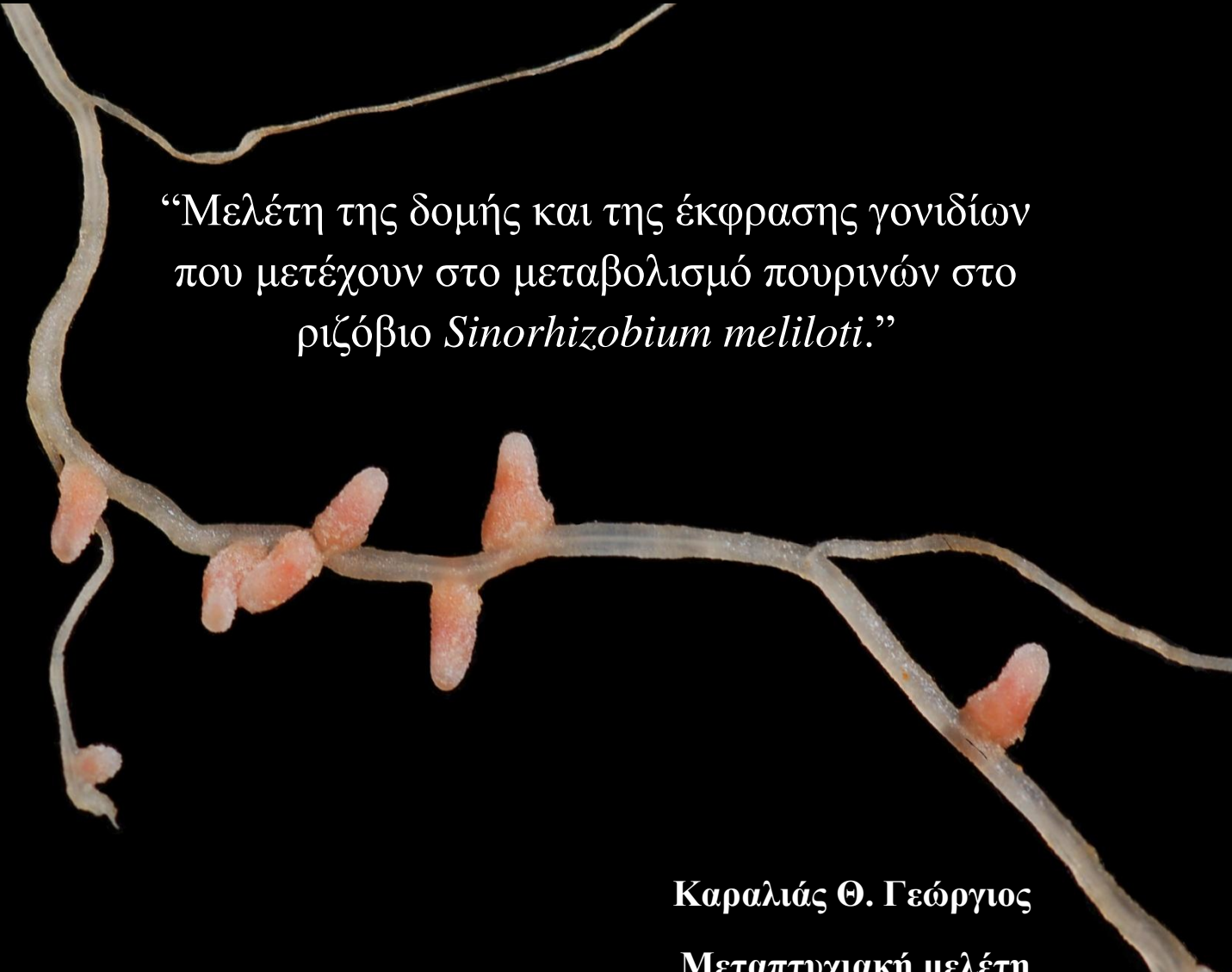


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: “Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη
Γεωργία”, Κατεύθυνση “Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά
Τροποποιημένων Οργανισμών”.



“Μελέτη της δομής και της έκφρασης γονιδίων
που μετέχουν στο μεταβολισμό πουρινών στο
ριζόβιο *Sinorhizobium meliloti*.”

Καραλιάς Θ. Γεώργιος

Μεταπτυχιακή μελέτη

Αθήνα, 2012

Επιβλέπων καθηγητής:

Φλεμετάκης Εμμανουήλ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: “Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωργία”, Κατεύθυνση “Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών”.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ & ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΟ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΣΤΟ ΡΙΖΟΒΙΟ
Sinorhizobium meliloti

Καραλιάς Θ. Γεώργιος
Μεταπτυχιακή Μελέτη
Αθήνα, 2012

Επιβλέπων καθηγητής: Φλεμετάκης Εμμανουήλ

Εικόνα εξωφύλλου: Ρίζα *Medicago truncatula* με εμφανή φυμάτια από συμβίωση με το ριζόβιο *Sinorhizobium meliloti*.

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: “Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωργία”, Κατεύθυνση “Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών”. Επιβλέπων Καθηγητής: Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ.

“Μελέτη της δομής και της έκφρασης γονιδίων που μετέχουν στο μεταβολισμό πουρινών στο ριζόβιο *Sinorhizobium meliloti*.”

Καραλιάς Θ. Γεώργιος

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (συνεδρία 15η, 27-06-2012) κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επ. Καθηγητής (Επιβλέπων)
2. Λάμπρου Νικόλαος, Αν. Καθηγητής (Μέλος)
3. Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Επ. Καθηγητής (Μέλος)

Πρόλογος & Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας υπό την άμεση επίβλεψη του Επίκουρου καθηγητή κ. Φλεμετάκη Εμμανουήλ στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοτεχνολογία & εφαρμογές στη γεωργία», με κατεύθυνση «Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών» .

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή κ. Φλεμετάκη Εμμανουήλ για την επιλογή του θέματος, το συνεχές ενδιαφέρον του για την πορεία του πειραματικού μέρους της εργασίας αλλά και για την κατανόηση του θεωρητικού πλαισίου μέσα στο οποίο εντάσσεται η συγκεκριμένη μελέτη. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, κ. Ν. Λάμπρου Αναπληρωτή Καθηγητή ΓΠΑ και κ. Ι. Χατζηπαυλίδη Επ. Καθηγητή ΓΠΑ, για το χρόνο που αφιέρωσαν να αναγνώσουν την παρούσα εργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την υποψήφια διδάκτορα Καλλονιάτη Χρυσάνθη για τη συνεργασία, την υπομονή, την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις της, καθώς και το μεταπτυχιακό φοιτητή Σκληρό Δημήτριο για την πολύτιμη βοήθειά του.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τα μέλη του εργαστηρίου της Μοριακής Βιολογίας για τις εξαιρετικές συνθήκες εργασίας και το φιλικό περιβάλλον το οποίο δημιούργησαν.

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος & Ευχαριστίες	7
1.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	13
1.2. Abstract	15
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	17
2.1. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥΡΙΝΩΝ	18
2.1.1. Οι πουρίνες.....	18
2.1.2. Μεταβολισμός πουρινών σε βακτηριακά συστήματα	18
2.1.2.1. <i>De novo</i> σύνθεση πουρινών.....	19
2.1.2.2. Περίσωση πουρινών	20
2.1.2.3. Αποικοδόμηση πουρινών	21
2.1.3. Καταβολισμός των πουρινών στα βακτήρια	23
2.2. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ.....	25
2.2.1. Μηχανισμοί των πρωτεϊνών διαμεμβρανικής μεταφοράς.....	25
2.2.2. Μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων.....	27
2.2.2.1. Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων	28
2.2.2.2. Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2.....	29
2.3. Η ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΗ ΣΧΕΣΗ ΨΥΧΑΝΘΩΝ/ΡΙΖΟΒΙΩΝ	30
2.3.1. Γενικά.....	30
2.3.2. Στάδια σχηματισμού των ριζικών φυματίων.....	31
2.3.3. Κατηγοριοποίηση φυματίων.....	32
2.3.4. Προσκόλληση και μόλυνση - βακτηροειδή.....	34
2.3.5. Σχηματισμός φυματίων	35
2.3.6. Βιοχημεία της αζωτοδέσμευσης στα φυμάτια.....	36
2.3.7. Λειτουργικός χαρακτηρισμός της βιολογίας των φυματίων μέσω των ομικών προσεγγίσεων	37
2.3.8. Το <i>M. truncatula</i>	38
2.3.8.1. Το <i>M. truncatula</i> ως φυτό-μοντέλο	38
2.3.8.2. Η πρωτοβουλία της αλληλούχισης του γονιδιώματος του <i>M. truncatula</i>	39
2.3.8.3. Πρακτικές χρήσεις του γονιδιώματος του <i>M. truncatula</i>	39
2.4. ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Sinorhizobium meliloti</i>	40
2.4.1. Γενικά.....	40
2.4.2. Το γένωμα του <i>S. meliloti</i>	40
3. ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ.....	43

3.1. Το ριζόβιο <i>S. meliloti</i> και το ψυχανθές <i>M. truncatula</i>	44
3.2. Προβλάστηση σπόρων <i>M. truncatula</i>	44
3.3. Προετοιμασία ριζοβίων για εμβολιασμό των φυτών.....	44
3.4. Μεταφορά σπόρων και ανάπτυξη φυτών	44
3.5. Συλλογή φυματίων <i>M. truncatula/S. meliloti</i> 1021	45
3.6. Καλλιέργεια ριζοβίων.....	45
3.7. Συλλογή κυττάρων ριζοβίων	45
3.8. Απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA από βακτηριακά.....	46
3.8.1. Απομόνωση ολικού βακτηριακού RNA.....	46
3.8.2. Απομόνωση ολικού RNA από φυμάτια.....	46
3.8.3. Καθαρισμός ολικού RNA.....	47
3.8.4. Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη.	48
3.9. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων	48
3.9.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των	48
3.9.2. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτική αгарόζης	49
3.10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	50
3.11. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα μόρια RNA (RT-PCR)	52
3.12. Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με	53
3.13. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	55
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	56
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
4.1. Μελέτη προτύπου έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα & πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό και τη μεταφορά πουρινών στο <i>S. meliloti</i>	60
4.2. <i>In silico</i> ανάλυση γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που μετέχουν στο μεταβολισμό των πουρινών καθώς και για πρωτεΐνες που μετέχουν στη μεταφορά πουρινών στο <i>S. meliloti</i> 1021	61
4.3. Οργάνωση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών	63
4.4. Ένζυμα που κωδικοποιούνται από γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών.....	63
4.5. Σχεδιασμός εξειδικευμένων εκκινητών, υπολογισμός σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων & στατιστική ανάλυση	64
4.6. Μελέτη προτύπου έκφρασης του γονιδίου <i>SM_b21277</i>	66
4.7. Μελέτη προτύπου έκφρασης του γονιδίου <i>SM_b21280</i>	68
4.8. Μελέτη προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για απαμινάση γουανίνης.....	69
4.9. Μελέτη προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για απαμινάση αδενίνης	70

4.10. Μελέτη προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για την αφυδρογονάση ξανθίνης.....	71
4.11. Μελέτη προτύπου έκφρασης του γονιδίου <i>SM_b21284</i>	75
4.12. Μελέτη προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για την υδρολάση του 5-υδροξυ-ισοουρικού.....	76
4.13. Μελέτη προτύπου έκφρασης του γονιδίου <i>SM_b20874</i>	77
4.14. Μελέτη προτύπου έκφρασης του γονιδίου <i>SM_b20875</i>	78
4.15. Μελέτη προτύπου έκφρασης του γονιδίου <i>SM_b21283</i>	79
4.16. Μελέτη προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για.....	80
4.17. Μελέτη προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταφορείς πουρινών ...	81
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	83
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	87
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	91

1.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση λαμβάνει χώρα στις ρίζες των ψυχανθών φυτών σε ειδικά οργανίδια, τα οποία ονομάζονται φυμάτια, και σχηματίζονται κατά τη συμβίωση ενός ψυχανθούς με συγκεκριμένου τύπου βακτήρια, που ονομάζονται ριζόβια. Τα ριζόβια μολύνουν τις ρίζες των ψυχανθών, και στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε ειδικές συμβιωτικές μορφές (βακτηροειδή), οι οποίες μπορούν να δεσμεύσουν ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) το οποίο θα χρησιμοποιηθεί από το ψυχανθές. Το φυμάτιο αποτελεί ένα ειδικό περιβάλλον, το οποίο απαιτεί αλλαγές στο μεταβολισμό από πλευράς ριζοβίων, έτσι ώστε να προσαρμοστούν σε αυτό το νέο περιβάλλον. Κατά τη συμβίωση του ριζοβίου *Sinorhizobium meliloti* με το ψυχανθές *Medicago truncatula*, σχηματίζονται μη-καθορισμένου τύπου φυμάτια, στα οποία δημιουργείται συνεχώς νέος ιστός μέσω της λειτουργίας του επάκριου μεριστώματος, καθώς και συνεχής διαφοροποίηση βακτηροειδών που μολύνουν τον κεντρικό ιστό. Αυτό οδηγεί σε συνεχή ανάγκη παροχής νουκλεοτιδίων, και υποδεικνύει ότι μία ενεργή μεταφορά και ένα ενεργό μεταβολικό μονοπάτι πουρινών μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Οι πουρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως συστατικά των νουκλεοτιδίων (*de novo* σύνθεση ή περίσωση πουρινών), είτε ως πηγές αζώτου κατά τον καταβολισμό τους. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που συμμετέχουν στο μονοπάτι του μεταβολισμού των πουρινών, καθώς και για μεταφορείς πουρινών, στο ριζόβιο *S. meliloti*. Για την επίτευξη αυτού του στόχου εντοπίστηκαν τα γονίδια αυτά σε δημόσιες βάσεις δεδομένων, σχεδιάστηκαν εξειδικευμένα ζεύγη εκκινητών και στη συνέχεια, με τη μέθοδο του ποσοτικού PCR πραγματικού χρόνου μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε φυμάτια 14, 21 & 28 ημερών του φυτού *M. truncatula* μολυσμένο με ριζόβια *S. meliloti* 1021, καθώς και ελεύθερα διαβιούντων *S. meliloti* 1021 στην εκθετική και στατική φάση ανάπτυξής τους, τα οποία είχαν αναπτυχθεί με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου (NH_4 , ξανθίνη, ουρικό οξύ). Παρατηρήθηκε επαγωγή των ενζύμων καταβολισμού και μεταφορέων στους χειρισμούς ξανθίνης και ουρικού οξέος των ελεύθερα διαβιούντων ριζοβίων, καθώς και επαγωγή ορισμένων ενζύμων ή υπομονάδων τους στα φυμάτια (*SMc01533*, *SM_b21558*, *SM_b21284*, *SM_b21283*). Τέλος, παρατηρήθηκε επαγωγή στα φυμάτια ενός μεταφορέα ξανθίνης (*SMc02513*).

Λέξεις κλειδιά: συμβιωτική αζωτοδέσμευση, ριζόβιο, ψυχανθές, μη-καθορισμένου τύπου φυμάτια, μεταβολισμός πουρινών, μεταφορά πουρινών, *S. meliloti*, *M. truncatula*, ποσοτική real-time PCR.

1.2. Abstract

Symbiotic nitrogen fixation (SNF) takes place in the roots of legumes plants, in organelles known as nodules. Nodules are formed during the symbiosis of a legume, with a host-specific strain of bacteria, known as rhizobia. Rhizobia infect the plant roots and subsequently differentiate to nitrogen fixing bacteroids. The nodule represents a special environment that requires metabolic changes for the adaptation of the bacteria in these new conditions. During symbiosis of *Sinorhizobium meliloti* with *Medicago truncatula*, indeterminate type nodules are formed, which maintain an active apical meristem that produces new cells over the life of the nodule, which in turn differentiate to bacteroids increasing their cell size and undergoing DNA endoreplication. This results in a constant need for nucleotide provision and implies that active purine transport and metabolism can play a significant role during SNF. Purines can be used either as nucleotide constituents (*de novo* synthesis or purine salvage), or as nitrogen sources during their catabolism. The objective of this study is the study of genes coding for, enzymes belonging to the purine metabolic pathway and purine transporters in rhizobia *S. meliloti* 1021. For this purpose genes of interest were identified in public databases. Then, using the method of quantitative real-time RT-PCR, the expression levels of these genes were measured in nodules harvested 14, 21 & 28 days post inoculation, of the plant *M. truncatula* infected with *S. meliloti* 1021 and free-living *S. meliloti* 1021 bacteria developed with a different, sole nitrogen source (NH₄, xanthine and uric acid) in their exponential and stationary growth phase. Genes belonging to the catabolic part of the purine metabolic pathway were upregulated in the growth media containing xanthine & uric acid, and also certain genes coding for enzymes or enzymatic subunits were upregulated during nodulation (*SMc01533*, *SM_b21558*, *SM_b21283*, *SM_b21284*). One permease (*SMc02513*) was found to be highly upregulated in the nodules.

Keywords: symbiotic nitrogen fixation, rhizobium, legume, indeterminate-type nodules, purine metabolism, purine transport, qPCR, *S. meliloti*, *M. truncatula*.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥΡΙΝΩΝ

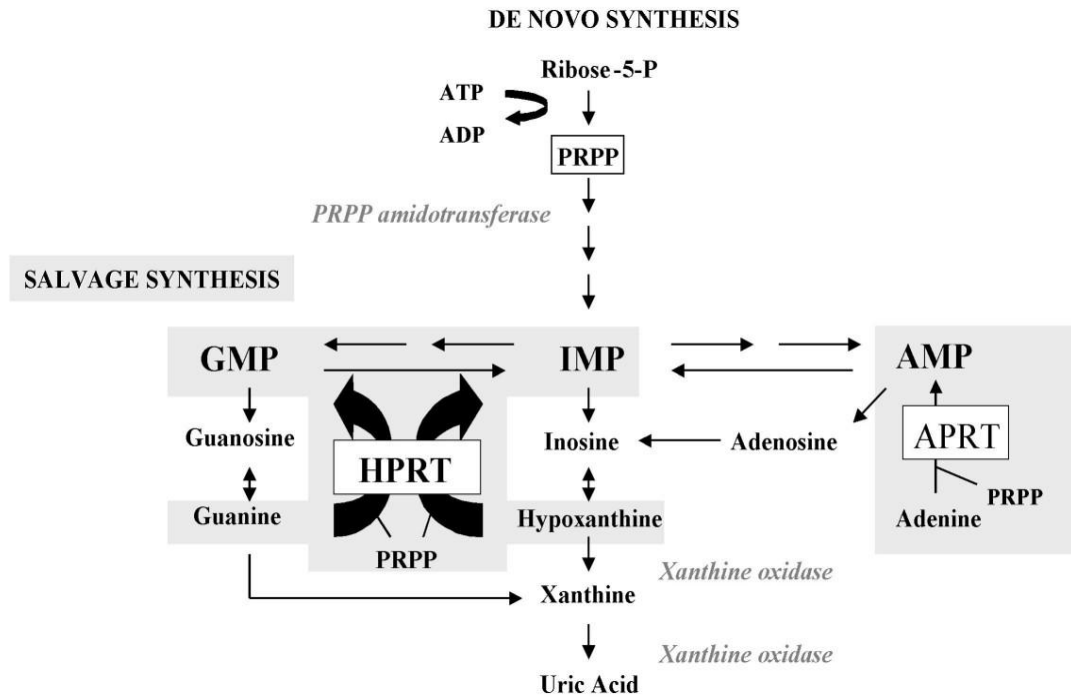
Μεταβολικά μονοπάτια που συναντώνται σε πολλούς οργανισμούς για τη σύνθεση ή την αποικοδόμηση πουρινών.

2.1.1. Οι πουρίνες

Οι πουρίνες είναι νουκλεοτιδικές βάσεις (μαζί με τις πυριμιδίνες) που εμπλέκονται σε ζωτικής σημασίας κυτταρικές διεργασίες σε όλους τους οργανισμούς, καθώς αποτελούν απαραίτητα συστατικά των νουκλεοτιδίων των νουκλεϊκών οξέων αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και καταβολικά ως πηγές αζώτου ή άνθρακα. Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), που περιέχει την πουρίνη αδενίνη, αποτελεί παγκόσμιο «νόμισμα» ελεύθερης ενέργειας σε όλα τα βιολογικά συστήματα ενώ παράγωγα νουκλεοτιδίων συμμετέχουν σε βιοσυνθετικές διεργασίες, όπως για παράδειγμα η UDP-γλυκόζη στη σύνθεση του γλυκογόνου. Κυκλικά νουκλεοτίδια όπως τα cAMP και cGMP αποτελούν «αγγελιοφόρους» που μεταβιβάζουν ενδοκυτταρικά και διακυτταρικά σήματα (Berg *et al.*, 2005). Οι νουκλεοτιδικές βάσεις παίζουν κεντρικό ρόλο και στα φυτά, όπου εκτός από τη σύνθεση του DNA και RNA σε όλους τους φυτικούς οργανισμούς, στα τροπικά όσπρια, η μεταφορά και αποθήκευση του αζώτου με τη μορφή ουρεΐδων (αλλαντοΐνη, αλλαντοϊκό) εξαρτάται από τη βιοσύνθεση και τον καταβολισμό των νουκλεοτιδικών βάσεων (Schubert and Boland, 1990). Παράγωγα νουκλεοτιδικών βάσεων είναι ενώσεις όπως κυτοκινίνες, καφεΐνη και αλκαλοειδή, ενώ παράλληλα, η αδενίνη, γουανίνη, υποξανθίνη και ξανθίνη μπορούν να αποτελέσουν και μοναδικές πηγές αζώτου για κάποιους μικροοργανισμούς (Vogels and van der Drift, 1976). Στα θηλαστικά, η αδενίνη, η γουανίνη και η υποξανθίνη οδηγούνται στα μονοπάτια ανακύκλωσης πουρινών για την παραγωγή ATP και GTP και για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, ή οξειδώνονται καταβολικά σε ξανθίνη ή ουρικό οξύ ή ουρεΐδες (Fox and Kelley, 1978). Το ουρικό οξύ ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο, έχει επιπρόσθετη σημασία λόγω της ιδιότητάς του να δρα ως αντιοξειδωτικό στον ορό του αίματος (Enomoto *et al.*, 2002).

2.1.2. Μεταβολισμός πουρινών σε βακτηριακά συστήματα

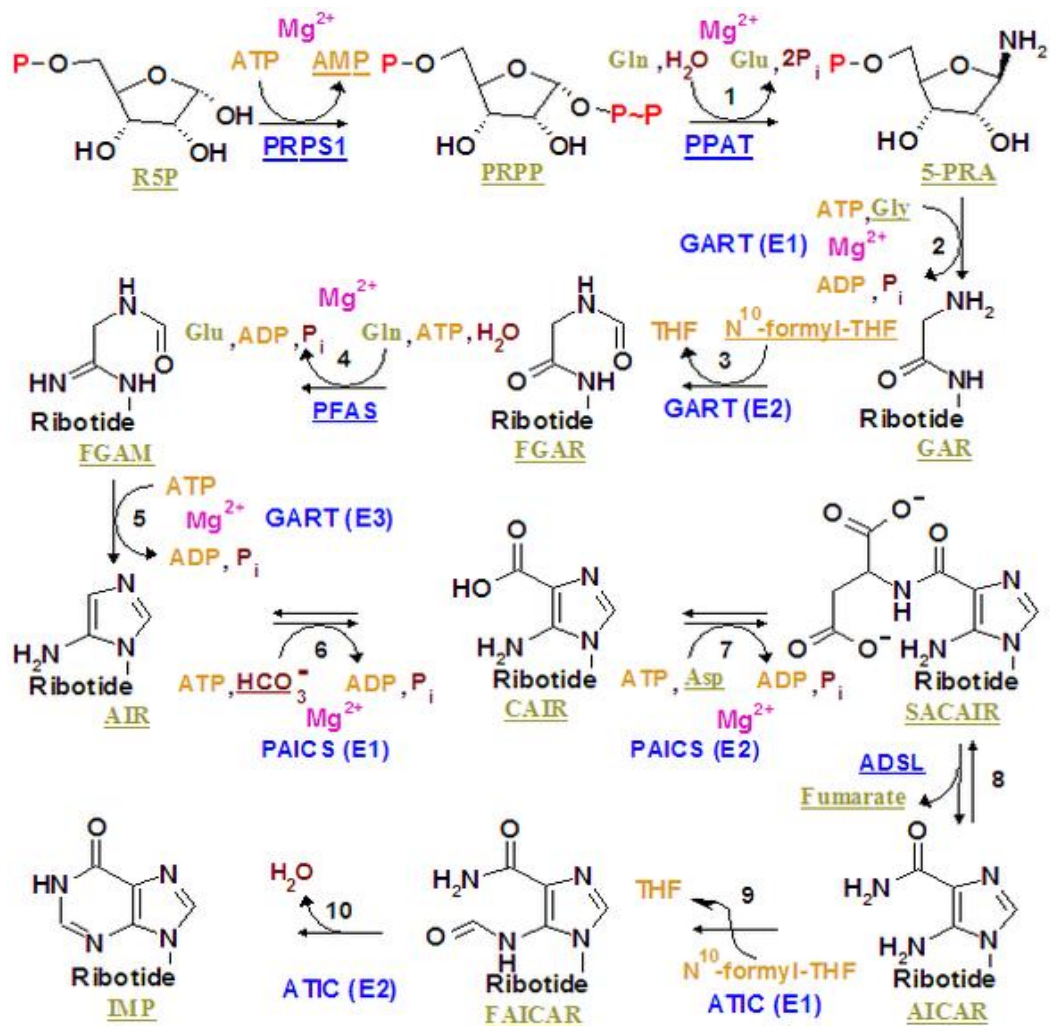
Οι πουρινικές βάσεις μπορούν να συντεθούν *de novo* ξεκινώντας από απλά αρχικά συστατικά όπως 5-φωσφοριβολυζο-1-πυροφωσφορικό (PRPP), αμινοξέα, CO₂ και όξινο ανθρακικό. Εναλλακτικά, βάσεις πουρινών που απελευθερώνονται από την αποικοδόμηση των νουκλεϊκών οξέων και νουκλεοτιδίων, μπορούν να ανακυκλωθούν με ιδιαίτερη εξοικονόμηση ενέργειας μέσω των μονοπατιών περίσωσης (purine salvage pathways) ή τέλος, να καταβολιστούν περαιτέρω και να χρησιμοποιηθούν ως πηγές αζώτου. Ακολούθως, πραγματοποιείται περαιτέρω αποικοδόμηση η οποία ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων ειδών οργανισμών (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση μεταβολικού μονοπατιού πουρινών.

2.1.2.1. *De novo* σύνθεση πουρινών

Ένα κύριο βήμα, για τη *de novo* βιοσύνθεση των πουρινών, είναι η παραγωγή 5-φωσφοριβουλοζο-1-πυροφωσφορικού (PRPP) από τη συνθετάση του PRPP. Δεν είναι όμως «δεσμευτικό» βήμα για την βιοσύνθεση των πουρινών, καθώς το PRPP μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη σύνθεση πυριμιδινών, καθώς και σε μονοπάτια ανακύκλωσης. Το πρώτο «δεσμευτικό» βήμα είναι η αντίδραση του PRPP με γλουταμίνη και νερό προς 5-φωσφοριβοζυλαμίνη, γλουταμικό και πυροφωσφορικό που καταλύεται από την αμιδοτρανσφεράση του πυροφωσφορικού. Στη συνέχεια μέσω πέντε αντιδράσεων παράγεται μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP) η οποία είναι πρόδρομο ένωση τόσο της αδενίνης, όσο και της πουρίνης (εικόνα 2).

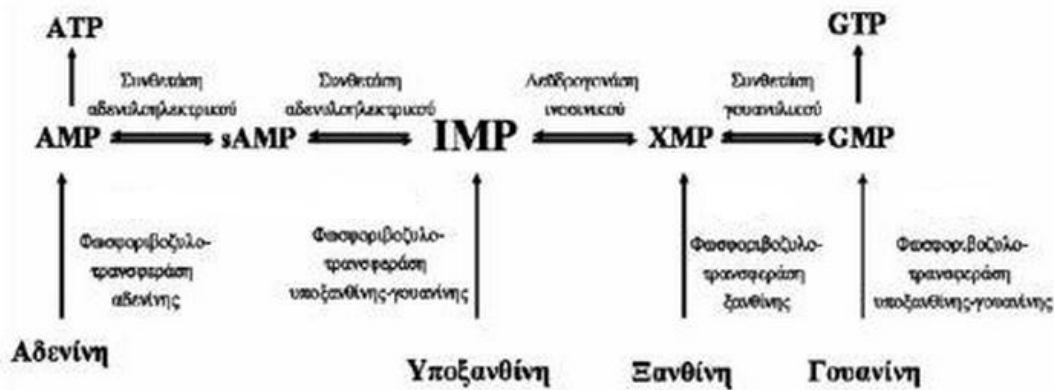


Εικόνα 2: *de novo* σύνθεση IMP.

Η IMP μπορεί να μετατραπεί σε μονοφωσφορική γουανίνη (GMP) μέσω της συνθάσης GMP και σε μονοφωσφορικής αδενίνη (AMP) για παραγωγή γουανίνης και αδενίνης, αντίστοιχα.

2.1.2.2. Περίσωση πουρινών

Πουρίνες από ανακύκλωση νουκλεϊκών οξέων (ή από τη διατροφή) μπορούν να περισωθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν σε νέα νουκλεοτίδια. Το ένζυμο φωσφοριβοσυλ-τρανσφεράση της αδενίνης (APRT) μπορεί να περισώσει αδενίνη, ενώ η φωσφοριβοσυλ-τρανσφεράση της υποξανθίνης/γουανίνης (HGPRT) μπορεί να περισώσει υποξανθίνη και γουανίνη (εικόνα 3).



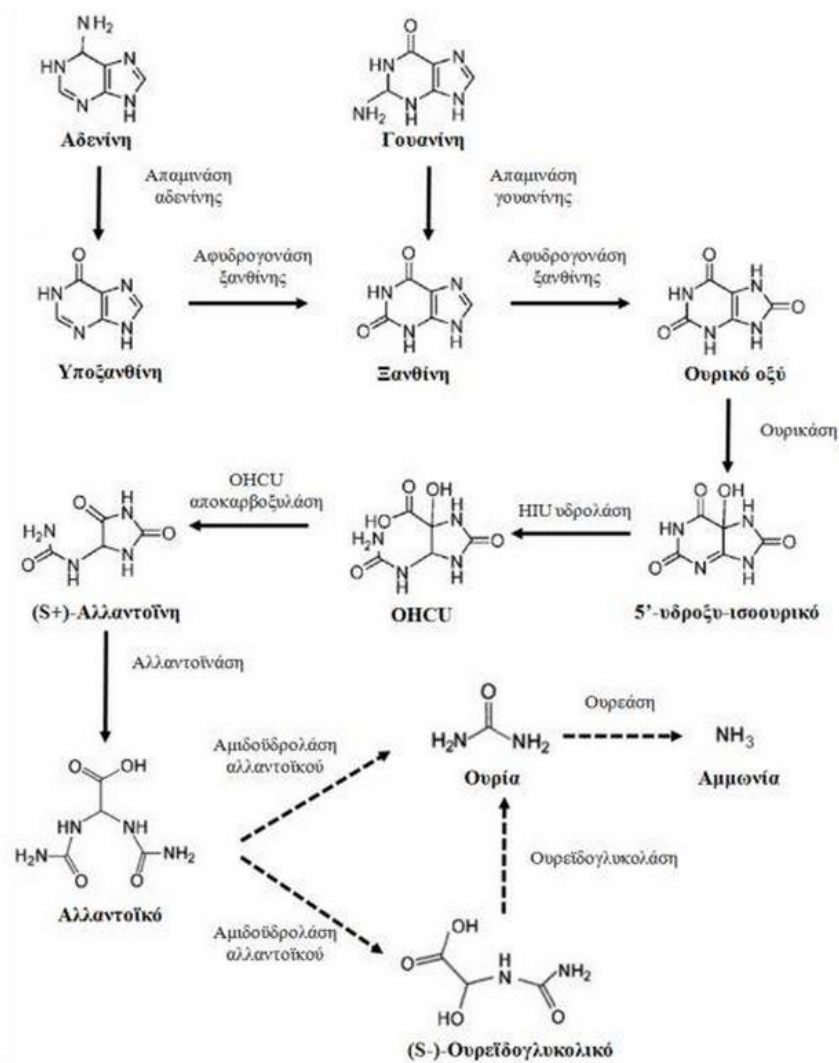
Εικόνα 3: Μονοπάτι περίσωσης πουρινών.

2.1.2.3. Αποικοδόμηση πουρινών

Η αδενίνη και η γουανίνη μετατρέπονται με τις αντίστοιχες απαμινάσες σε υποξανθίνη και ξανθίνη. Με το ένζυμο αφυδρογονάση της ξανθίνης η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και αυτή με τη σειρά της σε ουρικό οξύ (εικόνα 4). Αυτό είναι το βασικό στάδιο του καταβολισμού των πουρινών, καθώς αυτή η μετατροπή σε ουρικό οξύ απομακρύνει τις πουρίνες από τα μονοπάτια περίσωσης. Στη συνέχεια το ουρικό οξύ μετατρέπεται σε αλλαντοΐνη, με μια πορεία της οποίας τα στάδια μόλις πρόσφατα χαρακτηρίστηκαν πλήρως (Lee *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006). Κατά την πορεία αυτή, το ουρικό οξύ μετατρέπεται σε 5-υδροξυ-ισουουρικό (HIU) με τη δράση της ουρικάσης (οξειδάση του ουρικού οξέος). Το 5-υδροξυ-ισουουρικό μπορεί να μετατραπεί σε αλλαντοΐνη με μία αυθόρμητη αντίδραση (χρόνος ημιζωής *in vitro* περί τα 30 min), παράγοντας ρακεμικό μείγμα αλλαντοΐνης. Επειδή όμως το ένζυμο αλλαντοϊνάση αναγνωρίζει ειδικά (S+)-αλλαντοΐνη, βρέθηκε ότι υπάρχει ένα ενδιάμεσο βήμα κατά το οποίο το HIU μετατρέπεται ενζυμικά με τη δράση της υδρολάσης του HIU σε 2-οξο-4-υδροξυ-4-καρβοξυ-5-ουρεΐδοϊμιδαζολίνη (OCHU) η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε (S+)-αλλαντοΐνη με δράση της αποκαρβοξυλάσης της OCHU. Η (S+)-αλλαντοΐνη μέσω της αλλαντοϊνάσης δίνει αλλαντοϊκό, και το αλλαντοϊκό με τη σειρά του μπορεί να μετατραπεί σε ουρεΐδογλυκολικό με τη δράση της αμιδροϋλάσης του αλλαντοϊκού. Το ουρεΐδογλυκολικό στη συνέχεια, με τη δράση της ουρεΐδογλυκάσης μετατρέπεται σε ουρία, και η ουρία σε αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα μέσω της ουρέασης. Από το στάδιο του αλλαντοϊκού και μετά, υπάρχουν αρκετά εναλλακτικά καταβολικά μονοπάτια.

