς με 35S)

- *προαγωγέας έκφρασης κατά τη γήρανση (senescence-specific)*
(Senescence associated genes- SAG12 και SAG130)

- *προαγωγέας απόκρισης σε αυξίνη*

(στοιχεία αλληλουχίας απόκρισης σε αυξίνη- auxin response elements AuxREs- σε χειμαιρικούς προαγωγείς με 35S)

Δείκτες (γονίδια) επιλογής

- η έκφρασή τους παρέχει σαφή φαινοτυπική διάκριση ανάμεσα στα μεταμορφωμένα και μη κύτταρα
- η έκφρασή τους δεν τροποποιεί τη φυσιολογία του κυττάρου
- η χημική ουσία που χρησιμοποιείται για επιλογή επηρεάζει ελάχιστα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αναγέννηση και ανάπτυξη πλήρους φυτού

Παραδείγματα

- *nptII* –ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη [αντιβιοτικά]
(bleomycin, spectinomycin, hygromycin)
- *bar* -ανθεκτικότητα στο phosphinothricin (basta) [ζιζανιοκτόνα]
glyphosate
bialaphos
chlorsulfuron

Δείκτες (γονίδια) αναφοράς

Επιλογή μεταμορφωμένων φυτών με την αποτίμηση της έκφρασής τους σε βιοχημικό επίπεδο \Rightarrow ποσοτική, τοπική και χρονική έκφραση γονιδίων/υποκυτταρική θέση πρωτεϊνών

- το προϊόν τους δεν συντίθεται από το κύτταρο
- το προϊόν τους ή/και το προϊόν της ενζυμικής δραστηριότητας δεν είναι τοξικό για το κύτταρο
- το προϊόν τους έχει υψηλό βαθμό ενζυμικής δραστηριότητας, η οποία δεν αναστέλλεται από τις κυτταρικές χημικές ενώσεις
- το προϊόν τους είναι σταθερό
- η ενζυμική ανάλυση είναι απλή και ακριβής, μη δαπανηρή και ευαίσθητη
- είναι δυνατή η σύντηξη του ενζύμου αναφοράς με πολυπεπίδια χωρίς να χάνεται η ενζυμική δραστηριότητα

Δείκτες (γονίδια) αναφοράς

Παραδείγματα

uidA ή *gus* – β-glucuronidase από *E. coli*:

- ποσοτικός προσδιορισμός με μετρήσεις του φθορίζοντος υποστρώματος 4-MUG (4-methylumbelliferyl-β-glucuronide)
- ποιοτικός προσδιορισμός/ιστοχημικός εντοπισμός σε ιστούς και κύτταρα με κατακρήμνιση του χρωμογόνου υποστρώματος X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronide)
- “καταστρεπτική” μέθοδος, γρήγορη, εύκολη

gfp – Green Fluorescent Protein από *Aequorea victoria*

- κυρίως ποιοτική (απαραίτητη σε περιπτώσεις όπως σάρωση πρώτων μεταμορφωμένων φυτών, πειράματα time-course, ανάλυση μικρών φυταρίων)
- “μη καταστρεπτική”, γρήγορη και εύκολη αλλά απαιτεί την ύπαρξη απαραίτητου εξοπλισμού

luc* και *luxA/ luxB — luciferases από *Photinus pyralis* και *Vibrio harveyi*
οξείδωση D-luciferin παρουσία ATP με σύγχρονη και ταχύτατη εκπομπή φωτονίων
ποιοτική και ποσοτική,
“μη καταστρεπτική”, πολύ ακριβής και ευαίσθητη αλλά απαιτεί την ύπαρξη
φωτοπολλαπλασιαστών (photomultipliers, luminometers, film exposure)

cat — chloramphenicol acetyltransferase από *E. coli*
ημιποσοτική, πολύ ευαίσθητη αλλά απαιτεί τη χρήση ραδιενέργειας