Μερικοί οργανισμοί αποικοδομούν τις πουρίνες πλήρως σε CO₂ και αμμωνία, ενώ άλλοι οργανισμοί διαθέτουν μερικά μόνο στάδια καταβολισμού των πουρινών, με αποτέλεσμα τη μερική αποικοδόμησή τους. Στον άνθρωπο για παράδειγμα, τελικό προϊόν του καταβολισμού των πουρινών είναι το ουρικό οξύ, λόγω απουσίας των ενζύμων που είναι απαραίτητα για τον περαιτέρω καταβολισμό του. Έρευνες έχουν δείξει ότι στον άνθρωπο η ουρικάση που είναι υπεύθυνη για την οξείδωση του

ουρικού οξέος, κωδικοποιείται από ψευδογονίδιο (Oda *et al.*, 2002). Στα περισσότερα φυτά, τελικά προϊόντα αποικοδόμησης των πουρινών είναι το CO₂ και η αμμωνία. (Ashihara and Crozier, 2000). Στις ρίζες των ψυχανθών το άζωτο που δεσμεύεται από τα βακτήρια μετατρέπεται σε αλλαντοΐνη και αλλαντοϊκό για την ευκολότερη μεταφορά αζώτου σε ιστούς, καθώς οι ενώσεις αυτές έχουν αναλογία αζώτου προς άνθρακα 1:1 (Rao *et al.*, 2007; Quiles *et al.*, 2009). Τα περισσότερα βακτήρια και μύκητες καταβολίζουν τις πουρίνες πλήρως σε ουρία και αμμωνία (Scazzocchio 1994; Schultz *et al.*, 2001). Σημαντική εξαίρεση, μεταξύ άλλων, αποτελεί το εντεροβακτήριο *Escherichia coli*, στο οποίο ο καταβολισμός των πουρινών φαίνεται να φθάνει μέχρι το στάδιο παραγωγής αλλαντοΐνης ή αλλαντοϊκού (Xi *et al.*, 2000).



Εικόνα 4: Μονοπάτι καταβολισμού πουρινών.

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως στα είδη των γενών *Bacillus*, *Clebsiella* και *Escherichia*, τα γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα του μεταβολισμού των πουρινών, καθώς και τα αντίστοιχα γονίδια που κωδικοποιούν για μεταφορείς πουρινών, είναι οργανωμένα σε οπερόνια και ρυθμίζονται σε

μεταγραφικό επίπεδο από τη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων τους στο θρεπτικό μέσο.

2.1.3. Καταβολισμός των πουρινών στα βακτήρια

Το Gram⁺ βακτήριο του εδάφους *Bacillus subtilis* έχει αναπτύξει ένα ιδιαίτερα ελεγχόμενο σύστημα για τη χρήση μιας σειράς μικρομοριακών ενώσεων ως πηγών αζώτου, όταν οι προτιμώμενες πηγές αζώτου (π.χ. γλουταμικό και αμμωνία) εξαντλούνται από το θρεπτικό μέσο. Ένα σύστημα τέτοιου τύπου έχει προσδιορισθεί στο είδος αυτό και για τη χρήση πουρινών ως πηγών άζωτο. Πράγματι, τόσο η αδερίνη, η υποξανθίνη και η ξανθίνη, όσο και το ουρικό, η αλλαντοΐνη και η ουρία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο *B. subtilis* ως πηγές αζώτου (Christiansen *et al.*, 1997; Cruz-Ramos *et al.*, 1997). Μελέτες αερόβιας ανάπτυξης στελεχών του *B. subtilis* υπέδειξαν ότι ο καταβολισμός των πουρινών φτάνει μέχρι την παραγωγή αμμωνίας και διοξειδίου του άνθρακα (Christiansen *et al.*, 1997; Nygaard *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2001). Συγκεκριμένα, ο καταβολισμός της γουανίνης σε ξανθίνη, το πρώτο βήμα αποικοδόμησης της γουανίνης, πραγματοποιείται από το ένζυμο απαμινάση της γουανίνης. Η ενεργότητα του ενζύμου αυτού, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *gde*, επάγεται όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο (Nygaard *et al.*, 2000). Επίσης, 14 γονίδια που βρίσκονται σε μια ομάδα (cluster) γονιδίων στο 284-285 min του γονιδιώματος του *B. subtilis*, οργανώνονται σε μικρά οπερόνια, κωδικοποιούν για πρωτεΐνες ή ένζυμα που εμπλέκονται στο μονοπάτι καταβολισμού και μεταφοράς των πουρινών και επάγονται από την παρουσία πουρινών στο θρεπτικό μέσο (Schultz *et al.*, 2001). Η δυνατότητα του *B. subtilis* να χρησιμοποιεί τις πουρίνες ως μοναδική πηγή αζώτου και η οργάνωση σε οπερόνια των αντίστοιχων γονιδίων έδωσε τη δυνατότητα να μελετηθεί πιο αναλυτικά ο καταβολισμός των πουρινών, και να εξιχνιαστεί η πορεία της μετατροπής του ουρικού οξέος σε αλλαντοΐνη (Lee *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006).

Στην περίπτωση του μεταφορέα ξανθίνης PbuX του *B. subtilis*, η έκφραση των γονιδίων του αντίστοιχου οπερονίου εξαρτάται από τη δράση του μεταγραφικού αναστολέα PurR και από την ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων 5-φωσφοριβοζυλο-1-πυροσφωρικού (PRPP). Ο μεταγραφικός αναστολέας PurR συνδέεται στους υποκινητές των εκάστοτε γονιδίων, αναστέλλοντας τη μεταγραφή τους. Όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει πουρίνες, αυξάνονται τα επίπεδα του PRPP, το οποίο με τη σειρά του συνδέεται με το μεταγραφικό αναστολέα PurR, εμποδίζοντάς τον να συνδεθεί στον υποκινητή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων (Schultz *et al.*, 2001). Στον ίδιο οργανισμό έχει χαρακτηριστεί και ένας δεύτερος μηχανισμός ρύθμισης γονιδίων που εμπλέκονται με τη μεταφορά (PbuX μεταφορέας ξανθίνης, PbuG μεταφορέας υποξανθίνης/γουανίνης) και τη σύνθεση των πουρινών (Johansen *et al.*, 2003). Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, η παρουσία υποξανθίνης και γουανίνης στο

θρεπτικό μέσο, οδηγεί στο σχηματισμό πρόωρου σήματος τερματισμού της μεταγραφής, εμποδίζοντας την RNA πολυμεράση να ολοκληρώσει τη μεταγραφή, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρότερων, σε σχέση με τα λειτουργικά, μεταγραφημάτων (Christiansen *et al.*, 1997; Johansen *et al.*, 2003). Η μεταμεταγραφική αυτή ρύθμιση αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς του γενικότερου τύπου ρύθμισης, που είναι γνωστός με το όνομα “riboswitches” (Mandal *et al.*, 2003; Mandal and Breaker, 2004).

Το Gram⁻ παθογόνο βακτήριο *Klebsiella pneumonia* μπορεί και χρησιμοποιεί την αδενίνη και την υποξανθίνη ως μοναδικές πηγές αζώτου σε αερόβιες συνθήκες, και πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε το γενετικό σύστημα για τη μετατροπή της υποξανθίνης σε αλλαντοΐνη (de la Riva *et al.*, 2008; O’Leary *et al.*, 2009). Πρόκειται για το *hpx* σύστημα το οποίο περιέχει 7 γονίδια οργανωμένα σε 2 μικρά οπερόνια με το ρυθμιστικό μόριο να είναι το HpxR. Η ρυθμιστική αυτή πρωτεΐνη κρατά σε καταστολή το πρώτο οπερόνιο *hpxDE*, όταν υπάρχει μεγάλη διαθεσιμότητα αζώτου. Όταν αυτή η διαθεσιμότητα ελαττωθεί, η καταστολή μειώνεται και η παρουσία της υποξανθίνης έμμεσα οδηγεί σε απελευθέρωση της μεταγραφής του οπερονίου, το οποίο ελέγχει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και ουρικό οξύ. Η συσσώρευση του ουρικού οξέος προκαλεί την ενεργοποίηση του οπερονίου *hpxPQT*, το οποίο μαζί με το προϊόν του γονιδίου *hpxO* (HIU υδρολάση) είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή του ουρικού οξέος σε αλλαντοΐνη (de la Riva *et al.*, 2008).

Το Gram⁻ εντεροβακτήριο *E. coli*, σε αντίθεση με τα *B. subtilis*, *K. pneumonia* και άλλα βακτήρια, δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει άλλες πουρίνες εκτός από αδενίνη (ή αδενοσίνη) ως μοναδική πηγή αζώτου στην αερόβια ανάπτυξή του. Επίσης, έχειδειχθεί ότι μπορεί κάτω από αναερόβιες συνθήκες να χρησιμοποιήσει την αλλαντοΐνη ως μοναδική πηγή αζώτου (Cusa *et al.*, 1999). Μπορεί ωστόσο, να χρησιμοποιήσει πουρίνες όπως υποξανθίνη, γουανίνη (γουανοσίνη) ή ξανθίνη (ξανθοσίνη) για να ενδυναμώσει την αερόβια ανάπτυξη όταν χρησιμοποιείται αμμώνιο ή ασπαρτικό ως βασική πηγή αζώτου (Xi *et al.*, 2000; Karatza and Frillingos, 2005). Αν και οι παρατηρήσεις αυτές υπονοούν ότι οι εξωγενείς πουρίνες χρησιμοποιούνται κυρίως για τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων διαμέσου των μονοπατιών περίσωσης, είναι γνωστό ότι οι πουρίνες καταβολίζονται μερικώς μέχρι και την παραγωγή αλλαντοΐνης ή του αλλαντοϊνικού (Xi *et al.*, 2000). Είναι επομένως πιθανό, οι αντίστοιχοι μεταφορείς και ένζυμα να μην παράγονται ή να μην είναι ενεργά σε επίπεδα επαρκή ώστε να υποστηρίξουν την πλήρη ανάπτυξη, εξαιτίας χαμηλής ικανότητας πρόσληψης ή χαμηλής δραστηριότητας του υποκινητή ή ακόμα ανεπαρκούς ρύθμισης των αντίστοιχων γονιδίων στο μεταγραφικό επίπεδο (Xi *et al.*, 2000; Reitzer and Schneider, 2001).

Ωστόσο, ανάλυση του γονιδιώματος του *E. coli* με υπολογιστικά προγράμματα, υπέδειξε την ύπαρξη πέντε σ^{54} -εξαρτώμενων υποκινητών σε μια ομάδα (cluster) 23 γονιδίων στο 65 min του γονιδιώματος (Xi *et al.*, 2000). Τέτοιοι υποκινητές συνήθως ελέγχουν γονίδια, τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται στο μεταβολισμό του αζώτου, όπως η συνθετάση της γλουταμίνης και τα ένζυμα καταβολισμού της

αργινίνης (Schneider *et al.*, 1998). Ανάλυση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας των γονιδίων που βρίσκονται στην αντίστοιχη περιοχή δείχνει την ύπαρξη πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μεταφορά (Κ. Παπακώστας, Μεταπτυχιακή εργασία, 2010) και πιθανόν στο μεταβολισμό των πουρινών.

Στην παρούσα εργασία, θα μελετηθούν τα πρότυπα έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στο μεταβολισμό των πουρινών, καθώς και πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη μεταφορά πουρινών στο ριζόβιο *S. meliloti*.

2.2. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

2.2.1. Μηχανισμοί των πρωτεϊνών διαμεμβρανικής μεταφοράς

Από τη συστηματική ανάλυση των γονιδιωμάτων τόσο των ευκαρυωτικών όσο και των προκαρυωτικών οργανισμών, προκύπτει ότι, κατά μέσο όρο, 30% του συνόλου των γονιδιακών προϊόντων είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες. Το μεγαλύτερο μέρος από αυτές τις πρωτεΐνες (5-15% του συνόλου των γονιδιακών πρωτεϊνών, ανάλογα με το είδος του οργανισμού) είναι πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς (Markowitz *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2004). Αυτή η μεγάλη συχνότητα γονιδίων που κωδικοποιούν για μεμβρανικές πρωτεΐνες αντανακλά και τη μεγάλη βιολογική σημασία τους. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες διακρίνονται σε ενσωματωμένες (integral) και περιφερειακές (peripheral/extrinsic), ανάλογα με τη δομική-λειτουργική σχέση που έχουν με τη μεμβράνη. Οι ενδομεμβρανικές (ενσωματωμένες) είναι δυνατόν να λειτουργούν σε συνέργεια με τις περιφερειακές μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα στα συστήματα των μεμβρανικών υποδοχέων (integral) – πρωτεϊνικών κινασών (peripheral), έναν από τους γνωστούς μηχανισμούς μοριακής σηματοδότησης. Συνοπτικά, οι λειτουργικοί μηχανισμοί όπου συμμετέχουν μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να καταταγούν σε δύο ομάδες: μηχανισμοί μεταγωγής σήματος (signal transduction), που ελέγχουν την επικοινωνία και τις αλληλεπιδράσεις του κυττάρου με το περιβάλλον του ή με άλλα κύτταρα για παράδειγμα μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων, μια μηχανισμοί μεταγωγής ενέργειας (energy transduction), που αξιοποιούν ή δημιουργούν διαβαθμίσεις πρωτονίων (ηλεκτροχημικό δυναμικό) και χημική ενέργεια (ATP) και ρυθμίζουν τις συγκεντρώσεις ιόντων, μεταβολιτών, αλλά και κυτταροτοξικών ουσιών.

Οι πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς ανήκουν στη δεύτερη ομάδα, των μηχανισμών μεταγωγής ενέργειας, καθώς συμμετέχουν στη μεταφορά μορίων μέσω της μεμβράνης (μηχανικό έργο) και μπορούν να παράγουν διαβαθμίσεις συγκέντρωσης των υποστρωμάτων τους, αξιοποιώντας άλλες μορφές ενέργειας (διαβαθμίσεις ιόντων, ATP). Ταυτόχρονα βέβαια, η μεταφορά μορίων, απλών οργανικών ενώσεων και ιόντων, αποτελεί τη βάση της επικοινωνίας μεταξύ των

κυττάρων ή μεταξύ κυττάρων και περιβάλλοντος. Την ανάγκη αυτή εξασφαλίζουν πολλοί διαφορετικοί εξειδικευμένοι διαμεμβρανικοί μεταφορείς, διασφαλίζοντας την πρόσληψη θρεπτικών πηγών άνθρακα, αζώτου, θείου ή φωσφόρου, τη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης μεταβολιτών, τον έλεγχο της διαφοράς δυναμικού της μεμβράνης, του pH και των συνθηκών λειτουργίας ενζυμικών ή άλλων μηχανισμών του κυττάρου, τη ρύθμιση των μηχανισμών της μεταγωγής σήματος και του κύκλου λειτουργίας νευροδιαβιβαστών, ορμονών ή άλλων διακυτταρικών σημάτων και την άμυνα οργανισμού μέσω της ενεργού εκροής φαρμάκων, αντιβιοτικών, αντιϊκών παραγόντων και τοξινών ή τέλος, ρύθμιση της ανακατανομής αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως το ασκορβικό και το ουρικό οξύ (Hediger, 2002).

Για τις πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς έχει καθιερωθεί ένα διεθνές σύστημα φυλογενετικής-λειτουργικής ταξινόμησης και ονοματολογίας (Transport Commission, TC system, 1999) (<http://www.tcdb.org>) (Saier 2000; Saier *et al.*, 2009). Με βάση το σύστημα αυτό (εικόνα 5), οι πρωτεΐνες μεταφοράς ταξινομούνται σε διαύλους (channels) (TC1) και μεταφορείς (carriers) (TC2, TC3, TC4) (σχήμα 5), ενώ κατατάσσονται σε ξεχωριστές κατηγορίες οι μεταφορείς που συμμετέχουν στα συστήματα ροής ηλεκτρονίων (ETS) (TC5), οι πρωτεΐνες που λειτουργούν σε συνεργασία με άλλους, γνωστούς μεταφορείς (TC8), και πιθανοί μεταφορείς που δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως (TC9).

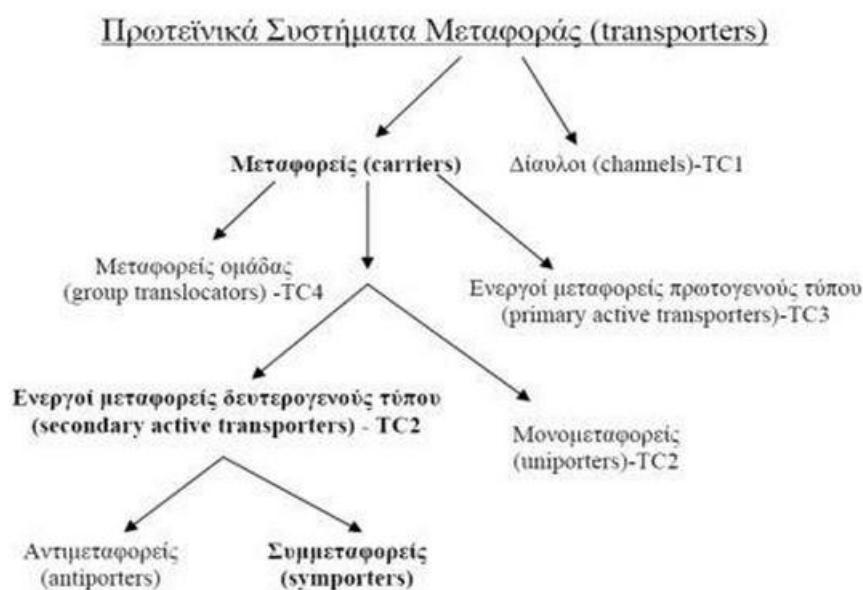
Οι διάυλοι (TC1) επιτελούν πάντα διευκολυνόμενη διάχυση, δηλαδή δε συσσωρεύουν, αλλά απλώς εξισορροπούν τις συγκεντρώσεις ιόντων ή μικρομορίων από τις δύο πλευρές της μεμβράνης και λειτουργούν με απλό τρόπο, εναλλάσσοντας μια ανοιχτή διαμόρφωση και μια κλειστή διαμόρφωση. Η εναλλαγή μεταξύ ανοιχτής και κλειστής διαμόρφωσης επιτυγχάνεται με ανταπόκριση είτε σε ειδικά χημικά σήματα, είτε στη διαφορά δυναμικού της μεμβράνης.

Οι μεταφορείς (TC2, TC3, TC4) επιτελούν κυρίως αντιδράσεις ενεργού μεταφοράς, που επιτρέπουν «ασύμμετρη» συσσώρευση ιόντων ή μικρομορίων από τις δύο πλευρές της μεμβράνης, ακόμη και αντίθετα με τη διαβάθμιση συγκέντρωσης και έχουν μεγαλύτερη ευελιξία διαμορφώσεων (Saier *et al.*, 2000). Για τις αντιδράσεις ενεργού μεταφοράς είναι απαραίτητα η αξιοποίηση μιας μορφής ενέργειας για τη μεταφορά ενός υποστρώματος από τη μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη. Η ενέργεια αυτή, μπορεί να προέρχεται είτε από μία «πρωτογενή» πηγή, όπως η υδρόλυση του ATP, οπότε οι μεταφορείς ονομάζονται πρωτεϊνικές ενεργού μεταφοράς πρωτογενούς τύπου (Primary TC3 active transporters) (Morth *et al.*, 2007; Shinoda *et al.*, 2009) είτε από μία «δευτερογενή» πηγή ενέργειας (ηλεκτροχημική διαβάθμιση ιόντων), οπότε έχουμε τις πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς δευτερογενούς τύπου (Secondary TC2 active transporters) (Guan and Kaback, 2006).

Στην κατηγορία των μεταφορέων δευτερογενούς τύπου κατατάσσονται συμμεταφορείς που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς δύο ειδών μορίων διαμέσου της μεμβράνης, προς την ίδια κατεύθυνση, και αντιμεταφορείς που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς δύο ειδών μορίων διαμέσου της μεμβράνης, προς αντίθετες

κατευθύνσεις. Στις ίδιες οικογένειες μπορεί να ανήκουν και μονομεταφορείς, οι οποίοι καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς ενός μόνο είδους μορίου διαμέσου της μεμβράνης, επιτελώντας διευκολυνόμενη διάχυση. Πολλοί μεταφορείς μπορούν να καταλύουν περισσότερες από μία αντιδράσεις, ενώ σημειακές μεταλλαγές μπορούν να μετατρέψουν συμμεταφορείς σε αντιμεταφορείς ή μονομεταφορείς (Franco and Brooker, 1994; Lolkema and Poolman 1995).

Τέλος, μια μικρή ομάδα πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς που εντοπίζονται μόνο στα βακτήρια (Barabote and Saier, 2005) και ονομάζονται μεταφορείς ομάδας (TC4, group translocators), τροποποιούν τα υποστρώματα τους κατά τη διαμεμβρανική μεταφορά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, το σύστημα φωσφοτρανσφεράσης (PTS) της γλυκόζης που χρησιμοποιεί το *E. coli* ως βασικό μηχανισμό πρόσληψης γλυκόζης και τροποποιεί το υπόστρωμα με φωσφορυλίωση κατά τη μεταφορά, ώστε να δεσμεύεται εξωκυτταρικά γλυκόζη, αλλά στο κυτταρόπλασμα να αποδίδεται 6-φωσφορική γλυκόζη. Η ενεργότητα της φωσφοτρανσφεράσης της γλυκόζης εξαρτάται από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP) (Tchieu *et al.*, 2001; Saier *et al.*, 2005) και ρυθμίζεται, σε πρωτεωμικό επίπεδο, από την αλληλεπίδραση με την κεντρική κυτταροπλασματική περιοχή της περιμεάσης λακτόζης LacY (Cochu *et al.*, 2005).



Εικόνα 5: Κατηγοριοποίηση πρωτεϊνικών συστημάτων μεταφοράς.

2.2.2. Μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων

Η πρόσληψη πουρινών και πυριμιδινών είναι βασική βιολογική διαδικασία τόσο στους προκαρυωτικούς, όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Μελέτες μοριακής γενετικής και φυσιολογίας αποδεικνύουν την ύπαρξη πολλών ειδικών συστημάτων μεταφοράς νουκλεοτιδικών βάσεων σε διάφορα είδη βακτηρίων

(Andersen *et al.*, 1995; Schultz *et al.*, 2001; Xi *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 2003; Karatza and Frillingos, 2005) και μυκήτων (Diallinas *et al.*, 1998; Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005, 2006; Vlanti *et al.*, 2006; Pantazopoulos and Diallinas, 2007; Hamari *et al.*, 2009), ενώ παρόμοια συστήματα είναι γνωστά σε πολλά είδη φυτών (Argyrou *et al.*, 2001; Maurino *et al.*, 2006), μεταζώων (Kato *et al.*, 2006), πρωτοκτίστων (de Koning *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2009) αλλά και τον άνθρωπο.

2.2.2.1. Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων

Οι γνωστοί μέχρι σήμερα μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων και οι πιθανές πρωτεΐνες που αντιστοιχούν σε γονίδια με ομολογίες αλληλουχίας έχουν ταξινομηθεί σε τέσσερις κύριες οικογένειες (Diallinas and Gournas, 2008), ενώ υπάρχουν και δύο ακόμη που περιορίζονται μόνο σε φυτά (Desimone *et al.*, 2002).

Ευρύτερα διαδεδομένη κατά την εξέλιξη είναι η οικογένεια των Μεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων-Ασκορβικού (Nucleobase-Ascorbate Transporters, NAT) (de Koning & Diallinas, 2000) ή οικογένεια-2 Συμμεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων-Κατιόντων (Nucleobase-Cation Symporters-2, NCS2) (TC 2.A.40), στην οποία θα αναφερθώ αναλυτικότερα στην επόμενη παράγραφο. Πρόκειται για οικογένεια με πάνω από 1000 μέλη από όλα τα φύλα οργανισμών, από τα αρχαία μέχρι των άνθρωπο, που όμως δεν έχει γνωστό πρότυπο δομής από κρυσταλλογραφική ανάλυση.

Η οικογένεια Μεταφορέων Πουρινών AzgA ανήκει στη Μείζονα Υπεροικογένεια Διευκολυνόμενης Μεταφοράς (Major Facilitator Superfamily, MFS) (TC 2.A.1.40) και αντιπροσωπεύεται κυρίως από τον μεταφορέα AzgA του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* που μεταφέρει αδενίνη/υποξανθίνη/γουανίνη (Cecchetto *et al.*, 2004; Goudela *et al.*, 2006, 2008).

Η οικογένεια Μεταφορέων Σχετιζόμενων με Πουρίνες (Purine Related Transporters, PRT) (de Koning & Diallinas, 2000) ή οικογένεια-1 Συμμεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων-Κατιόντων (Nucleobase-Cation Symporters-1, NCS1) (TC 2.A.39) περιλαμβάνει πάνω από 300 μέλη από αρχαία, βακτήρια, μύκητες και φυτά, αλλά δεν υπάρχει στα μετάρζωα.

Η οικογένεια Μεταφορέων Εξισορρόπησης συγκεντρώσεων Νουκλεοσιδίων (Equilibrative Nucleoside Transporters, ENT) (TC 2.A.57) περιλαμβάνει ευρείας εξειδίκευσης μεταφορείς νουκλεοσιδίων και/ή νουκλεοτιδικών βάσεων, καθώς και κυτταροτοξικών αναλόγων τους που χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά και αντιϊκά φάρμακα. Περιλαμβάνει ανάλογα από πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως μύκητες, πρωτόκτιστα και μετάρζωα, αλλά δε συναντάται σε προκαρυωτικούς οργανισμούς (de Koning *et al.*, 2005).

Δύο οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων απαντώνται μόνο στα φυτά, η οικογένεια των Περμεασών Οργανοκατιόντων των Φυτών (Plant

Organocation Oermease, POP) (TC 2.A.7.14) και η οικογένεια των Μεταφορέων Ενεργού Πρόσληψης Νουκλεοτιδικών βάσεων (Nucleobase Uptake Transporters, NBUT) (TC 2.A.4.7.19). Ο μόνος μεταφορέας της οικογένειας POP που έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά, είναι ο AtPUP1 του *Arabidopsis thaliana*, που είναι εξειδικευμένος μεταφορέας αδερίνης και κυτοσίνης (Gillissen *et al.*, 2000; Burkle *et al.*, 2003). Η οικογένεια NBUT αποτελείται από μεταφορείς που έχουν ως υποστρώματα ουρεΐδες, κυτοσίνη και ανάλογα πουρινών-πυριμιδινών.

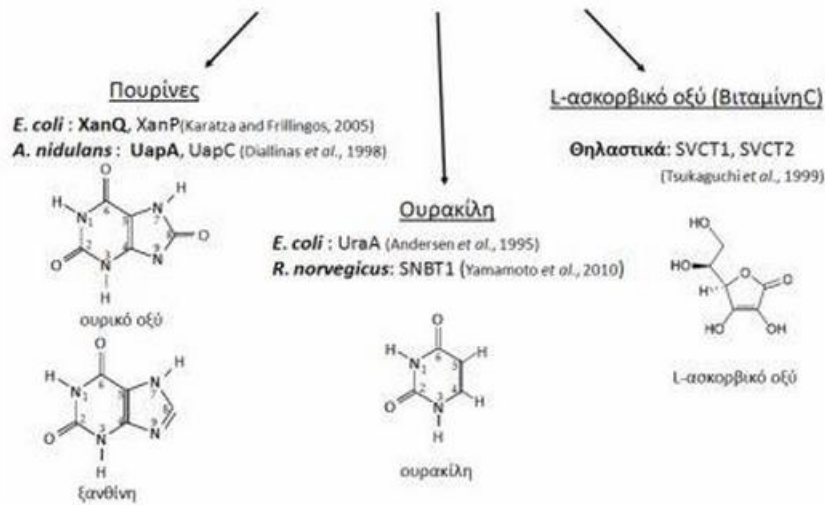
2.2.2.2. Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2

Η οικογένεια των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT/NCS2) είναι η μεγαλύτερη και πιο συντηρημένη οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων. Αν και περιλαμβάνει περισσότερες από 1000 πιθανές πρωτεΐνες από όλες τις ταξινομικές ομάδες οργανισμών, ελάχιστες έχουν ταυτοποιηθεί και μελετηθεί, με αποτέλεσμα να παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστοι οι μηχανισμοί λειτουργίας τους ή/και ο φυσιολογικός τους ρόλος. Επιπλέον, δεν υπάρχει διαθέσιμη καμία κρυσταλλική δομή που να επιτρέπει μοντελοποίηση των μεταφορέων NAT/NCS2 σε υψηλό επίπεδο ανάλυσης.

Τα μέλη της οικογένειας αυτής που προέρχονται από μικροοργανισμούς ή φυτά είναι ειδικοί μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων (de Koning and Diallinas, 2000; Gournas *et al.*, 2008), ενώ τα μέλη που προέρχονται από τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά μπορεί να υπάρχουν τόσο ομόλογα που μεταφέρουν ασκορβικό όσο και ομόλογα που μεταφέρουν ουρακίλη και πουρίνες (Yamamoto *et al.*, 2010) (εικόνα 6).

Σε σχέση με τα γνωστά υποστρώματα των μεταφορέων NAT/NCS2, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι ουρικό οξύ και ξανθίνη έχουν εντελώς διαφορετική δομή από το L-ασκορβικό. Αξίζει πάντως να σημειωθεί ότι το ουρικό και το ασκορβικό οξύ έχουν παρόμοιες και συμπληρωματικές λειτουργίες στα θηλαστικά, καθώς έχουν αντιοξειδωτική δράση, ενώ το ουρικό οξύ σταθεροποιεί το ασκορβικό οξύ στα βιολογικά υγρά (Ames *et al.*, 1981; Frei *et al.*, 1989; Nyssonen *et al.*, 1997; Sevanian *et al.*, 1991).

Οικογένεια NAT/NCS2 συμμεταφορείς νουκλεοβάσεων : κατιόντων



Εικόνα 6: NAT/NCS2 οικογένεια συμμεταφορέων.

Αναλύσεις των γνωστών γονιδιωμάτων που έχουν κατατεθεί, δείχνει ότι από τα Βακτήρια το 61% των κατατεθειμένων γονιδιωμάτων περιέχει πιθανά γονίδια για μεταφορείς NAT/NCS2, από τα Ευκάρυα το 68% και από τα Αρχαία το 27%. (Καρλετίδης Γ., 2010, Διπλωματική εργασία). Συχνά υπάρχουν πολλά ομόλογα NAT στον ίδιο οργανισμό.

Συγκεκριμένα, στα ριζόβια έχει παρατηρηθεί ότι μεταφορείς NAT/NCS2 εντοπίζονται μόνο σε είδη (π.χ. *Sinorhizobium*) ριζοβίων τα οποία σχηματίζουν μη-καθορισμένα φυμάτια στις ρίζες των ψυχανθών, ενώ αντίθετα, σε είδη τα οποία σχηματίζουν καθορισμένα φυμάτια (π.χ. *Mesorhizobium*) δεν έχουν εντοπιστεί τέτοιου τύπου μεταφορείς. Σε αυτή την εργασία θα παρουσιαστούν δεδομένα σχετικής έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για NAT/NCS2 μεταφορείς που έχουν χαρακτηριστεί από την ομάδα του Ευστάθιου Φριλλίγκου από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

2.3. Η ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΗ ΣΧΕΣΗ ΨΥΧΑΝΘΩΝ/ΡΙΖΟΒΙΩΝ

2.3.1. Γενικά

Τα ψυχανθή (οικογένεια Fabaceae) έρχονται δεύτερα σε σημαντικότητα από τα φυτά που χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο ως πηγή τροφής, ως τροφή για τα εκτρεφόμενα ζώα, και επίσης ως ωμά υλικά για τη βιομηχανία. Τα ψυχανθή αριθμούν το ένα τρίτο της παγκόσμιας πρωτοβάθμιας παραγωγής και είναι το κλειδί για την

επικρατούσα γεωργία επειδή μπορούν να εξασφαλίσουν άζωτο για το φυτό (να οξειδώσουν N_2 σε NH_3) όταν επικρατεί μια συμβιωτική σχέση με βακτήρια που ονομάζονται ριζόβια (π.χ. γένη *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*), και παρέχουν στις καλλιέργειες μια ελεύθερη και ανανεώσιμη πηγή αζώτου.

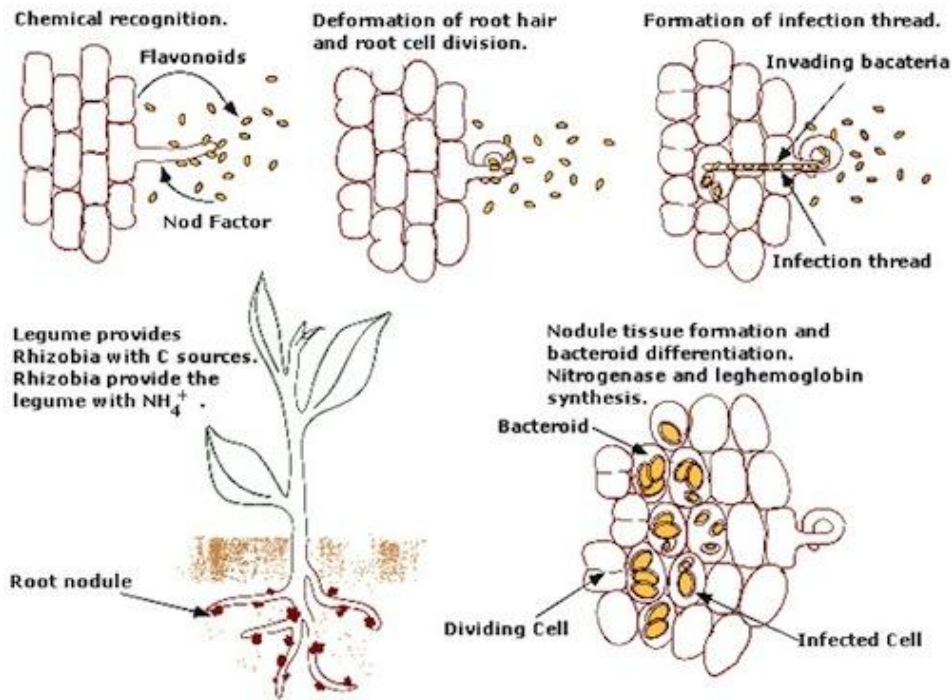
Τα βακτήρια αυτά είναι αρνητικά κατά Gram ραβδόμορφα βακτήρια με ικανότητα αυτοτελούς κίνησης. Μόλυνση της ρίζας ψυχανθούς με το κατάλληλο γένος βακτηρίου οδηγεί στον σχηματισμό ριζικών φυματίων, τα οποία μπορούν να ενσωματώνουν αέριο άζωτο σε ενώσεις του αζώτου με μια διαδικασία που ονομάζεται δέσμευση αζώτου, καθήλωση αζώτου ή αζωτοδέσμευση. Έχει υπολογισθεί ότι 40-60 εκατομμύρια τόνοι N παράγονται ετησίως από καλλιεργούμενα όσπρια, αποταμιεύοντας 10 δισεκατομμύρια δολάρια σε αζωτούχα λίπανση (Smil, 1999).

Η δέσμευση αζώτου μέσω της συμβίωσης των ψυχανθών με τα ριζόβια έχει πολύ μεγάλη σημασία για τη γεωργία, καθώς αυξάνει σημαντικά τις ποσότητες διαθέσιμου αζώτου στο έδαφος. Επειδή πολλά εδάφη είναι εκ φύσεως φτωχά σε άζωτο, τα ψυχανθή με ριζικά φυμάτια έχουν στις συγκεκριμένες συνθήκες συγκριτικό πλεονέκτημα και μπορούν να αναπτυχθούν καλά σε περιοχές στις οποίες άλλα φυτά αδυνατούν (Brock τόμος II., 2007).

2.3.2. Στάδια σχηματισμού των ριζικών φυματίων

Τα στάδια σχηματισμού των φυματίων (εικόνα 7) περιλαμβάνουν τα εξής:

1. Αμοιβαία αναγνώριση του σωστού εταίρου, από την πλευρά τόσο του φυτού όσο και του βακτηρίου, και προσκόλληση του βακτηρίου στα ριζικά τριχίδια.
2. Έκκριση των παραγόντων nod από το βακτήριο.
3. Διείσδυση του νήματος μόλυνσης (ο σχηματισμός του επάγεται από το βακτήριο) στο εσωτερικό του ριζικού τριχιδίου.
4. Μετατόπιση από το νήμα μόλυνσης προς το κυρίως σώμα της ρίζας.
5. Σχηματισμός βακτηροειδών (παραμορφωμένων βακτηριακών κυττάρων) μέσα στα φυτικά κύτταρα και ανάπτυξη αζωτοδεσμευτικής ικανότητας.
6. Συνεχείς διαιρέσεις των βακτηριακών και φυτικών κυττάρων και σχηματισμός των ώριμων ριζικών φυματίων.



Εικόνα 7: Στάδια σχηματισμού φυματίων.

Τα φυμάτια αναπτύσσονται από τα κύτταρα του φλοιού της ρίζας τα οποία ξεκινούν και διαιρούνται ακολουθώντας ανταλλαγές σημάτων μεταξύ των φυτικών ριζών και των ριζοβίων στο έδαφος. Οι ρίζες των ψυχανθών εκκρίνουν ποικίλες οργανικές ενώσεις οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξη μικροχλωρίδας στη ριζόσφαιρα. Αν το έδαφος περιέχει ριζόβια, τότε αυτά θα αρχίσουν σύντομα να αναπτύσσονται στη ριζόσφαιρα του ψυχανθούς φθάνοντας προοδευτικά σε μεγάλες πληθυσμιακές πυκνότητες. Τα ριζόβια έχουν στην επιφάνεια τους μια ειδική πρωτεΐνη προσκόλλησης που λέγεται ρικασυκολλιτίνη. Η ρικασυκολλιτίνη είναι μια ασβεστοδεσμευτική πρωτεΐνη που ενδέχεται να σχηματίζει σύμπλοκα ασβεστίου με την επιφάνεια των ριζικών τριχιδίων. Το ασβέστιο αποτελεί πολύ σημαντικό στοιχείο στην σηματοδότηση των παραγόντων nod. Σύμφωνα με μελέτες οι παράγοντες nod προκαλούν αλλαγές στα επίπεδα του ασβεστίου στα ριζικά τριχίδια (Enrhardt *et al.*, 1996). Στην προσκόλληση του βακτηρίου στο φυτό συμμετέχουν και ορισμένες άλλες ουσίες, όπως οι υδατανθρακοφόρες πρωτεΐνες λεκτίνες.

2.3.3. Κατηγοριοποίηση φυματίων

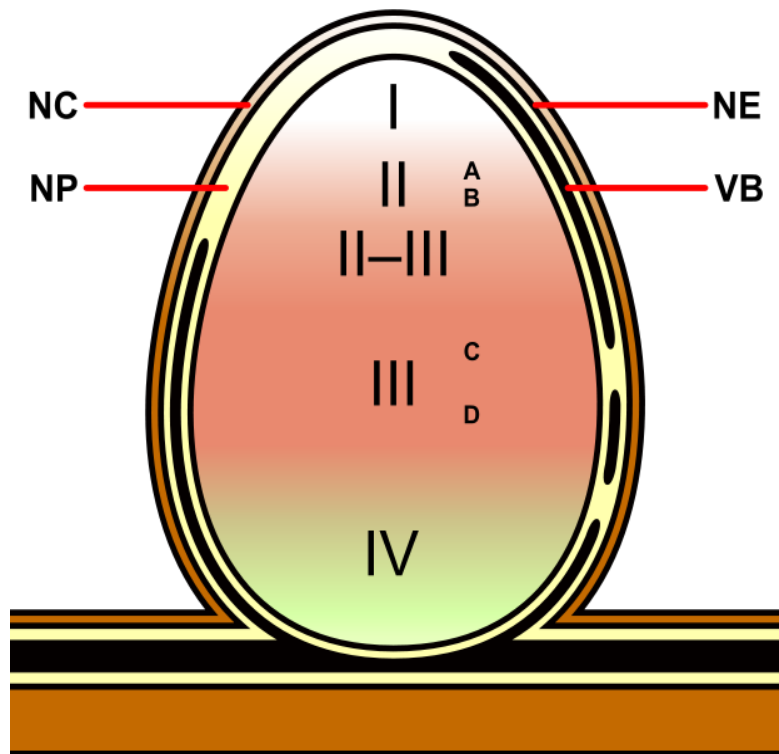
Στα ψυχανθή φυτά έχουν περιγραφεί δύο κύριες κατηγορίες φυματίων: τα καθορισμένα και τα μη-καθορισμένα.

Τα καθορισμένα φυμάτια εντοπίζονται στα τροπικά ψυχανθή, όπως τα γένη *Glycine*, *Phaseolus*, *Lotus* και *Vigna*. Χάνουν τη μεριστωματική τους δράση σύντομα

μετά την έναρξη, συνεπώς η ανάπτυξη του φυματίου οφείλεται μόνο στη διόγκωση των κυττάρων, κάτι που συνεπάγεται στο σφαιρικό σχήμα των ώριμων φυματίων.

Τα μη-καθορισμένα φυμάτια εντοπίζονται σε εύκρατα ψυχανθή, όπως τα γένη *Pisum*, *Medicago*, *Trifolium* και *Vicia*. Αποκτήσαν τον «τίτλο» μη-καθορισμένα καθώς διατηρούν ένα ενεργό ακραίο μερίστωμα, το οποίο παράγει νέα κύτταρα για ανάπτυξη καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του φυματίου. Αυτό συνεπάγεται στο κυλινδρικό σχήμα το οποίο παρουσιάζουν τα ώριμα φυμάτια. Επειδή αναπτύσσονται ενεργά, τα μη-καθορισμένα φυμάτια εκδηλώνουν ζώνες οι οποίες οριοθετούν διαφορετικά στάδια ανάπτυξης/συμβίωσης (εικόνα 8):

- Ζώνη I – το ενεργό μερίστωμα: Εδώ σχηματίζεται ο νέος ιστός στο φυμάτιο, για να διαφοροποιηθεί στη συνέχεια στις άλλες ζώνες.
- Ζώνη II – η ζώνη μόλυνσης: Αυτή η ζώνη είναι διαποτισμένη με νημάτια επιμόλυνσης. Τα φυτικά κύτταρα είναι μεγαλύτερα από την προηγούμενη ζώνη και η κυτταρική διαίρεση έχει παύσει.
- Ενδιάμεση Ζώνη II-III – Τα βακτήρια έχουν εισέλθει στα φυτικά κύτταρα. Επιμηκύνονται και ξεκινούν την καταληκτική τους διαφοροποίηση στα συμβιωτικά βακτηροειδή, που έχουν τη δυνατότητα να καθλώνουν άζωτο.
- Ζώνη III – Η ζώνη καθήλωσης αζώτου: Κάθε κύτταρο αυτής της ζώνης περιέχει ένα μεγάλο, κεντρικό κενοτόπιο και το κυτταρόπλασμα είναι γεμάτο με πλήρως διαφοροποιημένα βακτηροειδή, τα οποία καθλώνουν ενεργώς άζωτο. Το φυτό παρέχει σε αυτά τα κύτταρα την αιμοσφαιρίνη των ψυχανθών, δίνοντας στα φυμάτια ένα εμφανές ροζ χρώμα.
- Ζώνη IV – Ζώνη γήρανσης: Εδώ τα φυτικά κύτταρα και τα βακτηροειδή περιεχόμενά τους καταβόλιζονται. Η αποσύνθεση της αίμης συνεπάγεται σε ένα εμφανές πρασίνισμα της βάσης του φυματίου (Van de Velde *et al.*, 2006; Foucher & Kondorosi, 2000; Monahan-Giovanelli *et al.*, 2006).

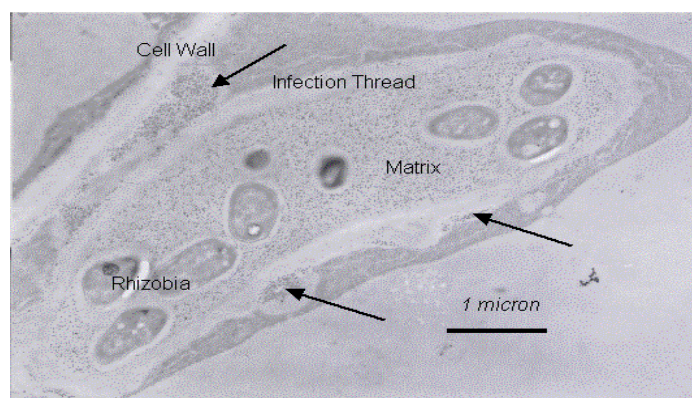


Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση σταδίων διαφοροποίησης σε μη-καθορισμένο φυμάτιο.

2.3.4. Προσκόλληση και μόλυνση - βακτηροειδή

Η αρχική διείσδυση των κυττάρων των ριζοβίων στα ριζικά τριχίδια γίνεται από το άκρο των τριχιδίων, όπου ακόμη αυξάνονται, γεγονός που καθιστά το ακρορίζιο ευαίσθητο στην προσβολή από τα ριζόβια, και μεταγενέστερα διακλαδώνονται σε ολόκληρο το φλοιώδη ιστό (Stougaard, 2000). Μετά την προσκόλληση, το ριζικό τριχίδιο κάμπτεται λόγω της δράσης ορισμένων βακτηριακών ουσιών που ονομάζονται παράγοντες nod. Τα ριζόβια κατορθώνουν να εισέλθουν στα κύτταρα του φλοιού όπου σχηματίζονται τα φυμάτια διαμέσου ενός νήματος επιμόλυνσης, το οποίο επάγεται από την είσοδο του βακτηρίου στο φυτό και διαπερνά τα κύτταρα των επιδερμικών ριζικών τριχιδίων (εικόνα 9). Ταυτόχρονα πραγματοποιείται διαίρεση των κυττάρων του φλοιού από ένα πρωτογενές φυμάτιο μέσα στο οποίο ένα νέο μερίστωμα ενεργοποιείται και οδηγεί στην οργανογένεση φυματίου. Τα βακτήρια έπειτα απελευθερώνονται από το νήμα επιμόλυνσης στο κυτόπλασμα των κυττάρων του φλοιού μέσω ενδοκύττωσης. Τα ριζόβια πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και μετασχηματίζονται σε διογκωμένες, παραμορφωμένες και διακλαδισμένες δομές που ονομάζονται βακτηροειδή. Η διαδικασία αυτή αφήνει τα βακτήρια περικυκλωμένα από μια κυτταροπλασματική προστατευτική μεμβράνη, το κάθε ένα ξεχωριστά ή σε μικρές ομάδες. Στο εσωτερικό του τελικού οργανιδίου, που ονομάζεται συμβίωση, τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται και τελικά διαφοροποιούνται στην κατάσταση εκείνη που μετατρέπουν το άζωτο. Τα κύτταρα του φλοιού τυπικά περιέχουν χιλιάδες

συμβιοσώματα, όπου το καθένα περιέχει ένα ή μερικά βακτηροειδή. Μόνο μετά τον μετασχηματισμό του συμβιοσώματος μπορεί να ξεκινήσει η αζωτοδέσμευση.



Εικόνα 9: Είσοδος νήματος επιμόλυνσης και δημιουργία φυματίου.

Όταν το φυτό πεθάνει, τα φυμάτια αποδιατάσσονται και τα βακτήρια απελευθερώνονται στο έδαφος. Τα βακτηροειδή δεν μπορούν να αναπαραχθούν, αλλά κάθε φυμάτιο περιέχει έναν μικρό αριθμό ραβδομόρφων κυττάρων που βρίσκονται σε λήθαργο. Έτσι, με τον θάνατο του φυτού αυτά αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται, χρησιμοποιώντας ως θρεπτικές ουσίες μερικά από τα προϊόντα αποικοδόμησης του φυματίου. Τα νέα βακτήρια μπορούν πλέον να μολύνουν άλλες ρίζες ή να ζήσουν μη συμβιωτικά στο έδαφος (Brock τόμος II., 2007).

2.3.5. Σχηματισμός φυματίων

Τα γονίδια *nod* κατευθύνουν στάδια του σχηματισμού φυματίων στο ζεύγος ψυχανθές/ριζόβιο. Πολλά γονίδια *nod*, ακόμη και σε διαφορετικά είδη ριζοβίων, εμφανίζουν αξιόλογη εξελικτική συντήρηση και βρίσκονται σε μεγάλα πλασμίδια, τα λεγόμενα πλασμίδια συμβίωσης (*pSym*). Εκτός από τα γονίδια *nod*, που κατευθύνουν συγκεκριμένα γεγονότα της διαδικασίας σχηματισμού των φυματίων, στα πλασμίδια *Sym* υπάρχουν και γονίδια εξειδίκευσης, τα οποία συνταιριάζουν κάθε είδος ριζοβίου με συγκεκριμένο φυτικό ξενιστή (Brock τόμος II., 2007). Οι παράγοντες *nod*, ή αλλιώς τα μόρια σινιάλα των λιπο-χιτο-ολιγοσακχαριτών (NF, *nod factors*), είναι σημαντικά στην καθιέρωση της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ του φυτού και του βακτηρίου. Η παραγωγή αυτού του μορίου σινιάλου ενεργοποιείται από την απελευθέρωση φαινολικών από το φυτό, που ενεργοποιούν την παραγωγή των παραγόντων *nod* με την εισαγωγή ενός συνόλου γονιδίων *nod* στο κατάλληλο στέλεχος ριζοβίου. Ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο των φυματίων, εκκρίνονται διάφορες ουσίες της κατηγορίας των φλαβονοειδών όπως φαινολικά συστατικά, φλαβόνες, φλαβονόνες και ισοφλαβόνες (Peters *et al.*, 1986, Redmond *et al.*, 1986). Η φύση των φλαβονοειδών που λειτουργούν ως σινιάλα καθώς και η δομή των παραγόντων *nod* είναι καίρια στην διατήρηση της εξειδίκευσης στην αλληλεπίδραση, και έτσι σιγουρεύουν ότι το φυτό θα δεχθεί μόνο φιλικά στελέχη ριζοβίων. Τα γονίδια

αυτά κωδικοποιούν τις αντίστοιχες ρυθμιστικές πρωτεΐνες Nod. Η εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή καθορίζεται από τη συγκεκριμένη δομή του παράγοντα nod που παράγει το εκάστοτε είδος ριζοβίου. Εκτός από τα γονίδια nod, το ριζόβιο περιέχει και ορισμένα μοναδικά γονίδια nod, που εισάγουν χημικές παραλλαγές στον θεμελιώδη σκελετό των παραγόντων nod. Έτσι λοιπόν για κάποιες επιπλέον τροποποιήσεις, οι οποίες προσφέρουν εξειδίκευση στους παράγοντες nod ως προς τη σχέση με τον ξενιστή ευθύνονται οι πρωτεΐνες Nod, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα υπόλοιπα γονίδια nod (Schultze and Kondorosi, 1998).

2.3.6. Βιοχημεία της αζωτοδέσμευσης στα φυμάτια

Η καθήλωση του αζώτου επιτελείται από το ένζυμο νιτρογενάση (ή αζωτάση). Η νιτρογενάση είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη δύο στοιχείων (σίδηρος και μολυβδαίνιο). Περιέχει τη Fe-δεσμεύουσα πρωτεΐνη και τη Mo/Fe-δεσμεύουσα πρωτεΐνη, οι οποίες από μόνες τους δεν είναι καταλυτικά ενεργές (Taiz and Zeiger, 2002). Η νιτρογενάση είναι πολύ ευαίσθητη στο οξυγόνο, επομένως απαιτείται περιβάλλον χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου (Vance and Heichel, 1991) Η νιτρογενάση των ριζικών φυματίων έχει παραπλήσια χαρακτηριστικά με την νιτρογενάση των μη συμβιωτικών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (σε ότι αφορά την ευαισθησία της στο O₂ και την ικανότητα αναγωγής του ακετυλενίου και του N₂). Εντοπίζεται μέσα στα βακτηροειδή και δεν απελευθερώνεται στο φυτικό κυτταρόπλασμα.

Τα βακτηροειδή εξαρτώνται πλήρως από το φυτό όσον αφορά τις απαραίτητες πηγές ενέργειας για τη δέσμευση του N₂ καθώς και για την ανάπτυξη και συντήρησή τους (Vance and Heichel, 1991). Οι κυριότερες οργανικές ενώσεις που μεταφέρονται μέσω της μεμβράνης το συμβιοσώματος στο ίδιο το βακτηροειδές είναι διάφοροι ενδιάμεσοι μεταβολίτες του κύκλου του κιτρικού οξέως, κυρίως τα οξέα C4 ηλεκτρικό, μηλικό και φουμαρικό. Τα οξέα αυτά χρησιμοποιούνται ως ηλεκτρονιοδότες κατά την παραγωγή ATP και, μετά τη μετατροπή τους σε πυροσταφυλικό, χρησιμεύουν ως τελική πηγή ηλεκτρονίων για την αναγωγή του N₂. Το πρώτο σταθερό προϊόν της αζωτοδέσμευσης είναι η αμμωνία. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η αφομοίωση της αμμωνίας από οργανικές ενώσεις του αζώτου στο ριζικό φυμάτιο διενεργείται κυρίως από το φυτό. Τα βακτηροειδή μπορούν επίσης να αφομοιώσουν την αμμωνία σε οργανικές ενώσεις, αλλά τα επίπεδα των ενζύμων αφομοίωσης της αμμωνίας στο εσωτερικό τους είναι αρκετά χαμηλά.

Αντίθετα, το αμμωνιοαφομοιωτικό ένζυμο συνθέτωση της γλουταμίνης απαντά σε πολύ υψηλά επίπεδα στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων. Φαίνεται, επομένως ότι η αμμωνία που μεταφέρεται από το βακτηροειδές στο φυτικό κύτταρο μπορεί να αφομοιωθεί από το φυτό υπό τη μορφή του αμινοξέος γλουταμίνη. Εκτός από τη γλουταμίνη, τα φυτικά κύτταρα συνθέτουν και άλλες αζωτούχες ενώσεις, κυρίως ορισμένα αμιδια αμινοξέων, όπως είναι η ασπαραγίνη και η 4-μεθυλογλουταμίνη, καθώς και τα ουρεΐδια αλλαντοΐνη και αλλαντοϊκό οξύ, τα οποία

μεταφέρονται μετά τη σύνθεσή τους στους υπόλοιπους φυτικούς ιστούς (Brock τόμος II., 2007).

2.3.7. Λειτουργικός χαρακτηρισμός της βιολογίας των φυματίων μέσω των ομικών προσεγγίσεων

Η εφαρμογή των DNA μικροσυστοιχειών και της κατανομής των επιπέδων μεταγραφημάτων στη δημιουργία φυματίων είναι σχετικά πρόσφατη σε σχέση με διάφορες μελέτες των επιπέδων μεταγραφημάτων στο *Arabidopsis*. Παρόλα αυτά, ο μεγάλος αριθμός των ESTs που είναι διαθέσιμος για τα ψυχανθή, επιπροσθέτως με τις cDNA, ολιγονουκλεοτιδικές και Affymetrix μικροσυστοιχίες, έχουν δημιουργήσει μεγάλο όγκο δεδομένων που μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση του μηχανισμού δημιουργίας φυματίων. Ταυτόχρονα νέες τεχνολογίες μας επιτρέπουν την ταυτόχρονη μελέτη γονιδίων των ξενιστών και των συμβιωτικών. Η ταυτόχρονη έκφραση δείχνει ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων που βοηθάει την αναγνώριση νέων υποψήφιων γονιδίων τα οποία μπορεί να εμπλέκονται στην δημιουργία φυματίων (Mitra *et al.*, 2004, Udvardi *et al.*, 2004, Aoki *et al.*, 2004, Kouchi *et al.*, 2004). Διάφορες μελέτες για τη μεταγραφική δράση στα φυμάτια αναγνώρισαν πολλά γονίδια των οποίων τα σχετικά επίπεδα έκφρασης αυξάνονται κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις ρίζες διάφορων ειδών ψυχανθών και των αντιστοιχών τους ριζοβίων. Ένας πολύ σημαντικός αριθμός από πηγές είναι διαθέσιμος να υποστηρίξει τις λειτουργικές γενωμικές μελέτες διάφορων ελλοβόκαρπων φυτών.

Τα γονίδια που αναγνωρίστηκαν σε αυτές τις μελέτες περιλαμβάνουν όχι μόνο διάφορα γονίδια που βοηθούν στην διαδικασία παραγωγής των φυματίων αλλά και πολλά άλλα καινούργια γονίδια. Για παράδειγμα, γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διάφορα μονοπάτια μεταβολικών διεργασιών, όπως είναι ο μεταβολισμός αζώτου ή άνθρακα, βρέθηκαν να έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στα φυμάτια των *L. japonicus*, *M. truncatula* και *G. max*. Πολλά γονίδια που κωδικοποιούν για μεταφορείς (ζάχαρης, πεπτιδίων, νιτρικών και H⁺-ATPase μεταφορείς) βρέθηκαν επίσης να παρουσιάζουν αύξηση στην έκφραση τους στα φυμάτια των *L. japonicus* και *M. truncatula*, προτείνοντας έναν πολύ σημαντικό ρόλο για αυτούς τους μεταφορείς στην ανταλλαγή των πηγών άνθρακα και των νιτρογενών μιγμάτων μεταξύ των ριζοβίων και των ψυχανθών. Επιπροσθέτως, ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που συμμετέχουν στη μετάδοση σήματος (π.χ. γονίδια που κωδικοποιούν αποδέκτες κινασών, καλμοντουλινών, και φωσφορικών), καθώς επίσης και γονίδια που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες, έχουν αύξηση στην έκφραση τους στα φυμάτια των *L. japonicus* και *M. truncatula*. Ποικίλα γονίδια που συνδέονται με την άμυνα παρουσιάζουν αύξηση στην έκφραση κατά την διάρκεια της δημιουργίας φυματίων, για παράδειγμα, γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα για το μονοπάτι βιοσύνθεσης φυτοαλεξίνης, γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στις μετατροπές του κυτταρικού τοιχώματος και γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεση που κωδικοποιούν για PR10 και μια χιτινάση (Stacey *et al.*, 2006).

2.3.8. Το *M. truncatula*

Το *M. truncatula* (εικόνα 10) είναι ένα ψυχανθές φυτό-μοντέλο που ανήκει στην οικογένεια Fabaceae, η οποία ταξινομικά κατατάσσεται στη σειρά των Fabales, στην κλάση Magnoliopsida και στην διαίρεση Magnoliophyta του βασιλείου των Φυτών (Plantae).



Εικόνα 10: Το φυτό *M. truncatula*.

2.3.8.1. Το *M. truncatula* ως φυτό-μοντέλο

Το *M. truncatula* είναι ένα ψυχανθές, άμεσα συσχετιζόμενο με τη *Medicago sativa* (Alfalfa, AA). Η καταγωγή του είναι από τη Μεσογειακή λεκάνη και τώρα καλλιεργείται σε ετήσια βάση, κυρίως στην Αυστραλία. Λόγω του ότι είναι ψυχανθές χειμερινής περιόδου, σχετίζεται με σημαντικές καλλιέργειες όπως είναι ο λευκό και το κόκκινο τριφύλλι (*Trifolium pratense* και *T. repens* αντίστοιχα), ο αρακάς (*Pisum sativum*), το ρεβίθι (*C. arietinum*), η φακή (*Lens culinaris*), και το ευρέως

διαδεδομένο φασόλι-φάβα (*V. faba*). Επίσης, η *M. truncatula* είναι φυλογενετικά κοντά με το *Lotus japonicus* καθώς και με τη σόγια (*Glycine max*) και με το κοινό φασόλι (*Phaseolus vulgaris*). Το έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον ως προς το *M. truncatula* ξεκίνησε με την μελέτη για τις συμβιωτικές σχέσεις που αναπτύσσει με το *S. meliloti* στις αρχές του 1990.

Ο στόχος της έρευνας για το *M. truncatula* αργότερα επεκτάθηκε στην μελέτη της μυκκοριζικής συμβίωσης, της ριζικής ανάπτυξης, του δευτερογενούς μεταβολισμού, της ανθεκτικότητας στις ασθένειες, και τελευταία στην γενωμική, τρανσκριπτομική, πρωτεωμική και μεταβολωμική. Ανάμεσα στους πολλούς λόγους για τους οποίους η *M. truncatula* επιλέχθηκε σαν ψυχανθές μοντέλο είναι το μέτριου μεγέθους γονιδίωμα της των 500-550 εκατομμυρίων ζευγών βάσεων (Mbs), το γεγονός ότι είναι διπλοειδές φυτό, το ότι μεσολαβεί μικρό χρονικό διάστημα από τη μια σποριογέννεση ως την επόμενη, το ότι γίνεται εύκολα ανασυνδυασμός καθώς και οι μεταλλαγμένοι πληθυσμοί και η ποικιλότητα των οικοτόπων που αναπτύσσεται (Young and Udvardi *et al.*, 2009).

2.3.8.2. Η πρωτοβουλία της αλληλούχισης του γονιδιώματος του *M. truncatula*

Η απόφαση για την πραγματοποίηση της αλληλούχισης του *M. truncatula* προήλθε σε μεγάλο βαθμό από την παρατήρηση ότι τα χρωμοσώματά της είναι οργανωμένα στην γονιδιακά πλούσια ευχρωματίνη ξεχωριστά από την γονιδιακά φτωχή ετεροχρωματίνη. Για να είναι χρήσιμη σα μοντέλο στην γενωμική ψυχανθών, είναι απαραίτητο η *M. truncatula* να παρουσιάζει γονιδιωματική συντήρηση σε σχέση με άλλα καλλιεργούμενα ψυχανθή. Ένας αυξανόμενος αριθμός από μελέτες δείχνει ότι υπάρχει μεγάλος συσχετισμός μεταξύ των ψυχανθών (Young and Udvardi *et al.*, 2009).

2.3.8.3. Πρακτικές χρήσεις του γονιδιώματος του *M. truncatula*

Το υπέρογκο ποσό των δεδομένων αλληλουχίας στην *M. truncatula* την κάνει μια εξαιρετική πηγή για μεταφραστική γενωμική. Φυσικά, η γονιδιωματική ακολουθία της *M. truncatula* παρέχει μια έτοιμη πηγή για εύκολα προσβάσιμους DNA δείκτες στα είδη ψυχανθών, επιτρέποντας τις συγκρίσεις μεταξύ όλων αυτών, διευκολύνοντας τον σχεδιασμό χαρτών συσχέτισης, συγκριτικής γενωμικής και επιλογής μέσω μοριακών δεικτών. Το γονιδίωμα του *M. truncatula* επίσης φανερώνει την κλίμακα και το πεδίο των βιολογικά σημαντικών οικογενειών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου γονιδίων ανθεκτικών σε ασθένειες. Ακόμα, η σημαντικότερη ολοκληρωμένη αλληλούχιση του γονιδιώματος της *M. truncatula*, επιταχύνει την χαρτογράφηση σε συσχετιζόμενα είδη και παρέχει μια βάση για την επόμενης γενιάς αλληλούχιση σε κοντινούς συγγενείς όπως τα αλφάλφα. Κάποιες από τις πρακτικές χρήσεις του γονιδιώματος της *M. truncatula* είναι:

- Ανάπτυξη δεικτών DNA

- Ανακάλυψη γονιδίων και κλωνοποίηση θέσης
- Φυσική χαρτογράφηση και αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (Young and Udvardi *et al.*, 2009).

2.4. ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Sinorhizobium meliloti*

2.4.1. Γενικά

Πρόκειται για το βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία συμβιωτικής σχέσης με το φυτό *M. truncatula*. Το *S. meliloti*, παλαιότερα γνωστό ως *Rhizobium meliloti*, είναι ένα Gram⁻ βακτήριο της ριζόσφαιρας με ιδιαίτερη γεωργική σημασία αφού διαθέτει την ικανότητα να δεσμεύει μοριακό άζωτο και να το μετατρέπει σε αμμωνία, αποικίζοντας τις ρίζες ψυχανθών ειδών των γενών *Medicago*, *Melilotus*, *Trigonella*.

Το *S. meliloti* είναι ένα ενδοσυμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο του εδάφους, που ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae, η οποία ταξινομικά κατατάσσεται στην τάξη των Rhizobiales, στην κλάση Alpha Proteobacteria και στην Α΄ υποδιαίρεση του φύλλου των Πρωτεοβακτηρίων (Proteobacteria).

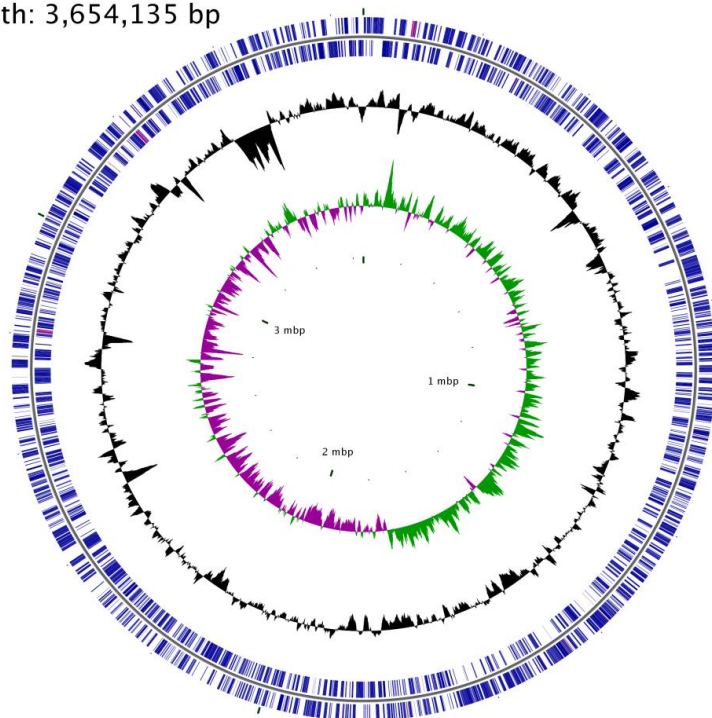
2.4.2. Το γένωμα του *S. meliloti*

Τα γονίδια των ριζοβίων που εμπλέκονται στη διαδικασία συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης βρίσκονται τόσο στο χρωμόσωμα όσο και σε πλασμίδια, τα οποία στα γένη *Rhizobium* και *Sinorhizobium* αποκαλούνται συμβιωτικά πλασμίδια (pSym). Αντίθετα, η πλειοψηφία των γονιδίων της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης φαίνεται να εδράζει στα χρωμοσώματα, στα γένη *Mesorhizobium* και *Bradyrhizobium*.

Accession: AL591688

Length: 3,654,135 bp

■ CDS
■ rRNA
■ tRNA
■ GC content
■ GC skew+
■ GC skew-

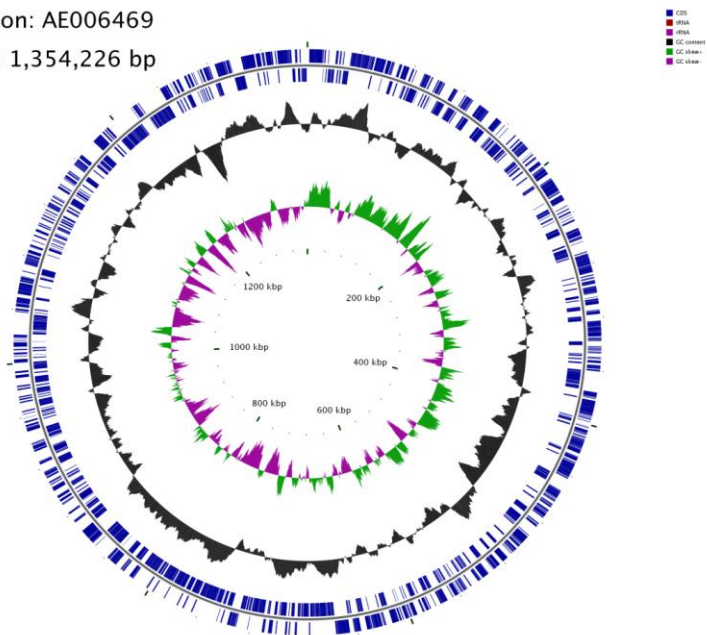


Εικόνα 11: Το χρωμόσωμα του *S. meliloti*.

Το *S. meliloti* είναι ένα μέλος των ριζοβίων, που έχει την ικανότητα να σχηματίζει κυλινδρικά μη-καθορισμένα φυμάτια και να συμβιώνει με είδη των γενών *Medicago*, *Melilotus*, *Trigonella*, συμπεριλαμβανομένου και του φυτού-μοντέλου *M. truncatula*. Είναι ένα ταχέως αναπτυσσόμενο ριζόβιο, το οποίο έχει ένα σχετικά μικρό γονιδίωμα, μεγέθους 6.7 εκατομμυρίων ζευγών βάσεων. Το γένωμα του παρά ταύτα είναι σχετικά περίπλοκο και αποτελείται από τρία κυκλικά στοιχεία DNA, τα οποία είναι γνωστά ως ρεπλικόνια. Ένα χρωμόσωμα μεγέθους 3.65Mb (εικόνα 11) και δύο mega-πλασμίδια μεγέθους 1.68Mb (pSymB) & 1.35Mb (pSymA) (<http://iant.toulouse.inra.fr>). Κάθε ρεπλικόνιο συμβάλλει κατά τη συμβίωση του βακτηρίου με το ψυχανθές-ξενιστή. Το χρωμόσωμα περιέχει όλα τα housekeeping γονίδια του *S. meliloti*, ειδικά αυτά τα οποία είναι υπεύθυνα για τις μεταβολικές διαδικασίες του βακτηρίου. Μεταφέρει επίσης γονίδια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με το φυτό, στην απόκριση stress, στην κινητικότητα και τον χημειοτακτισμό. Το ρεπλικόνιο pSymB (εικόνα 13), μεταφέρει γονίδια που εμπλέκονται στην πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων και στην αποτελεσματική «εισβολή» στο φυτό-ξενιστή. Το τρίτο και μικρότερο ρεπλικόνιο (pSymA) (εικόνα 12) είναι υπεύθυνο για τις ικανότητες δέσμευσης αζώτου του βακτηρίου. Και τα τρία αυτά ρεπλικόνια έχουν αλληλουχηθεί πλήρως.

Accession: AE006469

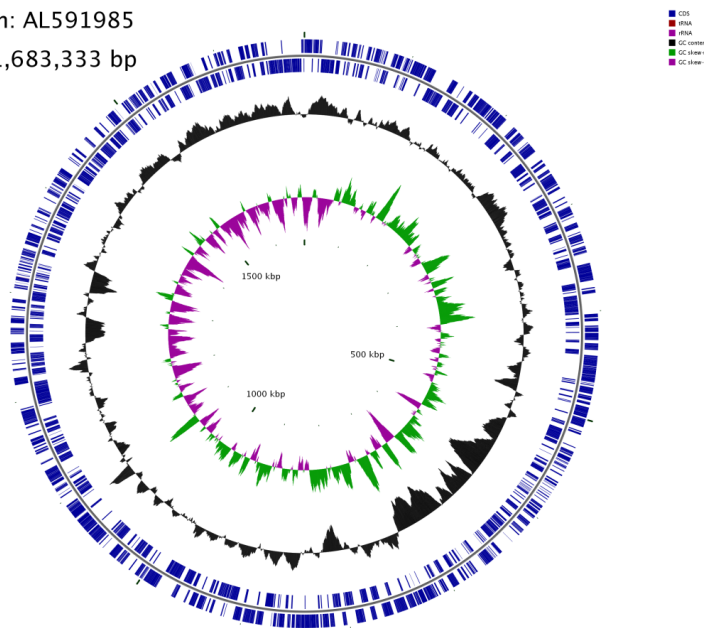
Length: 1,354,226 bp



Εικόνα 12: Το μεγαπλασμίδιο pSymA του *S. meliloti*.

Accession: AL591985

Length: 1,683,333 bp



Εικόνα 13: Το μεγαπλασμίδιο pSymB του *S. meliloti*.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ

3.1. Το ριζόβιο *S. meliloti* και το ψυχανθές *M. truncatula*

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το συμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *S. meliloti* στέλεχος 1021. Χρησιμοποιήθηκε, επίσης, το ψυχανθές *M. truncatula* που χρησιμοποιείται ως φυτικό μοντέλο για τη μελέτη της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών-ριζοβίων.

3.2. Προβλάστηση σπόρων *M. truncatula*

1. Αφαίρεση των σπόρων από τους χέδρωτες (pods).
2. Προσθήκη 5ml θειικού οξέως (H_2SO_4) για 10-15min. Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται για την διάρρηξη του εξωτερικού τοιχώματος των σπόρων έτσι ώστε να διευκολυνθεί η βλάστηση.
3. Αφαίρεση του H_2SO_4 και ξέπλυμα των σπόρων πέντε φορές με dH_2O .
4. Προσθήκη διαλύματος χλωρίνης 3% για 1,5-2min.
5. Ξέπλυμα της χλωρίνης με dH_2O οκτώ φορές.
6. Τοποθέτηση των σπόρων σε τρυβλία (~20 σπόροι/τρυβλίο) με άγαρ 0,8% w/v.
7. Τοποθέτηση των τρυβλίων με τους σπόρους ανάποδα στους 4°C για περίπου 72 ώρες σε σκοτεινό περιβάλλον.

3.3. Προετοιμασία ριζοβίων για εμβολιασμό των φυτών

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το ριζόβιο *S. meliloti* 1021. Τα ριζόβια εμβολιάζονται και αναπτύσσονται σε θρεπτικό διάλυμα YMB με 5 $\mu g/ml$ τετρακυκλίνης, στους 30°C για 2 μέρες.

3.4. Μεταφορά σπόρων και ανάπτυξη φυτών

1. Μεταφορά των σπόρων που έχουν βλαστήσει σε αποστειρωμένο και νοτερό μίγμα άμμου και περλίτη (1:1), τοποθετώντας το ριζίδιο προς τα κάτω.
2. Εμβολιασμός των φυτών με 1ml καλλιέργειας *S. meliloti* 1021, οπτικής πυκνότητας 0.1
3. Κάλυψη σπόρων.
4. Μεταφορά σε θάλαμο με 18 ώρες φώς, 6 ώρες σκοτάδι και θερμοκρασία 22°C. Για την άνθηση, και κατά συνέπεια για την σποριογένεση, ήταν απαραίτητο να προστεθεί και το κόκκινο φώς έτσι ώστε να ωθηθεί η διαδικασία
5. Πότισμα ανά 2-3 μέρες με διάλυμα B & D low nitrogen και dH_2O εναλλάξ.
6. Δεύτερος εμβολιασμός των φυτών με 1ml καλλιέργειας ριζοβίων *S. meliloti* 1021 μετά από επτά ημέρες.

3.5. Συλλογή φυματίων *M. truncatula*/*S. meliloti* 1021

Παρουσία υγρού αζώτου, υπό ασηπτικές συνθήκες και σε μικρό χρονικό διάστημα, έγινε συλλογή φυματίων από τις ρίζες φυτών *M. truncatula* 14, 21 και 28 μέρες μετά τον εμβολισμό (dpi, days post inoculation) με καλλιέργεια ριζοβίων *S. meliloti* 1021. Αποθήκευση απομονωμένων φυματίων στους -80°C.

3.6. Καλλιέργεια ριζοβίων

Παράλληλα, ετοιμάστηκαν και καλλιέργειες ελεύθερα διαβιούντων ριζοβίων *S. meliloti* παρουσία διαφορετικής, μοναδικής πηγής αζώτου. Χρησιμοποιήθηκαν αμμωνιακά ιόντα (NH₄), ξανθίνη (xan, xanthine) και ουρικό οξύ (uric, uric acid) ως πηγές αζώτου, και τα κύτταρα εμβολιάστηκαν σε υγρά θρεπτικά υλικά RMM-NH₄, RMM-xan, RMM-uric στους 30 °C υπό συνεχή ανάδευση.

- Ριζόβια αναπτύχθηκαν σε δοχεία των 30 ml που περιέχουν θρεπτικό υλικό YMB για τη δημιουργία προκαλλιέργειας. Τα δοχεία με το YMB, εμβολιάστηκαν με *S. meliloti* 1021 και επώαστηκαν για 48 ώρες, στους 30°C υπό συνεχή ανάδευση.
- Φυγοκέντρωση στις 4.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του pellet των κυττάρων σε 1ml του επιθυμητού θρεπτικού διαλύματος (RMM-NH₄, RMM-xan, RMM-uric).
- Εμβόλιο σε περίπου 30 ml του επιθυμητού θρεπτικού διαλύματος. Η ποσότητα του εμβολίου υπολογίζεται έτσι ώστε η αρχική απορρόφηση OD₆₀₀=0.05.

3.7. Συλλογή κυττάρων ριζοβίων

Στη συνέχεια συλλέχθηκαν τα ριζόβια σε εκθετική και στατική φάση ανάπτυξης για κάθε καλλιέργεια με τα θρεπτικά διαλύματα. Η συλλογή των κυττάρων έγινε ως εξής:

- Φυγοκέντρωση καλλιέργειας στις 4.000 rpm, στους 4°C και για 10-12 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση pellet κυττάρων που αντιστοιχεί σε 5 ml καλλιέργειας, σε 5 ml NaCl 150mM.
- Φυγοκέντρωση 4.000 rpm, στους 4°C και για 10-12 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση pellet κυττάρων που αντιστοιχεί με 10 ml καλλιέργειας, σε 1 ml NaCl 150mM.
- Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm, στους 4°C, για 5 λεπτά και αφαίρεση υπερκείμενου.

Η συλλογή των κυττάρων στις εκθετικές (17 hrs μετά τον εμβολιασμό της υγρής καλλιέργειας) και στατικές (41 hrs) φάσεις καθορίστηκε από τις καμπύλες ανάπτυξης του *S. meliloti* στα προαναφερθέντα θρεπτικά διαλύματα που έχουν πραγματοποιηθεί.

3.8. Απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA από βακτηριακά κύτταρα και φυμάτια

3.8.1. Απομόνωση ολικού βακτηριακού RNA

Τα στάδια που ακολουθήσαμε για την απομόνωση ολικού RNA από βακτηριακά κύτταρα, σύμφωνα με τον Cabanes, είναι τα παρακάτω:

- Βακτηριακό pellet από υγρή καλλιέργεια 10 ml όταν τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ή 5 ml όταν βρίσκονται στην στατική φάση, επαναδιαλύεται σε 1 ml προθερμασμένου διαλύματος εκχύλισης (RNA extraction buffer) και χωρίζεται σε δύο eppendorfs.
- Σε κάθε eppendorf προστίθεται 0,5 ml διαλύματος εκχύλισης.
- Το μίγμα αναδεύεται καλά και επωάζεται στους 65°C για 15 λεπτά.
- Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο χωρίζεται σε δυο eppendorfs με 0,5ml το καθένα.
- Στο μίγμα προστίθενται 250 μl NaCl 5M και 750 μl ισοπροπανόλη.
- Το μίγμα αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm στους 4°C για 30 λεπτά.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα ξεπλένεται με 100μl 75% αιθανόλη (EtOH).
- Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm, στους 4°C και για 15 λεπτά.
- Αφού αφαιρείται το υπερκείμενο, τα eppendorfs τοποθετούνται σε συνθήκες κενού για 45 λεπτά με 1 ώρα, έως ότου έχει εξατμιστεί όλο το υγρό.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 40μl ddH₂O.
- Προσδιορισμός συγκέντρωσης και ποιότητας του ολικού βακτηριακού RNA σε φασματοφωτόμετρο nanodrop.
- Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 2% για εντοπισμό ζωνών RNA.

3.8.2. Απομόνωση ολικού RNA από φυμάτια

Τα στάδια που ακολουθούνται για να ολοκληρωθεί η διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA από φυμάτια, σύμφωνα με τους Brusslan & Tobbin (1992), είναι τα παρακάτω:

- Τα φυμάτια ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτρίβησης παρουσία υγρού αζώτου.

- Το δείγμα μεταφέρεται με αποστειρωμένη σπάτουλα σε σωλήνα eppendorf, ο οποίος περιέχει 300μl RNA extraction buffer και 300μl μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου (PIC), pH 8,3.
- Το μείγμα αναδεύεται καλά (Vortex) και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδάτινη φάση (υπερκείμενο) μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf, ο οποίος περιέχει 300μl μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου (PIC), pH 8,3.
- Το μείγμα αναδεύεται καλά (vortex) και φυγοκεντρείται στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδάτινη φάση (υπερκείμενο) μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf.
- Προστίθεται 1/10 του όγκου 3M οξικό νάτριο pH 5,2 και ίσος όγκος ισοπροπανόλης.
- Το μείγμα αναδεύεται καλά με το χέρι, και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm, για 15 λεπτά, στους 4°C.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα και το ίζημα (pellet) επαναδιαλυτοποιείται σε 1125μl 10T/10E.
- Στο μείγμα προστίθενται 375μl LiCl 8M, αναδεύεται με το χέρι και επωάζεται στους 4°C για 12 ώρες.
- Μετά το πέρας της επώασης, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 30 λεπτά, στους 4°C..
- Αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα και το ίζημα ξεπλένεται με 70μl αιθανόλης 75% v/v.
- Το μείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 15 λεπτά, στους 4°C.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 10T/1E ή σε αποστειρωμένο ddH₂O .
- Το δείγμα αποθηκεύεται στους -20°C.

3.8.3. Καθαρισμός ολικού RNA

Κατά την διαδικασία απομόνωσης του RNA από τους φυτικούς ιστούς και τα βακτηριακά κύτταρα απομονώνεται και μέρος του γονιδιωματικού DNA αυτών. Για την αποφυγή λήψης λανθασμένων αποτελεσμάτων, κατά την μελέτη της μεταγραφής και έκφρασης γονιδίων, απαιτείται ο καθαρισμός του RNA από το γονιδιωματικό DNA. Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται σε ένζυμα που κόβουν-καταστρέφουν το DNA και αφήνουν ανέπαφο το RNA και είναι η ακόλουθη:

1. Σε σωλήνα eppendorf προστίθενται τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Δείγμα RNA 7 μg (ή 5μg ή 3μg)
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα DNase 7μl (ή 5μl για δείγμα RNA<7μg)
- DNase (1 units/μl) 7 μl (ή 5μl για δείγμα RNA<7μg)

- RNase out 1 μl
 - ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 70μl (ή έως 50μl για δείγμα RNA<7μg)
2. Το μίγμα των αντιδραστηρίων επωάζεται στους 37°C για 90 λεπτά.
 3. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί η διαδικασία του καθαρισμού του μίγματος με την διαδικασία του καθαρισμού των νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη.

3.8.4. Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη.

1. Στο υδατικό διάλυμα DNA/RNA προστίθεται ddH₂O έως τα 150 μl.
2. Προστίθεται ίσος όγκος μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1).
3. Το μίγμα αναδεύεται καλά (vortex) και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
4. Η υδάτινη υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου.
5. Το μίγμα αναδεύεται καλά (vortex) και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
6. Η υδάτινη υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και προστίθεται 1/10 του όγκου διαλύματος 3M οξικού νάτριου pH 5,2 και 2,5x όγκου αιθανόλης 100% (κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων).
7. Το βακτηριακό δείγμα επωάζεται στους -20°C για περίπου 18 ώρες.
8. Μετά το πέρας της επώασης το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm, για 30 λεπτά στους 4°C.
9. Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα ξεπλένεται με 100-150 μl αιθανόλης 75%
10. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm, για 15 λεπτά στους 4°C.
11. Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα στεγνώνει σε συνθήκες κενού.
12. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 23 μl ddH₂O.
13. Γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA σε φασματοφωτόμετρο nanodrop.
14. Τέλος το δείγμα αναλύεται σε 2% πηκτή αγαρόζης.

3.9. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων

3.9.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων σε υδατικό διάλυμα γίνεται με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου nanodrop. Αναλύοντας 1 μl δείγματος, το φασματόμετρο nanodrop μπορεί να μας δώσει τα εξής δεδομένα:

- τη συγκέντρωση των επιθυμητών νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA),
- την καθαρότητα του δείγματος ως προς τις πρωτεΐνες (δείκτης OD_{260/280}),

- την καθαρότητα του δείγματος ως προς άλλες ουσίες όπως EDTA, υδρογονάνθρακες, φαινόλες κ.ά. (δείκτης OD_{260/230}).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων σε υδατικό διάλυμα αρχικά μεταφέρεται 1 μl ddH₂O στην υποδοχή της συσκευής για τον μηδενισμό (blank measurement). Στη συνέχεια 1 μl από το δείγμα μεταφέρεται στην υποδοχή της συσκευής η οποία μετρά την οπτική πυκνότητα του δείγματος στα μήκη κύματος 230, 260 και 280 nm. Τέλος, η συσκευή εμφανίζει τη συγκέντρωση του DNA ή RNA και τους λόγους OD₂₆₀/OD₂₈₀ OD₂₆₀/OD₂₃₀. Για να θεωρείται ένα δείγμα νουκλεϊκών οξέων καθαρό, ο δείκτης OD_{260/280} πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0, ενώ ο δείκτης OD_{260/230} πρέπει να κυμαίνεται σε μεγαλύτερα επίπεδα, μεταξύ 2.0-2.2.

3.9.2 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA/RNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους του. Το εύρος των μεγεθών που μπορεί να διαχωριστούν στην πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από την συγκέντρωση της αγαρόζης (πίνακας 3).

1. Η πηκτή παρασκευάζεται με προσθήκη αγαρόζης σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE, με αναλογίες που εξαρτώνται από την επιθυμητή τελική συγκέντρωση της πηκτής.
2. Η αγαρόζη διαλύεται με θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων και αφού κρυώσει ελαφρά, προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml και αναμιγνύεται καλά.
3. Το διάλυμα τοποθετείται στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει και στη συνέχεια μεταφέρονται τα δείγματα προς ανάλυση, αναμεμιγμένα με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης, στα "πηγαδάκια" που σχηματίστηκαν.
4. Το κύκλωμα κλείνει με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE και τόσο η τάση του ηλεκτρικού πεδίου όσο και ο χρόνος εφαρμογής του εξαρτώνται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν.

Πίνακας 1: Συγκέντρωση αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων νουκλεϊκών οξέων (kb)
0.3	1.7-70
0.5	0.7-45
0.8	0.4-20
1	0.3-10

1.2	0.2-8
1.5	0.2-6
2	0.1-5

3.10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική αυτή (Mullis, K., 1986; Mullis, K. and Faloona, F., 1987) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης ακολουθιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*. Η βασική αρχή της PCR βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA: Το εκμαγείο του DNA αρχικά αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία 94°C σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Δύο μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής, υβριδίζονται με το εκμαγείο, ένα με κάθε αλυσίδα. Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη τα εξής:

1. Το μέγεθος των εκκινητών θα πρέπει να είναι σχετικά μικρό (15-30 νουκλεοτίδια) ώστε η θερμοκρασία υβριδισμού με το DNA να είναι μέσα σε λογικά πλαίσια.
2. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή πρέπει να είναι μοναδική και να υβριδίζεται σε μια μόνο περιοχή του DNA.
3. Οι εκκινητές δε θα πρέπει να έχουν δευτεροταγή δομή. Στην αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών, δε θα πρέπει τα 3'-άκρα τους να είναι συμπληρωματικά.
4. Η αλληλουχία των βάσεων των εκκινητών θα πρέπει να σχεδιάζεται έτσι ώστε να περιέχει περίπου ίση αναλογία σε GC/AT.
5. Ο κάθε εκκινητής θα πρέπει να περιέχει στα άκρα του G ή C.

Ακολούθως, μια DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'-3', ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου που είναι δίκλωνο. Για τη σύνθεση αυτή απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων, ιόντων Mg^{+2} και μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης. Αρχικά για την PCR χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση του *E. coli* αλλά το ένζυμο αυτό είναι θερμοευαίσθητο και καταστρέφεται στις θερμοκρασίες εκείνες που απαιτούνται για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Σήμερα χρησιμοποιείται η DNA πολυμεράση, που έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus*, και έχει άριστη θερμοκρασία δραστηριότητας στους 72°C. Η δραστηριότητα της αναφερόμενης ως Taq πολυμεράσης παραμένει σε υψηλά επίπεδα μετά από επανειλημμένη αύξηση της θερμοκρασίας στους 94°C.

Στη συνέχεια, οι αρχικές αλυσίδες, καθώς και οι νεοσυντιθέμενες, αφού πρώτα αποδιαταχθούν με θέρμανση στους 94°C, μπορούν να χρησιμεύσουν ξανά ως μήτρες

αντιγραφής όπου θα υβριδίσουν οι εκκινητές. Εάν αυτός ο κύκλος επαναληφθεί *n* φορές, τότε το τελικό αποτέλεσμα θα είναι η σύνθεση 2*n* δίκλωνων μορίων DNA που αποτελούν αντίγραφα της αλληλουχίας ανάμεσα από τους εκκινητές και περιέχουν τις αλληλουχίες των εκκινητών στα άκρα τους. Η εκθετική αυτή συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιείται εφ' όσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες, όπως η έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών και η παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης. Η εξειδίκευση του προϊόντος εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία υβριδισμού και από την εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των συγκεκριμένων εκκινητών στη μήτρα του DNA.

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Συγκεκριμένα, η ποσότητα της μήτρας DNA, που προστίθεται κάθε φορά, εξαρτάται από το είδος του. Έτσι, στην περίπτωση γενωματικού DNA χρησιμοποιείται ποσότητα ίση με 1μg, ενώ για πλασμιδιακό DNA αρκούν 10-100 ng. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεώς τους (T_m).

Στο συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιείται PCR για να επαληθεύει η δράση των DNases. Έτσι επειδή το δείγμα είναι θεωρητικά καθαρό από DNA, δεν θα πρέπει να υπάρχουν προϊόντα μετά την ολοκλήρωση της PCR.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής:

1. Σε ειδικό σωλήνα eppendorf προστίθενται:

- Μήτρα DNA/RNA 0.5 μl.
- Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης Forward (10 μM) 0,5 μl.
- Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης Reverse (10 μM) 0,5 μl.
- Μίγμα dNTPs (10 mM) 0.5 μl.
- 10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα 2.5 μl.
- *Taq* DNA πολυμεράση (2 units/μl) 0,5 μl.
- ddH₂O 20 μl για $V_{\text{τελ}}=25\mu\text{l}$.

2. Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι:

- Βήμα 1: Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 4 λεπτά
- Βήμα 2: Αποδιάταξη στους 94°C για 1 λεπτό
- Βήμα 3: Υβριδισμός εκκινητών στους 58°C για 1 λεπτό
- Βήμα 4: Επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό/1.3-15kb
- Επανάληψη βημάτων 2-4 για 30 κύκλους

- Βήμα 5: Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά.

Πέρα από την τυπική αντίδραση ενίσχυσης δίκλωνων τμημάτων DNA, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί παραλλαγές της βασικής διαδικασίας που περιγράφηκε παραπάνω. Μία από αυτές επιτρέπει τη χρησιμοποίηση μορίων RNA, ως αρχική μήτρα για την αντίδραση ενίσχυσης (RT-PCR), τα οποία μεταγράφονται σε cDNA με την δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Η άλλη τεχνική ονομάζεται Real Time PCR (qPCR) και πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας χρωστικής ουσίας, της SYBRGreen, η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεσή της στα δίκλιωνα μόρια του DNA. Έτσι είναι δυνατή η παρακολούθηση της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθ' όλη τη διάρκεια, σε πραγματικό χρόνο. Οι δύο αυτές τεχνικές που αναφέρθηκαν εφαρμόστηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία και αναλύονται εκτενέστερα παρακάτω.

3.11. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα μόρια RNA (RT-PCR)

Η αντίδραση ενίσχυσης τμημάτων RNA με την μέθοδο RT-PCR περιλαμβάνει δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο το RNA μεταγράφεται σε cDNA με την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η μεταγραφή ξεκινά από τον κατάλληλο εκκινητή, που μπορεί να είναι dT-ολιγονουκλεοτίδιο, όταν μεταγράφεται το σύνολο των mRNA, ή εξειδικευμένο νουκλεοτίδιο για το συγκεκριμένο τμήμα RNA που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Κατά το δεύτερο στάδιο, τα μόρια του cDNA, που δημιουργήθηκαν με την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, ενισχύονται σε μια τυπική αντίδραση PCR, με την παρουσία μη-εξειδικευμένων εκκινητών.

Σε σωλήνα eppendorf προστίθενται τα εξής:

- RNA 1.5 µg.
- Random primers 1µl.
- Μίγμα dNTPs (10mM) 1µl.
- ddH₂O έως τελικό όγκο 10 µl.

Στη συνέχεια το RNA αποδιάσεται με θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά, οπότε και πραγματοποιείται ο υβριδισμός εκκινητή-RNA. Το δείγμα μεταφέρεται αμέσως σε πάγο για να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση.

Ακολουθεί η προσθήκη στο eppendorf:

- 5X First-Strand Buffer 4µl.
- DTT (0,1M) 2µl.
- RNase out (40 units/µl) 1µl.

Το μίγμα ανακατεύεται ελαφρώς (με χρήση πιπέτας) και επωάζεται στους 25°C για 2 λεπτά.

Στη συνέχεια προστίθεται 1 μl ενζύμου SuperScript™ II RT (200units/μl) και ακολουθεί επώαση στους 25°C για 10 λεπτά.

Έπειτα το μίγμα επωάζεται στους 42°C για 50 λεπτά και τέλος, η αντίδραση απενεργοποιείται με θέρμανση στους 70°C για 15 λεπτά.

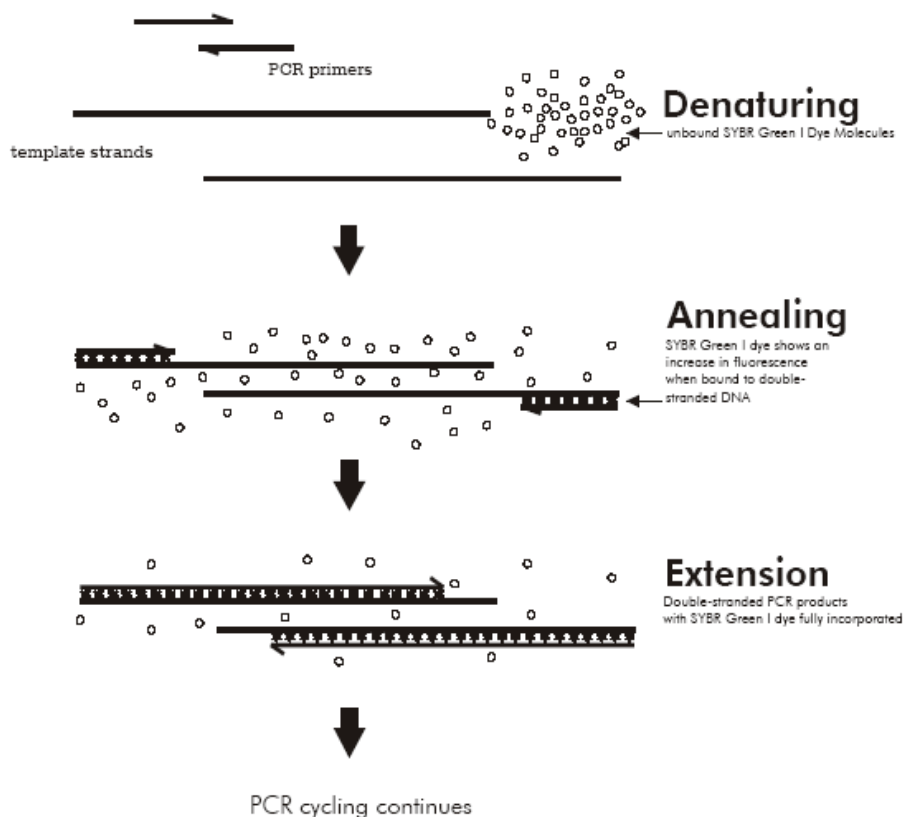
Το cDNA που προέκυψε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων. Η ενίσχυση αυτή πραγματοποιείται με μια αντίδραση qPCR και χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.

3.12. Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με τη χρήση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι μία εναλλακτική και ταυτόχρονα επαναστατική μέθοδος λογαριθμικής ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ακολουθιών DNA. Σε αντίθεση με την αντίδραση RT-PCR, δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθ' όλη τη διάρκεια που λαμβάνει χώρα, σε πραγματικό χρόνο. Η ικανότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης δίνεται από τη μέτρηση των επιπέδων φθορισμού της χρωστικής SYBR Green, η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεση της στα δίκλιωνα μόρια του DNA (dsDNA). Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιούνται μετρήσεις των επιπέδων του φθορισμού στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης με τη χρήση ρομποτικού σαρωτή. Συχνά η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη μέθοδο της RT-PCR, για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικρών αλληλουχιών mRNA που έχουν μετατραπεί σε cDNA πρώτα, δίνοντας τη δυνατότητα μελέτης της έκφρασης γονιδίων σε συγκεκριμένους ιστούς, κύτταρα ή αναπτυξιακά στάδια.

Η παρουσία της SYBR Green I μας επιτρέπει, όπως αναφέρθηκε πριν, να παρακολουθούμε σε πραγματικό χρόνο τη συσσώρευση των προϊόντων του PCR. Κατά την διάρκεια της φάσης της αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA η SYBR Green βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και ο φθορισμός που παράγει είναι μικρός. Κατά τις φάσεις της πρόσδεσης των εκκινητών και της επιμήκυνσης, όπου έχουμε διπλής έλικας DNA, η SYBR Green προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA και ο φθορισμός που παράγει αυξάνεται σημαντικά (έως και 1000 φορές) (Εικόνα 14). Η αύξηση του σήματος του φθορισμού εξαρτάται από την αρχική ποσότητα της μήτρας του DNA που υπάρχει στην έναρξη της αντίδρασης του PCR. Η ανίχνευση του φθορισμού που παράγεται πραγματοποιείται από ένα ειδικό φωτόμετρο που ανιχνεύει το φθορισμό που παράγεται στα 520 nm. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η SYBR Green παράγει φθορισμό όταν προσδένεται σε οποιοδήποτε δίκλινο μόριο DNA, όπως διμερή εκκινητών ή ανεπιθύμητα προϊόντα της αντίδρασης του PCR. Λόγω αυτού του φαινομένου ο προσεκτικός σχεδιασμός των εκκινητών και οι προσεκτικοί χειρισμοί

κατά την διάρκεια των πειραμάτων είναι αναγκαίοι για την αποφυγή μολύνσεων και κατ' έκταση την παραλαβή εσφαλμένων μετρήσεων φθορισμού.



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας πρόσδεσης της χρωστικής SYBR Green στην δίκλωνη έλικα του DNA κατά την διάρκεια των βημάτων του PCR.

Για την εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mx3005P (Stratagene), καθώς και το αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα MxPro-3005P. Τα δείγματα τοποθετούνται σε πλακέτα ειδική για αυτή τη χρήση.

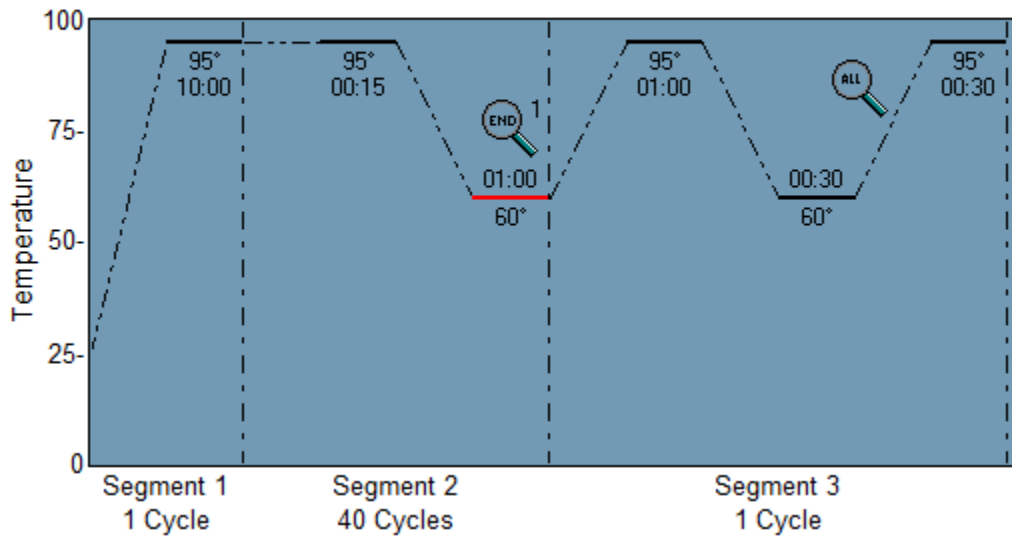
Για μία τυπική αντίδραση τελικού όγκου 10 μl αναμιγνύονται:

- 2X Fast Start SYBR-GREEN Master ROX (Roche): 5 μl
- cDNA (χρησιμοποιείται ως εκμαγείο): 1 μl
- Μίγμα (Forward+Reverse) εξειδικευμένων εκκινητών (0.5 μM): 4 μl

Αξίζει να σημειωθεί ότι έγινε κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA, και οι αραιώσεις έγιναν με βάση τις μετρήσεις που έδωσε το qPCR για τα house-keeping γονίδια.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα και τα στάδια της αντίδρασης είναι:

Thermal Profile (Estimated Run Time: 01:53:44)



Εικόνα 15: Στάδια και θερμοκρασιακό πρόγραμμα Real Time PCR.

3.13. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του προγράμματος SigmaStat 3.5, πραγματοποιώντας t-test για τη στατιστική σύγκριση της έκφρασης των βιολογικών χειρισμών. Τα διαγράμματα δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα SigmaPlot 10.0.

Στο παρακάτω παράρτημα (Παράρτημα Α) παρουσιάζονται οι συστάσεις των θρεπτικών υλικών και πληροφορίες για τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Α. Σύσταση διαφόρων διαλυμάτων:

- Βρωμιούχο αιθίδιο: Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH₂O και φυλάσσεται στους 4°C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5 μg/ml.
- Διάλυμα εκχύλισης RNA βακτηριακών κυττάρων: SDS 1.4%, EDTA 4mM, proteinase K 75μg.
- Διάλυμα TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA.
- Διάλυμα φόρτωσης: 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη.
- NaCl (150mM): Σε τελικό όγκο 1 lt H₂O διαλύονται 8.77 gr χλωριούχο νάτριο.
- Οξικό νάτριο (3M pH:5.2): Σε τελικό όγκο 1 lt H₂O διαλύονται 246,09 gr άνυδρο οξικό νάτριο. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.2 με την προσθήκη πυκνού οξικού οξέος. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- TAE (1x): Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 50x TAE το οποίο αραιώνεται 50 φορές, 50 x TAE: 242 gr Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 0,5 ml EDTA pH: 8,0 σε ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1lt.
- TE: 10 mM Tris-HCL pH:8, 1 mM EDTA.
- Φαινόλη: Σε 500 ml φαινόλη προστίθενται 200 ml διαλύματος 1 M Tris-HCl pH:8,0. Ακολουθεί καλή ανάδευση και οι δύο φάσεις αφήνονται να διαχωριστούν. Η άνω υδάτινη φάση απομακρύνεται και προστίθενται 200 ml διαλύματος 100 mM Tris-HCl pH:8,0. Μετά από καλή ανάδευση το μείγμα φυλάσσεται ανά 40 ml σε σωλήνες Falcon στους -20°C.

B. Σύσταση διαλύματος B & D (Broughton & Dilworth) low nitrogen:

Stock Solutions	Stock Concentration		C final	V for 1 lt
CaCl ₂ 2H ₂ O (147.014)	0.1 M	2.94 gr at 200ml	1 mM	10 ml
KH ₂ PO ₄ (136.086)	1 M	6.8 gr at 50ml	0.5 mM	500 μl
MgSO ₄ 7H ₂ O (246.469)	1 M	24.65 gr at 100ml	0.25 mM	250 μl
K ₂ SO ₄ (174.177)	0.1 M	1.74 gr at 100ml	0.25 mM	2.5 ml
Ferric citrate (244.94)	10 mM	0.123 gr at 50 ml	10 μM	1 ml
Microelements				
H ₃ BO ₃ (61.83)	2 mM	61.83 mgr at 500ml	2 μM	1 ml
MnSO ₄ H ₂ O (169.02)	1mM	84.51 mgr at 500ml	1 μM	
ZnSO ₄ 7H ₂ O (287.54)	0.5 mM	71.89 mgr at 500ml	0.5 μM	
CuSO ₄ 5H ₂ O (249.70)	0.2 mM	24.97 mgr at 500ml	0.2 μM	
CoSO ₄ 7H ₂ O (281.103)	0.1 mM	14.06 mgr at 500ml	0.1 μM	
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O (241.95)	0.1 mM	12.1 mgr at 500ml	0.1 μM	
Low Nitrogen				
KNO ₃ (101.103)	1 M	10.11 gr at 100 ml	0.5 mM	500 μl

Γ. Σύσταση θρεπτικών διαλυμάτων

YMB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *S. meliloti*: Για την παρασκευή 1 lt θρεπτικού διαλύματος YMB:

- Σε 1 lt απιονισμένου νερού προστίθενται 10gr μαννιτόλη, 0,5gr K₂HPO₄, 0,2gr MgSO₄•7H₂O, 0,1gr NaCl και 0,5gr Yeast extract.
- Ακολουθεί αποστείρωση.
- Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε φιαλίδια MacCartney (30 ml) σε θερμοκρασία δωματίου.

RMM-NH₄: Για την Παρασκευή 500ml θρεπτικού διαλύματος RMM-NH₄:

- Σε 950 ml ddH₂O διαλύονται 0.25 gr MgSO₄•7H₂O, 0.1 gr CaCl₂•2H₂O, 1 gr K₂HPO₄, 0.53 gr NH₄Cl και 1 gr KH₂PO₄.
- 10 μg FeCl₃•6H₂O και 20 μg CoCl₂, 20 μg Na₂MoO₄, 20 μg MnSO₄•H₂O, ZnSO₄•7H₂O, 20 μg CuSO₄•5H₂O.
- Ακολουθεί αποστείρωση.
- Προστίθενται 100μl βιοτίνη (stock 0.2 mg/ml), παντοθενικό οξύ (B5 – stock 10mg/ml) και θειαμίνη (stock 0,2 mg/ml).
- Προστίθενται 50ml γλυκόζη 20%.

- Η γλυκόζη, βιοτίνη, παντοθενικό οξύ και θειαμίνη αποστειρώθηκαν ξεχωριστά μέσω φιλτραρίσματος.

RMM-xanthine: Για την Παρασκευή 1lt θεραπευτικού διαλύματος RMM-xanthine:

- Σε 945 ml ddH₂O διαλύονται 0.25 gr MgSO₄•7H₂O, 0.1 gr CaCl₂•2H₂O, 1 gr K₂HPO₄, και 1 gr KH₂PO₄.
- 10 µg FeCl₃•6H₂O και 20 µg CoCl₂, 20 µg Na₂MoO₄, 20 µg MnSO₄•H₂O, ZnSO₄•7H₂O, 20 µg CuSO₄•5H₂O.
- 5 ml stock διαλύματος ξανθίνης (0.3787gr xan/ml KOH).
- Ακολουθεί αποστείρωση.
- Προστίθενται 100µl βιοτίνη (stock 0.2 mg/ml), παντοθενικό οξύ (B5 – stock 10mg/ml) και θειαμίνη (stock 0,2 mg/ml).
- Προστίθενται 50ml γλυκόζη 20%.
- Η γλυκόζη, βιοτίνη, παντοθενικό οξύ και θειαμίνη αποστειρώθηκαν ξεχωριστά μέσω φιλτραρίσματος.

RMM-uric acid: Για την Παρασκευή 1lt θεραπευτικού διαλύματος RMM-uric acid:

- Σε 945 ml ddH₂O διαλύονται 0.25 gr MgSO₄•7H₂O, 0.1 gr CaCl₂•2H₂O, 1 gr K₂HPO₄, και 1 gr KH₂PO₄.
- 10 µg FeCl₃•6H₂O και 20 µg CoCl₂, 20 µg Na₂MoO₄, 20 µg MnSO₄•H₂O, ZnSO₄•7H₂O, 20 µg CuSO₄•5H₂O.
- 5 ml stock διαλύματος ουρικού οξέος (0.4185gr uric/ml KOH).
- Ακολουθεί αποστείρωση.
- Προστίθενται 100µl βιοτίνη (stock 0.2 mg/ml), παντοθενικό οξύ (B5 – stock 10mg/ml) και θειαμίνη (stock 0,2 mg/ml).
- Προστίθενται 50ml γλυκόζη 20%.
- Η γλυκόζη, βιοτίνη, παντοθενικό οξύ και θειαμίνη αποστειρώθηκαν ξεχωριστά μέσω φιλτραρίσματος.

Πριν την αποστείρωση έχει πραγματοποιηθεί ρύθμιση του pH ~ 7.5 των RMM θεραπευτικών υλικών. Αυτή πραγματοποιείται με διάλυμα K₂HPO₄ 0.5M για το RMM-NH₄ και με διάλυμα KH₂PO₄ 0.5M για τα RMM-xanthine & RMM-uric acid.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

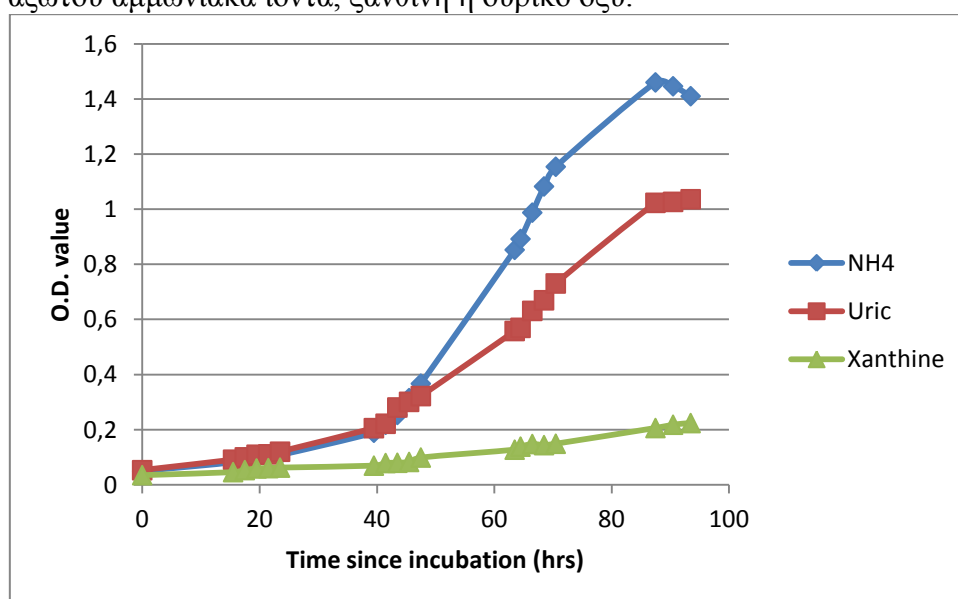
4.1. Μελέτη προτύπου έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα & πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό και τη μεταφορά πουρινών στο *S. meliloti*

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να μελετηθεί το μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών σε συμβιωτικές και μη συμβιωτικές συνθήκες του ριζοβίου, καθώς το *S. meliloti* σχηματίζει μη-καθορισμένα φυμάτια και χρειάζεται συνεχή παροχή πουρινών. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκαν τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών, σε φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών (dpi) φυτών *M. truncatula* που είχαν μολυνθεί με το *S. meliloti* 1021.

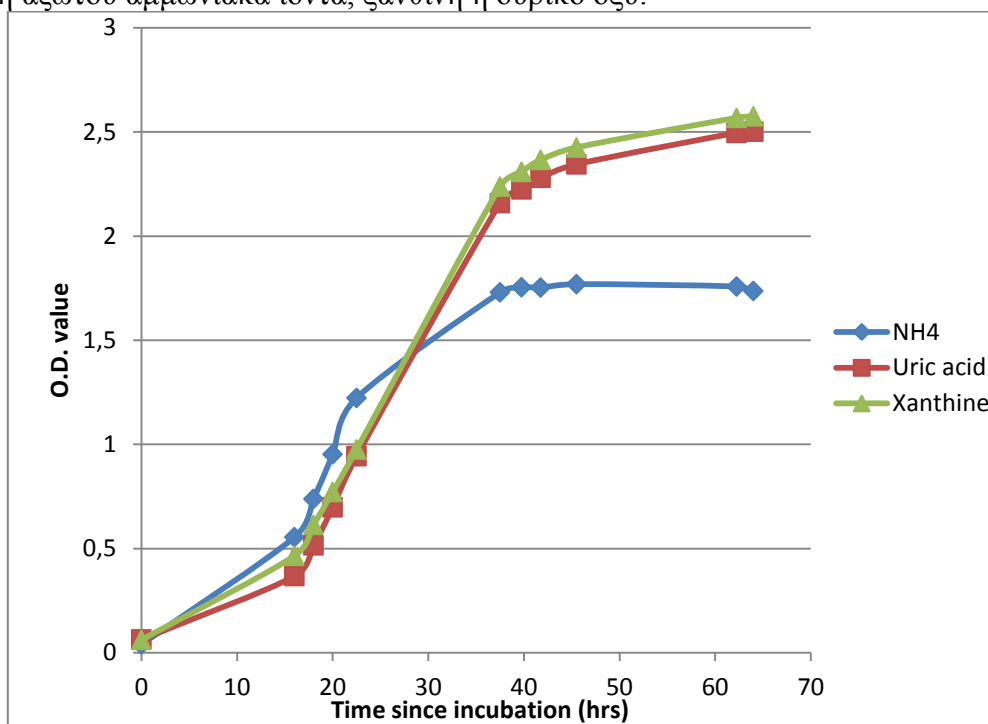
Επίσης, μελετήθηκαν τα πρότυπα έκφρασης των εν λόγω γονιδίων κατά την εκθετική και τη στατική φάση ανάπτυξης ελεύθερα διαβιούντων *S. meliloti* που αναπτύχθηκαν με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου (αμμωνιακά ιόντα, ξανθίνη ή ουρικό οξύ).

Ακόμη, μελετήθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης πέντε γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταφορά πουρινών (περμεάσες). Αυτό έγινε, καθώς παρατηρήθηκε ότι το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* MAFF, το οποίο σχηματίζει καθορισμένα φυμάτια, ελλείπει των πρωτεϊνών αυτών, αδυνατεί να χρησιμοποιήσει την ξανθίνη (και το ουρικό οξύ σε μικρότερο βαθμό) ως μοναδική πηγή αζώτου για την ανάπτυξή του. Αντίθετα, το *S. meliloti*, μπορεί να αξιοποιήσει την ξανθίνη και το ουρικό οξύ ως μοναδικές πηγές αζώτου, σε μεγαλύτερο μάλιστα βαθμό από τα αμμωνιακά ιόντα. Παραθέτονται τα διαγράμματα ανάπτυξης των δύο αυτών ριζοβίων, με χρήση αμμωνιακών, ξανθίνης ή ουρικού οξέος ως μοναδικής πηγής αζώτου:

Εικόνα 16: Καμπύλες ανάπτυξης του *M. loti* MAFF, σε θρεπτικό μέσο με μοναδική πηγή αζώτου αμμωνιακά ιόντα, ξανθίνη ή ουρικό οξύ.



Εικόνα 17: Καμπύλες ανάπτυξης του *S. meliloti* 1021, σε θρεπτικό μέσο με μοναδική πηγή αζώτου αμμωνιακά ιόντα, ξανθίνη ή ουρικό οξύ.



4.2. *In silico* ανάλυση γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που μετέχουν στο μεταβολισμό των πουρινών καθώς και για πρωτεΐνες που μετέχουν στη μεταφορά πουρινών στο *S. meliloti* 1021

Για τον εντοπισμό γονιδίων που κωδικοποιούν, α) για ένζυμα που μετέχουν στο μεταβολισμό των πουρινών, και β) για μεταφορείς πουρινών εντός του κυττάρου, πραγματοποιήθηκε *in silico* έρευνα στις διεθνείς βάσεις δεδομένων μεταγραφόμενων αλληλουχιών του *S. meliloti* 1021. Συγκεκριμένα, η έρευνα πραγματοποιήθηκε στις βάσεις δεδομένων KEGG Pathway (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) και Rhizobase (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>). Τα γονίδια - στόχοι που βρέθηκαν στο *S. meliloti* 1021 και κωδικοποιούν για πρωτεΐνες μεταφοράς πουρινών, καθώς και ένζυμα που μετέχουν στο μονοπάτι μεταβολισμού πουρινών, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και με βάση την αλληλουχία τους σχεδιάστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του προτύπου έκφρασής τους στο *S. meliloti*:

Πίνακας 2: Γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό και τη μεταφορά πουρινών στο *S. meliloti*.

Γονίδια	Κωδικός	Χαρακτηρισμός
<i>SM_b21277</i>	iunh	υδρολάση νουκλεοσιδίου (προτίμηση σε ινοσίνη)
<i>SM_b21280</i>	apt	φωσφοριβοσυλμεταφοράση αδενίνης
<i>SM_b20849</i>	guaD2	απαμινάση γουανίνης
<i>SM_b21293</i>	guaD1	απαμινάση γουανίνης
<i>SMc01533</i>	adeC1	απαμινάση αδενίνης
<i>SM_b21278</i>	adeC2	απαμινάση αδενίνης
<i>SMA1715</i>	adeC3	απαμινάση αδενίνης
<i>SMA1718</i>	adeC4	απαμινάση αδενίνης
<i>SM_b21286</i>	xdhA1	αφυδρογονάση ξανθίνης (α. ξ.)
<i>SM_b21011</i>	xdhA2	αφυδρογονάση ξανθίνης
<i>SM_b21287</i>	xdhB1	αφυδρογονάση ξανθίνης
<i>SM_b20846</i>	xdhB2	αφυδρογονάση ξανθίνης
<i>SM_b21288</i>	xdhC1	παράγοντας ωρίμανσης αφυδρογονάση ξανθίνης
<i>SM_b20132</i>	yagR	Μο-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα α. ξ.
<i>SM_b20396</i>	yagS	FAD-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα α. ξ.
<i>SM_b21337</i>	yagT	Fe/S-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα α. ξ.
<i>SM_b21338</i>	yagS	FAD-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα α. ξ.
<i>SM_b21556</i>	yagR	Fe/S-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα α. ξ.
<i>SM_b21557</i>	yagS	FAD-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα α. ξ.
<i>SM_b21558</i>	yagT	Fe/S-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα α. ξ.
<i>SMA2349</i>	yagT	Fe/S-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα α. ξ.
<i>SMA2351</i>	yagS	FAD-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα α. ξ.
<i>SMA2353</i>	yagR	Μο-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα α. ξ.
<i>SM_b21284</i>	uox	ουρικάση
<i>SM_b20872</i>	urah	υδρολάση του 5-υδροξυ-ισουουρικού (HIU)
<i>SM_b21285</i>	urah	υδρολάση του 5-υδροξυ-ισουουρικού (HIU)
<i>SM_b20874</i>	urad	πιθανή αποκαρβοξυλάση της 2-οξο-4-υδροξυ-4-καρβοξυ-5-ουρείδοϊμιδαζολίνης (OCHU)
<i>SM_b20875</i>	aln	αλλαντοϊνάση
<i>SM_b21283</i>	allc	αλλαντοϊκάση
<i>SMc01941</i>	ureA	ουρεάση
<i>SMc01939</i>	ureB	ουρεάση
<i>SMc01837</i>	ureC	ουρεάση
<i>SMc02513</i>		NAT/NCS2 περμεάση ξανθίνης/ουρικού
<i>SMc02512</i>		NAT/NCS2 περμεάση ουρικού
<i>SM_b20134</i>		NAT/NCS2 περμεάση
<i>SM_b20289</i>		NAT/NCS2 περμεάση
<i>SM_b21281</i>		NAT/NCS2 περμεάση

4.3. Οργάνωση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών

Τα γονίδια τα οποία μελετήθηκαν και εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών, εντοπίζονται και στα τρία ρεπλικόνια του *S. meliloti* 1021. Τα γονίδια με το πρόθεμα SMC εντοπίζονται στο χρωμόσωμα του ριζοβίου, ενώ αυτά με τα προθέματα SMa & SM_b, εντοπίζονται στα συμβιωτικά mega-πλασμίδια pSymA & pSymB αντίστοιχα.

Στις ομάδες των γονιδίων:

SM_b21277 – *SM_b21278*,

SM_b21283 – *SM_b21284*,

SM_b21285 – *SM_b21286* – *SM_b21287* – *SM_b21288*,

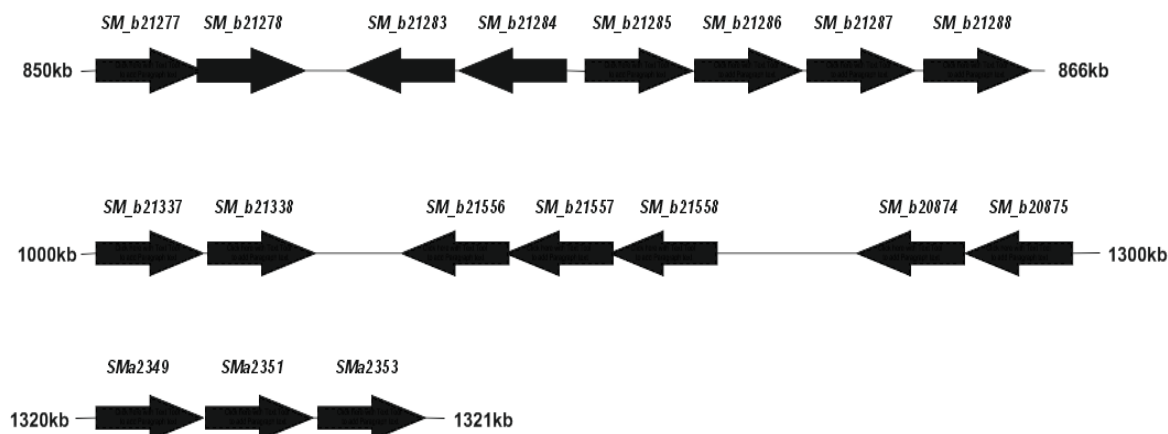
SM_b21337 – *SM_b21338*,

SM_b21556 – *SM_b21557* – *SM_b21558*,

SMa2349 – *SMa2351* – *SMa2353* &

SM_b20874 – *SM_b20875*,

τα εκάστοτε γονίδια εντοπίζονται σε κοντινές θέσεις στο γονιδίωμα και με την ίδια φορά μεταγραφής, κάτι που αποτελεί ένδειξη ότι ίσως ανήκουν σε οπερόνια (εικόνα 18), και βρίσκονται κάτω από κοινή μεταγραφική ρύθμιση.

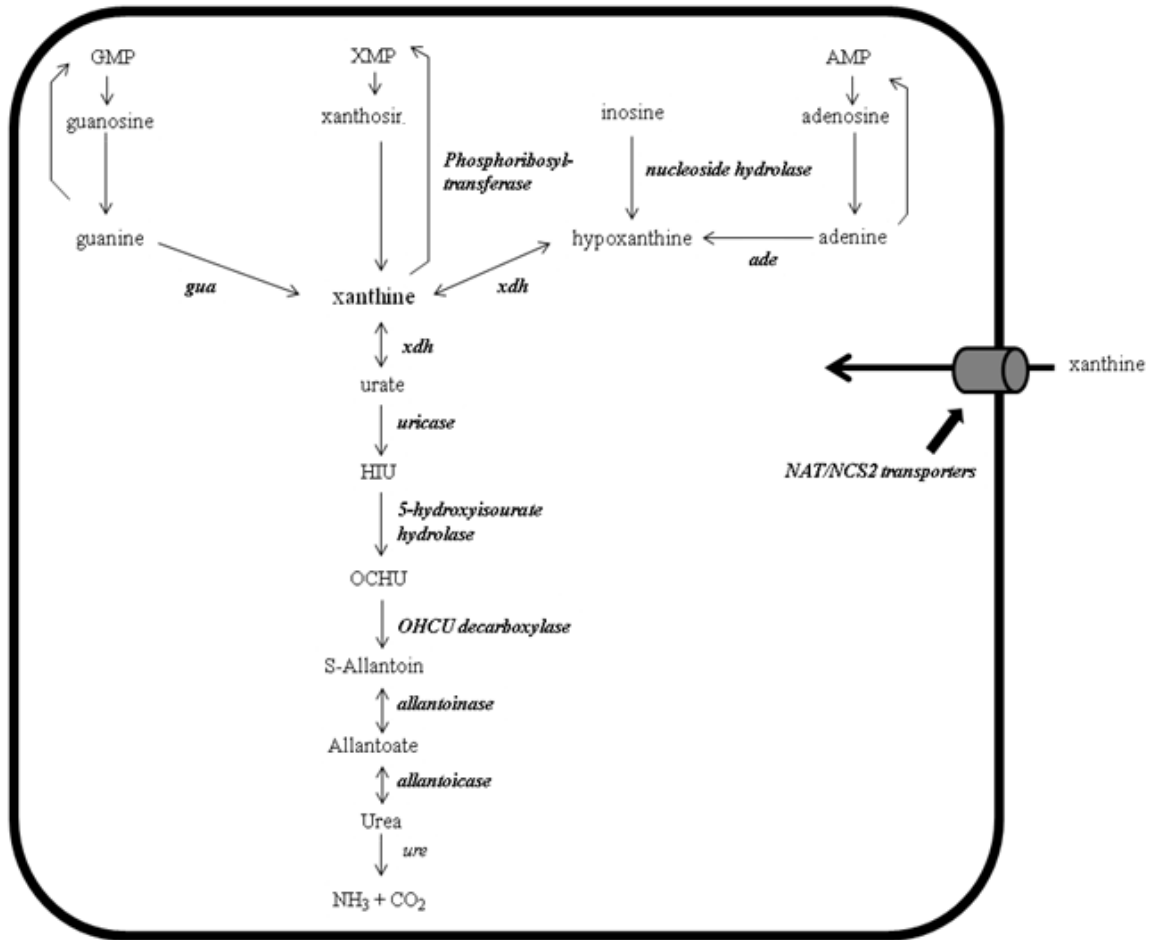


Εικόνα 18: Θέση γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι πουρινών και ανήκουν σε πιθανά οπερόνια στο γονιδίωμα του *S. meliloti* 1021.

4.4. Ένζυμα που κωδικοποιούνται από γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών

Τα γονίδια που εξετάστηκαν κωδικοποιούν για ένζυμα και υπομονάδες ενζύμων που μετέχουν στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών, καθώς και για πρωτεΐνες που

μεταφέρουν (περμεάσες) πουρίνες. Παρακάτω (εικόνα 19) παρουσιάζεται η θέση των ενζύμων αυτών στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών.



Εικόνα 19: Θέση των ενζύμων και των περμεασών που κωδικοποιούνται από γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών.

Σε επόμενες παραγράφους θα παρουσιαστούν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης για τα γονίδια που μελετήθηκαν και εμπλέκονται στο μεταβολισμό και τη μεταφορά των πουρινών.

4.5. Σχεδιασμός εξειδικευμένων εκκινήτων, υπολογισμός σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων & στατιστική ανάλυση

Ολικό RNA απομονώθηκε από τρεις βιολογικές επαναλήψεις για κάθε χειρισμό. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε από τα δείγματα το γενωματικό DNA και η καθαρότητα των δειγμάτων πιστοποιήθηκε με PCR. Ακολούθως, τα δείγματα RNA, μεταγράφηκαν σε cDNA με τη χρήση τυχαίων εκκινήτων και του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR).

Η μελέτη του επιπέδου έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του PCR πραγματικού χρόνου (qReal Time-PCR). Η αντίδραση PCR

πραγματικού χρόνου είναι μία μέθοδος λογαριθμικής ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ακολουθιών cDNA, που δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθ' όλη τη διάρκεια που λαμβάνει χώρα, σε πραγματικό χρόνο. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για κάθε γονίδιο στόχο (πίνακας 6). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με την χρήση του προγράμματος Primer Express (Applied Biosystems, Darmstadt), ενώ ελέγχθησαν μέσω του αλγορίθμου blastn στις δημόσιες βάσεις δεδομένων και επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα να υβριδίζουν και με άλλα γονίδια.

Πίνακας 3: Εξειδικευμένοι εκκινητές για τα γονίδια – στόχους.

	Forward primer	Reverse primer
<i>SM_b21277</i>	5'-TTTCCAGCGGCAATCATACG-3'	5'-ATCCTTCGGATAGGCGATGACC-3'
<i>SM_b21280</i>	5'-CCTCGCGAAAATTCTGGTACG-3'	5'-TAGAGCCGCTTTTTCTGACCG-3'
<i>SM_b20849</i>	5'-TTTTCCGCAGATGCAGGTG-3'	5'-GGTGTTCAGCCATCAAGCAG-3'
<i>SM_b21293</i>	5'-TTCGTGAGCAAAGGCAAGATC-3'	5'-TTTCGCCACGTCACCGTAA-3'
<i>SMc01533</i>	5'-TCACCACCCGAAGGTAATCG-3'	5'-ACACCCGGGAAGTTCATGAA-3'
<i>SM_b21278</i>	5'-TGACGACCTCATCGCCAAA-3'	5'-AAGAAGATGATCGTGCGAGCC-3'
<i>SMa1715</i>	5'-GCGTGAAGCTGATGAACGAC-3'	5'-CGAAGATGTTGACGGGCAG-3'
<i>SMa1718</i>	5'-GCCTCAACGGATACATGCAGT-3'	5'-TGTAGCTCTCGTGATCGGCA-3'
<i>SM_b21286</i>	5'-TTTCGTGATGTCGCTCTACGG-3'	5'-CCTTCTCGATTTCTGAACGC-3'
<i>SM_b21011</i>	5'-GTGGATTTTCATGGCTCCCAA-3'	5'-TAAAGCGACATCACGATCCCC-3'
<i>SM_b21287</i>	5'-CGGATTCTACAAGACCCCGAA-3'	5'-AATAATAGAACGGACGCCCCC-3'
<i>SM_b20846</i>	5'-CCCTTTTCCATGCGGACAA-3'	5'-AGGTGAGCTTCACATGCGGAT-3'
<i>SM_b21288</i>	5'-AAAGATCGCACCTTCTCCACG-3'	5'-GGTCGATCGCCATGAATTCA-3'
<i>SM_b20132</i>	5'-TGTCTGTGTCAGCCAGTGGG-3'	5'-GAGGTCCACATGGTGAGCTTG-3'
<i>SM_b20396</i>	5'-AGGAGTTCACCGTTTGCCT-3'	5'-GCAGGTCGGTCTCGATATCG-3'
<i>SM_b21337</i>	5'-GAACTTCACCCGATGCAAGC-3'	5'-GCACTGAAAGCCGTCTGTGT-3'
<i>SM_b21338</i>	5'-GGCCAGATACGAAACAAGGC-3'	5'-CGTGCGTTGGAGAAGGTTG-3'
<i>SM_b21556</i>	5'-AATGTGCAGGTGATCTGCC-3'	5'-CAGACTGGTACCGAAAGCGC-3'
<i>SM_b21557</i>	5'-TGATGCGAGAGGAGGTGGAG-3'	5'-GGCGATTGATGTCCACGATC-3'
<i>SM_b21558</i>	5'-ATGTATGACGGCGCGAAGAT-3'	5'-CTCTCCTTCTGCGACACCCT-3'
<i>SMa2349</i>	5'-TAACCGAACGACGCTTCTCG-3'	5'-CCCGTCAAATGCAGATGCT-3'
<i>SMa2351</i>	5'-GGCACC AATCTCCTGGACCT-3'	5'-ATGTGTCGGCGTCTCGATC-3'
<i>SMa2353</i>	5'-ATTCGACACACCAGCAACGA-3'	5'-CCGATTACCTTGCCCTGATC-3'
<i>SM_b21284</i>	5'-AAGTTCGGCTTCCCTTCA-3'	5'-TTGCCGATACGGTTCTCGA-3'
<i>SM_b20872</i>	5'-CGAGAGGGAGATACATGAGCAA-3'	5'-CGAGAACGTGGGTCGTCAG-3'
<i>SM_b21285</i>	5'-CAATCTGCGCATCGACCTCTA-3'	5'-TTTCCATCGTGGAGCCGTT-3'
<i>SM_b20874</i>	5'-CACTGGGCTGAACACGACCT-3'	5'-ATGATGAAGGGAAAGCCGAA-3'
<i>SM_b20875</i>	5'-CGGCAAATACGCTCAAGCTC-3'	5'-AGGAATAGAGGAAACCGCCC-3'
<i>SM_b21283</i>	5'-TTGCGACGGACGAATTCTTC-3'	5'-CATCCATTTGCCGTGATCG-3'
<i>SMc01941</i>	5'-ATGTTCTACCCGCGATCAG-3'	5'-CGTGGATCATCTCCGCAAT-3'
<i>SMc01939</i>	5'-GAGATCGAGTTGAATGCGGG-3'	5'-GTTGGCAACCTCGATGCTG-3'
<i>SMc01837</i>	5'-AACACGCTTGCGGAACATCT-3'	5'-CGACAGGTGATGGCATAACA-3'
<i>SMc02513</i>	5'-TGGACTACGCCAACAAATGAA-3'	5'-ATCGGAATCATGCCGAAGC-3'
<i>SMc02512</i>	5'-AGCAACATCGCGGTTCTGA-3'	5'-CGAAATGCATCATGCCGAG-3'
<i>SM_b20134</i>	5'-TGATGTATGCCGGTGCCAT-3'	5'-ATCCTTGGAGAGATTAGCGC-3'
<i>SM_b20289</i>	5'-ACGGCTGCTGCGCTATTTT-3'	5'-CGTAGATGCGCACGAGGTTTA-3'
<i>SM_b21281</i>	5'-TCTCGTCCACGTCATTCTCGT-3'	5'-TTGCCCTCTCCACCAGTTTC-3'

Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστούν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης είναι: $Eff^{-\Delta Ct}$ όπου Eff: η απόδοση της αντίδρασης PCR και $\Delta Ct: Ct_{\text{γονιδίου}} - \text{GeoMean } Ct_{\text{γονιδίων αναφοράς}}$. Ως γονίδια αναφοράς επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν η πολυνουκλεοτιδική νουκλεοτρανσφεράση (rnp, polyribonucleotide nucleotidyltransferase, *SMc00324*) και η heat shock protein 70 kilodaltons (HSP70) dnaK (*SMc02857*). Τα γονίδια αναφοράς επιλέχτηκαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε τα επίπεδα έκφρασής τους να παραμένουν σταθερά τόσο στην συμβιωτική όσο και στην ελεύθερη διαβιούντα κατάσταση.

Παρακάτω παρατίθενται διαγράμματα έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών, καθώς και αυτών που κωδικοποιούν για περμεάσες που εμπλέκονται στη μεταφορά των πουρινών. Εμφανίζεται η σχετική έκφραση των γονιδίων στους χειρισμούς:

nod 14d	φυμάτια <i>M. truncatula/S. meliloti</i> 14dpi
nod 21d	φυμάτια <i>M. truncatula/S. meliloti</i> 21dpi
nod 28d	φυμάτια <i>M. truncatula/S. meliloti</i> 28dpi
NH₄ exp	καλλιέργεια <i>S. meliloti</i> 1021 με αμμωνιακά ιόντα ως μοναδική πηγή αζώτου, συλλεγμένα στην εκθετική φάση ανάπτυξης
NH₄ stat	καλλιέργεια <i>S. meliloti</i> 1021 με αμμωνιακά ιόντα ως μοναδική πηγή αζώτου, συλλεγμένα στη στατική φάση ανάπτυξης
xan exp	καλλιέργεια <i>S. meliloti</i> 1021 με ξανθίνη ως μοναδική πηγή αζώτου, συλλεγμένα στην εκθετική φάση ανάπτυξης
xan stat	καλλιέργεια <i>S. meliloti</i> 1021 με ξανθίνη ως μοναδική πηγή αζώτου, συλλεγμένα στη στατική φάση ανάπτυξης
uric exp	καλλιέργεια <i>S. meliloti</i> 1021 με ουρικό οξύ ως μοναδική πηγή αζώτου, συλλεγμένα στην εκθετική φάση ανάπτυξης
uric stat	καλλιέργεια <i>S. meliloti</i> 1021 με ουρικό οξύ ως μοναδική πηγή αζώτου, συλλεγμένα στη στατική φάση ανάπτυξης

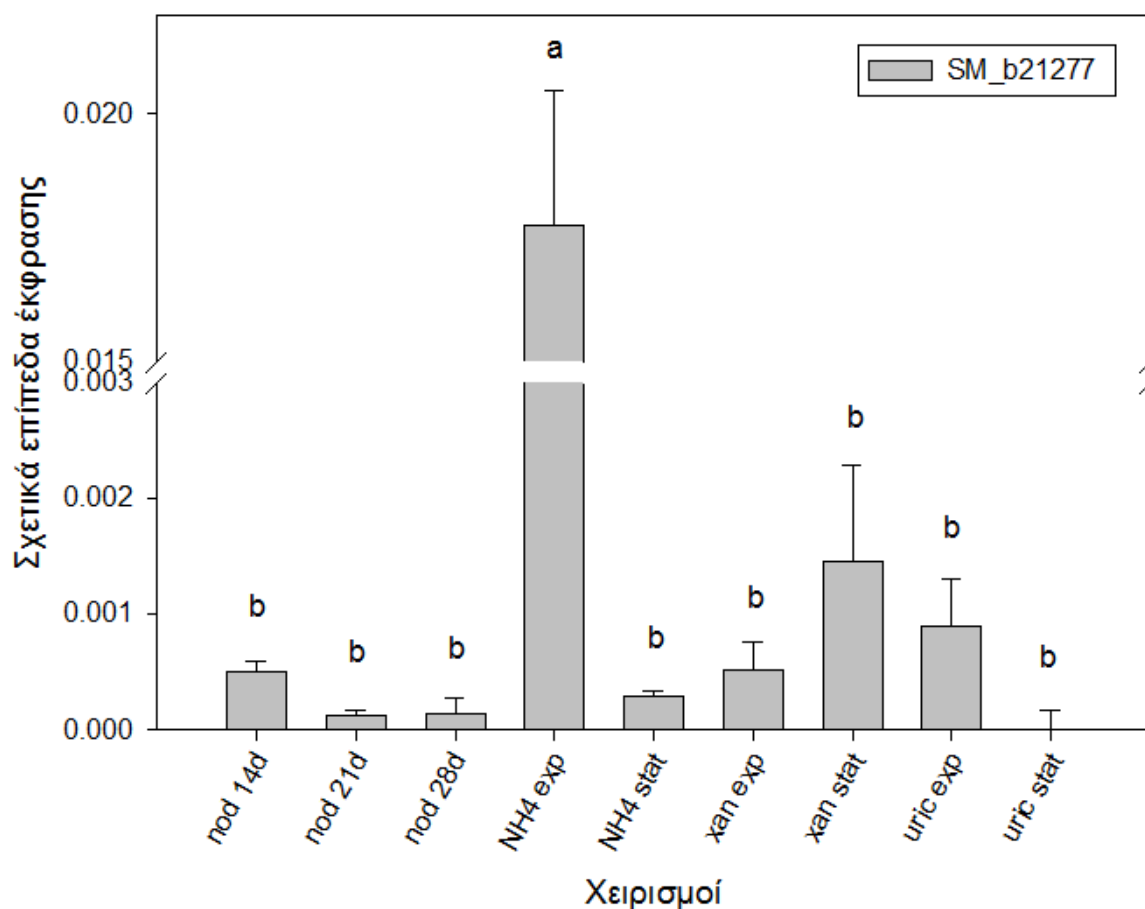
Τα διαγράμματα έκφρασης των γονιδίων δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα SigmaPlot 10.0.

Στατιστική σύγκριση πραγματοποιήθηκε μεταξύ όλων των χειρισμών για κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SigmaStat 3.5, πραγματοποιώντας δοκιμή Anova σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.

4.6. Μελέτη προτύπου έκφρασης του γονιδίου *SM_b21277*

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μία νουκλεοσιδική υδρολάση, η οποία μετατρέπει –παρουσία νερού– όλα τα πουρινικά νουκλεοσίδια σε ριβόζη και την αντίστοιχη αζωτούχα βάση τους (iunh). Το συγκεκριμένο ένζυμο έχει προτίμηση στην ουριδίνη ή ινোসίνη για υπόστρωμα (EC: 3.2.2.1). Το ένζυμο αυτό είναι σημαντικό για την περίσωση των πουρινικών νουκλεοσιδίων, ιδιαίτερα σε

οργανισμούς που δεν είναι ικανοί να συνθέσουν *de novo* τις πουρίνες που χρειάζονται.



Εικόνα 20: Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *SM_b21277* που κωδικοποιεί για ιονη νουκλεοσιδική υδρολάση με προτίμηση σε ουριδίνη & ινοσίνη, σε φυμάτια 14, 21, 28 dpi του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι M.O. των τριών βιολογικών επαναλήψεων ± S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Ανονα πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ των χειρισμών.

Σαφώς και θέλουμε να συγκρίνουμε τα σχετικά επίπεδα έκφρασης μεταξύ όλων των χειρισμών σε κάθε γονίδιο, αλλά θα δώσουμε ιδιαίτερη προσοχή στη σύγκριση μεταξύ έκφρασης ανάμεσα στους χειρισμούς των φυματίων και σε αυτούς των ελεύθερα διαβιούντων ριζοβίων, που είχαν ως μοναδική πηγή αζώτου τα αμμωνιακά ιόντα (ο “control” χειρισμός), για να εντοπιστούν ενδείξεις για πιθανό ρόλο του μεταβολικού μονοπατιού των πουρινών κατά τη συμβίωση.

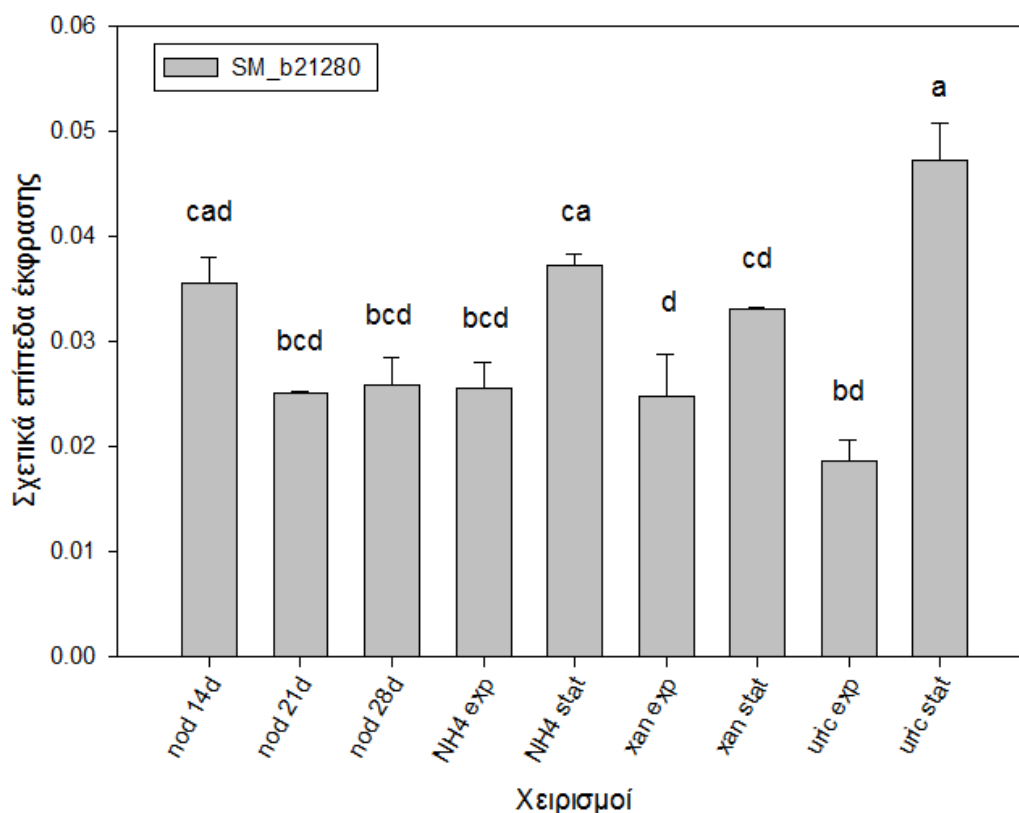
Σε ότι αφορά στο γονίδιο *SM_b21277*, βλέπουμε ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των χειρισμών δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά, με εξαίρεση τον χειρισμό *NH4 exp* (ελεύθερα διαβιούντα ριζόβια με μοναδική πηγή αζώτου τα αμμωνιακά, συλλεγμένα σε εκθετική φάση ανάπτυξης).

Μεταξύ των χειρισμών των φυματίων και των ελεύθερα διαβιούντων *S. meliloti* με τα αμμωνιακά ως μοναδική πηγή αζώτου, παρατηρείται ότι στα φυμάτια και τη

στατική φάση των ελεύθερα διαβιούντων ριζοβίων η έκφραση του γονιδίου κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, ενώ είναι ιδιαίτερα αυξημένη στην εκθετική φάση.

4.7. Μελέτη προτύπου έκφρασης του γονιδίου *SM_b21280*

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μία φωσφοριβοσυλτρανσφεράση αδενίνης (EC: 2.4.2.7). Χρησιμοποιεί αδενίνη και PRPP για το σχηματισμό AMP και είναι σημαντικό, καθώς μπορεί να περισώσει αδενίνη προς AMP ώστε να χρησιμοποιηθεί από το κύτταρο.



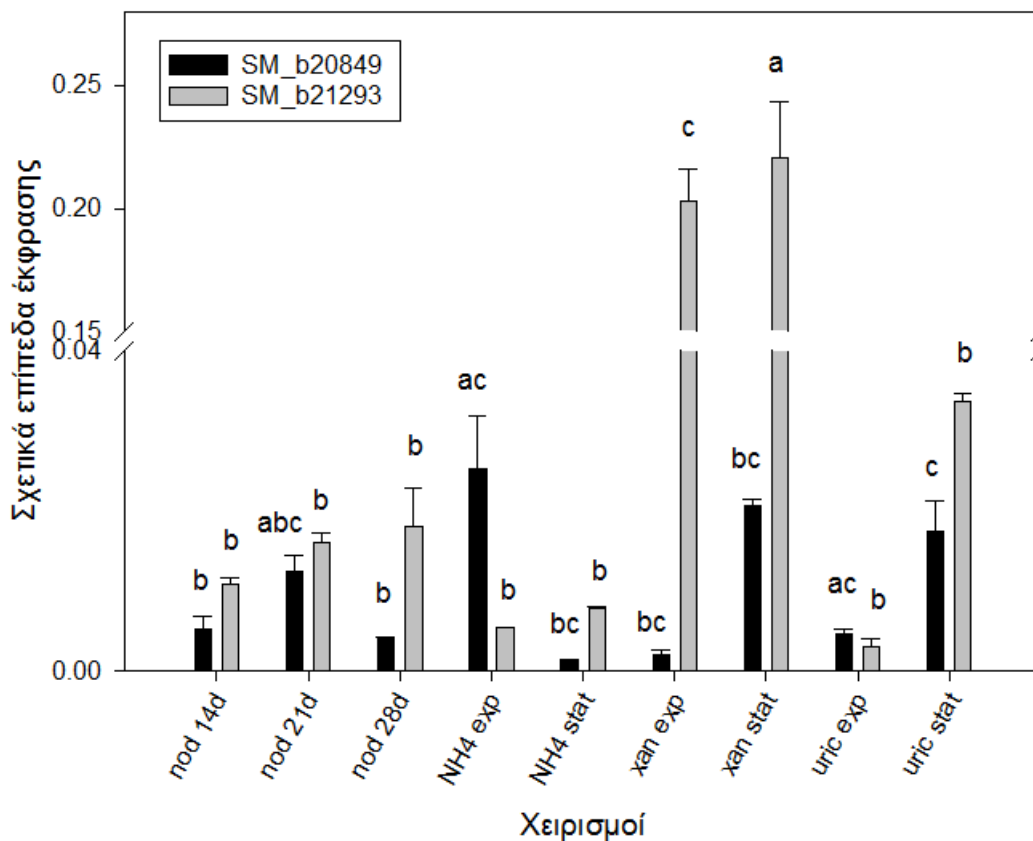
Εικόνα 21: Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *SM_b21280* που κωδικοποιεί για apf φωσφοριβοσυλτρανσφεράση, σε φυμάτια 14, 21, 28 dpi του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι Μ.Ο. των τριών βιολογικών επαναλήψεων \pm S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Ανονα πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ των χειρισμών.

Μελετώντας τα σχετικά επίπεδα έκφρασης, παρατηρούμε στατιστικώς σημαντικές διαφορές στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών, με τον χειρισμό των ελεύθερα διαβιούντων ριζοβίων στην εκθετική φάση, με ουρικό οξύ ως μοναδική πηγή αζώτου (*uric exp*) να παρουσιάζει τα μικρότερα επίπεδα έκφρασης, ενώ ο αντίστοιχος χειρισμός της στατικής φάσης παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης.

Μεταξύ των χειρισμών των φυματίων και των ελεύθερα διαβιούντων *S. meliloti* με αμμωνιακά ως μοναδική πηγή αζώτου, παρατηρούμε ότι η σχετική έκφραση του γονιδίου κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα.

4.8. Μελέτη προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για απαμινάση γουανίνης

Στο *S. meliloti* 1021 βρέθηκαν δύο γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για την απαμινάση της γουανίνης (EC: 3.5.4.3): τα *SM_b20849* (*guaD2*) και *SM_b21293* (*guaD1*). Η απαμινάση της γουανίνης είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή της γουανίνης σε ξανθίνη και αμμωνία.



Εικόνα 22: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *SM_b20849* & *SM_b21293* που κωδικοποιούν για *gua* απαμινάση της γουανίνης, σε φυμάτια 14, 21, 28 dpi του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι Μ.Ο. των τριών βιολογικών επαναλήψεων \pm S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Ανομα πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ όλων των χειρισμών ξεχωριστά για κάθε γονίδιο.

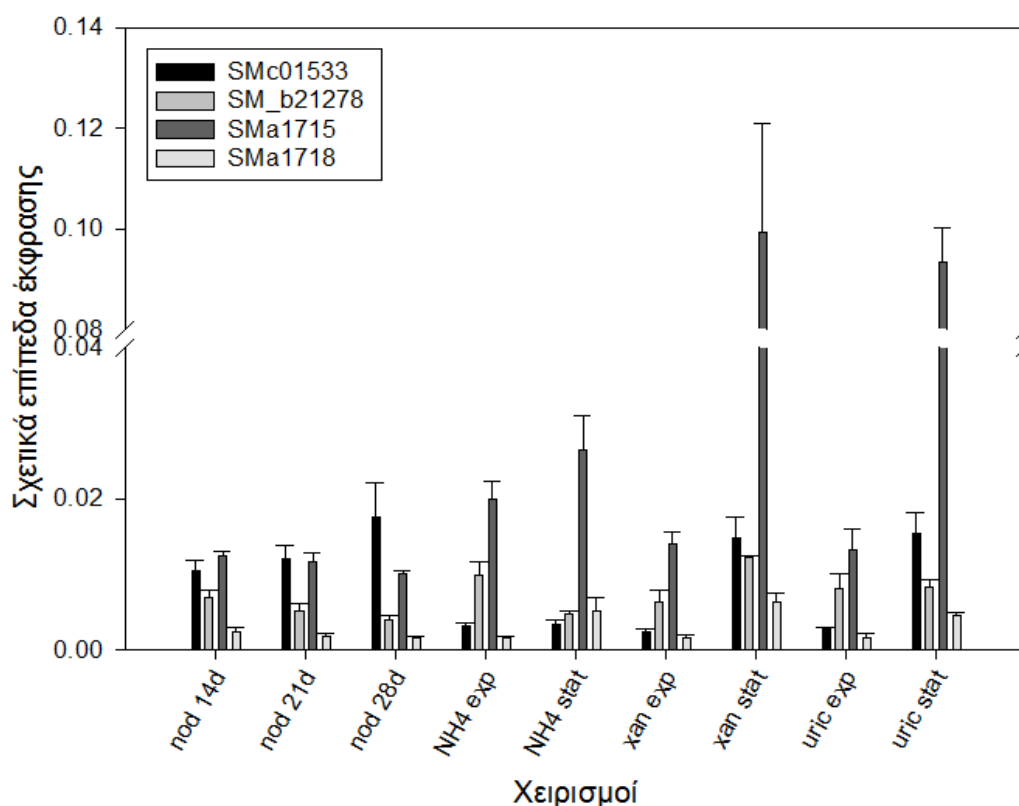
Σε ότι αφορά στα πρότυπα έκφρασης του γονιδίου *SM_b20849* (*guaD2*) παρατηρούμε αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους χειρισμούς NH_4 exp, xan stat & uric stat. Επίσης, μεταξύ των φυματίων παρατηρείται αυξημένη έκφραση του γονιδίου στα φυμάτια 21 ημερών, σε σχέση με αυτά των 14 & 28 ημερών, χωρίς όμως να παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Για το γονίδιο *SM_b21293* (*guaD1*), παρατηρούμε αυξημένη και στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των χειρισμών xan exp & xan stat, όπου τα ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* είχαν την ξανθίνη ως μοναδική πηγή αζώτου.

Και στα δύο γονίδια που κωδικοποιούν για απαμινάση γουανίνης, δεν παρατηρείται κάτι αξιοσημείωτο στη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των φυμάτων και των ελεύθερα διαβιούντων NH_4 χειρισμών.

4.9. Μελέτη προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για απαμινάση αδενίνης

Στις βάσεις δεδομένων βρέθηκαν τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν για απαμινάση αδενίνης (EC: 3.5.4.2): τα *SMc01533* (*adeC1*), *SM_b21278* (*adeC2*), *SMA1715* (*adeC3*) & *SMA1718* (*adeC4*). Όπως βλέπουμε δύο από τα γονίδια εδράζονται στο *rSymA* μεγαπλασμίδιο του *S. meliloti* 1021, ένα στο μεγαπλασμίδιο *rSymB* και ένα στο χρωμόσωμα του ριζοβίου.



Εικόνα 23: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *SMc01533*, *SM_b21278*, *SMA1715* & *SMA1718* που κωδικοποιούν για *ade* απαμινάση της αδενίνης, σε φυμάτια 14, 21, 28 dpi του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι Μ.Ο. των τριών βιολογικών επαναλήψεων \pm S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Απονα πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ όλων των χειρισμών για κάθε γονίδιο ξεχωριστά και παρουσιάζεται στο Παράρτημα Β.

Η απαμινάση της αδενίνης καταλύει την αντίδραση: αδενίνη προς υποξανθίνη & αμμωνία. Η αντίδραση της απαμίνωσης της αδενίνης είναι σημαντική τόσο για τη χρήση της αδενίνης ως πουρίνης, όσο και ως πηγής αζώτου.

Μελετώντας τα επίπεδα έκφρασης σε ότι αφορά στο γονίδιο *SMc01533* (*adeC1*), παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου στα φυμάτια, καθώς και στους χειρισμούς *xan stat* & *uric stat*. Αξιοσημείωτη είναι και η επαγωγή του

γονιδίου στα φυμάτια, σε σχέση με τους χειρισμούς NH_4 των ριζοβίων, κάτι που μπορεί να αποτελεί ένδειξη για ρόλο του *SMc01533* κατά τη συμβίωση.

Το γονίδιο *SM_b21278* (*adeC2*) ακολουθεί σε μεγάλο βαθμό τα πρότυπα έκφρασης του γονιδίου *SM_b21277* (4.6) που, όπως προαναφέραμε, μπορεί να ανήκουν σε οπερόνιο. Σε αυτή την περίπτωση όμως, μαζί με τον χειρισμό NH_4 , παρατηρείται αύξηση στην έκφραση και κατά τον χειρισμό *xan stat*.

Τα γονίδια *SMc1715* & *SMc1718* παρουσιάζουν μεταξύ τους ίδια πρότυπα έκφρασης, και είναι επαγόμενα στους χειρισμούς *xan stat* & *uric stat*, παρουσιάζοντας στατιστικώς σημαντική διαφορά από τους υπόλοιπους χειρισμούς (Παράρτημα Β).

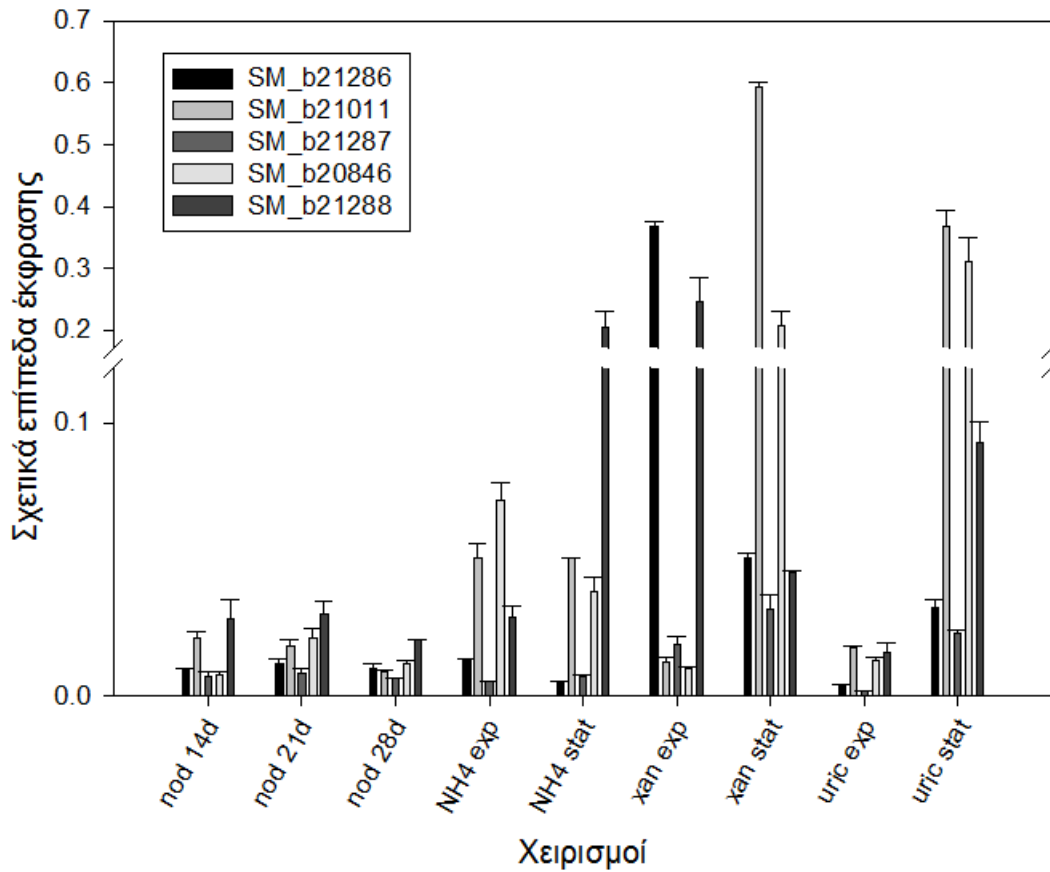
4.10. Μελέτη προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για την αφυδρογονάση ξανθίνης

Η αφυδρογονάση της ξανθίνης είναι το ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη, και στη συνέχεια την οξείδωση της ξανθίνης σε ουρικό οξύ που είναι και το πρώτο βήμα για τον καταβολισμό των πουρινών.

Η αφυδρογονάση της ξανθίνης είναι ένα ομοδιμερές ένζυμο του οποίου το πρότυπο έκφρασης μελετήθηκε, και στο *S. meliloti* 1021 τα γονίδια *SM_b21286* (*xdhA1*), *SM_b21011* (*xdhA2*), *SM_b21287* (*xdhB1*) & *SM_b20846* (*xdhB2*) κωδικοποιούν για τις δομικές περιοχές του ενζύμου, ενώ το γονίδιο *SM_b21288* (*xdhC1*) κωδικοποιεί για έναν παράγοντα ωρίμανσης του ενζύμου.

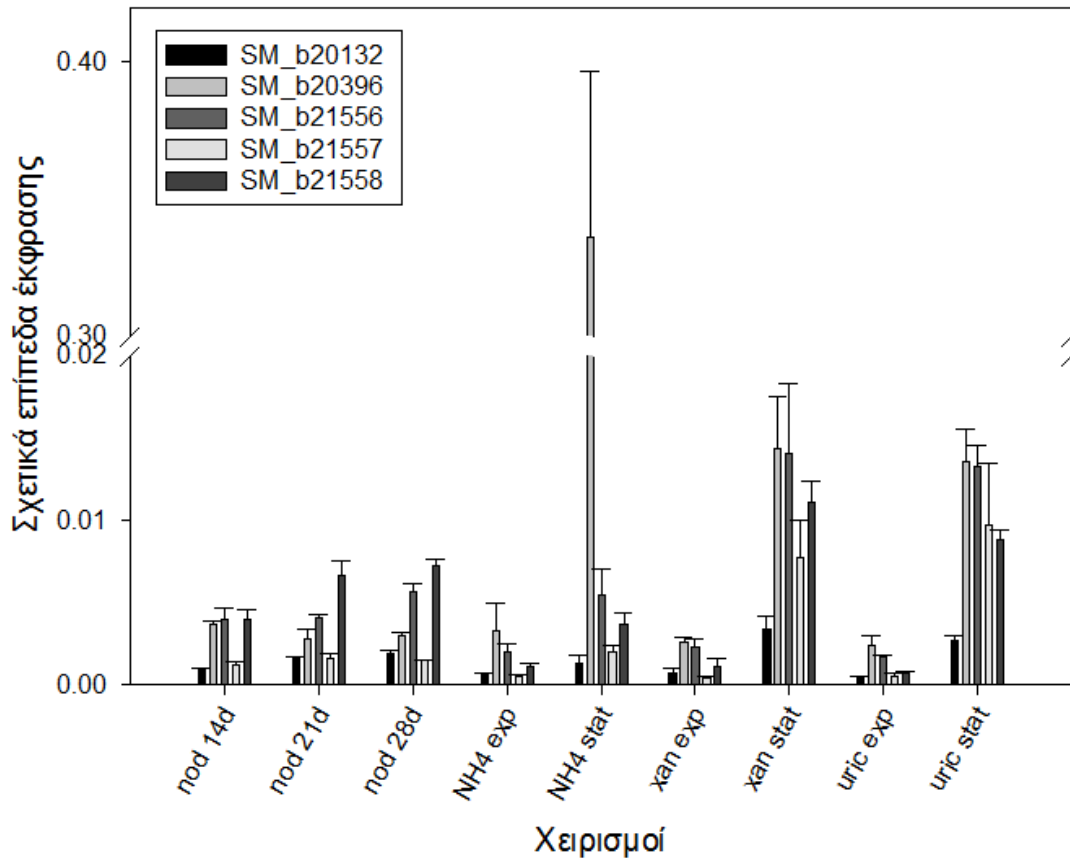
Τα υπόλοιπα γονίδια που εντοπίστηκαν (*SM_b20132*, *SM_b20396*, *SM_b21337*, *SM_b21338*, *SM_b21556*, *SM_b21557*, *SM_b21558*, *SMA2349*, *SMA2351* & *SMA2353*) κωδικοποιούν για μικρές υπομονάδες του ενζύμου που δεσμεύουν FAD, Mo ή Fe/S.

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των δομικών υπομονάδων του ενζύμου της αφυδρογονάσης της ξανθίνης, καθώς και του παράγοντα ωρίμανσης του ενζύμου.



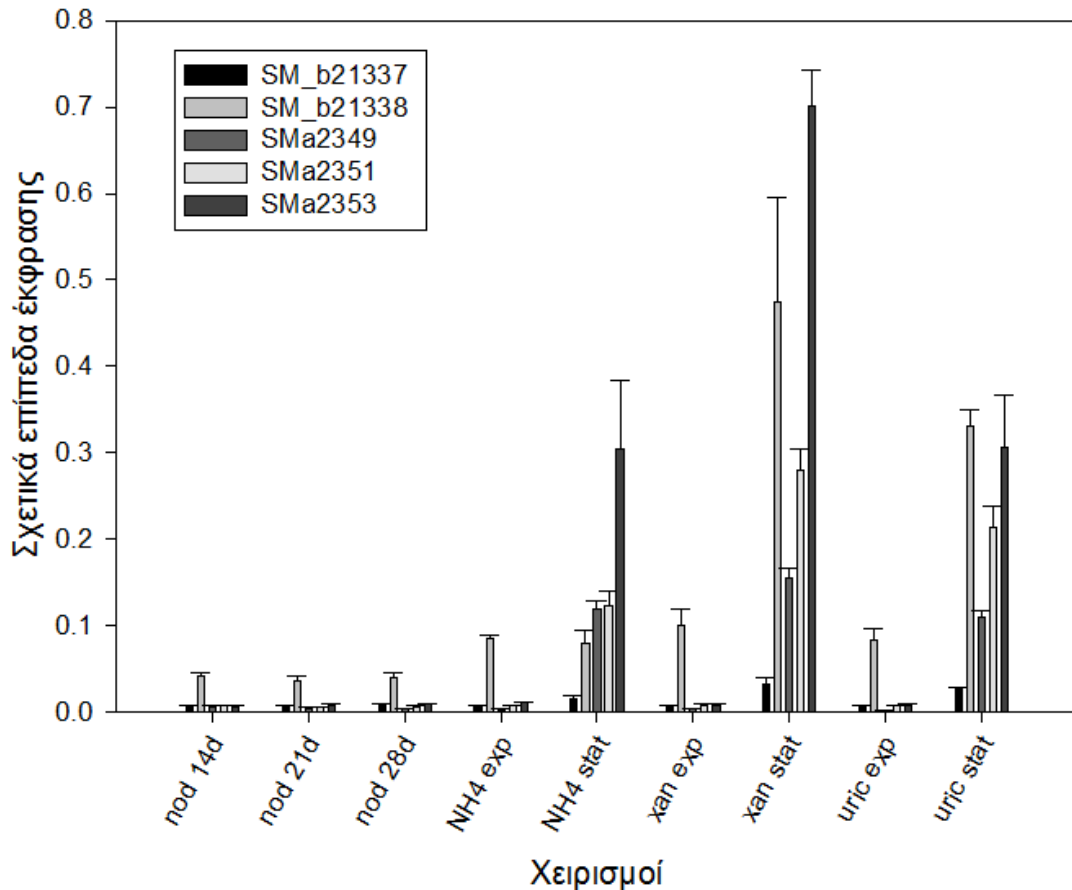
Εικόνα 24: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *SM_b21286*, *SM_b21011*, *SM_b21287*, *SM_b20846* & *SM_b21288* που κωδικοποιούν για υπομονάδες της *xdh* αφυδρογονάσης ξανθίνης, σε φυμάτια 14, 21, 28 dpi του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι Μ.Ο. των τριών βιολογικών επαναλήψεων \pm S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Ανονα πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ όλων των χειρισμών για κάθε γονίδιο ξεχωριστά και παρουσιάζεται στο Παράρτημα Β.

Σε ότι αφορά στις υπομονάδες *xdhB* (*SM_b21011* & *SM_b20846*), παρατηρείται επαγωγή με στατιστικώς σημαντική διαφορά στους χειρισμούς *xan stat* & *uric exp*, κάτι που ισχύει και για τις υπομονάδες *xdhA* (*SM_b21286* & *SM_b21287*), με επιπλέον επαγωγή στον χειρισμό *xan exp*. Στον παράγοντα ωρίμανσης του ενζύμου (*SM_b21288*) παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης του στους χειρισμούς *NH4 stat* & *xan exp*.



Εικόνα 25: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *SM_b20132*, *SM_b20396*, *SM_b21556*, *SM_b21557* & *SM_b21558* που κωδικοποιούν για μικρές υπομονάδες δέσμευσης της xdh αφυδρογονάσης ξανθίνης, σε φυμάτια 14, 21, 28 dpi του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι Μ.Ο. των τριών βιολογικών επαναλήψεων \pm S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Ανονα πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ όλων των χειρισμών για κάθε γονίδιο ξεχωριστά και παρουσιάζεται στο Παράρτημα Β.

Όσον αφορά στις μικρές δεσμευτικές υπομονάδες της xdh, παρατηρούμε ότι το γονίδιο *SM_b20132*, που κωδικοποιεί για Mo-δεσμεύουσα υπομονάδα, επάγεται με στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκφρασή του στους χειρισμούς xan stat & uric stat, ενώ παρουσιάζει σχετική αύξηση στα επίπεδα έκφρασής του στα φυμάτια 21 & 28 ημερών. Η υπομονάδα που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SM_b20396* και δεσμεύει FAD, επάγεται ισχυρά στο χειρισμό NH₄ stat και παρουσιάζει ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα έκφρασης στους υπόλοιπους χειρισμούς. Οι μικρές υπομονάδες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *SM_b21556* (Mo-δεσμεύουσα), *SM_b21557* (FAD-δεσμεύουσα) και *SM_b21558* (Fe/S-δεσμεύουσα), τα οποία ίσως ανήκουν σε ένα οπερόνιο, παρουσιάζουν σχεδόν όμοιο πρότυπο έκφρασης, με επαγωγή στους χειρισμούς xan stat & uric stat. Η διαφορά προκύπτει στο γεγονός ότι το γονίδιο *SM_b21558* επάγεται και στα φυμάτια σε σχέση με τους ελεύθερα διαβιούντες χειρισμούς NH₄.



Εικόνα 26: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *SM_b21337*, *SM_b21338*, *SMa2349*, *SMa2351* & *SMa2353* που κωδικοποιούν για μικρές υπομονάδες δέσμευσης της xdh αφυδρογονάσης ξανθίνης, σε φυμάτια 14, 21, 28 dpi του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι Μ.Ο. των τριών βιολογικών επαναλήψεων \pm S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Ανοπα πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ όλων των χειρισμών για κάθε γονίδιο ξεχωριστά και παρουσιάζεται στο Παράρτημα Β.

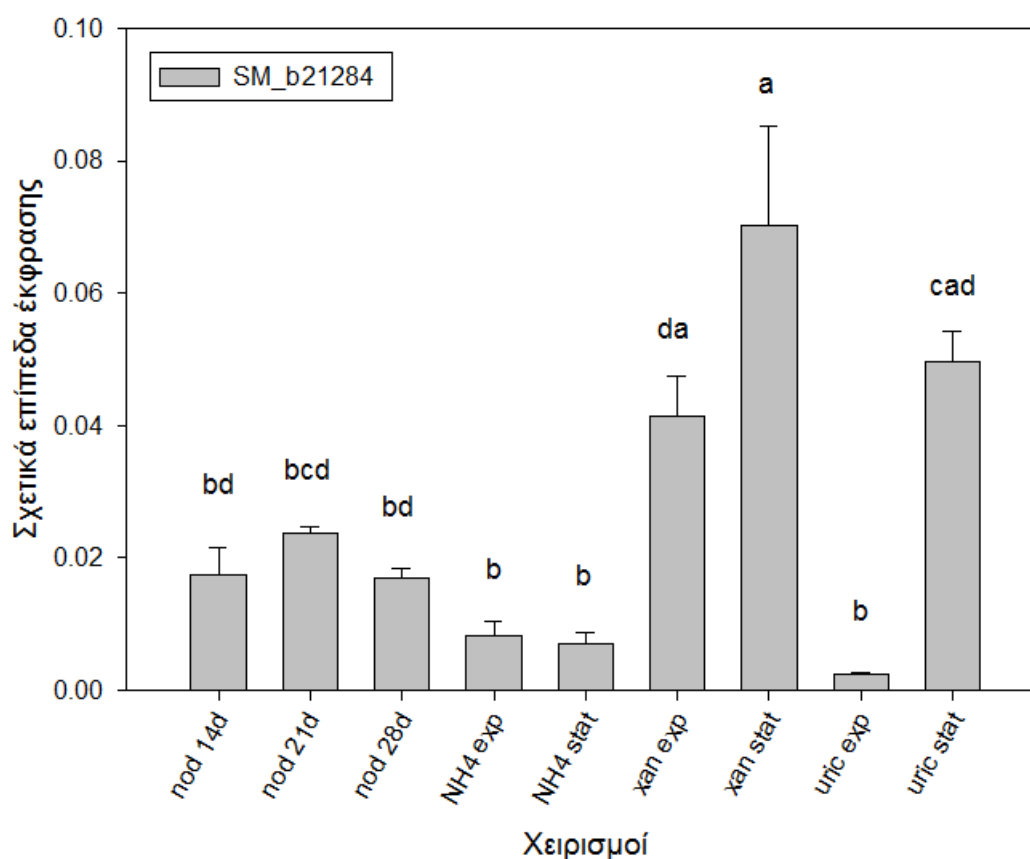
Τα γονίδια *SM_b21337* & *SM_b21338* (που πιθανόν να ανήκουν στο ίδιο οπερόνιο, όπως προαναφέρθηκε) και κωδικοποιούν για Fe/S- και FAD-δεσμεύουσες υπομονάδες αντιστοίχως, ακολουθούν το ίδιο πρότυπο έκφρασης, με επαγωγή στους χειρισμούς xan stat & uric stat. Σε ότι αφορά στα γονίδια *SMa2349* (κωδικοποιεί για Fe/S-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα), *SMa2351* (FAD-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα) και *SMa2353* (Mo-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα), ακολουθούν το ίδιο μοτίβο στην έκφρασή τους, με επαγωγή στις στατικές φάσεις ανάπτυξης των ελεύθερα διαβιούντων *S. meliloti* 1021 (NH₄, xan & uric).

Στη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των υπομονάδων της xdh, μεταξύ των χειρισμών των φυματίων και αυτών των ελεύθερα διαβιούντων *S. meliloti* με τα αμμωνιακά ιόντα ως μοναδική πηγή αζώτου δεν παρατηρήθηκε κάτι αξιοσημείωτο, με εξαίρεση το γονίδιο *SM_b21558* το οποίο κωδικοποιεί για Fe/S-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα. Εκτός της επαγωγής της έκφρασης της υπομονάδας στους χειρισμούς xan stat & uric stat, επαγωγή παρατηρήθηκε και στα φυμάτια. Αυτό, μαζί με το

γεγονός ότι τέτοιου είδους υπομονάδες (δεσμευτικές) μπορεί να ενεργοποιούν ένα ένζυμο, αποτελεί μία ένδειξη ότι ίσως αυτό το γονίδιο να έχει κάποιο ρόλο κατά τη συμβίωση των ριζοβίων.

4.11. Μελέτη προτύπου έκφρασης του γονιδίου *SM_b21284*

Μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *SM_b21284* του *S. meliloti* 1021 σε συμβιωτικές (με το ψυχανθές *M. truncatula*) και μη-συμβιωτικές συνθήκες. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για το ένζυμο ουρικάση (EC: 1.7.3.3) το οποίο μετατρέπει (παρουσία O₂ & H₂O) το ουρικό οξύ σε 5-υδροξυ-ισσοουρικό και H₂O₂.

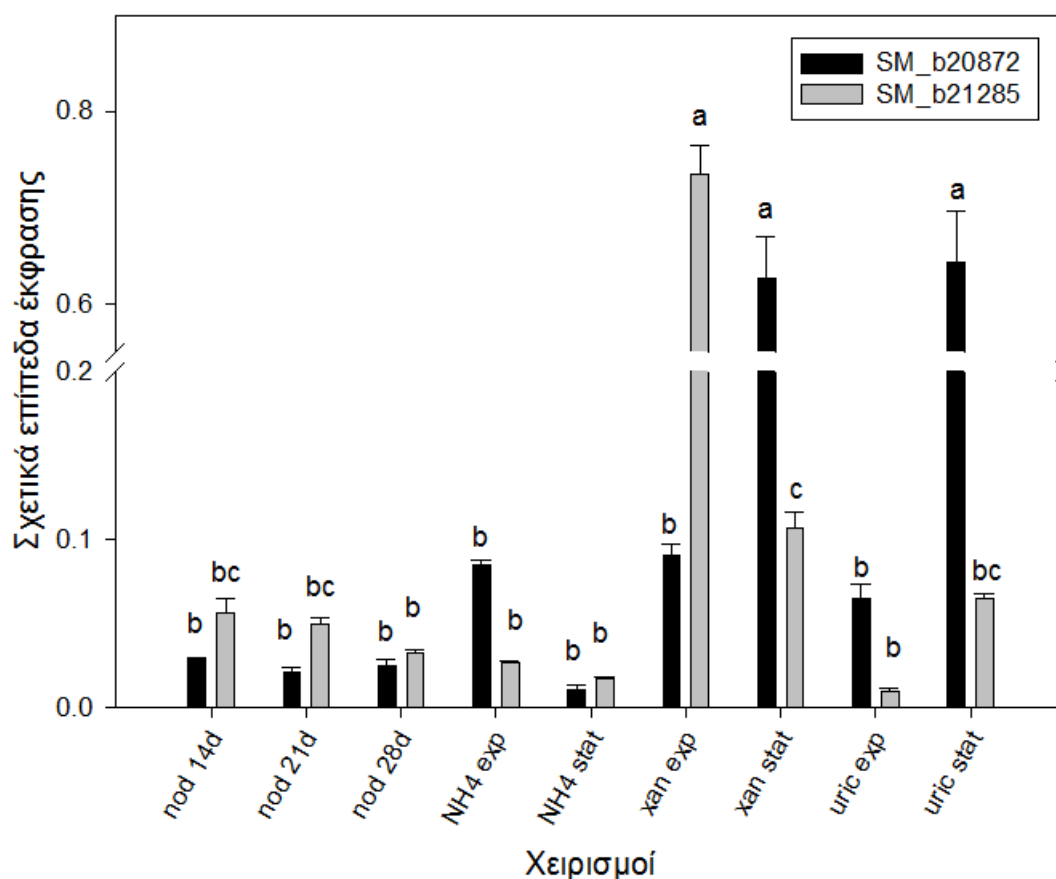


Εικόνα 27: Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *SM_b21284* που κωδικοποιεί για το ένζυμο ουρικάση, σε φυμάτια 14, 21, 28 dpi του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι Μ.Ο. των τριών βιολογικών επαναλήψεων ± S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Anova πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ των χειρισμών.

Παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους χειρισμούς xan exp, xan stat & uric stat, με στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στη σύγκριση μεταξύ των χειρισμών των φυματίων και των ελεύθερα διαβιούντων NH₄, βλέπουμε μία ελαφριά αύξηση της έκφρασης στα φυμάτια, χωρίς όμως να είναι στατιστικώς σημαντική.

4.12. Μελέτη προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για την υδρολάση του 5-υδροξυ-ισουουρικού

Από τις δημόσιες βάσεις δεδομένων, βρέθηκαν για το *S. meliloti* 1021 δύο γονίδια που κωδικοποιούν για την υδρολάση του 5-υδροξυ-ισουουρικού, των οποίων τα πρότυπα έκφρασης μελετήθηκαν. Τα γονίδια αυτά είναι τα: *SM_b20872* & *SM_b21285*. Η υδρολάση του 5-υδροξυ-ισουουρικού (EC: 3.5.2.17) μετατρέπει (παρουσία H₂O) το 5-υδροξυ-ισουουρικό (HIU) σε 2-οξο-4-υδροξυ-4-καρβοξυ-5-ουρεϊδοϊμιδαζολίνη (OCHU).



Εικόνα 28: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *SM_b20872* & *SM_b21285* που κωδικοποιούν για την υδρολάση του 5-υδροξυ-ισουουρικού, σε φυμάτια 14, 21, 28 dpi του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι Μ.Ο. των τριών βιολογικών επαναλήψεων ± S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Anova πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ των χειρισμών ξεχωριστά για κάθε γονίδιο.

Για το γονίδιο *SM_b20872* παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους χειρισμούς xan stat & uric stat και με στατιστικώς σημαντική διαφορά από τους υπόλοιπους χειρισμούς.

Σε ότι αφορά στο γονίδιο *SM_b21285* έχει αναφερθεί ότι μπορεί να ανήκει στο ίδιο οπερόνιο μαζί με τα *SM_b21286*, *SM_b21287* & *SM_b21288* και να υπόκειται στην ίδια μεταγραφική ρύθμιση. Το *SM_b21285* μοιράζεται το ίδιο πρότυπο

έκφρασης με τα *SM_b21286* & *SM_b21287* (4.10), παρουσιάζοντας επαγωγή της έκφρασής του στους χειρισμούς *xan exp*, *xan stat* & *uric stat*. Αυτό αποτελεί μία ακόμη ένδειξη ότι τα γονίδια αυτά μπορεί να βρίσκονται σε ένα οπερόνιο.

Στη σύγκριση των χειρισμών των φυματίων με αυτών των ελεύθερα διαβιούντων *S. meliloti* που είχαν ως μοναδική πηγή αζώτου αμμωνιακά ιόντα, δεν εξάγεται κάποιο αξιόλογο συμπέρασμα.

4.13. Μελέτη προτύπου έκφρασης του γονιδίου *SM_b20874*

Το γονίδιο *SM_b20874* κωδικοποιεί για μία πιθανή αποκαρβοξυλάση της OCHU (2-οξο-4-υδροξυ-4-καρβοξυ-5-ουρεϊδοϊμιδαζολίνη). Δεν είχε χαρακτηριστεί κάποιο γονίδιο που να κωδικοποιεί για αποκαρβοξυλάση της OCHU στο *S. meliloti* 1021, και έτσι με τη μέθοδο *blastp* (protein – protein BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov) βρέθηκε 99% ομολογία με την ήδη χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη της αποκαρβοξυλάσης της OCHU από το *S. meliloti* CCNWSX0020.

```
>[ref|ZP_12978067.1] OCHU decarboxylase [Sinorhizobium meliloti CCNWSX0020]
[gb|EHK74026.1] OCHU decarboxylase [Sinorhizobium meliloti CCNWSX0020]
Length=167

Score = 333 bits (855), Expect = 6e-115, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 165/167 (99%), Positives = 166/167 (99%), Gaps = 0/167 (0%)

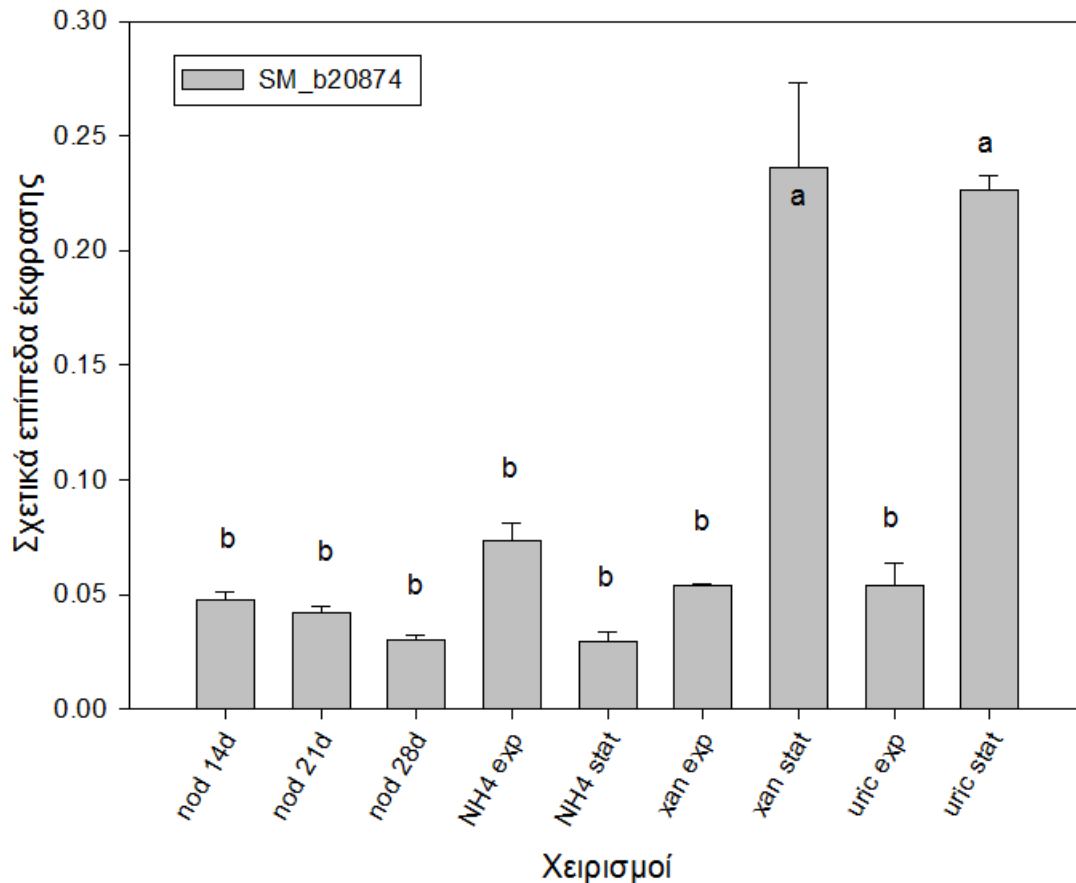
Query 1  MSERDDFIRRFGGIFEHSPWVAERAYDRAASSGLTAGNVHSALCNAFRAASPAERLRVLR 60
Sbjct 1  MSERDDFIRRFGGIFEHSPWVAERAYDRAASSGLTAGNVHSALCNAFRAASPAERLRVLR 60

Query 61  AHPDLAGKLAVAGELTADSKAEQASAGLDRLSPEEHSRFTGLNTTYTKKFGFPFIIAVKG 120
Sbjct 61  AHP+LAGKLAVAGELTA SKAEQASAGLDRLSPEEHSRFTGLNTTYTKKFGFPFIIAVKG 120

Query 121 LTKEDILAAFERRIDNSKEEEFETACAEVERIARLRLRSMLPGDDNA 167
Sbjct 121 LTKEDILAAFERRIDNSKEEEFETACAEVERIARLRLRSMLPGDDNA 167
```

Εικόνα 29: Ομολογία υποθετικής πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SM_b20874* του *S. meliloti* 1021, με την αποκαρβοξυλάση της OCHU από το *S. meliloti* CCNWSX0020.

Η αποκαρβοξυλάση της OCHU (EC: 4.1.1.-) είναι το ένζυμο το οποίο μετατρέπει την OCHU σε αλλαντοΐνη και παρακάτω παρουσιάζονται τα σχετικά επίπεδα έκφρασής της.

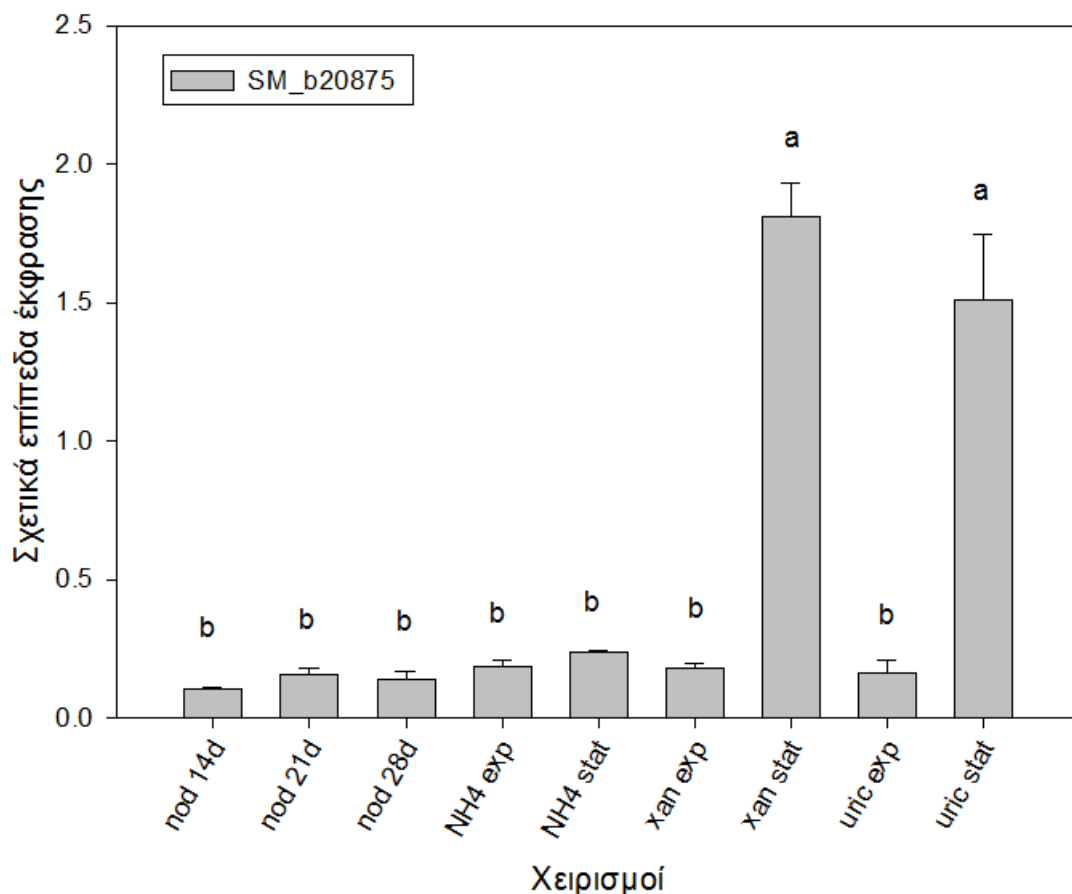


Εικόνα 30: Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *SM_b20874* που κωδικοποιεί για urac πιθανή αποκαρβοξυλάση της OCHU, σε φυμάτια 14, 21, 28 dpi του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι Μ.Ο. των τριών βιολογικών επαναλήψεων ± S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Ανονα πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ των χειρισμών.

Βλέπουμε κι εδώ ένα μοτίβο έκφρασης που έχει εμφανιστεί και σε άλλα γονίδια μέχρι στιγμής: επαγωγή του γονιδίου στους χειρισμούς xan stat & uric stat. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης στους χειρισμούς των φυματίων και στους NH₄ exp & stat δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά.

4.14. Μελέτη προτύπου έκφρασης του γονιδίου *SM_b20875*

Το γονίδιο *SM_b20875* κωδικοποιεί για μία πιθανή αλλαντοϊνάση. Η αλλαντοϊνάση (EC: 3.5.2.5) μετατρέπει την αλλαντοΐνη (παρουσία H₂O) σε αλλαντοϊκό.



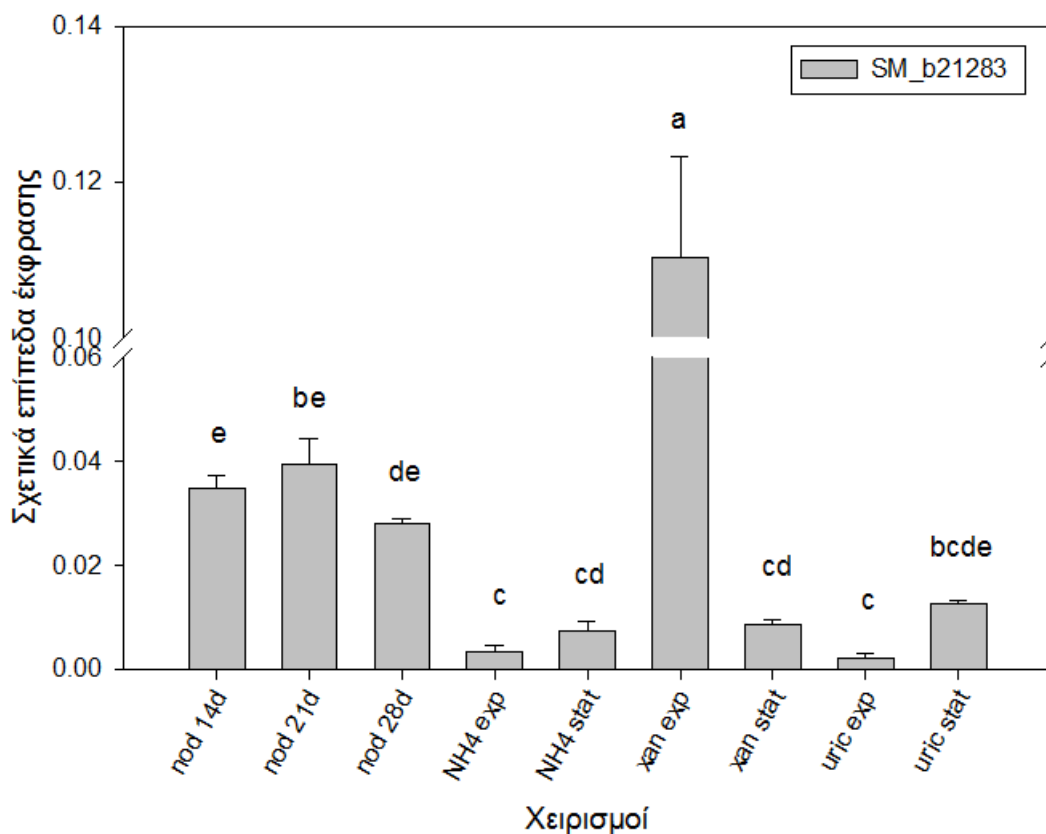
Εικόνα 31: Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *SM_b20875* που κωδικοποιεί για αln αλλαντοϊνάση, σε φυμάτια 14, 21, 28 dpi του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι Μ.Ο. των τριών βιολογικών επαναλήψεων \pm S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Απονοα πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ των χειρισμών.

Το γονίδιο *SM_b20875* ακολουθεί το ίδιο μοτίβο έκφρασης με το *SM_b20874*, με το μπορεί να ανήκουν στο ίδιο οπερόνιο. Δηλαδή, επαγωγή της έκφρασής του στους χειρισμούς xan stat & uric stat. Αυτό είναι μία ακόμη ένδειξη ότι ίσως ανήκουν στο ίδιο οπερόνιο.

4.15. Μελέτη προτύπου έκφρασης του γονιδίου *SM_b21283*

Μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *SM_b21283* σε συμβιωτικές (με τη *M. truncatula*) και μη συνθήκες του ριζοβίου *S. meliloti* 1021. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για το ένζυμο αλλαντοϊκάση (EC: 3.5.3.4) το οποίο καταλύει την αντίδραση αλλαντοϊκό και νερό προς ουρία και ουρεΐδογλυκολικό.

Τα μεγαλύτερη επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στο χειρισμό xan exp, εμφανίζοντας μάλιστα στατιστικώς σημαντική διαφορά από τους υπόλοιπους χειρισμούς.



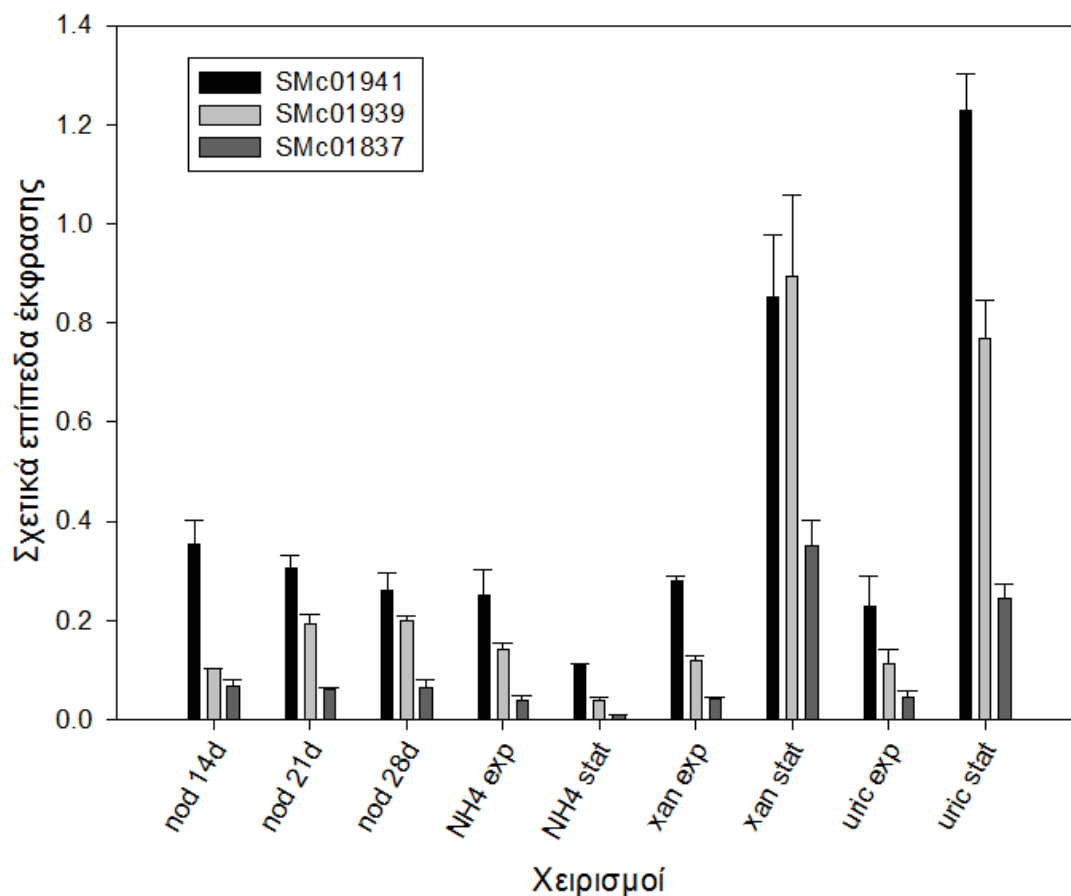
Εικόνα 32: Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *SM_b21283* που κωδικοποιεί για allc αλλαντοϊκάση, σε φυμάτια 14, 21, 28 dpi του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι Μ.Ο. των τριών βιολογικών επαναλήψεων ± S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Απονοα πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ των χειρισμών.

Αξιοσημείωτο ακόμα, είναι το γεγονός ότι υπάρχει επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου στα φυμάτια, σε σχέση με τα ελεύθερα διαβιούντα ριζόβια *S. meliloti* που αναπτύχθηκαν με αμμωνιακά ιόντα ως μοναδική πηγή αζώτου. Αυτό αποτελεί μια ένδειξη ότι το γονίδιο αυτό, ίσως να έχει κάποιο ρόλο στη συμβίωση.

4.16. Μελέτη προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για την ουρεάση

Στις δημόσιες βάσεις δεδομένων εντοπίστηκαν τρία γονίδια που κωδικοποιούν για το ένζυμο ουρεάση στο *S. meliloti* 1021. Τα γονίδια *SMc01941* (*ureA*), *SMc01939* (*ureB*) & *SMc01837* (*ureC*), τα οποία εντοπίζονται στο χρωμόσωμα του ριζοβίου.

Η ουρεάση (EC: 3.5.1.5) καταλύει την υδρόλυση της ουρίας (παρουσία νερού) προς CO₂ και NH₃, και αποτελεί το τελευταίο βήμα του μονοπατιού του καταβολισμού των πουρινών.

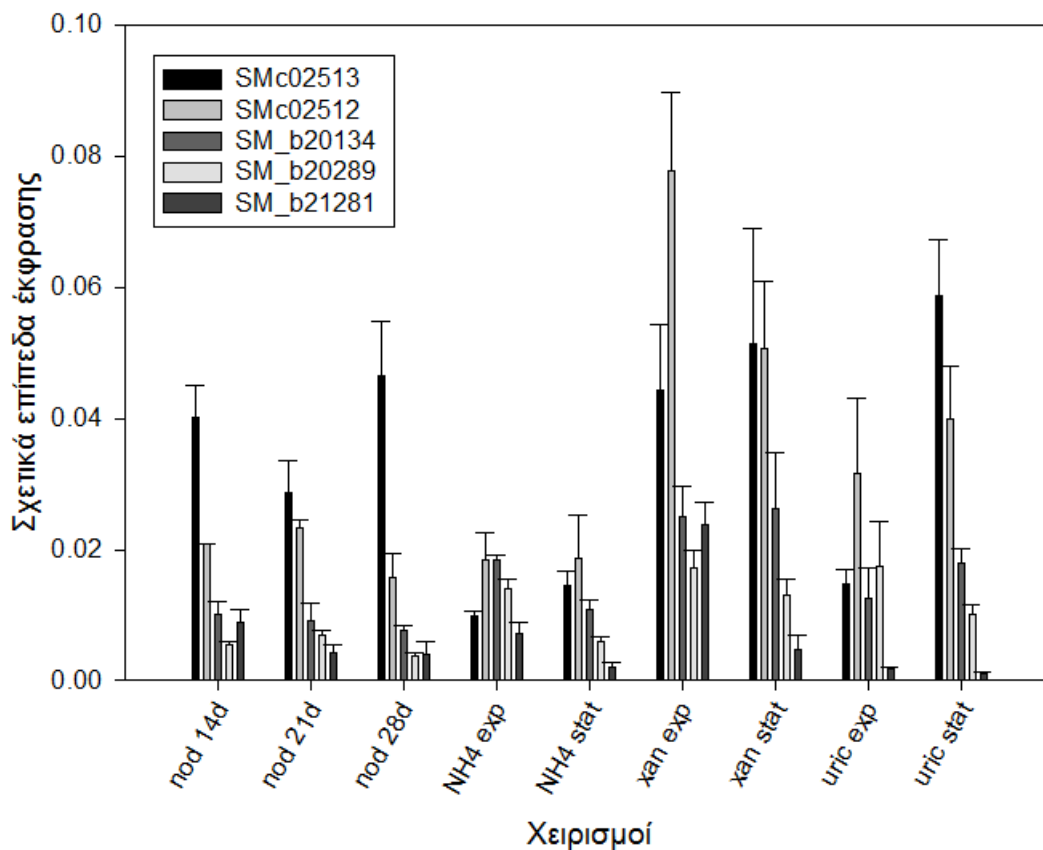


Εικόνα 33: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *SMa01941*, *SMa01939* & *SMa01837* που κωδικοποιούν για υρα ουρέαση, σε φυμάτια 14, 21, 28 ημερών του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι Μ.Ο. των τριών βιολογικών επαναλήψεων \pm S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Ανοηνα πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ όλων των χειρισμών για κάθε γονίδιο ξεχωριστά και παρουσιάζεται στο Παράρτημα Β.

Παρατηρούμε ότι και τα τρία γονίδια εμφανίζουν παρόμοιο μοτίβο έκφρασης, καθώς επάγονται στους χειρισμούς xan stat & uric stat. Συγκρίνοντας τα σχετικά επίπεδα έκφρασης στους χειρισμούς των φυματίων με αυτούς των ελεύθερα διαβιούντων NH₄ χειρισμών δεν εξάγεται κάποιο αξιόσημο συμπέρασμα.

4.17. Μελέτη προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταφορείς πουρινών

Πέρα από τα γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα και ενζυμικές υπομονάδες που λαμβάνουν μέρος στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών, μελετήθηκαν επίσης και τα πρότυπα έκφρασης πέντε γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες μεταφοράς (περμεάσες) που είχαν ήδη χαρακτηριστεί (Φριλλίγκος, 2010, 2011). Τα γονίδια αυτά είναι τα: *SMc02513*, *SMc02512*, *SM_b20134*, *SM_b20289* & *SM_b21281*.

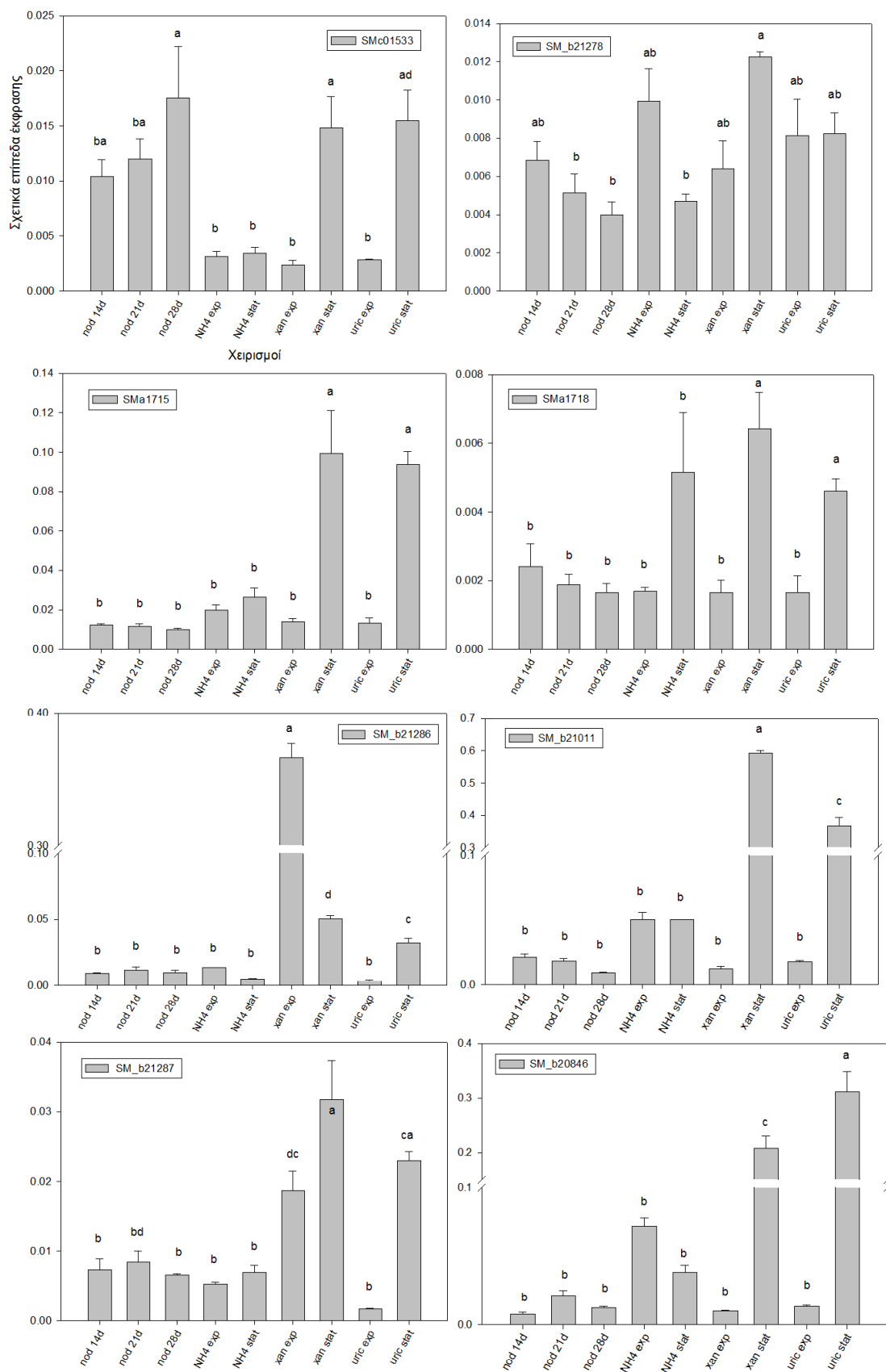


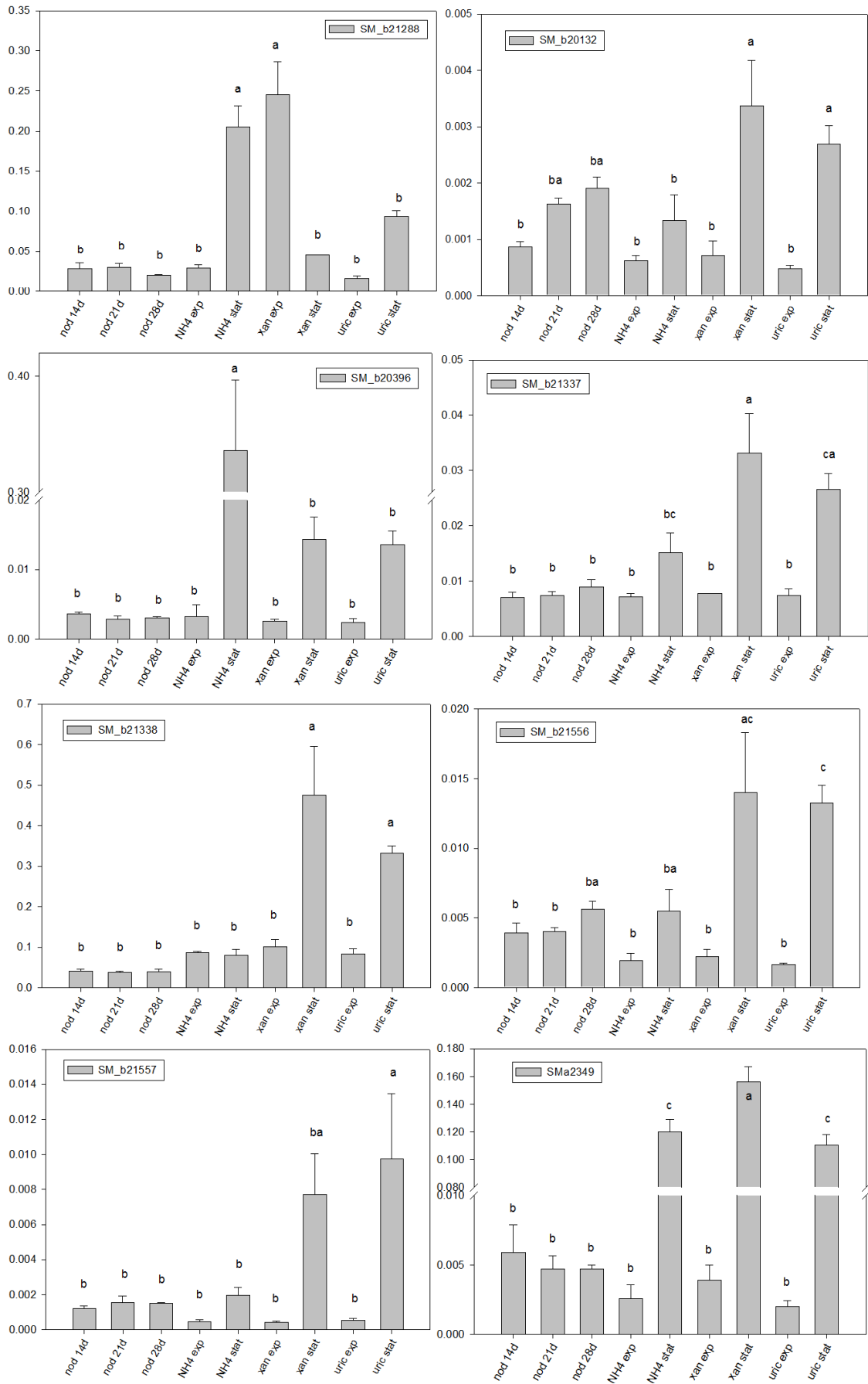
Εικόνα 34: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *SMc02513*, *SMc02512*, *SM_b20134*, *SM_b20289* & *SM_b21281* που κωδικοποιούν για περμεάσες πουρινών, σε φυμάτια 14, 21, 28 dpi του *S. meliloti* 1021 (με *M. truncatula*) και σε ελεύθερα διαβιούντα *S. meliloti* 1021 σε θρεπτικά διαλύματα με διαφορετική, μοναδική πηγή αζώτου. Οι τιμές είναι οι Μ.Ο. των τριών βιολογικών επαναλήψεων \pm S.E. και επισημαίνεται η στατιστική ανάλυση. Δοκιμή Ανονα πραγματοποιήθηκε (επίπεδο σημαντικότητας 95%) μεταξύ των χειρισμών κάθε γονιδίου και παρουσιάζεται στο Παράρτημα Β.

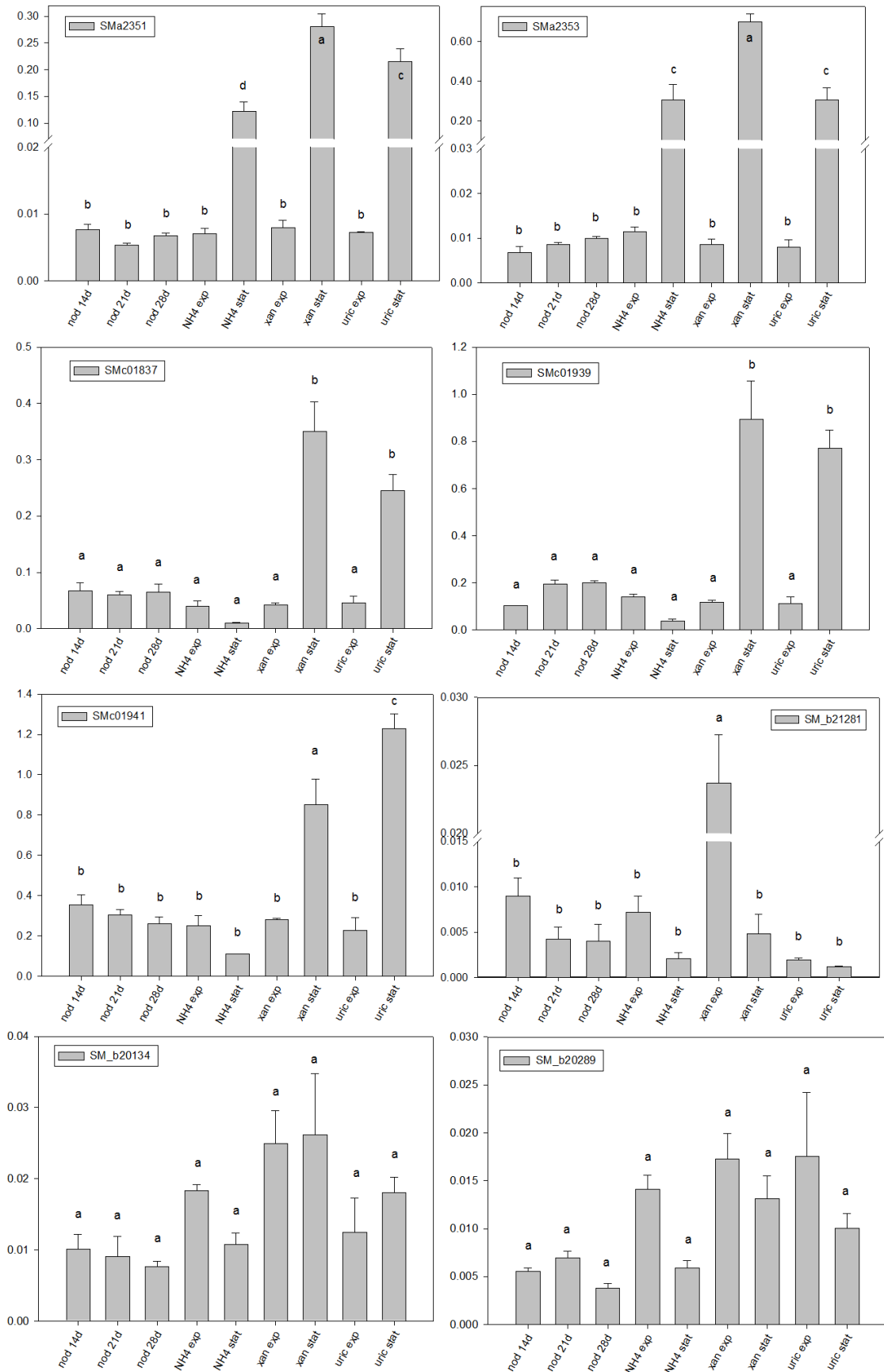
Το γονίδιο *SM_b21281* επάγεται μόνο κατά τον χειρισμό *xan exp*. Τα γονίδια *SM_b20134* & *SM_b20289* δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης τους μεταξύ των χειρισμών, αλλά παρουσιάζουν κάπως αυξημένη έκφραση στους χειρισμούς *NH₄ exp*, *xan (exp, stat)* & *uric (exp, stat)*. Το γονίδιο *SMc02512* κωδικοποιεί για περμεάση ουρικού/ξανθίνης και επάγεται στον χειρισμό *xan exp*. Παρουσιάζει σχετικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους χειρισμούς *xan stat*, *uric exp* & *uric stat*, χωρίς όμως να εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά.

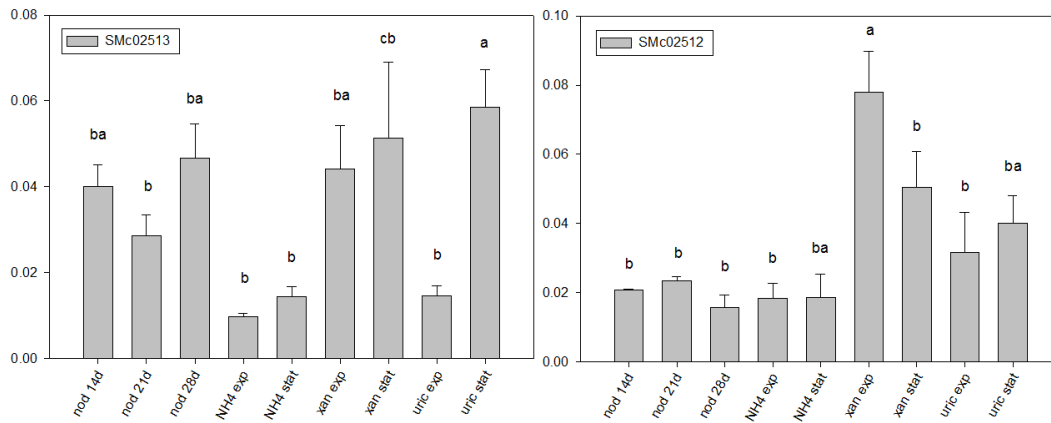
Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γονίδιο *SMc02513*, το οποίο κωδικοποιεί για περμεάση ξανθίνης/ουρικού. Επάγεται στους χειρισμούς *xan (exp, stat)* & *uric stat*, αλλά το αξιοσημείωτο είναι ότι επάγεται στα φυμάτια συγκριτικά με τους χειρισμούς *NH₄*. Αυτή η επαγωγή αποτελεί μια ένδειξη ότι αυτό το γονίδιο πιθανόν να έχει κάποιο ρόλο στο φυμάτιο κατά τη συμβίωση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β









Στα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται η στατιστική ανάλυση που έγινε με τη δοκιμή Ανονα, των γονιδίων στα οποία αυτή δεν παρουσιάστηκε στα Αποτελέσματα. Οι συγκρίσεις έγιναν μεταξύ όλων των χειρισμών για κάθε γονίδιο.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, το πείραμα που πραγματοποιήθηκε είχε ως στόχο τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών, καθώς και γονιδίων που κωδικοποιούν για NAT/NCS2 μεταφορείς (περμεάσες) πουρινών στο ριζόβιο *S. meliloti* 1021.

Θέλαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων και των περμεασών αυτών, για να διαπιστώσουμε το ρόλο τους κατά τη συμβίωση ριζοβίου και ψυχανθούς. Το έναυσμα για τη μελέτη του μεταβολισμού των πουρινών έδωσε το γεγονός ότι το *M. truncatula* σχηματίζει μη-καθορισμένα φυμάτια, στα οποία δημιουργείται συνεχώς νέος ιστός –εν αντιθέσει με τα καθορισμένα φυμάτια–, ενώ και το *S. meliloti* κατά τη διαφοροποίησή του σε βακτηροειδή υπόκειται σε διαδοχικούς κύκλους ενδο-διπλασιασμού του γονιδιωματικού του DNA, και έτσι δημιουργείται μία ανάγκη για συνεχή παροχή πουρινών στο φυμάτιο. Επιπλέον, η μελέτη του προτύπου έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις περμεάσες πραγματοποιήθηκε, καθώς παρατηρήθηκε ότι το ριζόβιο *M. loti* MAFF 303099 –που σχηματίζει καθορισμένα φυμάτια– ελλείπει αυτών των περμεασών, δεν μπορεί να αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας την ξανθίνη ως μοναδική πηγή αζώτου (και το ουρικό οξύ σε μικρότερο βαθμό), ενώ το *S. meliloti* 1021 μπορεί να αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας και την ξανθίνη και το ουρικό οξύ ως μοναδική πηγή αζώτου.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τον *in silico* εντοπισμό γονιδίων στο *S. meliloti* 1021 που κωδικοποιούν για ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού των πουρινών, καθώς και για μεταφορείς πουρινών. Εντοπίστηκαν συνολικά 32 γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα ή ενζυμικές υπομονάδες που λαμβάνουν μέρος στο μεταβολισμό πουρινών και 5 γονίδια που κωδικοποιούν για μεταφορείς πουρινών (βλ. πίνακα 2).

Από τα γονίδια που εντοπίστηκαν, βρέθηκαν κάποια τα οποία είναι πιθανό να ανήκουν σε οπερόνια λόγω της θέσης τους και της φοράς μεταγραφής στο γονιδίωμα του *S. meliloti* 1021. Τα πιθανά οπερόνια είναι τα: *SM_b21277 – SM_b21278*, *SM_b21283 – SM_b21284*, *SM_b21285 – SM_b21286 – SM_b21277 – SM_b21278*, *SM_b21337 – SM_b21338*, *SM_b21556 – SM_b21557 – SM_b21558*, *SMA2349 – SMA2351 – SMA2353 & SM_b20874 – SM_b20875*.

Για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ποσοτικού RT-PCR πραγματικού χρόνου (Real Time RT-qPCR). Η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει να υπολογίσουμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν σε σχέση με γονίδια αναφοράς (housekeeping genes), τα οποία στην προκειμένη περίπτωση ήταν τα γονίδια της πολυνουκλεοτιδικής νουκλεοτρανσφεράσης (pnp) *SMc00324* και της heat shock protein 70kDa (dnaK) *SMc02857*. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης πραγματοποιήθηκε σε cDNA από φυμάτια 14, 21 & 28 ημερών του ψυχανθούς *M. truncatula*, εμβολιασμένου με το ριζόβιο *S. meliloti* 1021 και σε καλλιέργειες βακτηρίων του *S. meliloti* 1021 που αναπτύχθηκαν σε ένα βασικό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ριζοβίων (RMM) με μόνη διαφοροποίηση στις πηγές

αζώτου που ήταν διαθέσιμες στον κάθε χειρισμό. Ως μοναδικές πηγές αζώτου ανά χειρισμό χρησιμοποιήθηκαν αμμωνιακά ιόντα (NH_4), ξανθίνη (xan) και ουρικό οξύ (uric), ενώ συλλέχθηκαν κύτταρα στην εκθετική και στατική φάση ανάπτυξης του ριζοβίου.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το μεταβολικό μονοπάτι πουρινών είναι ενεργό στο *S. meliloti* 1021 τόσο στην ελεύθερη, όσο και στη συμβιωτική του μορφή. Στο καταβολικό μέρος του μονοπατιού (ξανθίνη μέχρι ουρία και έπειτα CO_2 και NH_3) παρατηρείται επαγωγή των περισσοτέρων γονιδίων στους χειρισμούς xan stat & uric stat που ίσως εξηγείται αν οι πουρίνες συσσωρεύονται σε αυτούς τους χειρισμούς και τα ριζόβια τις καταβολίζουν προς αμμωνία για πηγή αζώτου.

Επιπλέον, οι ομάδες των γονιδίων *SM_b21277 – SM_b21278*, *SM_b21283 – SM_b21284*, *SM_b21285 – SM_b21286 – SM_b21277 – SM_b21278*, *SM_b21337 – SM_b21338*, *SM_b21556 – SM_b21557 – SM_b21558*, *SMA2349 – SMA2351 – SMA2353* & *SM_b20874 – SM_b20875* για τα οποία υποθέσαμε ότι μπορεί να ανήκουν σε οπερόνια, δείχνουν να έχουν παρόμοια πρότυπα έκφρασης μεταξύ τους, κάτι το οποίο αποτελεί περαιτέρω ένδειξη ότι ίσως πράγματι να ανήκουν σε οπερόνια.

Σημαντικότερα συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν από τα γονίδια τα οποία επάγονται στα φυμάτια σε σχέση με τους χειρισμούς NH_4 , καθώς αυτό αποτελεί ένδειξη ότι μπορεί να έχουν κάποιο ρόλο στη συμβίωση.

Συγκεκριμένα, το γονίδιο *SMc01533*, που κωδικοποιεί για απαμινάση της αδενίνης (adeC1), φαίνεται να επάγεται στα φυμάτια. Η απαμινάση της αδενίνης μετατρέπει την αδενίνη σε υποξανθίνη και αμμωνία. Έτσι λειτουργεί ως πηγή αζώτου, αλλά μειώνει την ποσότητα αδενίνης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μονοπάτια περίσωσης με τη μετατροπή της σε AMP. Υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι η αδενίνη από ένα διαφορετικό μονοπάτι, μπορεί να μετατραπεί σε γουανίνη, και τελικά σε GMP για να χρησιμοποιηθεί από το κύτταρο (Nygaard, Duckert and Saxild, 1996).

Το επόμενο γονίδιο το οποίο επάγεται στα φυμάτια είναι το *SM_b21558*, το οποίο κωδικοποιεί για μία Fe/S-δεσμεύουσα μικρή υπομονάδα της αφυδρογονάσης της ξανθίνης (xdh). Η xdh είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη, και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Έτσι, παρά το γεγονός ότι οι δομικές υπομονάδες της xdh δεν επάγονται στα φυμάτια, η υπομονάδα αυτή, με τη δέσμευση Fe/S, μπορεί να ενεργοποιεί το ένζυμο και να είναι δραστικότερο.

Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *SM_b21284* στα φυμάτια, χωρίς να συνοδεύεται όμως από στατιστικώς σημαντική διαφορά. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για ουρικάση, η οποία μετατρέπει το ουρικό οξύ σε 5-υδροκυ-ισουορικό (HIU).

Το τελευταίο από το γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα που μετέχουν στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών, και επάχθηκε κατά τη συμβίωση, είναι το *SM_b21283*. Το γονίδιο κωδικοποιεί για αλλαντοϊκάση, η οποία μετατρέπει το αλλαντοϊκό σε ουρία.

Σε ότι αφορά στους μεταφορείς πουρινών που μελετήθηκαν, βρέθηκε ένα γονίδιο, το *SMc02513*, το οποίο επάγεται ισχυρά κατά τη συμβίωση σε σχέση με την ανάπτυξη των ελεύθερα διαβιούντων *S. meliloti* 1021 σε υπόστρωμα NH_4 . Το *SMc02513* οποίο κωδικοποιεί για περμεάση ξανθίνης/ουρικού της οποίας η επαγωγή στα φυμάτια, συγκριτικά με τις υπόλοιπες περμεάσες που μελετήθηκαν, αποτελεί μία ένδειξη ότι ίσως να έχει κάποιο ρόλο κατά τη συμβίωση.

Τέλος, χρήσιμη θα ήταν η περαιτέρω μελέτη γονιδίων που μετέχουν στο μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών και στη μεταφορά τους στο *S. meliloti*. Στους μελλοντικούς στόχους, συμπεριλαμβάνεται μία τεχνική gene knockout για τα γονίδια τα οποία επάχθηκαν κατά τη συμβίωση, ώστε να μελετηθούν οι επιπτώσεις που έχουν τόσο σε φαινοτυπικό, όσο και σε βιοχημικό επίπεδο στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ames B. N., Cathcart R., Schwier E. & Hochstein P.,** (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78, 6858-6872.
- Andersen P. S., Frees D., Fat R. & Mygind B.,** (1995). Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of *uraA* mutants and cloning of the gene. *J. Bacteriol.*, 177, 2008-2013.
- Argyrou E., Sophianopoulou V., Schultes N. & Diallinas G.,** (2001). Functional characterization of a maize purine transporter by expression in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell*, 13, 953-964.
- Ashihara H. & Crozier A.,** (2000). Biosynthesis and catabolism of caffeine in low-caffeine-containing species of *Coffea*. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3425-3431.
- Barabote R. D. & Saier M. H. Jr,** (2005). Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69, 608-634.
- Berg J. M., Tymoczko J. L. & Stryer L.,** (2005). *Biochemistry*, 5th Edition, W. H. Freeman and Co., San Francisco.
- Brusslan J.A. & Tobin E.M.** (1992). Light-independent developmental regulation of *cab* gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 7791-7795
- Burkle L., Cedzich A., Dopke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kuhn C. & Frommer W. B.,** (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J.*, 34, 13-26.
- Cabanes D., Boinstard P. & Battut J.,** (2000). Identification of *Sinorhizobium meliloti* genes regulated during symbiosis. *Journal of Bacteriology*, 182, 3632-3637.
- Cecchetto G., Amillis S., Diallinas G., Scazzocchio C. & Drevet C.,** (2004). The *AzgA* purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J. Biol. Chem.*, 279, 3132-3141.
- Christiansen L. C., Schou S., Nygaard P. & Saxild H. H.,** (1997). Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the *xpt-pbuX* operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *J. Bacteriol.*, 179, 2540-2550.
- Cochu A., Roy D., Vaillancourt K., Lemay J. D., Casabon I., Frenette M., Moineau S. & Vadeboncoeur C.,** (2005). The doubly phosphorylated form of HPr, HPr(Ser-P)(His-P), is abundant in exponentially growing cells of *Streptococcus thermophilus* and phosphorylates the lactose transporter LacS as efficiently as HPr(His-P). *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 1364-1372.
- Colebatch G., Desbrosses G., Ott T., Krusell L., Montanari O., Kloska S., Kopka J. & Udvardi M.K.** (2004). Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant J*, 39, 487-512.

- Cruz-Ramos H., Glaser P., Wray L. V. Jr & Fisher S. H.,** (1997). The *Bacillus subtilis* ureABC operon. *J. Bacteriol.*, 179, 3371-3373.
- Cusa E., Obradors N., Baldoma L., Badia J. & Aguilar J.,** (1999). Genetic analysis of a chromosomal region containing genes required for assimilation of allantoin nitrogen and linked glyoxylate metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 181, 7479-7484.
- de Koning H. P., Bridges D. J. & Burchmore R. J.,** (2005). Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29, 987-1020.
- de Koning H. & Diallinas G.,** (2000). Nucleobase transporters. *Mol. Membr. Biol.*, 17, 75-94.
- de la Riva L., Badia J., Aguilar J., Bender R. A. & Baldoma L.,** (2008). The *hpx* genetic system for hypoxanthine assimilation as a nitrogen source in *Klebsiella pneumoniae*: gene organization and transcriptional regulation. *J. Bacteriol.*, 190, 7892-7903.
- Desimone M., Catoni E., Ludewig U., Hilpert M., Schneider A., Kunze P., Tegeder M., Frommer W. B. & Schumacher K.,** (2002). A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14, 847-856.
- Diallinas G. & Gournas C.,** (2008). Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: Lessons from model microbial genetic systems. *Channels (Austin)*, 2, 363-372.
- Diallinas G., Valdez J., Sophianopoulou V., Rosa A. & Scazzocchio C.,** (1998). Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial plant and metazoan homologues. *EMBO J.*, 17, 3827-3837.
- Ehrhardt D.W., Wais R., Long S.R.,** (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell*. 31, 85(5), 673-81.
- Enomoto A., Kimura H., Chairoungdua A., Shigeta Y., Jutabha P., Cha S. H., Hosoyamada M., Takeda M., Sekine T., Igarashi T., Matsuo H., Kikuchi Y., Oda T., Ichida K., Hosoya T., Shimokata K., Niwa T., Kanai Y. & Endou H.,** (2002). Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature*, 417, 447-452.
- Foucher F. & Kondorosi E.,** (2000). Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology*, 43 (5-6), 772-786.
- Fox I. H. & Kelley W. N.,** (1978). The role of adenosine and 2-deoxyadenosine in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* 47, 655-686.
- Franco P. J. & Brooker R. J.,** (1994). Functional roles of Glu-269 and Glu-325 within the lactose permease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 269, 7379-7386.
- Frei B., England L. & Ames B.N.,** (1989). Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 6377-6381.

- Gillissen B., Burkle L., Andre B., Kuhn C., Rentsch D., Brandl B. & Frommer W. B.,** (2000). A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12, 291-300.
- Goudela S., Karatza P., Koukaki M., Frillingos S. & Diallinas G.,** (2005). Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. *Mol. Membr. Biol.*, 22, 263-275.
- Goudela S., Reichard U., Amillis S. & Diallinas G.,** (2008). Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.*, 45, 459-472.
- Goudela S., Tsvili H. & Diallinas G.,** (2006). Comparative kinetic analysis of AzgA and Fcy21p, prototypes of the two major fungal hypoxanthine-adenine-guanine transporter families. *Mol. Membr. Biol.*, 23, 291-303.
- Gournas C., Papageorgiou I. & Diallinas G.,** (2008). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Mol. Biosyst.*, 4, 404-416.
- Guan L. & Kaback H. R.,** (2006). Lessons from lactose permease. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 35, 67-91.
- Hamari Z., Amillis S., Drevet C., Apostolaki A., Vagvolgyi C., Diallinas G. & Scazzocchio C.,** (2009). Convergent evolution and orphan genes in the Fur4p-like family and characterization of a general nucleoside transporter in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, 73, 43-57.
- Hediger M. A.,** (2002a). Kidney function: gateway to a long life?. *Nature*, 417, 393-395.
- Hediger M. A.,** (2002b). New view at C. *Nature Med*, 8, 445-446.
- Johansen L. E., Nygaard P., Lassen C., Agerso Y. & Saxild H. H.,** (2003). Definition of a second *Bacillus subtilis* pur regulon comprising the pur and xpt-pbuX operons plus pbuG, nupG (yxjA), and pbuE (ydhL). *J. Bacteriol.*, 185, 5200-5209.
- Jung D.-K., Lee Y., Park S. G., Park B. C., Kim G.-H. & Rhee S.,** (2006). Structural and functional analysis of PucM, a hydrolase in the ureide pathway and a member of the transthyretin-related protein family. *PNAS*, 103, 9790-9795.
- Karatza P. & Frillingos S.,** (2005). Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. *Mol. Membr. Biol.*, 22, 251-261.
- Kato R., Maeda T., Akaike T. & Tamai I.,** (2006). Characterization of novel Na⁺-dependent nucleobase transport systems at the blood-testis barrier. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 290, E968-975.
- Kouchi H., Shimomura K., Hata S., Hirota A., Wu G.J., Kumagai H., Tajima S., Suganuma N., Suzuki A. & Aoki T.,** (2004). Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res*, 11, 263-274.

- Koukaki M., Vlanti A., Goudela S., Pantazopoulou A., Gioule H., Tournaviti S. & Diallinas G.,** (2005). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines function of the purine translocation pathway. *J. Mol. Biol.*, 350, 499-513.
- Lee Y., Lee D. H., Kho C. W., Lee A. Y., Jang M., Choc S., Lee C. H., Lee J. S., Myung P. K., Park B. C. & Park S. G.,** (2005). Transthyretin-related proteins function to facilitate the hydrolysis of 5-hydroxyisourate, the end product of the uricase reaction. *FEBS letters*, 579, 4769-4774.
- Lolkema J. S. & Poolman B.,** (1995). Uncoupling in secondary transports proteins. A mechanistic explanation for mutants of lac permease with an uncoupled phenotype. *J. Biol. Chem.*, 270, 12670-12676.
- Mandal M., Boese B., Barrick J. E., Winkler W. C. & Breaker R. R.,** (2003). Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell*, 113, 577-586.
- Mandal M. & Breaker R. R.,** (2004). Gene regulation by riboswitches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 451-463.
- Markowitz V. M., Szeto E., Palaniappan K., Grechkin Y., Chu K., Chen I.-M. A., Dubchak I., Anderson I., Lykidis A., Mavromatis K., Ivanova N. N. & Kyprides C.** (2008). The integrated microbial genomes (IMG) system in 2007: data content and analysis tools extensions. *Nucleic Acids Res.*, 36, D528-D533.
- Maurino V. G., Grube E., Zielinski J., Schild A., Fischer K. & Flugge U. I.,** (2006). Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 47, 1381-1393.
- Mitra R.M., Gleason C.A., Edwards A., Hadfield J., Downie J.A., Oldroyd G.E. & Long S.R.,** (2004). A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci*, 101, 4701-4705.
- Monahan-Giovanelli H., Arango Pinedo C. & Gage D. J.,** (2006). Architecture of infection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 140(2), 661-670.
- Morth J. P., Pedersen P., Toustrup-Jensen M. S., Sorensen T. L., Petersen J., Anderson J. P., Vilsen B. & Nissen P.,** (2007). Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature*, 450, 1043-1049.
- Mullis K.,** (1986). "Specific Enzymatic Amplification of DNA *In Vitro*: The Polymerase Chain Reaction," *Cold Spring harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263-273.
- Mullis K. & Faloona F.,** (1987). "Specific Synthesis of DNA *In Vitro* Via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction," *Methods Enzymol.*, 155, 355-350.

- Nygaard P., Bested S. M., Andersen K. A. & Saxild H. H.,** (2000). *Bacillus subtilis* guanine deaminase is encoded by the yknA gene and is induced during growth with purines as the nitrogen source. *Microbiology*, 146, 3061-3069.
- Nygaard P., Duckert P. & Saxild H. H.,** (1996). Role of adenine deaminase in purine salvage and nitrogen metabolism and characterization of the *ade* gene in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 178(3), 846-853.
- Nyyssonen K., Porkkala-Saratho E., Kaikkonen J. & Salonen J. T.,** (1997). Ascorbate and urate are the strongest determinants of plasma antioxidative capacity and serum lipid resistance to oxidation in Finnish men. *Artherosclerosis*, 130, 223-233.
- Oda M., Satta Y. O., Takenaka O. & Takahata N.,** (2002). Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Mol. Biol. Evol.*, 19, 640-653.
- O'Leary S. E., Hicks K. A., Ealick S. E. & Begley T. P.,** (2009). Biochemical characterization of the HpxO enzyme from *Klebsiella pneumoniae*, a novel FAD-dependent urate oxidase. *Biochemistry*, 48, 3033-3035.
- Ortiz D., Sanchez M.A., Koch H. P., Larsson H. P. & Landfear S. M.,** (2009). An acid-activated nucleobase transporter from *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.*, 284, 16164-16169.
- Pantazopoulos A. & Diallinas G.,** (2007). The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport. *Mol. Membr. Biol.*, 23, 337-348.
- Peters, N.K., Frost J.W. & Long S.R.,** (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* 233, 977-980.
- Quiles F. A., Raso M. J., Pineda M. & Pierdas P.,** (2009). Ureide metabolism during seedling development in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol. Plant*, 135, 19-28
- Raso M. J., Pineda M. & Pierdas P.,** (2007). Tissue abundance and characterization of two purified proteins with allantoinase activity from French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol. Plant*, 135, 19-28.
- Redmond, J.W., Batley M., Djordjevic M.A., Innes R.W., Kuempel E.L. & Rolfe B.G.,** (1986). Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323, 632-635.
- Reitzer L. & Schneider B. L.,** (2001). Metabolic context and possible physiological themes of σ^{54} -dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65, 422-444.
- Ren Q., Kang K. H. & Paulsen I. T.,** (2004). TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. *Nucleic Acids Res.*, 32, D284-288.
- Saier M. H. Jr,** (2000). Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol. Microbiol.*, 35, 699-710.

- Saier M. H., Yen M. R., Noto K., Tamang T. G. & Elkan C.,** (2009). The transporter classification database: recent advances. *Nucleic acids Res.*, 37, D274-278.
- Scazzocchio C.,** (1994). The purine degradation pathway, genetics, biochemistry and regulation. *Prog. Ind. Microbiol.*, 29, 221-257.
- Schneider B. L., Kiupakis A. K. & Reitzer L. J.,** (1998). Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 180, 4278-4286.
- Schubert K. R. & Boland M. J.,** (1990). The ureides. B. J. Mifflin *The biochemistry of plants*, 16, 197-282.
- Schultze M. & Kondorosi A.,** (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* 32, 33-57
- Schultz A. C., Nygaard P. & Saxild H. H.,** (2001). Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. *J. Bacteriol.*, 183, 3293-3302.
- Sevanian A., Davie K. J. & Hochstein P.,** (1991). Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54, 1129S-1134S.
- Shinoda T., Ogawa H., Cornelius F. & Toyoshima C.,** (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature*, 459, 446-450.
- Smil, V.,** (1999). Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochem. Cycles*, 13, 647-662.
- Stacey G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J & May G.D.,** (2006). Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Plant Biol.* 9(2), 110-21.
- Stougaard J.,** (2000), Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiol.*, 124(2), 531-40.
- Taiz L. & Zeiger E.** (2002). *Plant physiology*. Sinauer Associates, Inc, Publishers, 266-272.
- Tchieu J. H., Norris V., Edwards J. S., & Saier M. H. Jr,** (2001). The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 3, 329-346.
- Vance C.P. & Heickel G.H.** (1991). Carbon in N₂ fixation: Limitation or exquisite adaptation. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42, 373-392
- Van de Velde W., Pérez Guerra J. C., De Keyser A., De Rycke R., Rombauts S., Maunoury N., Mergaert P., Kondorosi E., Holsters M. & Goormachtig S.,** (2006). Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 141(2), 711-720.

- Vlanti A., Amillis S., Koukaki M. & Diallinas G.,** (2006). A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter. *J. Mol. Biol.*, 357, 808-819.
- Vogels G. D. & van der Drift C.,** (1976). Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, 40, 403-468.
- Xi H., Schneider B. L. & Reitzer L.,** (2000). Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage. *J. Bacteriol.*, 182, 5332-5341.
- Yamamoto S., Inoue K., Murata T., Kamigaso S., Yasujima T., Maeda J. Y., Joshida Y., Ohta K.Y. & Yuasa H.,** (2010). Identification and functional characterization of the first nucleobase transporter in mammals: Implication in the species difference in the intestinal absorption mechanism of nucleobases and their analogs between higher primates and other mammals. *J. Biol. Chem.*, 285, 6522-6531.
- Young N.D. & Udvardi M.,** (2009). Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 193–201.
- Βrock τόμος II,** (2007). Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- Καρλετίδης Γ.,** (2010). Εξελικτικές συσχετίσεις στην οικογένεια των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT). Πτυχιακή Εργασία, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Παπακόστας Κ.,** (2010). Διερεύνηση του μηχανισμού πρόσληψης πουρινών στους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT). Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας.