

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

*Χαρακτηρισμός και βιοχημικός ρόλος  
των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό  
του άνθρακα στα φυμάτια του Lotus japonicus*

ΔΑΝΙΕΛΑ Ο. ΤΣΙΚΟΥ

Επιβλέπων Καθηγητής  
ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΑΤΙΝΑΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2009

## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*Χαρακτηρισμός και βιοχημικός ρόλος  
των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό  
του άνθρακα στα φυμάτια του *Lotus japonicus**

**ΔΑΝΙΕΛΑ Ο. ΤΣΙΚΟΥ**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

Κατινάκης Π. Καθηγητής ΓΠΑ

### **ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

Κατινάκης Π. Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Χατζόπουλος Π. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Κίντζιος Σ. Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

### **ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

Κατινάκης Π. Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Χατζόπουλος Π. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Μπουράνης Δ. Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Κίντζιος Σ. Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Λάμπρου Ν. Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Αιβαλάκης Γ. Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Φλεμετάκης Ε. Λέκτορας ΓΠΑ (Μέλος)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση των ψυχανθών με βακτήρια του εδάφους που ονομάζονται ριζόβια. Η αλληλεπίδραση αυτή καταλήγει στο σχηματισμό ενός νέου φυτικού οργάνου, του φυματίου. Κατά τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης συμβαίνουν πολλές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και στη συσσώρευση μεταβολιτών τόσο στα ριζόβια όσο και στο φυτό-ξενιστή. Σε μια προσπάθεια να μελετηθούν οι συνολικές αλλαγές που συμβαίνουν στο μεταβολισμό κατά την ανάπτυξη του φυματίου, χρησιμοποιήθηκε μια πλατφόρμα βασισόμενη στην τεχνική ποσοτικού (RT)-PCR για τη μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης γονιδίων του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού του *Lotus japonicus*, ενώ για την ανάλυση των μεταβολιτών αναπτύχθηκε μια πλατφόρμα βασισόμενη στην τεχνική GC-MS. Τόσο η μεταγραφή των γονιδίων όσο και η συσσώρευση μεταβολιτών μελετήθηκαν σε φυτά *L. japonicus* που είχαν υποστεί παρατεταμένο σκοτάδι για 24 και 72 ώρες. Η έλλειψη φωτοσυνθετικού άνθρακα που προκλήθηκε από το παρατεταμένο σκοτάδι είχε ως αποτέλεσμα αλλαγές τόσο στη συσσώρευση των μεταγραφημάτων των γονιδίων όσο και στη συσσώρευση μεταβολιτών. Τα μεταγραφικά επίπεδα των περισσότερων γονιδίων που μελετήθηκαν μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της σκοτεινής περιόδου, και ιδιαίτερα, μετά από 72 ώρες συνεχούς σκότους. Τα επίπεδα των μεταβολιτών είτε ήταν μειωμένα είτε δεν παρουσίασαν διαφορά. Εξαιρέση αποτέλεσε η μεγάλη συσσώρευση αμινοξέων, δηλώνοντας πιθανή αποδόμηση των πρωτεϊνών στις συνθήκες αυτές. Η έλλειψη άνθρακα επηρέασε πολλές μεταβολικές διαδικασίες του φυματίου, περιλαμβάνοντας σύνθεση αμύλου, γλυκόλυση, δέσμευση CO<sub>2</sub> και αφομοίωση αζώτου. Η ταυτόχρονη μείωση των μεταβολικών μονοπατιών της γλυκόλυσης και της δέσμευσης CO<sub>2</sub> είχε ως αποτέλεσμα την έλλειψη σε σκελετούς άνθρακα και ιδιαίτερα την έλλειψη μηλικού οξέως, που θεωρείται η κύρια πηγή άνθρακα για το μεταβολισμό των βακτηριοειδών και την αζωτοδέσμευση. Τα πολύ αυξημένα επίπεδα έκφρασης ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για NADH-εξαρτώμενη αφυδρογονάση του γλουταμινικού είναι πιθανό να χρειάζονται για την αποδόμηση των αμινοξέων με σκοπό να παρέχονται σκελετοί άνθρακα στην αναπνευστική οδό, λειτουργώντας ως μια εναλλακτική πηγή ενέργειας.

Ένα από τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού του άνθρακα είναι το CO<sub>2</sub>, το οποίο παρουσιάζει υψηλή συσσώρευση στα φυμάτια. Η καρβονική ανυδράση (CA, EC 4.2.1.1) αποτελεί ένζυμο-«κλειδί» στο μεταβολισμό του CO<sub>2</sub> καθώς καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση ενυδάτωσής του παράγοντας HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Οι καρβονικές ανυδράσες είναι άφθονα στη φύση ένζυμα, που βρίσκονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και συμμετέχουν σε πλήθος φυσιολογικών και βιοχημικών διαδικασιών. *In silico* ανάλυση των ESTs του *L. japonicus* αποκάλυψε την ύπαρξη δύο cDNA κλώνων, που ονομάστηκαν *Ljcaa1* και *Ljcaa2*,

και κωδικοποιούν για α-τύπου καρβονικές ανυδράσεις όμοιες με τους α-τύπου ισομόρφους των θυλαστικών. Ένα άλλο γονίδιο, το *Ljca1*, που κωδικοποιεί για μια β-τύπου CA μελετήθηκε επίσης. Η λειτουργικότητα των πολυπεπτιδίων που κωδικοποιούν τα γονίδια αυτά, επιβεβαιώθηκε με βιοχημικές δοκιμές, χρησιμοποιώντας μια μέθοδο που βασίζεται σε μετρήσεις στην αλλαγή του pH κατά τη διάρκεια της βιοχημικής αντίδρασης με τη χρήση μιας χρωμοφόρου ουσίας. Η έκφραση των γονιδίων μελετήθηκε με τη μέθοδο ποσοτικού (RT)-PCR τόσο σε συμβιωτικούς όσο και σε μη συμβιωτικούς ιστούς, και βρέθηκε ότι τα γονίδια κωδικοποιούν για ισοτύπους με ενισχυμένη έκφραση στα φυμάτια. Η έκφραση των *Ljcaa1* και *Ljcaa2* ήταν μέγιστη στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του φυματίου, ενώ στα ώριμα φυμάτια τα επίπεδα έκφρασης μειώθηκαν. Τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης όλων των γονιδίων σε φυμάτια φυτών που είτε είχαν εμβολιαστεί με μεταλλαγμένα στελέχη *Mesorhizobium loti* είτε είχαν υποστεί συνθήκες εκτενούς σκότους, δηλώνουν τη συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων αυτών με τη λειτουργία του φυματίου και τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης. Ο χωροταξικός εντοπισμός των *Ljcaa1* και *Ljcaa2* ελέγχθηκε με RNA-RNA *in situ* υβριδισμό και βρέθηκε πως και τα δύο γονίδια εντοπίζονται στα παρεγγυματικά κύτταρα, τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και τον κεντρικό ιστό. Ο φυσιολογικός ρόλος των γονιδίων αυτών μελετήθηκε κατόπιν σίγησης των γονιδίων με τη χρήση της τεχνικής RNAi. Η μειωμένη δραστηριότητα νιτρογενάσης στις μεταλλαγμένες σειρές φυτών που τα γονίδια παρουσιάζουν σίγηση είναι ενδεικτική του σημαντικού ρόλου των καρβονικών ανυδρασιών στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση.

# TITAE

## *Characterization and biochemical role of genes involved in carbon metabolism in Lotus japonicus nodules*

### ABSTRACT

Symbiotic nitrogen fixation (SNF) involves the complex interaction of legume plants with soil bacteria collectively called Rhizobia. This interaction results in the formation of a novel plant organ, the root nodule. During SNF many changes occur in gene expression and metabolite accumulation in both rhizobia and host plant. In an attempt to study global changes occurring during nodule development, a real-time reverse transcription (RT)-PCR based platform was developed for the transcript profiling of *Lotus japonicus* genes involved in primary and secondary metabolism in nodules, while, the metabolites were analysed with the use of a GC-MS based platform. Both gene transcript profiling and metabolite accumulation were studied in nodules of *L. japonicus* plants that had undergone extended dark for 24 and 72 hours. Photosynthetic carbon deficiency caused by prolonged darkness resulted in changes in both gene transcript level and metabolomic profile. Most genes analysed were down regulated during the dark period and especially after 72 hours of continuous darkness. Metabolite levels were found to be either decreased or unaltered. High accumulation of aminoacids was an exception, denoting possible protein degradation under such conditions. Carbon deficiency affected many metabolic processes in *L. japonicus* nodules, involving starch synthesis, glycolysis, carbon fixation and ammonium assimilation. Reduced glycolysis and carbon fixation result in deficiency of carbon skeletons and especially malate, which is likely to be the primary source of carbon for bacteroid metabolism and SNF. The up regulation of a gene coding for NADH-glutamate dehydrogenase is probably needed for aminoacid breakdown to supply carbon skeletons to the respiratory pathway, as an alternative carbon source.

One of the final products of carbon metabolism is CO<sub>2</sub>, which is highly accumulating in nodules. Carbonic Anhydrase (CA, EC 4.2.1.1) is a key enzyme in CO<sub>2</sub> metabolism as it catalyses CO<sub>2</sub> reversible hydration to HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. CAs are ubiquitous enzymes found in all kingdoms of life and they are known to participate in several physiological and biochemical processes. *In silico* analysis of *L. japonicus* ESTs revealed the existence of two cDNA clones, designed *Ljcaa1* and *Ljcaa2*, coding for  $\alpha$ -type CAs similar to the mammalian  $\alpha$ -type isoforms. Another gene, *Ljca1*, coding for a  $\beta$ -type CA was also studied. Functionality of the encoded polypeptides was confirmed by biochemical assays using a dye indicator method.

The temporal expression profiling of the genes was studied by real time qPCR in both symbiotic and non-symbiotic organs and revealed that the genes code for nodule enhanced carbonic anhydrase isoforms. Expression of both *Ljcaa1* and *Ljcaa2* genes was maximal at early stages of nodule development, while at later stages the levels of both transcripts declined. Reduced expression levels of all genes in nodules either inoculated with mutant *Mesorhizobium loti* strains or after extended dark period, correlate their expression with nodulation and nitrogen fixation. The spatial expression profiling of *Ljcaa1* and *Ljcaa2* genes was examined by RNA-RNA *in situ* hybridization and revealed that both genes were expressed in nodule inner cortical cells, vascular bundles, and central tissue. The physiological role of these genes was studied by loss-of-function studies, using RNAi mutants. The reduced nitrogenase activity in silenced mutant lines denotes the important role of CAs in symbiotic nitrogen fixation.

Η ανάθεση της παρούσας μελέτης έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (συνεδρία 7η/29-11-2005), κατά την οποία εγκρίθηκε το θέμα της διδακτορικής διατριβής. Ως μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (συνεδρία 20η/25-6-2009) ορίστηκαν οι εξής:

Κατινάκης Π. Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Χατζόπουλος Π. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Μπουράνης Δ. Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Κίντζιος Σ. Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Λάμπρου Ν. Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Αιβαλάκης Γ. Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Φλεμετάκης Ε. Λέκτορας ΓΠΑ (Μέλος)

«Η έγκριση της παρούσης διδακτορικής διατριβής υπό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλεί αποδοχή των γνωμών του συγγραφέως»

[Νόμος 5343/1932, άρθρο 202]

## Αντί Προλόγου

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και έχει χρηματοδοτηθεί από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθ. κ. Παναγιώτη Κατινάκη για την ανάθεση της παρούσας μελέτης, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς επίσης και για τη βοήθειά του για την ολοκλήρωση της διατριβής. Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής, κ. Χατζόπουλο Π. Καθηγητή ΓΠΑ, κ. Κίντζιο Σ. Αναπληρωτή Καθηγητή ΓΠΑ, κ. Μπούρανη Δ. Αναπληρωτή Καθηγητή ΓΠΑ, κ. Λάμπρου Ν. Αναπληρωτή Καθηγητή ΓΠΑ και κ. Αιβαλάκι Γ. Επίκουρο Καθηγητή ΓΠΑ για την κριτική ανάγνωση του κειμένου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο Λέκτορα κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη για την ουσιαστική καθοδήγησή του σε όλη την πορεία εκτέλεσης της έρευνας και της συγγραφής της παρούσης διατριβής, καθώς επίσης και για τις γνώσεις που μου προσέφερε.

Οφείλω να εκφράσω πολλές ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου που ο καθένας χωριστά συνέβαλε με το δικό του τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Ευχαριστώ ιδιαίτερα, τη διδάκτορα Catalina Stedel για τη βοήθειά της στην ανάπτυξη των φυτών και στο πείραμα του *in situ* RNA-RNA υβριδισμού, τη διδάκτορα Μαριιάτζελα Φωτέλλη για τη βοήθειά της στο πείραμα της συσκότισης των φυτών, το διδάκτορα Μιχάλη Φασσέα για τη βοήθεια στο πείραμα μετασχηματισμού της ζύμης, καθώς επίσης και την υπομονή του να ακούει και να δίνει λύσεις σε κάθε είδους πρόβλημα που προέκυπτε στη δική μου δουλειά, τη διδάκτορα Κατερίνα Καλιαμπάκου για τις πολύτιμες συμβουλές της κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων, την υπ. διδάκτορα Ευαγγελία Κουρή για τη βοήθεια στο μικροσκόπιο, την υπ. διδάκτορα Χρυσάνθη Καλλονιάτη για τη βοήθειά της στο πείραμα μέτρησης δραστηριότητας νιτρογενάσης και την υπ. διδάκτορα και γραμματέα στο τμήμα Γαρυφαλλιά Φραγκογεώργη για τη βοήθειά της σε οτιδήποτε χρειάστηκε από τη γραμματεία. Σας ευχαριστώ όλους πολύ για το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον και που υπήρξατε πολύτιμοι συνεργάτες και πολύ καλοί φίλοι.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη και των άλλων εργαστηρίων του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, συγκεκριμένα το Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας φυτών, το Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, το Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας και το Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας για την προθυμία τους να με εξυπηρετήσουν κάθε φορά που χρειάστηκε να χρησιμοποιήσω το δικό τους εργαστηριακό εξοπλισμό. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη διδάκτορα Ειρήνη Αξαρή και τη διδάκτορα Γεωργία Κοτζιά του εργαστηρίου Ενζυμικής Τεχνολογίας για τις συμβουλές τους όσο αφορά την έκφραση και καθαρισμό πρωτεϊνών, καθώς επίσης και για τη βοήθεια στην κινητική μελέτη των ενζύμων.

Ευχαριστίες οφείλω, επίσης, να εκφράσω στο Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για τη χορήγηση υποτροφίας μεταπτυχιακών σπουδών συνολικής χρονικής διάρκειας 3,5 ετών.

Τέλος, με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης της διατριβής αυτής, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου, καθώς επίσης και όλους τους φίλους που μου στάθηκαν σαν δεύτερη οικογένεια.



## *ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ*

---



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---



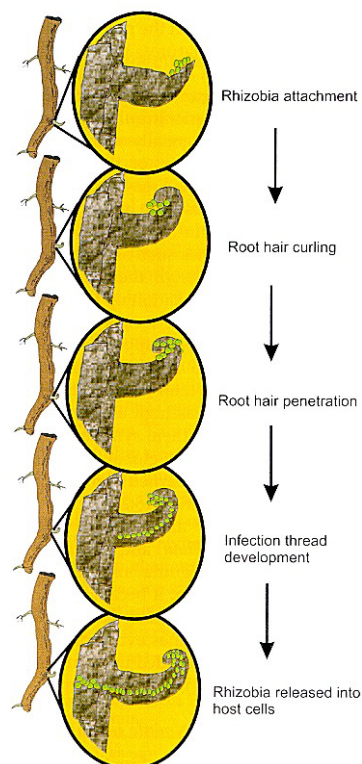
## 1. Η ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΗ ΣΧΕΣΗ ΡΙΖΟΒΙΩΝ-ΨΥΧΑΝΘΩΝ

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους, τα φυτά έχουν εφεύρει διάφορες λύσεις για το πρόβλημα της διαθεσιμότητας των θρεπτικών στη γή. Μια από τις λύσεις ήταν η εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων. Η συμβίωση φυτού-μύκητα πριν από 450 εκατομμύρια χρόνια ίσως ήταν μια εξέλιξη καθοριστική που κατέστησε τα φυτά ικανά να αποικήσουν τη γή (Pirozynski & Malloch, 1975; Remy *et al.*, 1994).

Μία διαφορετικού είδους αλληλεπίδραση φυτού-μικροβίου που εφοδιάζει ένα περιορισμένο εύρος φυτών με το συχνά ελλιπές μακροστοιχείο άζωτο είναι η συμβιωτική αζωτοδέσμευση (SNF: symbiotic nitrogen fixation). Αυτού του τύπου η συμβίωση εξελίχθηκε πιο πρόσφατα, περίπου 60 εκατομμύρια χρόνια πριν, και περιορίζεται σε ψυχανθή και σε ελάχιστα μη-ψυχανθή (Doyle, 1998) τα οποία συμβιώνουν με ριζόβια ή άλλα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, αντίστοιχα (Pawlowski & Bisseling, 1996). Πρόκειται για μια πολύ ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτού ξενιστή και του βακτηριακού στελέχους, όπου βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* και *Sinorhizobium* προκαλούν το σχηματισμό του φυματίου στο αντίστοιχο φυτό ξενιστή. Το φυτό παρέχει στον ενδοσυμβιώτη του φωτοσυνθετικά προϊόντα, με αντάλλαγμα άζωτο σε μορφή αμμωνιακών ιόντων και αμινοξέων (Udvardi & Day, 1997).

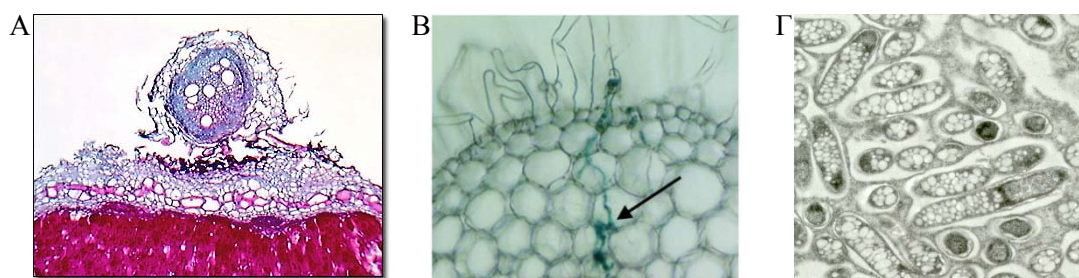
### 1.1. Έναρξη της συμβίωσης και σχηματισμός του φυματίου

**Εικόνα 1:** Έναρξη σχηματισμού του φυματίου



Η περιοχή της ρίζας που είναι δεκτική στη μόλυνση από τα ριζόβια είναι αυτή των νεοαναπτυσσόμενων ριζικών τριχιδίων. Η πρώτη αντίδραση των ριζικών τριχιδίων στην παρουσία των ριζοβίων είναι η παραμόρφωσή τους. Μόλις τα βακτήρια έρθουν σε επαφή με το άκρο των ριζικών τριχιδίων του φυτού, δημιουργείται κύρτωση στο άκρο του τριχιδίου και τα βακτήρια που βρίσκονται προσκολλημένα στο τριχίδιο παγιδεύονται μέσα σ' αυτή (Εικόνα 1). Εκείνη τη στιγμή συμβαίνουν πολλές μορφολογικές αλλαγές στο φυτικό κύτταρο, όπως αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης (Ehrhardt *et al.*, 1992), αυξημένη ροή ασβεστίου, έκκριση πρωτονίων, αναδιοργάνωση των νηματίων ακτίνης (Allen *et al.*, 1994) και αναδιάταξη του κυτταροπλάσματος (Heidstra *et al.*, 1994). Στο σημείο επαφής το κυτταρικό τοίχωμα υδρολύεται (Callaham & Torrey, 1981; Van

Spronsen *et al.*, 1994), παρατηρείται εγκόλπωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και στην περιοχή γύρω από την εγκόλπωση αρχίζει να εναποτίθεται νέο κυτταρικό τοίχωμα (Bauer, 1981; Newcomb, 1981; Brewin, 1991; Kijne, 1992). Η εναπόθεση νέου κυτταρικού τοιχώματος καταλήγει στο σχηματισμό μιας κυλινδρικής δομής που ονομάζεται **μολυσματικό νημάτιο** μέσω της οποίας εισέρχονται τα βακτήρια στο εσωτερικό του φυτού (Εικόνα 2B).



Εικόνα 2: Α) Φυμάτιο, Β) Μολυσματικό νημάτιο, Γ) Βακτηριοειδή

Ταυτόχρονα με το σχηματισμό του μολυσματικού νηματίου, ενεργοποιείται η κυτταροδιαίρεση των κυττάρων του φλοιώδους παρεγχύματος για να σχηματιστεί το αρχέφυτρο του φυματίου. Στα τροπικά ψυχανθή, όπως η σόγια, πραγματοποιούνται κυτταροδιαιρέσεις στα εξωτερικά παρεγχυματικά κύτταρα, ενώ στα εύκρατα ψυχανθή, όπως το μπιζέλι και το αλφάλφα, διαιρούνται τα εσωτερικά παρεγχυματικά κύτταρα (Kijne, 1992).

Το μολυσματικό νημάτιο μεγαλώνει με κατεύθυνση προς το αρχέφυτρο του φυματίου και μόλις φτάσει εκεί τα βακτήρια απελευθερώνονται και εισέρχονται στο φυμάτιο με μια διαδικασία που μοιάζει με ενδοκύττωση (Basset *et al.*, 1977). Εντός του φυτικού κυττάρου τα ριζόβια χάνουν το κυτταρικό τους τοίχωμα και μεταπίπτουν στη συμβιωτική τους μορφή, τα **βακτηριοειδή** (Εικόνα 2Γ). Στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων τα βακτηριοειδή περιβάλλονται από μια μεμβράνη η οποία προέρχεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του φυτικού κυττάρου και ονομάζεται **περιβακτηριακή μεμβράνη**. Η πρωτεϊνική σύνθεση της μεμβράνης αυτής διαφέρει από την αντίστοιχη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, γεγονός που της προσδίδει κάποιες ιδιαίτερες λειτουργίες (Verma, 1992). Η περιβακτηριακή μεμβράνη έχει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στο να ελέγχει την ανταλλαγή των μεταβολιτών μεταξύ φυτού και βακτηριοειδούς. Ο χώρος που δημιουργείται μεταξύ της περιβακτηριακής μεμβράνης και της μεμβράνης του βακτηριοειδούς ονομάζεται **περιβακτηριακός χώρος**. Η νεοσχηματισμένη δομή που αποτελείται από τα βακτηριοειδή μαζί με την περιβακτηριακή μεμβράνη που τα περιβάλλει, ονομάζεται **συμβιώσωμα**.

Μόλις απελευθερωθούν τα βακτήρια, το αρχέφυτρο του φυματίου διαφοροποιείται σε αζωτοδεσμευτικό φυμάτιο (Εικόνα 1Α). Με βάση την ανάπτυξή τους, τα φυμάτια μπορούν να διακριθούν σε δύο τύπους, καθορισμένα και μη-καθορισμένα φυμάτια (Newcomb, 1981). Στα μη-καθορισμένα φυμάτια, ο κεντρικός ιστός διαχωρίζεται σε διάφορες ζώνες (Vasse *et*

*al.*, 1990). Τη μεριστωματική ζώνη, την προαζωτοδεσμευτική ζώνη όπου γίνεται η μόλυνση των κυττάρων, την ενδιάμεση ζώνη όπου επάγεται η αζωτοδέσμευση, την αζωτοδεσμευτική ζώνη και την ζώνη γήρανσης όπου τα βακτηριοειδή αποδομούνται από το φυτό. Στα καθορισμένα φυμάτια, η μεριστωματική δραστηριότητα σταματά νωρίς, οπότε όλα τα κύτταρα του κεντρικού ιστού βρίσκονται στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο. Επιπλέον, στα καθορισμένα φυμάτια τα βακτηριοειδή συνεχίζουν να διαιρούνται μέσα στο συμβιώσωμα, οπότε τα συμβιώσωμα καταλήγουν να περιέχουν πολλά βακτηριοειδή (Bergersen, 1982). Στα μη-καθορισμένα φυμάτια, τα συμβιώσωμα διαιρούνται μαζί με τα βακτηριοειδή οπότε συνήθως συναντάται ένα βακτηριοειδές σε κάθε συμβιώσωμα (Robertson & Lyttleton, 1984).

## 1.2. Σηματοδότηση για εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης

Στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης ριζοβίου-ψυχανθούς κεντρικό ρόλο έχουν σηματοδοτικά μόρια όπως οι παράγοντες Nod ή οι λιπο-χιτο-ολιγοσακχαρίτες (Denarie *et al.*, 1996; Long, 1996; Oldroyd, 2001). Η παραγωγή τέτοιων σηματοδοτικών μορίων ενεργοποιείται από την απελευθέρωση φαινολικών ουσιών, κυρίως φλαβονοειδών, από το φυτό προς τη ριζόσφαιρα. Η παρουσία των ουσιών αυτών στη ριζόσφαιρα ενεργοποιεί την παραγωγή των Nod παραγόντων του κατάλληλου ριζοβιακού στελέχους μέσω επαγωγής των αντίστοιχων *nod* γονιδίων.

Πολύ σημαντικό στοιχείο στη σηματοδότηση των Nod παραγόντων αποτελεί το ασβέστιο (Ehrhardt *et al.*, 1996). Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι πραγματοποιούνται αλλαγές στο ασβέστιο των ριζικών τριχιδίων οι οποίες επάγονται από τους παράγοντες Nod (Cardenas *et al.*, 2000). Παρατηρούνται δύο γεγονότα που αφορούν το ασβέστιο και διαφέρουν τοπικά και χρονικά. Το ένα είναι αυξημένη ροή ασβεστίου στην άκρη του ριζικού τριχιδίου και το άλλο είναι ταλάντευση ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα (Oldroyd & Downie, 2004). Το ασβέστιο είναι ένας άφθονος δευτερογενής αγγελιοφόρος που είναι πιθανό να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων ανταποκρινόμενος σε ένα σηματοδοτικό μόριο.

Ο υποδοχέας των Nod παραγόντων είναι πιθανότατα ένα ετεροδιμερές δύο τύπων κινασών που περιέχουν από έναν τομέα LysM στην εξωκυττάρια περιοχή (Limpens *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003). Οι τομείς LysM δεσμεύουν πολυσακχαρίτες, ιδιαίτερα αλυσίδες γλυκοσαμινών, που αποτελούν το σκελετό των μορίων των Nod παραγόντων. Μεταλλάξεις στον υποδοχέα αυτό αποτρέπουν όλες τις αλλαγές που επάγονται από τους παράγοντες Nod, όπως είναι οι αλλαγές στο ασβέστιο (Amor *et al.*, 2003; Limpens *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003).

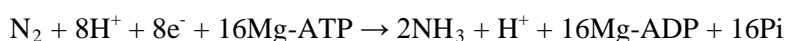
Επόμενα στοιχεία του σηματοδοτικού μονοπατιού φαίνεται να είναι το DMI1, που είναι πιθανώς ένα κανάλι κατιόντων, και το NORK/SYMRK/DMI2, άλλη μια κινάση με επαναλαμβανόμενες πλούσιες σε λευκίνη (Leu) περιοχές στο εξωκυττάριο τμήμα (Endre *et*

*al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Ane *et al.*, 2004). Μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες αυτές αποτρέπουν τις αλλαγές που επάγονται από τους παράγοντες Nod, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στο ασβέστιο (Wais *et al.*, 2000; Shaw & Long, 2003). Η παρουσία κινασών εμπλέκει φωσφορυλιώσεις αρκετά νωρίς στο μονοπάτι σηματοδότησης των Nod παραγόντων, δείχνοντας ότι οι στόχοι των κινασών αυτών είναι βασικής σημασίας για τη σύνδεση της υποδοχής των Nod παραγόντων με την ενεργοποίηση των αλλαγών στο ασβέστιο.

Η πρωτεΐνη DMI3 από το *M. truncatula* είναι απαραίτητη για τη σηματοδότηση, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο *dmi3* είναι φαινοτυπικά όμοιες με τις *dmi1* και *dmi2*, εκτός από το γεγονός ότι μπορούν να ενεργοποιηθούν οι αλλαγές στο ασβέστιο (Catoira *et al.*, 2000; Wais *et al.*, 2000). Αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση στις αλλαγές ασβεστίου προηγείται της λειτουργίας της πρωτεΐνης DMI3, οπότε είναι πολύ πιθανό η πρωτεΐνη αυτή να αποκωδικοποιεί το σήμα των αλλαγών στο ασβέστιο και στη συνέχεια να το μεταδίδει. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η DMI3 είναι μια χημειρική ασβέστιο/καλμοδουλίνη-εξαρτώμενη κίνηση (Levy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004a).

## 2. ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΗ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΣΗ

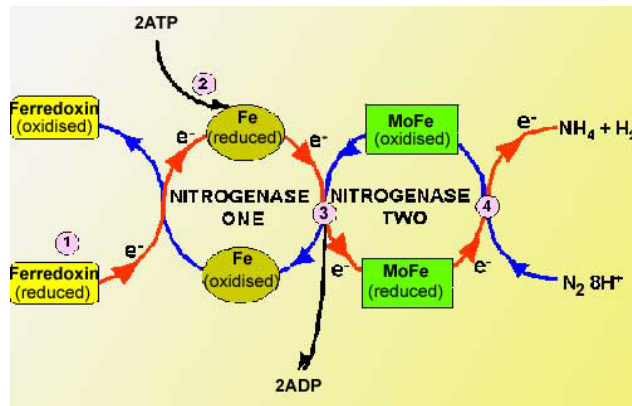
Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση λαμβάνει χώρα στα βακτηριοειδή των φυματίων. Η νιτρογενάση των βακτηριοειδών καταλύει την αντίδραση αναγωγής του N<sub>2</sub> σε αμμωνία:



Η συμβίωση οδηγείται από το φυτό το οποίο παρέχει μια πηγή άνθρακα στα βακτηριοειδή, ο μεταβολισμός του οποίου τροφοδοτεί τη δέσμευση N<sub>2</sub> σε αντάλλαγμα μιας εκκρινόμενης πηγής αζώτου. Για την αντίδραση αναγωγής N<sub>2</sub> σε αμμωνία χρησιμοποιούνται 16 με 18 μόρια ATP (Dixon & Kahn, 2004). Αυτή η διαδικασία είναι ενεργειακά πολύ ακριβή και αυτό εξηγεί το γεγονός ότι η συμβίωση παρεμποδίζεται στην παρουσία πηγής N, όπως τα νιτρικά.

Η νιτρογενάση αποτελείται από δύο τμήματα, την ομοδιμερή Fe-πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *nifH*, και την τετραμερή MoFe-πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τα γονίδια *nifD* και *nifK*. Κρυσταλλογραφικές αναλύσεις δομής των πρωτεϊνών αυτών από τα ελευθέρως διαβιούντα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, έδειξαν ότι υπάρχουν δομικές ομοιότητες με άλλα συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων όπως οι υδρογονάσες και το φωτοσυνθετικό κέντρο (Kim & Rees, 1992; Kim *et al.*, 1993; Georgiadis *et al.*, 1992).





**Εικόνα 3:** Μηχανισμός βιολογικής αζωτοδέσμευσης

Η αντίδραση της βιολογικής αζωτοδέσμευσης συμβαίνει καθώς το  $N_2$  προσδένεται στο ενζυμικό σύμπλεγμα της νιτρογενάσης (Εικόνα 3). Αρχικά, η Fe-πρωτεΐνη ανάγεται από ηλεκτρόνια που δίδονται από τη φερρεδοξίνη. Στη συνέχεια, η ανηγμένη Fe-πρωτεΐνη δεσμεύει ATP και ανάγει την MoFe-πρωτεΐνη, η οποία δίδει ηλεκτρόνια στο  $N_2$ , παράγοντας  $HN=NH$ . Σε δύο επιπλέον κύκλους της διαδικασίας αυτής (όπου σε κάθε κύκλο δίδονται ηλεκτρόνια από τη φερρεδοξίνη) το  $HN=NH$  ανάγεται σε  $H_2N-NH_2$ , το οποίο με τη σειρά του ανάγεται σε  $2NH_3$  (Charpy-Roubaud *et al.*, 2001).

Η νιτρογενάση είναι πολύ ευαίσθητη στο  $O_2$ , επομένως, ένα περιβάλλον χαμηλής συγκέντρωσης  $O_2$  είναι απαραίτητο. Ο συμπαράγοντας MoFe αποδιατάσσεται στην παρουσία  $O_2$  (Shaw & Brill, 1977). Η αναπνοή των βακτηριοειδών απαιτεί υψηλή ποσότητα  $O_2$  όμως αυτό πρέπει να επιτευχθεί διατηρώντας παράλληλα χαμηλή συγκέντρωση ελεύθερου  $O_2$  για τη δράση της νιτρογενάσης. Το παρέγχυμα των φυματίων έχει λίγους και μικρούς μεσοκυττάριους χώρους, μια μορφολογία που βοηθά στο να αποτρέπεται η διάχυση του  $O_2$  (Witty *et al.*, 1986). Παράλληλα, όμως, στα μολυσμένα κύτταρα του κεντρικού ιστού υψηλά επίπεδα της ψυχανθαιμοσφαιρίνης διευκολύνουν τη διάχυση του  $O_2$ . Τυπικά τα φυμάτια διατηρούν τη συγκέντρωση  $O_2$  στα 3 με 22 nM (Witty, 1991) με τη χρήση ψυχανθαιμοσφαιρίνης, η οποία αποτελείται από μια οικογένεια πρωτεϊνών αίμης που δεσμεύουν το  $O_2$  και έχουν παρόμοια λειτουργία με τη μυογλοβίνη (Ott *et al.*, 2005).

### 3. ΑΝΤΑΛΛΑΓΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΣΥΜΒΙΩΤΕΣ

Η ανταλλαγή θρεπτικών ανάμεσα στους συμβιώτες είναι βασικής σημασίας για τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης. Η ανταλλαγή αυτή περιλαμβάνει μεταβολισμό των φυτών που παρέχουν ενώσεις άνθρακα στα βακτηριοειδή και ταυτόχρονη αφομοίωση των μεταβολιτών που απελευθερώνονται από τα βακτηριοειδή. Τα θρεπτικά που μεταφέρονται μεταξύ των συμβιωτών πρέπει να διασχίσουν τόσο την περιβακτηριακή μεμβράνη όσο και τη

μεμβράνη των βακτηριοειδών (White *et al.* 2007). Ο μεταβολισμός των βακτηριοειδών θα πρέπει να θεωρηθεί ανάλογος του μεταβολισμού ενός οργανιδίου καθώς δεν είναι πλέον ένα κύτταρο που αναπτύσσεται ελεύθερα, επομένως είναι εξαρτώμενο από το φυτικό κύτταρο.

### 3.1. Εφοδιασμός των βακτηριοειδών με άνθρακα

Η παροχή άνθρακα προέρχεται από τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης και μεταφέρεται στα φυμάτια μέσω του φλοιώματος ως σακχαρόζη (Gordon *et al.*, 1999). Μεταφορά σακχάρων κατά μήκος της μεμβράνης του συμβιωσώματος έχει αποδειχτεί μόνο για το *Phaseolus vulgaris* και όχι για άλλα φυτά, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι στα βακτηριοειδή μεταφέρονται δικαυβοξυλικά οξέα και όχι σακχαρόζη.

Είναι πιθανό η παροχή άνθρακα στα μολυσμένα κύτταρα του φυματίου να απαιτεί συμπλαστική μεταφορά από τα μη-μολυσμένα κύτταρα. Μη-μολυσμένα, και όχι μολυσμένα, κύτταρα του *Vicia faba* είναι ικανά να προσλάβουν σακχαρόζη από τον αποπλάστη (Peiter & Schubert, 2003). Επιπλέον, ένας χαρακτηρισμένος συμμεταφορέας Suc/H<sup>+</sup> (*LjSUT4*) από το *L. japonicus* εκφράζεται στα ώριμα φυμάτια αποκλειστικά σε ηθμαγειώδεις δεσμίδες και παρέγχυμα και καθόλου στον κεντρικό ιστό στον οποίο βρίσκονται τα μολυσμένα κύτταρα που περιέχουν τα βακτηριοειδή (Flemetakis *et al.*, 2003; Colebatch *et al.*, 2004). Επομένως, τα μη-μολυσμένα κύτταρα του φυματίου συσσωρεύουν σάκχαρα και τα μετατρέπουν σε οργανικά οξέα τα οποία μπορεί να απελευθερώνονται στον αποπλάστη (Kavroulakis *et al.*, 2000). Στη συνέχεια, τα οργανικά ανιόντα μπορούν είτε να μεταφερθούν παθητικά στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων εξαιτίας του χαμηλού αποπ्लाστικού pH είτε να μεταφερθούν εκεί συμπλαστικά από τα μη-μολυσμένα κύτταρα.

Η σακχαρόζη μπορεί να καταβολιστεί από τα ένζυμα συνθάση της σακχαρόζης και αλκαλική μιβερτάση. Η δραστηριότητα και των δύο ενζύμων είναι πολύ υψηλότερη στα μη-μολυσμένα κύτταρα παρά στους γύρω ιστούς (Singh *et al.*, 1994; Chopra *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1999; Flemetakis *et al.*, 2006). Μεταλλαγμένα φυτά *Pisum sativum* που τους λείπει το ένζυμο συνθάση της σακχαρόζης δεν καταφέρνουν να παράγουν αζωτοδεσμευτικά φυμάτια, δείχνοντας ότι το ένζυμο είναι απαραίτητο για την αζωτοδέσμευση (Gordon *et al.*, 1999).

Τα υδρολυμένα προϊόντα του μεταβολισμού της σακχαρόζης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βιοσύνθεση κυτταρίνης και αμύλου ή εναλλακτικά να πραγματοποιηθεί περαιτέρω μεταβολισμός με τη δράση γλυκολυτικών ενζύμων και να παραχθεί φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό οξύ (PEP). Το PEP μπορεί στη συνέχεια να καρβοξυλωθεί σε οξαλοξικό οξύ και αυτό με τη σειρά του να αναχθεί σε μηλικό οξύ για να εφοδιάσει με άνθρακα τα βακτηριοειδή (Rosendahl *et al.*, 1990; Day & Copeland, 1991). Η γλυκόλυση είναι αρκετά αυξημένη στα φυμάτια σε σχέση με τη ρίζα και η σχετική συσσώρευση 6-P-φρουκτόζης και 6-P-γλυκόζης είναι 5 φορές υψηλότερη στα φυμάτια του *L. japonicus*, ενώ η συγκέντρωση φρουκτόζης και γλυκόζης είναι αρκετά μειωμένη (Day &

Copeland, 1991; Debrosses *et al.*, 2005). Η δράση της PEP καρβοξυλάσης στα φυμάτια του τριφυλλιού, της σόγιας, του *Vigna radiata* και του *Lens culinaris* είναι πολύ υψηλότερη από ότι στην υπόλοιπη ρίζα, δείχνοντας ότι παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στο να προμηθεύει τα μολυσμένα κύτταρα με σκελετούς άνθρακα (Miller *et al.*, 1987; Pathinara *et al.*, 1992; Vance & Gantt, 1992; Chopra *et al.*, 2002). Όταν μειώθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του *Ljperc1*, μειώθηκε σημαντικά η ενζυμική δραστηριότητα της συνθάσης της σακχαρόζης και επίσης περιορίστηκε η αζωτοδέσμευση (Nomura *et al.*, 2006).

Προϊόν της PEP καρβοξυλάσης είναι το οξαλοξικό οξύ το οποίο αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου αφυδρογονάση του μηλικού και από το οποίο παράγεται μηλικό οξύ για τον εφοδιασμό των βακτηριοειδών. Έχειδειχτεί ότι στα φυμάτια των φυτών *P. sativum*, *L. japonicus* και *M. truncatula* τα επίπεδα έκφρασης της αφυδρογονάσης του μηλικού και της PEP καρβοξυλάσης είναι αρκετά αυξημένα (Colebatch *et al.*, 2002; Saalbach *et al.*, 2002; Wienkoop & Saalbach, 2003; Colebatch *et al.*, 2004; El Yahyaoui *et al.*, 2004; Kouchi *et al.*, 2004). Πειράματα σήμανσης με  $^{14}\text{CO}_2$  έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις δικαρβοξυλικών είναι πολύ υψηλές στα φυμάτια και ότι η αρχική μορφή ενσωμάτωσης της σήμανσης στα βακτηριοειδή ήταν ως μηλικό (Rosendahl *et al.*, 1990; Salminen & Streeter, 1992).

Επομένως, ενώ η μεταφορά σακχάρων κατά μήκος της μεμβράνης του συμβιωσώματος έχει αποδειχτεί μόνο για το *Phaseolus vulgaris*, η μεταφορά δικαρβοξυλικών έχει αποδειχτεί για όλα τα φυτά και σε υψηλούς ρυθμούς, αποδεικνύοντας το ρόλο τους ως κύρια πηγή άνθρακα για τα βακτηριοειδή (Herrada *et al.*, 1989; Ouyang *et al.*, 1990; Ouyang & Day, 1992).

### **3.2. Μεταφορά κατά μήκος της περιβακτηριακής μεμβράνης και της μεμβράνης των βακτηριοειδών**

Καθώς η περιβακτηριακή μεμβράνη προέρχεται από ενδοκύτωση των βακτηριοειδών από τη φυτική πλασματική μεμβράνη, είναι ανεστραμμένη και η μετακίνηση ουσιών από το φυτικό κύτταρο στο συμβίωσώμα μοιάζει με εξαγωγή ουσιών από το κύτταρο. Η μεταφορά ουσιών από τον περιβακτηριακό χώρο στο εσωτερικό του βακτηριοειδούς μοιάζει με την πρόσληψη ουσιών από τα ελευθέρως-αναπτυσσόμενα βακτήρια (White *et al.*, 2007).

Μονάδες συμβιωσώματων που απομονώθηκαν από τη σόγια δεν είναι διαπερατές στη μεταφορά σακχάρων και αμινοξέων από το κυτταρόπλασμα των φυτών στα βακτηριοειδή (Udvardi & Day, 1997; Day *et al.*, 2001; Lodwig & Poole, 2003). Αντιθέτως, τα δικαρβοξυλικά μεταφέρονται μεταξύ των μεμβρανών σε πολύ υψηλούς ρυθμούς. Κινητικές μελέτες σε συμβιωσώματα από σόγια έδειξαν να υπάρχει ένας μεταφορέας δικαρβοξυλικών στην περιβακτηριακή μεμβράνη με προτίμηση στο μηλικό και το ηλεκτρικό οξύ. Φαίνεται να είναι ένας μηχανισμός παθητικής μεταφοράς που να καθορίζεται από τη διαφορά δυναμικού της μεμβράνης (Udvardi *et al.*, 1988).

Τα ριζόβια είναι gram-αρνητικά βακτήρια και έχουν δύο μεμβράνες, μία εσωτερική και μια εξωτερική. Όπως και σε άλλα gram-αρνητικά βακτήρια, η εσωτερική μεμβράνη ενεργοποιείται από τη μεταφορά ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας και από τη δράση μεμβρανικών ΑΤΡασών που δημιουργούν μια ηλεκτροχημική διαβάθμιση (θετικά φορτισμένη η εξωτερική πλευρά) κατά μήκος της μεμβράνης (O'Brian & Maier, 1989). Αυτή η μεμβράνη καθορίζει κυρίως την μεταφορά ουσιών μεταξύ των βακτηρίων και του περιβάλλοντός τους.

Τα δικαυβοξυλικά οξέα εισέρχονται στο εσωτερικό των βακτηριοειδών μέσω του συστήματος μεταφορέων Dct που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη. Μεταλλαγμένα στελέχη βακτηρίων ως προς το σύστημα Dct προκαλούν στα φυτά φαινότυπο Fix<sup>-</sup> (Yurgel & Kahn, 2004). Το σύστημα αποτελείται από τρία γονίδια, το *dctA* που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μεταφορέα και τα *dctB*, *dctD* που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες οι οποίες ενεργοποιούν τη μεταγραφή του *dctA* στην παρουσία δικαυβοξυλικών (Watson, 1990; Reid & Poole, 1998; Yurgel *et al.*, 2000; Yurgel & Kahn, 2005).

Στην περιβακτηριακή μεμβράνη υπάρχει μια αντλία H<sup>+</sup>-ATPase (Blumwald *et al.*, 1985; Udvardi & Day, 1989; Szafran & Haaker, 1995) η οποία δημιουργεί μια διαφορά δυναμικού κατά μήκος της μεμβράνης, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των πρωτονίων στον περιβακτηριακό χώρο. Η συγκέντρωση πρωτονίων αυξάνεται ακόμα περισσότερο από την παράλληλη δράση της μεταφοράς ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας στην εσωτερική μεμβράνη των βακτηριοειδών. Αποτέλεσμα των δράσεων αυτών είναι η οξίνιση του περιβακτηριακού χώρου, που υπολογίζεται να είναι δύο μονάδες pH πιο όξινο από το φυτικό κυτταρόπλασμα (Udvardi *et al.*, 1991). Επομένως, οι μεμβράνες διαχωρίζουν τρία διαμερίσματα με διαφορετικά pH: ένα ελάχιστο αλκαλικό φυτικό κυτταρόπλασμα, έναν όξινο περιβακτηριακό χώρο και ένα αλκαλικό εσωτερικό των βακτηριοειδών. Η περιβακτηριακή μεμβράνη και η εσωτερική μεμβράνη των βακτηριοειδών έχουν αντίθετες ηλεκτρικές πολικότητες.

### 3.3. Εξαγωγή αζώτου στο φυτό και αφομοίωσή του

Το κεντρικό μονοπάτι μεταβολισμού στο εσωτερικό των ριζοβίων είναι ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA) και είναι απαραίτητος για την έναρξη της αζωτοδέσμευσης (Lodwig & Poole, 2003). Στο πρώτο στάδιο του TCA κύκλου πραγματοποιείται η σύνθεση του κιτρικού οξέος από οξαλοξικό οξύ και ακετυλ-CoA. Το οξαλοξικό προκύπτει από μηλικό, ηλεκτρικό και φουμαρικό, τα οποία παρέχονται στο βακτήριο από το φυτό. Το ακετυλ-CoA προκύπτει από μια διαδικασία δύο βημάτων. Στο πρώτο βήμα, το μηλικό αποκαρβοξυλιώνεται από το μηλικό ένζυμο και παράγεται πυροσταφυλικό, ενώ στο δεύτερο βήμα, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε ακετυλ-CoA με τη δράση του ενζύμου

αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού (McKay *et al.*, 1988; Finan *et al.*, 1991; Driscoll & Finan, 1993; Driscoll & Finan, 1996; Cabanes *et al.*, 2000; Mitsch *et al.*, 2007).

Πειράματα σήμανσης στο φυτό *Pisum sativum* με  $^{15}\text{N}_2$  έδειξαν ότι από τα βακτηριοειδή εκκρίνεται κυρίως αμμωνιακό ιόν αλλά και σημαντικές ποσότητες αλανίνης (Allaway *et al.*, 2000). Το κυρίως μονοπάτι παραγωγής αλανίνης στα βακτηριοειδή είναι μέσω της αναγωγικής αμίνωσης του πυροσταφυλικού από το ένζυμο αφυδρογονάση της αλανίνης. Όταν μεταλλάχθηκε το γονίδιο *aldA* που κωδικοποιεί για το ένζυμο αφυδρογονάση της αλανίνης στα βακτηριοειδή του φυτού *Pisum sativum*, παρατηρήθηκε έκκριση μόνο αμμωνιακού ιόντος και όχι αλανίνης (Allaway *et al.*, 2000).

Είναι πιθανό να εξέρχεται αμμωνία από τα βακτηριοειδή στον όξινο περιβακτηριακό χώρο όπου ευνοείται ο σχηματισμός  $\text{NH}_4^+$  το οποίο στη συνέχεια μεταφέρεται εκτός του συμβιωσώματος διασχίζοντας τη μεμβράνη μέσω καναλιών (Tyerman *et al.*, 1995; Mouritzen & Rosendahl, 1997; Kaiser *et al.*, 1998; Roberts & Tyerman, 2002). Τα κανάλια αυτά ρυθμίζονται από την παρουσία  $\text{Ca}^{+2}$  και  $\text{Mg}^{+2}$  και έχει προταθεί ότι η μεταφορά αμμωνίου εκτός του συμβιωσώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση  $\text{Mg}^{+2}$  στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου (Roberts & Tyerman, 2002). Υπάρχουν ενδείξεις ότι συμβαίνει επίσης διάχυση αερίου αμμωνίας μέσω ενός καναλιού στην περιβακτηριακή μεμβράνη (Niemietz & Tyerman, 2000).

Το αμμωνιακό ιόν που απελευθερώνεται από τα βακτηριοειδή αφομοιώνεται σε γλουταμίνη (Gln) μέσω του μονοπατιού συνθετάση γλουταμίνης/συνθάση γλουταμινικού (GS/GOGAT) στο φυτικό κύτταρο (Patriarca *et al.*, 2002; Barsch *et al.*, 2006a). Τα εύκρατα ψυχανθή που τείνουν να σχηματίζουν μη-καθορισμένα φυμάτια, όπως τα μπιζέλι, τριφύλλι, αλφάλφα, εξάγουν κυρίως ασπαραγίνη (Asn) από τα φυμάτια στο βλαστό. Τα τροπικά ψυχανθή που τείνουν να σχηματίζουν καθορισμένα φυμάτια, όπως η σόγια και το φασόλι, εξάγουν ουρείδες (Temple *et al.*, 1998; Goggin *et al.*, 2003). Σε φυμάτια αλφάλφα εντοπίστηκαν τρεις τύποι GS, εκ των οποίων ο ένας παρουσιάζει ενισχυμένη έκφραση στα φυμάτια. Η μεταγραφή ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για το ένζυμο GOGAT, καθώς και η δραστηριότητα του ενζύμου αυτού εμφανίζουν επαγωγή στα μολυσμένα κύτταρα σε σχέση με τα μη-μολυσμένα κύτταρα και τους υπόλοιπους ιστούς (Vance & Gantt, 1992; Vance *et al.*, 1995; Trepp *et al.*, 1999a). Ανάλυση μεταγραφημάτων και μεταβολιτών στο *L. japonicus* αποκάλυψε τη βιοσύνθεση γλουταμίνης (Gln) και ασπαραγίνης (Asn) και την επαγωγή δύο γονιδίων που κωδικοποιούν για GS και δύο γονιδίων που κωδικοποιούν για συνθετάση ασπαραγίνης (Wienkoop & Saalbach, 2003; Colebatch *et al.*, 2004; Debrosses *et al.*, 2005). Στα περισσότερα εύκρατα ψυχανθή, η αφομοιώσιμη γλουταμίνη (Gln) εξάγεται από τα φυμάτια κυρίως ως ασπαραγίνη (Asn), που απαιτεί τη δράση μιας Gln-εξαρτώμενης συνθετάσης ασπαραγίνης και μιας αμινοτρανσφεράσης ασπαρτικού οξέως. Σε φυτά αλφάλφα βρέθηκε μια Gln-εξαρτώμενη συνθετάση ασπαραγίνης που εκφράζεται ισχυρά στα φυμάτια

(Shi *et al.*, 1997) και στα *L. corniculatus* και αλφάλφα βρέθηκαν αμινοτρανσφεράσες ασπαρτικού οξέως με ενισχυμένη έκφραση στα φυμάτια (Gregerson *et al.*, 1994; Mett *et al.*, 1996).

Στα μη-καθορισμένα φυμάτια του *V. faba* τα περισσότερα μολυσμένα κύτταρα δεν έρχονται σε επαφή με τα μη-μολυσμένα κύτταρα και προτάθηκε πως τα αμινοξέα απελευθερώνονται από τα μολυσμένα κύτταρα στον αποπλάστη. Από τον αποπλάστη μπορούν να προσληφθούν ξανά από τα μη-μολυσμένα κύτταρα και στη συνέχεια να μεταφερθούν συμπλαστικά στο αγωγό σύστημα (Abd-Alla *et al.*, 2000; Peiter *et al.*, 2004). Στα καθορισμένα φυμάτια της σόγιας, όλα τα μολυσμένα κύτταρα έρχονται σε επαφή με τα μη-μολυσμένα κύτταρα, και οι ουρείδες συντίθενται στα μη-μολυσμένα κύτταρα και από εκεί εξέρχονται στο ξύλωμα (Schubert, 1986; Selker, 1988).

#### 4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ ΣΤΗΝ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΣΗ

Η αζωτοδέσμευση απαιτεί την παροχή μεγάλης ποσότητας άνθρακα από το φυτό στο φυμάτιο. Ερωτήματα που απασχόλησαν τους ερευνητές ήταν κατά πόσο οι απαιτήσεις σε άνθρακα από την αζωτοδέσμευση περιορίζουν την παραγωγικότητα του φυτού, καθώς επίσης, αν η δραστηριότητα της νιτρογενάσης περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα σε άνθρακα.

##### 4.1. Διαθεσιμότητα άνθρακα

Τα φωτοσυνθετικά προϊόντα μεταφέρονται στο φυμάτιο σε μορφή σακχαρόζης και αποθηκεύονται εκεί σε μορφή αμύλου. Αποθήκευση αμύλου στους ιστούς ερμηνεύεται γενικώς ως περίσσεια υδατανθράκων. Ενεργά αζωτοδεσμευτικά φυμάτια σε όλα τα ψυχανθή περιέχουν άμυλο τόσο σε μολυσμένα όσο και σε μη-μολυσμένα κύτταρα (Cralle & Heichel, 1985; Gordon *et al.*, 1985; Hostak *et al.*, 1987; Kouchi *et al.*, 1985; Minchin *et al.*, 1981). Ενώ το άμυλο συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της μέρας, η δραστηριότητα της νιτρογενάσης συνεχίζεται και κατά τη διάρκεια της νύχτας. Έχειδειχτεί ότι η κύρια πηγή άνθρακα για τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης κατά τη διάρκεια της νύχτας προέρχεται από τις δεξαμενές υδατανθράκων στο βλαστό (Gordon *et al.*, 1985; Kouchi *et al.*, 1985; Walsh *et al.*, 1987). Τα αποθέματα αμύλου στη ρίζα φαίνεται να μην είναι διαθέσιμα για αζωτοδέσμευση, ενώ τα αποθέματα υδατανθράκων στα φυμάτια μεταβολίζονται μόνο στην περίπτωση που εξαντληθούν τα εξωτερικά αποθέματα και ιδίως εκείνα του βλαστού (Hostak *et al.*, 1987; Kouchi *et al.*, 1985; Walsh *et al.*, 1987). Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι τα φωτοσυνθετικά προϊόντα που μεταφέρονται στο φυμάτιο βρίσκονται σε περίσσεια τόσο για τις ανάγκες της αζωτοδέσμευσης όσο και για τις ανάγκες της ανάπτυξης άλλων οργάνων.

Η σκοτεινή δέσμευση του CO<sub>2</sub> από την PEPC (phospho-*enol*-pyruvate carboxylase) αποτελεί μια επιπλέον πηγή άνθρακα για τη λειτουργία του φυματίου. Στο αλφάλφα αποτελεί το 12% των συνολικών απαιτήσεων σε σκελετούς άνθρακα για την αφομοίωση του δεσμευμένου αζώτου (Ta *et al.*, 1987). Στη σόγια, η μισή περίπου ποσότητα CO<sub>2</sub> που καταλήγει στο εσωτερικό του φυματίου ανακυκλώνεται με τη δράση της PEPC και υπολογίστηκε να είναι 1.5 mg C / mg δεσμευμένου N<sub>2</sub> (Warembourg & Roumet, 1989).

#### 4.2. Συσχέτιση άνθρακα και αζωτοδέσμευσης

Η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης έχει μεγάλο κόστος στα προϊόντα της φωτοσύνθεσης που καταναλώνει και πολλές ανησυχίες έχουν προκύψει από το γεγονός ότι αυτά τα φωτοσυνθετικά προϊόντα θα μπορούσαν διαφορετικά να συμμετέχουν στην αύξηση της παραγωγής. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν κάποιες ενδείξεις που να υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η αζωτοδέσμευση μειώνει την παραγωγή. Επιπλέον, πειράματα σε ψυχανθή στο χωράφι σπάνια δείχνουν αυξημένη τελική παραγωγή από τη χρήση επιπρόσθετης λίπανσης με διάφορες μορφές αζώτου (Vance & Heichel, 1991).

Λίπανση με CO<sub>2</sub> σε φυτά σόγιας στον αγρό αύξησε σημαντικά την αζωτοδέσμευση (Hardy & Havelka, 1975; Havelka & Hardy, 1976), ενισχύοντας τη μάζα των φυματίων και τη συσσώρευση αζώτου. Η δραστηριότητα της νιτρογενάσης ανταποκρίθηκε στη λίπανση με CO<sub>2</sub> αποδεικνύοντας ότι η φωτοσύνθεση μπορεί να περιορίσει την αζωτοδέσμευση. Τα ψυχανθή ανταποκρίνονται σε μια μεγάλου διαστήματος αυξημένη παροχή φωτοσυνθετικών προϊόντων, αυξάνοντας τη μάζα όλων των οργάνων, συμπεριλαμβανομένων και των φυματίων. Αλφάλφα που επιλέχτηκε εξαιτίας της αυξημένης μάζας φυματίων, παρουσίασε μια αναλογική αύξηση στη μάζα όλων των οργάνων (Cralle *et al.*, 1987).

Γενικώς, πειραματικές συνθήκες που ενισχύουν τη φωτοσύνθεση, όπως αυξημένη συγκέντρωση CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα (Hardy & Havelka, 1976; Finn & Brun, 1982; Murphy, 1986; Soussana & Hartwig, 1996; Schortemeyer *et al.*, 1999) και αυξημένη ένταση φωτός (Lawn & Brun, 1974; Hardy & Havelka, 1976; Bethlenfalvay & Phillips, 1977a), συνήθως σχετίζονται με αυξημένη αζωτοδέσμευση. Ομοίως, χειρισμοί που περιορίζουν τη φωτοσύνθεση, όπως αποφύλλωση (Fujita *et al.*, 1988), σκίαση (Tricot, 1993), σύντομη φωτοπερίοδος (Murphy, 1986) και μειωμένη ένταση φωτός (Feigenbaum & Mengel, 1979), μειώνουν την αζωτοδέσμευση.

Αποτελέσματα ερευνών δείχνουν ότι τα φυμάτια των ψυχανθών σπάνια έχουν επιπλέον ικανότητα δραστηριότητας νιτρογενάσης η οποία να μπορεί να ενεργοποιηθεί αυξάνοντας την ικανότητα των φυτών να φωτοσυνθέτουν. Η παροχή των φωτοσυνθετικών προϊόντων φαίνεται πως είναι αρκετή τόσο για τη δράση της νιτρογενάσης όσο και για τη σύνθεση της νιτρογενάσης. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι μπιζέλι στο οποίο παρατηρήθηκε αυξημένος ρυθμός αφομοίωσης CO<sub>2</sub> στα φύλλα, δεν παρουσίασε αυξημένη αζωτοδέσμευση

στο χωράφι (Mahon, 1982). Επιπλέον, παρόλο που πηγές και καταβόθρες N και C ανταποκρίνονται στην αυξημένη παροχή φωτοσυνθετικών προϊόντων, η συσσώρευση N καθυστερεί τη συσσώρευση C, καθώς η φωτοσύνθεση αυξάνεται (Wilson *et al.*, 1933).

Η μείωση της αζωτοδέσμευσης που παρατηρήθηκε σε έλλειψη νερού σχετίστηκε με την αύξηση των συνολικών υδατανθράκων (Fujita *et al.*, 1988) ή με την αυξημένη συγκέντρωση διαλυτής σακχαρόζης (Minchin *et al.*, 1986). Οι Vance & Heichel (1991) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αζωτοδέσμευση δεν μπορεί να περιορίζεται άμεσα από την παροχή C, αλλά μάλλον περιορίζεται από το O<sub>2</sub> (Hunt & Layzell, 1993). Ο περιορισμός της αζωτοδέσμευσης από τον άνθρακα θα πρέπει να πηγάζει από την αδυναμία να χρησιμοποιηθεί ο άνθρακας στα φυμάτια (Vance *et al.*, 1998) καθώς περιορίζονται σημαντικά ένζυμα του μεταβολισμού του άνθρακα, όπως η συνθάση της σακχαρόζης (Gordon *et al.*, 1993; Gonzales *et al.*, 1995).

Παρόλο που η δράση της νιτρογενάσης φαίνεται να περιορίζεται μάλλον από το O<sub>2</sub> παρά από τον άνθρακα (Hunt & Layzell, 1993; Vance & Heichel, 1991), η δραστηριότητα της αζωτοδέσμευσης μπορεί να εξαρτάται από την παροχή άνθρακα. Κατά την ανάπτυξη φυτών *Pisum sativum* εμφανίστηκε να υπάρχει μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας άνθρακα που κατανέμεται στα φυμάτια και στην ειδική δραστηριότητα της αζωτοδέσμευσης (Voisin *et al.*, 2003). Αυτό δείχνει ότι η αζωτοδέσμευση είναι ισχυρά συνδεδεμένη με την παροχή άνθρακα.

#### 4.3. Έλλειψη άνθρακα

Η αζωτοδέσμευση εξαρτάται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως αποφύλλωση, έλλειψη νερού, διαρκής σκοτάδι και λίπανση νιτρικών (Vance *et al.*, 1979; Witty *et al.*, 1986; Layzell *et al.*, 1990). Στις περισσότερες συνθήκες καταπόνησης, η αρχική μείωση της δραστηριότητας νιτρογενάσης οφείλεται στην μειωμένη συγκέντρωση O<sub>2</sub> που φτάνει στα μολυσμένα κύτταρα και τα βακτηριοειδή (Witty *et al.*, 1986; Carroll *et al.*, 1987; Layzell *et al.*, 1990; Escuredo *et al.*, 1996). Παρατεταμένες συνθήκες καταπόνησης επάγουν την πρόωρη γήρανση του φυματίου. Η γήρανση που επάγεται από καταπόνηση έχει συσχετιστεί με αυξημένη παραγωγή οξειδωτικών ουσιών και την ταυτόχρονα μειωμένη αντιοξειδωτική προστασία (Escuredo *et al.*, 1996; Gogorcena *et al.*, 1997).

Η έκθεση φυτών σόγιας σε συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού επάγει δομικές και μεταβολικές αλλαγές στα φυμάτια που μοιάζουν με φυσιολογική γήρανση, γεγονός που δηλώνει ότι οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις διαδικασίες αυτές είναι όμοιοι (Pfeiffer *et al.*, 1983; Cohen *et al.*, 1986). Το παρατεταμένο σκοτάδι προάγει την παραγωγή τοξικών ριζών OH σε φυμάτια από φασόλι, που είναι μια άμεση ένδειξη οξειδωτικής καταπόνησης (Becana & Klucas, 1992).



Η έκθεση φυτών σόγιας σε μικρής διάρκειας συνθήκες σκοταδιού είναι αρκετή για να προκαλέσει γρήγορη μείωση στα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων που κωδικοποιούν για σημαντικές πρωτεΐνες του φυματίου και στη δραστηριότητα του ενζύμου συνθάση της σακχαρόζης (SS) (Gordon *et al.*, 1993). Επιπλέον, καταπόνηση σκοταδιού μείωσε την αναπνοή και τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης σε φυμάτια σόγιας και λούπινου (Layzell *et al.*, 1990; Iannetta *et al.*, 1993).

Στο φασόλι, μετά από συνεχές σκοτάδι μίας ημέρας η *in vivo* δραστηριότητα της νιτρογενάσης ήταν σχεδόν μηδενική και τα υποστρώματα άνθρακα είχαν εξαντληθεί. Η μείωση της αναπνευστικής δραστηριότητας αύξησε τη συγκέντρωση οξυγόνου στην κεντρική ζώνη σε ποσοστό 1%, μια συγκέντρωση ικανή να προκαλέσει την απενεργοποίηση της νιτρογενάσης. Μετά από δύο ημέρες σκοτάδι, μειώθηκε το επίπεδο των πρωτεϊνών της νιτρογενάσης, καθώς επίσης, μειώθηκαν οι δραστηριότητες των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του άνθρακα και του αζώτου. Για την πλήρη κατάρρευση του μεταβολισμού του φυματίου χρειάστηκαν 4 ημέρες συνεχούς σκότους, όπου μειώθηκε η περιεχόμενη ποσότητα σε ψυχανθαιμοσφαιρίνη και η αντιοξειδωτική προστασία. Στο τελικό στάδιο γήρανσης σημειώθηκε οξειδωτική καταπόνηση με τη συσσώρευση κατεστραμμένων πρωτεϊνών (Gogorcena *et al.*, 1997).

Ομοίως στο μπιζέλι, η *in vivo* δραστηριότητα της νιτρογενάσης μειώθηκε σημαντικά μετά από συνεχές σκοτάδι μίας ημέρας ενώ η περιεχόμενη σακχαρόζη μειώθηκε κατά ποσοστό 97%. Μετά από συνεχές σκοτάδι 2 ημερών, μειώθηκαν σημαντικά η ψυχανθαιμοσφαιρίνη, οι υδατάνθρακες και πολλές αντιοξειδωτικές ουσίες, ενώ συσσωρεύτηκαν τροποποιημένες πρωτεΐνες. Πλήρης κατάρρευση του μεταβολισμού του φυματίου παρατηρήθηκε μετά από 4 ημέρες συνεχούς σκότους που συνοδεύτηκε από εκτενείς δομικές ζημιές (Matamoros *et al.*, 1999).

## 5. ΨΥΧΑΝΘΗ: ΤΟ ΦΥΤΟ *Lotus japonicus*

Η *Leguminosae* είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια φυτών, συμπεριλαμβάνοντας 20000 μέλη και υποδιαιρείται σε τρεις υπο-οικογένειες: Papilionoideae, Caesalpinioideae και Mimosoideae. Στα μέλη της οικογένειας αυτής παρατηρείται πολύ μεγάλη ποικιλομορφία καθώς περιλαμβάνει από ετήσιες πόες μέχρι και δασικά δέντρα. Αυτή η ποικιλομορφία αντανακλάται και στο μέγεθος και την πολυπλοκότητα των γονιδιωμάτων τους.

Τα ψυχανθή είναι πολύ μεγάλης σημασίας για την ανθρωπότητα ως πηγή τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα αλλά και για τις χρήσεις τους στη βιομηχανία (Graham & Vance, 2003). Το μεγάλο τους πλεονέκτημα είναι το ότι μπορούν να αζωτοδεσμεύουν κατόπιν συμβίωσης τους με τα *Rhizobium*, πράγμα που παρέχει στα φυτά αυτά αλλά και σε επόμενες

καλλιέργειες μια ελεύθερη και ανανεώσιμη πηγή αζώτου. Έχει υπολογιστεί ότι κάθε χρόνο δεσμεύονται από τα καλλιεργούμενα ψυχανθή περίπου 40 με 60 εκατομμύρια τόνοι αζώτου (Smil, 1999). Τα ψυχανθή αποτελούν το ένα τρίτο της παγκόσμιας πρωτογενούς παραγωγής και επίσης καλύπτουν κατά το ένα τρίτο τις ανάγκες σε πρωτεΐνη του ανθρώπινου διαιτολογίου.

Στα ψυχανθή παγκόσμιας διατροφικής αξίας ανήκουν τα φασόλι (*Phaseolus vulgaris*), σόγια (*Glycine max*), μπιζέλι (*Pisum sativum*), ρεβύθι (*Cicer arietinum*), κουκί (*Vicia faba*), *Cajanus cajan*, *Vigna unguiculata* και φακή (*Lens esculenta*). Το πιο σημαντικό ψυχανθές είναι η σόγια. Το μεγαλύτερο ποσοστό του παραγόμενου σπόρου χρησιμοποιείται για εκχύλιση λαδιού και ως σανός για τα ζώα (Wang, 2003). Εκτός από τη χρήση τους στη διατροφή, τα ψυχανθή χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση του εδάφους, φυτοεξυγίανση, την παραγωγή ξυλείας, ως διακοσμητικά βότανα και θάμνοι, καθώς και για εκχύλιση τσίχλας, ρετσίνα και ως προσθετικά τροφίμων. Επιπλέον, τα ψυχανθή παράγουν ένα μεγάλο εύρος δευτερογενών μεταβολιτών, κάποιοι από τους οποίους έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες όπως τα ισοφλαβονοειδή (Dixon & Sumner, 2003; Dixon, 2004).

Δυστυχώς, τα καλλιεργούμενα ψυχανθή είναι σχετικώς φτωχά συστήματα-μοντέλα για γενετική και γενωμική έρευνα. Κάποια είναι τετραπλοειδή (π.χ. αράπικο φυστίκι), πολλά έχουν μεγάλα γονιδιώματα (π.χ. μπιζέλι και φάβα) και κάποια είναι δύσκολα στο μετασχηματισμό ή δύσκολα στην αναγέννηση (π.χ. φασόλι, σόγια και μπιζέλι). Επίσης, κάποια έχουν μεγάλους σπόρους, σχετικά λίγους σπόρους ανά φυτό και μεγάλα φυτάρια που δεν επιτρέπουν την καλλιέργεια σε μεγάλη πυκνότητα (π.χ. φασόλι, σόγια, μπιζέλι, ρεβύθι). Κάποια ψυχανθή όπως η σόγια έχουν στο γένωμά τους διπλασιασμούς και κάποια είναι ασυμβίβαστα ή έχουν μεγάλο βιολογικό κύκλο. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να υιοθετηθούν ως μοντέλα για την έρευνα των ψυχανθών δύο άλλα είδη, το *Lotus japonicus* και το *Medicago truncatula*, καθώς και τα δύο φέρουν χαρακτηριστικά φυτών-μοντέλων.

### 5.1. Η έρευνα στο φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*

Το *L. japonicus* είναι ένα διπλοειδές φυτό με μικρό γένωμα, αυτογονιμοποιούμενο και με μικρό κύκλο ζωής, περίπου 2-3 μήνες (Handberg & Stougaard, 1992; Imaizumi-Anraku *et al.*, 1997; Jiang & Gresshoff, 1997). Τα νεαρά φυτά είναι πολύ μικρού μεγέθους και μπορούν να μεγαλώνουν *in vitro* σε δοκιμαστικούς σωλήνες και σε μεγάλη πυκνότητα στο έδαφος (Handberg & Stougaard, 1992). Το *L. japonicus* είναι μοναδικό στο γεγονός ότι είναι ένα ψυχανθές που μεταφέρει αμίδια και σχηματίζει καθορισμένα φυμάτια (Streeter, 1991; Takane *et al.*, 2000), ενώ τα περισσότερα από τα άλλα ψυχανθή είτε θα είναι φυτά που μεταφέρουν αμίδια και έχουν μη-καθορισμένα φυμάτια (όπως αλφάλφα και μπιζέλι), είτε θα είναι φυτά που μεταφέρουν ουρεΐδες και έχουν καθορισμένα φυμάτια (όπως η σόγια).

Το γονιδίωμα του *L. japonicus* υπολογίζεται να έχει μέγιστο μέγεθος 472.1Mb (Ito *et al.*, 2000) και έχει ξεκινήσει μια μεγάλης κλίμακας μελέτη για την αλληλούχιση του γονιδιώματος του οικότυπου Miyakojima (Sato *et al.*, 2001). Παράλληλα με την αλληλούχιση, άρχισε η παραγωγή DNA δεικτών και η κατασκευή γενετικών χαρτών. Ένας μεγάλος αριθμός πλήρους μήκους cDNA κλώνων είναι διαθέσιμος, ενώ επίσης διαθέσιμος είναι ένας μεγάλος αριθμός EST, τα οποία προέρχονται τόσο από ολόκληρα φυτά *L. japonicus* όσο και από ποικιλία οργάνων όπως ρίζα, φυμάτια, άνθη και σπόρους.

Μικροσυστοιχίες DNA έχουν παραχθεί χρησιμοποιώντας cDNA από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβάνοντας κλώνους από άνθη, φυμάτια και άλλα φυτικά όργανα. Με τη χρήση των μικροσυστοιχιών αυτών μελετήθηκε η ανάπτυξη των ανθών (Endo *et al.*, 2002), καθώς επίσης, η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των φυματίων (Colebatch *et al.*, 2004; Kouchi *et al.*, 2004), όπου εντοπίστηκαν περισσότερα από 1000 φυτικά γονίδια που φαίνεται να επάγονται. Ένα παρόμοιο εργαλείο για μεταγραφικές αναλύσεις έχει αναπτυχθεί και για τον ενδοσυμβιώτη του *L. japonicus*, το *Mesorhizobium loti*.

Η ικανότητα των φυτών να μετασχηματιστούν και να αναγεννηθούν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη μοριακή και τη φυσιολογική ανάλυση της λειτουργίας του γονιδίου. Τα φυτά *L. japonicus* είναι ικανά να μετασχηματιστούν με τη μεσολάβηση του Αγροβακτηρίου σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα όπως έχει περιγραφεί από τους Lombardi *et al.* το 2003.

Μεγάλη πρόοδος έχει παρατηρηθεί τα τελευταία χρόνια στην εφαρμογή διαφόρων τεχνικών στο *L. japonicus* όπως η τεχνική RNAi που περιορίζει την έκφραση των γονιδίων. Περιορισμός της σύνθεσης ψυχανθαιμοσφαιρίνης είχε δραματικές συνέπειες στην αζωτοδέσμευση (Ott *et al.*, 2005). Στις ανεξάρτητες RNAi σειρές που προέκυψαν, τα επίπεδα έκφρασης της ψυχανθαιμοσφαιρίνης μειώθηκαν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 97%. Επιπλέον, έχει αναπτυχθεί η τεχνική TILLING που μπορεί να ανιχνεύσει φυτά με σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια που ενδιαφέρουν, μέσα σε έναν EMS (ethyl methane sulfonate)-μεταλλαγμένο πληθυσμό (Perry *et al.*, 2003). Η διαθεσιμότητα περίπου 5000 EMS-μεταλλαγμένων σειρών και ταυτόχρονα το μεγάλο μέγεθος πληροφοριών που παίρνουμε από το πρόγραμμα αλληλούχισης έχουν κάνει την τεχνική TILLING εύκολη και αποτελεσματική.

Το *L. japonicus* έχει γίνει αντικείμενο μελετών και σε πρωτεομικές αναλύσεις. Υγρή χρωματογραφία μαζί με φασματομετρία μαζών χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την περιβακτηριακή μεμβράνη (Wienkoop & Saalbach, 2003). Επιπλέον, έχει αναπτυχθεί αρκετά και η ανάλυση σε επίπεδο μεταβολιτών με χρήση της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (Fiehn, 2000). Για τη διευκόλυνση της ταυτοποίησης μεταβολιτών έχει δημιουργηθεί για το *L. japonicus* μια βιβλιοθήκη αναφοράς. Μ' αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών σε διάφορα βιολογικά δείγματα.



# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---



## 1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ, ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Οι σπόροι *L. japonicus* (Gifu B-129) ήταν μια ευγενική προσφορά του Δρ. Jens Stougaard (University of Aarhus, Δανία). Πριν την εκβλάστησή τους, οι σπόροι επωάστηκαν για 5 λεπτά σε πυκνό H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και στη συνέχεια απολυμάνθηκαν για 20 λεπτά σε διάλυμα που περιείχε 2% NaOCl–0.02% Tween 20. Οι σπόροι διατηρήθηκαν στους 18 °C στο σκοτάδι για 72 ώρες μέχρι την εκβλάστησή τους και τα μικρά φυτά μεταφέρθηκαν στη συνέχεια σε θήκες σποράς που περιείχαν άμμο. Κατά τη μεταφορά τους στις θήκες σποράς, τα νεαρά φυτά μολύνθηκαν με καλλιέργεια *Mesorhizobium loti* (στέλεχος R7a) που είχε αναπτυχθεί μέχρι OD<sub>600</sub>=0,1. Το στέλεχος R7a του *M. loti* ήταν μια ευγενική προσφορά του Καθ. Clive Ronson (University of Otago, Νέα Ζηλανδία). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον με φωτοπερίοδο 16 ώρες μέρα/8 ώρες νύχτα, θερμοκρασία 22 °C την ημέρα/18 °C τη νύχτα και υγρασία 70% (Handberg & Stougaard, 1992) και μεγάλωσαν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950).

## 2. ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

### 2.1. Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς

Για την απομόνωση ολικού RNA από τους ιστούς του *L. japonicus* ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Περίπου 0.2 gr φυτικού ιστού που μόλις έχουν απομακρυνθεί από το φυτό ή έχουν διατηρηθεί στους -80°C ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτριβήσεως παρουσία υγρού αζώτου.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 300μl διαλύματος εκχύλισης RNA και 300μl μείγματος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1 (διάλυμα PIC) pH:8,3.
- Στη συνέχεια το δείγμα αναδεύεται καλά για 30 δευτερόλεπτα με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με 300μl μείγματος PIC.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf.

- Τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και ενός όγκου ισοπροπανόλης.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- Το ίζημα των νουκλεϊνικών οξέων επαναδιαλύεται σε 1125 μl διαλύματος 10T/10E και το RNA κατακρημνίζεται εκλεκτικά με την προσθήκη 375 μl διαλύματος 8 M LiCl και επώαση στους 4°C για τουλάχιστον 12 ώρες.
- Το ολικό RNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- Το ίζημα ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη, αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE.
- Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζονται φωτομετρικά ενώ η ακεραιότητα διαπιστώνεται με ανάλυση του δείγματος σε πηκτική αгарόζης.

#### Διαλύματα απομόνωσης RNA από φυτικούς ιστούς

##### **Διάλυμα εκχύλισης RNA**

50 mM Tris-HCl pH:8.3 , 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Lauryl sarcosine.

##### **PIC pH 8.3**

Φαινόλη, χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη αναμιγνύονται σε αναλογία 24:24:1. Το μείγμα εξισορροπείται με 100 mM Tris-HCl pH:8.3/10 mM EDTA.

##### **3M Οξικό νάτριο pH:5.2**

Σε τελικό όγκο 1 lt H<sub>2</sub>O διαλύονται 246,09 gr άνυδρο οξικό νάτριο. Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 5,2 με την προσθήκη πυκνού οξικού οξέος. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

##### **10T/10E**

10 mM Tris-HCl pH: 8.3, 10 mM EDTA.

##### **8 M LiCl**

Σε τελικό όγκο 100ml dH<sub>2</sub>O διαλύονται 33.9gr LiCl.

##### **TE**

10 M Tris-HCl pH: 8.0, 1 mM EDTA.

## **2.2. Απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα ολικού RNA**

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης του RNA από τους φυτικούς ιστούς απομονώνεται και μέρος του γονιδιωματικού DNA, επομένως, απαιτείται ο καθαρισμός του RNA από το



γονιδιωματικό DNA. Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται σε ένζυμα που κόβουν - καταστρέφουν το DNA, ενώ ταυτόχρονα αφήνουν ανέπαφο το RNA.

- Το ολικό RNA επωάζεται με DNase I για 1 ώρα και 10 λεπτά στους 37°C.
- Ακολουθεί απενεργοποίηση της DNase I και καθαρισμός του δείγματος με ίσο όγκο φαινόλης.
- Το δείγμα αναδεύεται καλά για 30 δευτερόλεπτα με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf.
- Προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/χλωροφόρμιο 1:1, το μείγμα αναδεύεται καλά και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf.
- Προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφόρμιου, το μείγμα αναδεύεται καλά και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf.
- Τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και 2,5x του όγκου αιθανόλη. Το δείγμα αφήνεται στους -20°C για περίπου 16 ώρες.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- Το ίζημα ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη, αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο ddH<sub>2</sub>O.

### 2.3. Αντίστροφη (reverse) μεταγραφή

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

## 2.4. RT-qPCR πραγματικού χρόνου

- Τα cDNA-στόχοι ενισχύθηκαν με εξειδικευμένους εκκινητές (Πίνακας 1, Παράρτημα) που σχεδιάστηκαν στη μεταγραφόμενη περιοχή του κάθε γονιδίου με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν κοντά στην περιοχή του 3' άκρου των γονιδίων και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 70 έως 150 ζεύγη βάσεων.
- Η αντίδραση PCR περιλάμβανε το μίγμα της Power SYBR Green (Applied Biosystems), τους εξειδικευμένους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0.2μM ο καθένας και 1μl της μήτρας cDNA.
- Οι αντιδράσεις του ποσοτικού RT-PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα MX3005P της εταιρίας Stratagene.
- Το πρόγραμμα του PCR περιλάμβανε 10 λεπτά επώαση στους 95°C και ακολούθησαν 40 κύκλοι με 95°C για 15 δευτερόλεπτα και 60°C για 1 λεπτό.
- Η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός διμερών των εκκινητών ελέγχθηκε για κάθε ζεύγος χωριστά από την ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης στο τέλος της αντίδρασης.
- Τα επίπεδα έκφρασης ενός γονιδίου του *L. japonicus* που κωδικοποιεί για ουβικιτίνη χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικός έλεγχος για να γίνει κανονικοποίηση στις μικρές διαφορές που παρουσιάζονται στις ποσότητες του cDNA.
- Τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου (X) υπολογίστηκαν σε αναλογία προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της ουβικιτίνης (U). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης υπολογίστηκαν από τον τύπο  $(1+E)^{-\Delta C_t}$ , όπου  $\Delta C_t$  είναι η διαφορά  $C_t^X - C_t^U$  και E είναι η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR.
- Η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR (E) για κάθε γονίδιο υπολογίστηκε από την γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της απορρόφησης ανά κύκλο αντίδρασης, χρησιμοποιώντας το λογισμικό LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003).
- Όλες οι αντιδράσεις qPCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκαν σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

## 3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (GC-MS)

### 3.1. Εκχύλιση μεταβολιτών από φυτικά δείγματα

- Τα δείγματα που συλλέγονται για να αναλυθούν με GC-MS, τα παγώνουμε γρήγορα σε υγρό άζωτο και τα διατηρούμε στους -80°C.

- Ξηρός ιστός (περίπου 75 με 175 mg) φυματίων *L. japonicus* που είχαν υποστεί λυοφιλίωση, ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτριβήσεως με 1ml διαλύματος 70% αιθανόλης.
- Μεταφέρουμε το μίγμα σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα Sorvil των 10ml και ξεπλένουμε το γουδί με επιπλέον 4ml διαλύματος 70% αιθανόλης το οποίο επίσης μεταφέρουμε στο δοκιμαστικό σωλήνα.
- Μετά από καλή ανάδευση (vortex), επωάζουμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο υπερήχων μέσα σε βραστό νερό για 15 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές/λεπτό στους 5°C για 10 λεπτά
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα.
- Επαναλαμβάνουμε την εκχύλιση, με τον ίδιο τρόπο, προσθέτοντας 2ml διαλύματος 70% αιθανόλης. Ακολουθεί ξανά ανάδευση, επώαση στο υδατόλουτρο υπερήχων, φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο μεταφέρεται επίσης στο νέο δοκιμαστικό σωλήνα, δηλαδή προστίθεται στο υπερκείμενο της προηγούμενης φυγοκέντρησης.
- 1ml από το συνολικό υπερκείμενο των δύο φυγοκεντρήσεων, μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προστίθεται 100μl ενός σημασμένου ισοτόπου μίας γνωστής ένωσης σε γνωστή συγκέντρωση (1mg/ml σε αιθανόλη) που θα χρησιμοποιηθεί στην κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.
- Τα δείγματα ξηραίνονται σε ξηραντήρα με εφαρμογή κενού, σε θερμοκρασία 40°C και με ταυτόχρονη ανάδευση.

### 3.2. Παραγωγοποίηση (Derivatization)

Με την παραγωγοποίηση, μια χημική ένωση μετατρέπεται σε ένα νέο προϊόν παρόμοιας χημικής σύστασης με νέες χημικές ιδιότητες. Οι νέες ιδιότητες καθιστούν τα μόρια καταλληλότερα για διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση κατά τη χρωματογραφική ανάλυση. Με την τεχνική του GC-MS μπορούν να αναλυθούν μόνο ενώσεις που είναι πτητικές και θερμοσταθερές. Η χημική παραγωγοποίηση των δειγμάτων είχε ως στόχο να αποδόσει στις προς ανάλυση ουσίες αυτές τις δύο ιδιότητες και για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο χειρισμοί:

A) Προσθήκη της ομάδας  $\text{CH}_3\text{-O-NH}_2$  (methoxyamine). Μ'αυτό το χειρισμό επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση των ομάδων καρβονυλίων ( $\text{=C=O}$ ). Παρεμποδίζεται ο κετο-ενολ ταυτομερισμός και ο σχηματισμός πολλαπλών ακέτυλ- ή κέτυλ- δομών.

B) Προσθήκη πυριτικής ομάδας (σιλανοποίηση). Κατά την αντίδραση αυτή ένα ενεργό πρωτόνιο αντικαθίσταται από μια αλκυλοσιλομάδα, συνήθως τριμεθυλοσιλομάδα. Τα σιλανοπαράγωγα δημιουργούνται από αντικατάσταση του ενεργού πρωτονίου ομάδων όπως  $\text{-OH}$ ,  $\text{-COOH}$ ,  $\text{=NH}$ ,  $\text{-NH}_2$ ,  $\text{-SH}$  από την ομάδα  $\text{-Si(CH}_3)_3$ .

Με τον τρόπο αυτό, μη πτητικές ενώσεις μπορούν να μετασηματιστούν σε περισσότερο πτητικά προϊόντα, καθώς με την προσθήκη μιας νέας ομάδας μετατρέπονται σε λιγότερο πολικές ενώσεις.

Η διαδικασία είχε ως εξής:

- Στο δείγμα μετά την ξήρανση προσθέτουμε 100μl MOX (methoxyamine hydrochloride in pyridine) συγκέντρωσης 20mg/ml και το επωάζουμε όλο το βράδυ σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση
- Στη συνέχεια, προσθέτουμε 200μl MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide) και το επωάζουμε στους 50°C για 30 λεπτά με συνεχή ανάδευση.

### 3.3. Ανάλυση των δειγμάτων με GC-MS

Η αεριοχρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με αέριο χρωματογράφο Agilent (Agilent Technologies, Wilmington, Delaware, USA) GC 6890N ο οποίος είναι εξοπλισμένος με φασματόμετρο μαζών ως ανιχνευτή (5973inert). Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με αυτόματο σύστημα splitless σε ποσότητα 1μl και σε θερμοκρασία 250 °C. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε He με ρυθμό ροής 0.9ml/min. Η θερμοκρασία του θαλάμου μεταβαλλόταν σύμφωνα με προκαθορισμένο πρόγραμμα: 80 °C για 2 λεπτά και αύξηση στους 380 °C με ρυθμό 10 °C/min όπου διατηρείται για 3 λεπτά. Ο συνολικός χρόνος διέλευσης ήταν 35 λεπτά. Η στήλη ήταν ZB-5HT Inferno (Zebron: 7HG-G015-02, Phenomenex, Macclesfield, UK.) 30m x 0.25mm x 0.25 μm.

Για την ανάλυση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System). Η ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε μέσω της ηλεκτρονικής MST (mass spectral tag) βιβλιοθήκης (NIST02, [http://chemdata.nist.gov/mass-spc/Srch\\_v1.7/intex.html](http://chemdata.nist.gov/mass-spc/Srch_v1.7/intex.html)). Κριτήρια για την ταυτοποίηση των MST ήταν ο χρόνος έκλουσης από τη χρωματογραφική κολώνα όπου επιτράπηκε μια απόκλιση της τάξης ±2.5 του RI (retention intex) και ομοιότητα στα φάσματα μαζών μεγαλύτερη του 700 σε κλίμακα από 0-1000.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις. Η επαναληψιμότητα των μεταβολιτών ελέγχθηκε για κάθε έναν μεταβολίτη χωριστά και κάποιος μεταβολίτης απορρίπτονταν στην περίπτωση που δεν επαναλαμβανόταν σε τρία τουλάχιστον από τα τέσσερα δείγματα. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές του εμβαδού της καμπύλης του κάθε μεταβολίτη (Xi). Η κανονικοποίηση έγινε ως προς την τιμή που πάρθηκε για το μεταβολίτη 361\_2380.4\_[921; Trehalose (8TMS)] που είχε προστεθεί σε όλα τα δείγματα (μεταβολίτης αναφοράς), καθώς επίσης και ως προς το ξηρό βάρος του κάθε δείγματος, σύμφωνα με τον τύπο:

$$Ni = Xi \times Xis^{-1} \times \xi\eta\rho \beta\acute{\alpha}\rho\omicron\varsigma^{-1}$$

όπου  $N_i$  η κανονικοποιημένη τιμή του κάθε μεταβολίτη και  $X_{is}$  το εμβαδό της καμπύλης του μεταβολίτη αναφοράς.

#### 4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη στατιστική μέθοδο ANOVA (Analysis of variance). Επειδή η μεταβλητή παράμετρος ήταν μία κάθε φορά επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος ONE WAY ANOVA. Η μέθοδος αυτή είναι μια παραμετρική μέθοδος και για να εφαρμοστεί απαιτείται ο προς ανάλυση πληθυσμός να είναι κανονικός με ίση παραλλακτικότητα. Στις περιπτώσεις που δεν ίσχυε η προϋπόθεση αυτή χρησιμοποιήθηκε εναλλακτικά η μέθοδος ANOVA ON RANKS, που είναι η ανάλογη μέθοδος της ONE WAY ANOVA όταν ο πληθυσμός δεν είναι κανονικός. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του προγράμματος SigmaStat 3.5 και τα διαγράμματα με το πρόγραμμα SigmaPlot 10.0.



# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---





## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας που ακολουθεί ήταν να εντοπιστούν γονίδια που μετέχουν σε βασικές μεταβολικές οδούς του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού και τα οποία εμφανίζουν ενισχυμένη έκφραση ή εκφράζονται ειδικά στα φυμάτια. Η συμπεριφορά της έκφρασης των γονιδίων αυτών μελετήθηκε επίσης σε συνθήκες έλλειψης φωτοσυνθετικού άνθρακα, υπό συνθήκες παρατεταμένου σκότους για να βρεθεί κάποιος πιθανός σύνδεσμος μεταξύ των γονιδίων αυτών, του γενικότερου μεταβολισμού του φυματίου και της αζωτοδέσμευσης. Παράλληλα με την έρευνα των γονιδίων που μετέχουν στο μεταβολισμό του φυματίου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του φυματίου και σε επίπεδο μεταβολιτών και μελετήθηκαν ιδιαίτερα οι αλλαγές στη συσσώρευση των μεταβολιτών που επιφέρει στο φυμάτιο η έλλειψη φωτοσυνθετικού άνθρακα. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας αυτής δόθηκε έμφαση σε τρία μέλη της οικογένειας των καρβονικών ανυδρασών, η έκφραση των οποίων επάγεται κατά τη διαδικασία σχηματισμού και τη λειτουργία των αζωτοδεσμευτικών φυματίων.

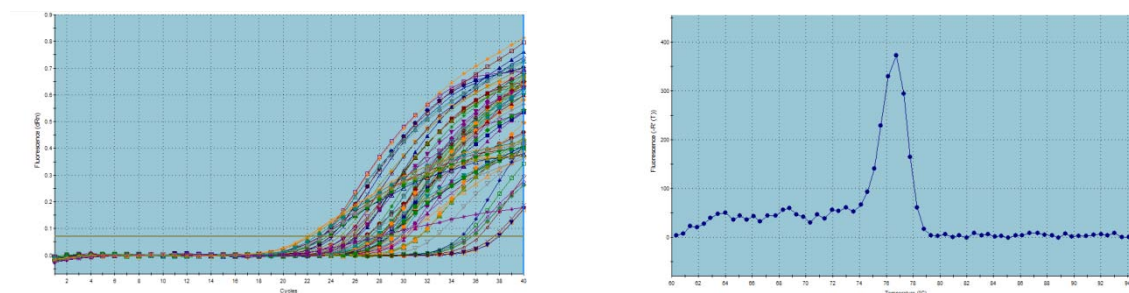
### 1. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΣΤΑ ΦΥΜΑΤΙΑ.

#### 1.1. Σχεδιασμός και εξειδίκευση qRT-PCR εκκινητών

Για 189 γονίδια που πιθανώς συμμετέχουν στο μεταβολισμό του άνθρακα, χρησιμοποιήθηκε μια πλατφόρμα ποσοτικού PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) με στόχο την ανίχνευση γονιδίων που παρουσιάζουν ενισχυμένη έκφραση στα φυμάτια και πιο συγκεκριμένα στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του φυματίου. Η πλατφόρμα περιελάμβανε 189 ζεύγη εκκινητών οι οποίοι ενισχύουν περιοχές, το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από 70 έως 150 ζεύγη βάσεων (Παράρτημα, Πίνακας 1).

Η εικόνα 4.A δείχνει τυπικές καμπύλες ενίσχυσης στις οποίες φαίνεται η αύξηση του φθορισμού της SYBR® Green με την αύξηση του αριθμού των κύκλων της PCR. Πέντε ζεύγη εκκινητών δεν παρήγαγαν προϊόν PCR, ενώ άλλα δύο ζεύγη εκκινητών παρήγαγαν περισσότερα από ένα προϊόντα PCR. Αυτά τα ζεύγη εκκινητών δεν συμπεριελήφθησαν στην μετέπειτα μελέτη. Η εξειδίκευση των εκκινητών ελέγχθηκε για κάθε ζεύγος χωριστά από τις καμπύλες αποδιάταξης (εικόνα 4.B). Τα επίπεδα έκφρασης ενός γονιδίου του *L. japonicus* που κωδικοποιεί για ουβικιτίνη χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικός μάρτυρας. Τα επίπεδα έκφρασης της ουβικιτίνης χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση στις μικρές διαφορές που παρουσιαζόταν στις ποσότητες του cDNA. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ουβικιτίνη επιλέχθηκε εξαιτίας του γεγονότος ότι η έκφρασή του θεωρείται σταθερή σε όλους

τους ιστούς. Τα επίπεδα έκφρασης όλων των γονιδίων μετρήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.



**Εικόνα 4:** Εξειδίκευση της qRT-PCR. Α) τυπικές καμπύλες ενίσχυσης της qRT-PCR, Β) καμπύλη αποδιάταξης ενός προϊόντος PCR

## 1.2. Επιλογή γονιδίων που επάγονται στα φυμάτια

Η έκφραση των 182 γονιδίων που πιθανά συμμετέχουν στο μεταβολισμό μελετήθηκε σε διαφορετικής ηλικίας φυμάτια του φυτού *L. japonicus*. Απομονώθηκε ολικό RNA από φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών καθώς επίσης και από ρίζες φυτών που δεν είχαν μολυνθεί με το *M. loti* και μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων με τη μέθοδο του ποσοτικού PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR). Τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων μετρήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης έγινε με τον τρόπο που έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.4 στα Υλικά και Μεθοδοί.

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων στα φυμάτια έγινε κατόπιν σύγκρισης των επιπέδων έκφρασης στα φυμάτια με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης που παρατηρήθηκαν στη ρίζα των μη μολυσμένων φυτών. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο ANOVA όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 4 στα Υλικά και Μεθοδοί. Από την ανάλυση αυτή βρέθηκε πως η έκφραση 102 γονιδίων στα φυμάτια παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά από τα βασικά επίπεδα έκφρασης που παρατηρήθηκαν στη μη-μολυσμένη ρίζα, σε ένα τουλάχιστον στάδιο ανάπτυξης του φυματίου ( $P < 0.05$ ).

Για την επιλογή των γονιδίων που επάγονται στα φυμάτια, χρησιμοποιήθηκε μια ελάχιστη αναλογία, 'έκφραση στα φυμάτια προς έκφραση στη μη-μολυσμένη ρίζα' μεγαλύτερη του 2 (φυμάτια/ρίζα  $> 2$ ) και τιμή  $P < 0.05$ . Θέτοντας ως βάση τα κριτήρια αυτά, βρέθηκε ότι υπάρχουν **82** γονίδια που η έκφρασή τους στα φυμάτια διαφέρει σημαντικά από τα βασικά επίπεδα έκφρασης στη ρίζα των μη-μολυσμένων φυτών (Πίνακας 2, Παράρτημα).

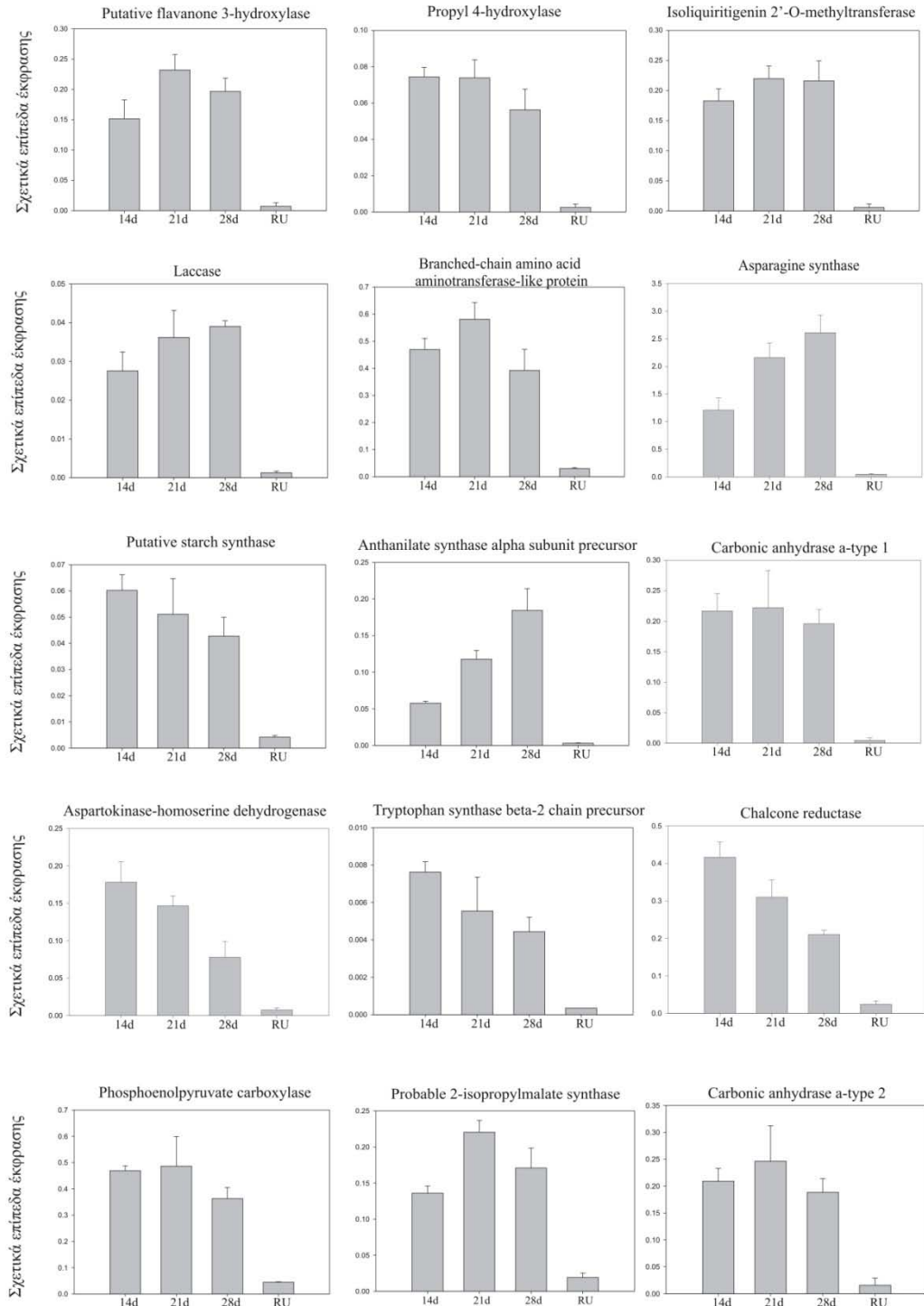
Στον Πίνακα 1 συνοψίζονται τα 44 γονίδια που παρουσίασαν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα φυμάτια. Πρόκειται για γονίδια που η έκφρασή τους ήταν περισσότερο από πενταπλάσια από τα βασικά επίπεδα έκφρασης της μη-μολυσμένης ρίζας σε ένα τουλάχιστον αναπτυξιακό στάδιο του φυματίου (λόγος φυμάτια/ρίζα  $> 5$ ).

ΓΟΝΙΔΙΟ		14d N/RU	21dN/RU	28d N/RU	P
<b>Μεταβολισμός αμύλου</b>					
soluble starch synthase SSIII, precursor - potato	TC16679	<b>5.01</b>	<b>3.93</b>	2.93	0.017
Putative starch synthase	TC11131	<b>14.33</b>	<b>10.09</b>	<b>4.06</b>	0.006
<b>Υπόλοιπος μεταβολισμός υδατανθράκων</b>					
Trehalase 1	TC18454	<b>5.63</b>	<b>5.77</b>	2.49	<0.001
Fructokinase	TC14218	3.75	<b>5.4</b>	2.25	0.033
Fructan 1-εxohydrolase	BP071102	<b>5.47</b>	<b>6.68</b>	<b>6.53</b>	0.016
Sucrose Synthase LjSUS3	TC7847	<b>7.82</b>	<b>10.24</b>	3.41	<0.001
<b>Γλυκόλυση</b>					
Pyruvate decarboxylase II	TC7922	<b>8.9</b>	<b>5.2</b>	<b>3.9</b>	<0.001
Alcohol dehydrogenase	Ljnest14brc	<b>8.18</b>	<b>4.16</b>	<b>4.09</b>	0.001
<b>Κύκλος των φωσφορικών πεντοζών</b>					
Transaldolase	TC11589	<b>10.72</b>	4.08	2.12	0.016
Ribulose bispophate carboxylase/oxygenase	TC14081	2.64	7.3	<b>13.08</b>	0.019
<b>Μεταβολισμός CO<sub>2</sub></b>					
Carbonic anhydrase LjCA1	TC14306	<b>13.09</b>	<b>6.58</b>	2.62	<0.001
Carbonic anhydrase a-type 1	Ljnest13e5	<b>45.79</b>	<b>46.95</b>	<b>41.39</b>	0.007
Carbonic anhydrase a-type 2	Ljnest20a7rc	<b>13.47</b>	<b>15.87</b>	<b>12.14</b>	0.011
Phosphoenolpyruvate carboxylase	TC7830	<b>10.51</b>	<b>10.9</b>	<b>8.13</b>	0.003
Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase	TC14602	<b>5.17</b>	<b>8.18</b>	<b>7.16</b>	0.005
<b>Αφομοίωση αζώτου</b>					
Glutamine synthetase chloroplastic precursor	TC14146	<b>6.66</b>	<b>7.39</b>	<b>6.68</b>	0.006
Glutamine synthetase, cytosolic isozyme	TC8035	<b>7</b>	<b>4.56</b>	<b>3</b>	<0.001
Asparagine synthase	TC8451	25.89	46.3	<b>55.95</b>	0.022
<b>Υπόλοιπος μεταβολισμός αμινοξέων</b>					
Serine acetyltransferase	TC17048	10.45	<b>42.06</b>	11.28	0.033
Cysteine synthase	TC8523	3.17	<b>21.85</b>	13.37	0.029
Cysteine synthase	TC14692	2.35	<b>8.16</b>	5.56	0.03
Cysteine synthase, chloroplast precursor	TC10541	4.67	<b>19.32</b>	9.88	0.018
tryptophan synthase beta-2 chain precursor	TC20070	<b>21.72</b>	15.79	12.63	0.042
Anthranilate synthase alpha subunit precursor	TC10990	18.79	38.31	<b>59.9</b>	0.015
Aspartokinase-homoserine dehydrogenase (HDH)	TC9572	<b>26.06</b>	21.46	11.4	0.022
pantoate--beta-alanine ligase	TC12836	<b>7.16</b>	<b>6.45</b>	<b>5.5</b>	0.005
Ornithine decarboxylase	CAC02644	<b>7.35</b>	6.67	3.47	0.025
Similarity to ornithine cyclodeaminase	TC11292	<b>8.95</b>	<b>10.9</b>	3.56	0.006
proline oxidase	TC7864	<b>13.61</b>	10.41	3.08	0.029
Proline dehydrogenase	TC7860	<b>7.08</b>	<b>6.35</b>	1.4	0.021
Prolyl 4-hydroxylase	TC15896	<b>28.88</b>	<b>28.7</b>	<b>21.86</b>	<0.001
Prolyl 4-hydroxylase, alpha subunit-like protein	TC11925	<b>12.1</b>	<b>11.59</b>	<b>7.11</b>	<0.001
Probable 2-isopropylmalate synthase	TC14289	<b>7.08</b>	<b>11.48</b>	<b>8.9</b>	<0.001
Branched-chain amino acid aminotransferase-like	TC16062	<b>15.56</b>	<b>19.26</b>	<b>13.01</b>	<0.001
<b>Υπόλοιπος μεταβολισμός</b>					
Chalcone reductase	TC8351	<b>17.19</b>	<b>12.79</b>	<b>8.68</b>	<0.001
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4HPPD)	TC8682	4.5	<b>12.55</b>	7.49	0.016
Putative flavanone 3-hydroxylase	TC7931	<b>21.26</b>	<b>32.53</b>	<b>27.59</b>	<0.001
thiazole biosynthetic enzyme precursor	TC14068	<b>7.18</b>	<b>8.33</b>	4.87	0.045
N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase-like	TC8570	<b>6.74</b>	<b>5.67</b>	<b>5.51</b>	0.002
Isoliquiritigenin 2'-O-methyltransferase	TC14525	<b>31.11</b>	<b>37.4</b>	<b>36.77</b>	<0.001
Laccase	TC17617	21.95	28.82	<b>31.07</b>	0.044
Adenosine 5' phosphosulfate reductase	TC14588	5.29	<b>5.39</b>	3.86	0.05
dihydrodipicolinate synthase	TC18091	<b>11.56</b>	7.52	5.46	0.038
1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	TC14222	<b>7.83</b>	<b>8.17</b>	<b>8.25</b>	0.012

**Πίνακας 1: Γονίδια που επάγονται ισχυρά στα φυμάτια.** Τα γονίδια που συνοψίζονται εδώ βρέθηκε να παρουσιάζουν σημαντικά υψηλή έκφραση σε ένα τουλάχιστον αναπτυξιακό στάδιο (14d, 21d, 28d) των φυματίων (N) σε σχέση με τα βασικά επίπεδα έκφρασης της μη-μολυσμένης ρίζας (RU). Με έντονη γραφή έχουν επισημανθεί τα επίπεδα έκφρασης στα οποία ισχύει ταυτόχρονα  $P < 0.05$  και λόγος φυμάτια/ρίζα  $> 5$ . Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τα επίπεδα έκφρασης του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικιτίνης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους τριών βιολογικών επαναλήψεων.

Στα διαγράμματα της Εικόνας 5 φαίνονται αναλυτικά τα επίπεδα έκφρασης στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του φυματίου και στη μη-μολυσμένη ρίζα των 15 πιο υψηλά εκφραζόμενων γονιδίων. Τα γονίδια αυτά παρουσίασαν υψηλή έκφραση σε όλα τα στάδια

ανάπτυξης του φυματίου. Ανάμεσά τους, βρίσκονται και δύο α-τύπου καρβονικές ανυδράσες (*Ljnest13e5* και *Ljnest20a7rc*), οι οποίες θα μελετηθούν αναλυτικά στο δεύτερο μέρος της διατριβής.



**Εικόνα 5:** Στα διαγράμματα παρουσιάζονται 15 γονίδια που παρουσίασαν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυματίου (14dρι, 21dρι, 28dρι) και η αντίστοιχη έκφραση που παρατηρήθηκε στη μη-μολυσμένη ρίζα (RU). Οι μπάρες αντιστοιχούν σε σχετικά επίπεδα έκφρασης κατόπιν κανονικοποίησης με το σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο της ουβικιτίνης, και αντιπροσωπεύουν μέσους όρους τριών βιολογικών επαναλήψεων.

### 1.3 Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων κατά την ανάπτυξη του φυματίου

Η έκφραση των γονιδίων στόχων μελετήθηκε σε φυμάτια ηλικίας 14, 21 και 28 ημερών. Αυτά τα χρονικά σημεία αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του φυματίου και αντιστοιχούν στη διαμόρφωση του οργάνου, τη διαφοροποίησή του, που συμπίπτει και με την έναρξη της αζωτοδέσμευσης, και την ωρίμανσή του. Η έκφραση των γονιδίων μελετήθηκε επίσης σε ρίζες φυτών που δεν είχαν μολυνθεί με το *M. loti* για λόγους σύγκρισης.

Αρχικά εξετάστηκε εάν η έκφραση του συνόλου των 182 γονιδίων στα διάφορα στάδια ανάπτυξης φυμάτια (14d, 21d, 28d) διαφέρει από την αντίστοιχη έκφραση που παρατηρήθηκε στη μη-μολυσμένη ρίζα (RU). Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο ANOVA ON RANKS και βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης του φυματίου και της μη-μολυσμένης ρίζας, με τιμή  $P < 0.001$ . Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων κατόπιν κανονικοποίησης με το γονίδιο αναφοράς.

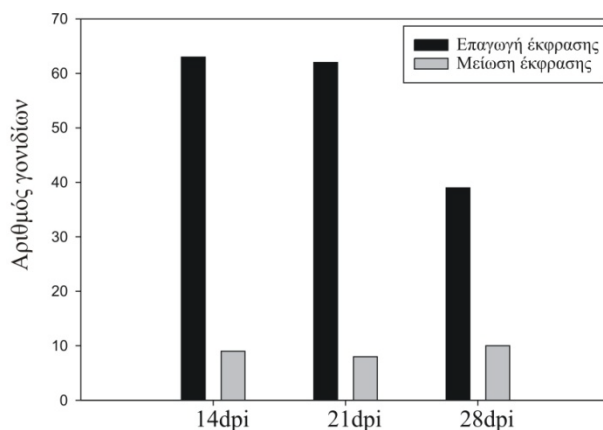
Σύγκριση	P<0.05
14d vs RU	NAI
21d vs RU	NAI
28d vs RU	NAI

Στη συνέχεια, για να βρεθεί αν η έκφραση γονιδίων διαφέρει μεταξύ των σταδίων ανάπτυξης του φυματίου, πραγματοποιήθηκε ξανά στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA ON RANKS. Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι λόγοι, 'έκφραση στα φυμάτια προς αντίστοιχη έκφραση στη μη μολυσμένη ρίζα' (λόγος φυμάτια/ρίζα), για το κάθε γονίδιο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, φαίνεται να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκφραση των γονιδίων με τιμή  $P=0.008$ . Κάνοντας πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ 14 και 28 ημερών φυμάτια και επίσης μεταξύ 21 και 28 ημερών φυμάτια. Ωστόσο, βρέθηκε να μην υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ 14 και 21 ημερών φυματίων.

Σύγκριση	P<0.05
14d vs 21d	OXI
14d vs 28d	NAI
21d vs 28d	NAI

Ο συνολικός αριθμός των γονιδίων που παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) στα 14, 21 και 28 ημερών φυμάτια μετά από σύγκριση με τη μη-μολυσμένη ρίζα ήταν αντίστοιχα **76**, **75** και **54**. Στα 14 ημερών φυμάτια ο αριθμός των

γονιδίων που παρουσίασαν έκφραση μεγαλύτερη από 2 φορές της βασικής έκφρασης της μη-μολυσμένης ρίζας (λόγος φυμάτια/ρίζα>2 και  $P<0.05$ ) ήταν **63**, ενώ ο αντίστοιχος αριθμός γονιδίων στα 21 και 28 ημερών φυμάτια ήταν **62** και **39**. Γενικώς, τα περισσότερα γονίδια παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στα φυμάτια σε σχέση με τη μη-μολυσμένη ρίζα, ενώ **12** μόνο γονίδια παρουσίασαν μείωση στα επίπεδα έκφρασης (λόγος φυμάτια/ρίζα<0.5 και  $P<0.05$ ) (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7:** Αριθμός γονιδίων που παρουσιάζουν διαφορετική ρύθμιση σε φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών (dpi) μετά από σύγκριση με τη ρίζα μη μολυσμένων φυτών. (Επαγωγή έκφρασης: λόγος φυμάτια/ρίζα>2, Μείωση έκφρασης: λόγος φυμάτια/ρίζα<0.5,  $P<0.05$ )

Μία αναλυτική λίστα της επαγωγής ή της καταστολής των γονιδίων στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του φυματίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 2 του Παραρτήματος. Στα 14 ημερών φυμάτια, 19 γονίδια παρουσίασαν πολύ υψηλή έκφραση (φυμάτια/ρίζα>10 και  $P<0,05$ ). Η πιο υψηλή έκφραση παρατηρήθηκε στην α-τύπου καρβονική ανυδράση 1 (*Ljnest13e5*), ενώ μεγάλη έκφραση παρατηρήθηκε επίσης στην προπυλ 4-υδροξυλάση (TC15896), στην ασπαρτοκινάση-αφυδρογονάση ομοσερίνης (TC9572) και στη συνθάση της ασπαραγίνης (TC8451). Στα 21 ημερών φυμάτια, ο αριθμός των γονιδίων που παρουσίασαν υψηλά επίπεδα έκφρασης ήταν 23. Ανάμεσά τους βρίσκονται η συνθάση της ασπαραγίνης (TC8451), η ακετυλ-μεταφοράση της σερίνης (TC17048), μια πιθανή υδροξυλάση-3 των φλαβονών (TC7931), μια Ο-μεθυλ-μεταφοράση της χαλκόνης (TC14525) και η α-τύπου καρβονική ανυδράση 1 (*Ljnest13e5*). Στα 28 ημερών φυμάτια, 14 γονίδια παρουσίασαν υψηλά επίπεδα έκφρασης. Η πιο υψηλή έκφραση παρατηρήθηκε στην α-υπομονάδα της συνθάσης του ανθραυλικού (TC10990). Υψηλά επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν επίσης στη συνθάση της ασπαραγίνης (TC8451), στην α-τύπου καρβονική ανυδράση 1 (*Ljnest13e5*) στην Ο-μεθυλ-μεταφοράση της χαλκόνης (TC14525) και στη Λακκάση (TC17617).

## 2. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΤΑ ΦΥΜΑΤΙΑ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΛΛΕΙΨΗΣ C

Η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης και η αφομοίωση του ανηγμένου N απαιτούν από το φυτό την παροχή μια πηγής C. Σε περίπτωση έλλειψης C, όπως συμβαίνει σε συνθήκες παρατεταμένου σκότους, η αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα μειώνεται (Pfeiffer *et al.*, 1983). Για να εντοπίσουμε γονίδια που η έκφρασή τους επηρεάζεται σημαντικά από την έλλειψη C, πραγματοποιήσαμε ανάλυση qRT-PCR σε φυμάτια φυτών που είχαν υποστεί συνθήκες παρατεταμένου σκότους.

Για το πείραμα αυτό, φυτά *L. japonicus* μολύνθηκαν με το *M. loti* και μεγάλωσαν σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι. 28 ημέρες μετά τη μόλυνση τα φυτά χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα φυτών διατηρήθηκε στις συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου, η δεύτερη ομάδα φυτών υποβλήθηκε σε συνθήκες σκότους για 24 ώρες, ενώ η τρίτη ομάδα για 72 ώρες. Τα φυμάτια συλλέχθηκαν μετά το πέρας της σκοτεινής περιόδου, χωρίς τα φυτά να εκτεθούν ξανά σε φως.

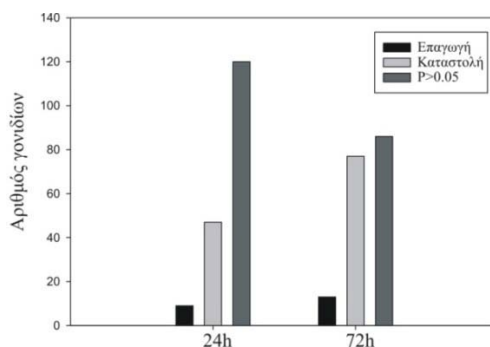
Τα μεταγραφικά επίπεδα 182 γονιδίων του μεταβολισμού, μετρήθηκαν σε φυμάτια φυτών που είχαν υποστεί συνθήκες παρατεταμένου σκότους και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα μεταγραφικά επίπεδα που παρατηρήθηκαν στα φυτά τα οποία διατηρήθηκαν σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου. Τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων μετρήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις και η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης έγινε με βάση τα επίπεδα έκφρασης του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικιτίνης. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο ANOVA ON RANKS. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το συνολικό πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου διαφέρει σημαντικά από την αντίστοιχη έκφραση που παρατηρείται τόσο μετά από 24 όσο και μετά από 72 ώρες σκοτάδι, με τιμή  $P < 0.001$ .

Για να βρεθεί αν η έκφραση των γονιδίων διαφέρει μεταξύ των δύο χειρισμών, 24 και 72 ώρες σκοτάδι, πραγματοποιήθηκε ξανά στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA ON RANKS. Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι λόγοι, 'έκφραση σε συνθήκες σκότους προς αντίστοιχη έκφραση σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου' (λόγος σκότος/κ.φ), για το κάθε γονίδιο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, φαίνεται να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στο πρότυπο έκφρασης μεταξύ των χειρισμών 24 και 72 ώρες σκοτάδι με τιμή  $P = 0.004$ .

Σύγκριση	P<0.05
Κανονική φωτοπερίοδος vs 24 ώρες σκοτάδι	NAI
Κανονική φωτοπερίοδος vs 72 ώρες σκοτάδι	NAI
24 ώρες σκοτάδι vs 72 ώρες σκοτάδι	NAI

Ο συνολικός αριθμός των γονιδίων που παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) σε συνθήκες 24 και 72 ώρες σκότους μετά από σύγκριση με τις συνθήκες

κανονικής φωτοπεριόδου ήταν αντίστοιχα **56** και **90**. Μετά από 24 ώρες σκοτάδι, ο αριθμός των γονιδίων που παρουσίασαν έκφραση μικρότερη από 2 φορές της βασικής έκφρασης που παρατηρείται σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου (κ.φ.) (λόγος σκότος/κ.φ.<0.5 και  $P<0.05$ ) ήταν **47**, ενώ ο αντίστοιχος αριθμός γονιδίων μετά από 72 ώρες σκοτάδι ήταν **77**. Γενικώς, τα περισσότερα γονίδια παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης στις συνθήκες παρατεταμένου σκότους (συνολικά 78 γονίδια), ενώ **16** μόνο γονίδια παρουσίασαν αύξηση στα επίπεδα έκφρασης (λόγος σκότος/κ.φ.>2 και  $P<0.05$ ) (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8:** Αριθμός γονιδίων που παρουσιάζουν επαγωγή της έκφρασης (λόγος σκότος/κ.φ.>2 και  $P<0.05$ ), καταστολή της έκφρασης (λόγος σκότος/κ.φ.<0.5 και  $P<0.05$ ) και μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές ( $P>0.05$ ) μετά από συνθήκες 24(24h) και 72(72h) ωρών σκότους κατόπιν σύγκρισης με τα επίπεδα έκφρασης που παρατηρούνται σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου.

Μία αναλυτική λίστα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που μετρήθηκαν μετά από συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού κατόπιν σύγκρισης με τα επίπεδα έκφρασης σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου βρίσκεται στον Πίνακα 3 του Παραρτήματος. Στον πίνακα 2 συνοψίζονται τα **48** γονίδια που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη καταστολή έκφρασης μετά από εφαρμογή παρατεταμένου σκότους. Πρόκειται για γονίδια που η έκφρασή τους ήταν περισσότερο από 5 φορές μειωμένη από τα βασικά επίπεδα έκφρασης που παρατηρούνται σε φυτά που μεγαλώνουν σε κανονική φωτοπερίοδο (λόγος σκότος/κ.φ. <0.2 και  $P<0.05$ ).

Η μεγαλύτερη μείωση στην έκφραση των γονιδίων παρατηρήθηκε σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για ισότυπο της καρβονικής ανυδράσης (TC14306) και σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για πιθανή αναγωγή της χαλκόνης (TC8351). Πολύ μειωμένη έκφραση παρατηρήθηκε επίσης σε γονίδια που πιθανώς κωδικοποιούν για κυτόχρωμα P450 (TC8343), ασπάρτοκινάση-αφυδρογονάση ομοσερίνης (HDH) (TC9572), τρανσαλδολάση (TC11589) και πρωτεΐνη που παρουσιάζει ομολογία με αμινοτρανσφεράση διακλαδιζόμενων αμινοξέων (TC16062). Γενικώς τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης παρατηρήθηκαν μετά από 72 ώρες συνεχούς σκότους. Κάποια από τα γονίδια που παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση στις συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού, είχε βρεθεί να επάγονται ισχυρά στα φυμάτια (φυμάτια/ρίζα>2 και  $P<0.05$ ), σύμφωνα με τα αποτελέσματα της προηγούμενης παραγράφου. Τα γονίδια αυτά έχουν σημειωθεί στον πίνακα 2 με αστερίσκο.



ΓΟΝΙΔΙΟ		24 ώρες	72 ώρες	P
<b>Μεταβολισμός αμύλου</b>				
*soluble starch synthase {Arabidopsis thaliana;}	TC15963	<b>0.3425</b>	<b>0.1707</b>	0.024
*ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit PvAGPS1	TC8396 5-end	0.0752	<b>0.0232</b>	0.004
*ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit CagpS1	TC8756 3-end	0.0559	<b>0.0286</b>	0.011
<b>Υπόλοιπος μεταβολισμός υδατανθράκων</b>				
Trehalose-6-phosphate synthase homolog	TC14996	0.1175	<b>0.0280</b>	0.004
Phosphoglucosyltransferase, cytoplasmic	TC14676	0.1382	<b>0.0920</b>	0.025
Phosphoglucosyltransferase, cytoplasmic	TC14675	0.3960	<b>0.0700</b>	0.036
Glucose-6-phosphate isomerase	TC17137	<b>0.2819</b>	<b>0.1993</b>	0.033
*Sucrose Synthase LjSUS3	TC7847	0.1645	<b>0.0800</b>	0.004
<b>Γλυκόλυση</b>				
Enolase	TC14118	<b>0.3557</b>	<b>0.1277</b>	0.004
Enolase	TC16760	0.7294	<b>0.1700</b>	0.004
*Pyruvate decarboxylase II	TC7922	<b>0.2730</b>	<b>0.1651</b>	< 0.001
<b>Πεντοσική οξείωση</b>				
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	TC8851	0.2932	<b>0.0568</b>	0.004
*Transaldolase	TC11589	0.0179	<b>0.0107</b>	0.011
Transaldolase ToTAL2	TC10369	0.1771	<b>0.0811</b>	0.011
<b>Κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων</b>				
Cytosolic malate dehydrogenase (1.1.1.37)	TC7834	0.2809	<b>0.1485</b>	0.011
Aconitate hydratase, cytoplasmic	TC14371	0.3710	<b>0.1577</b>	0.004
<b>Μεταβολισμός CO<sub>2</sub></b>				
*Carbonic anhydrase LjCA1	TC14306	0.0133	<b>0.0005</b>	0.004
*Carbonic anhydrase α-type 1	Ljncst13e5	<b>0.3269</b>	<b>0.1253</b>	< 0.001
*Carbonic anhydrase α-type 2	Ljncst20a7rc	0.2006	<b>0.0784</b>	0.004
*Phosphoenolpyruvate carboxylase	TC7830	0.5990	<b>0.1127</b>	0.009
*Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase	TC14602	0.1943	<b>0.0718</b>	0.004
*Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	TC14081	<b>0.1659</b>	<b>0.0255</b>	0.012
<b>Αφομοίωση αζώτου</b>				
*Glutamine synthetase, cytosolic isozyme	TC8035	<b>0.3902</b>	<b>0.1276</b>	0.007
*Glutamate dehydrogenase	TC10844	<b>0.2012</b>	<b>0.1556</b>	0.008
<b>Υπόλοιπος μεταβολισμός αμινοξέων</b>				
*Alanine:glyoxylate aminotransferase 2 homolog	TC9107	0.4828	<b>0.1040</b>	0.016
*Histidinol dehydrogenase	TC10151	<b>0.1691</b>	<b>0.0586</b>	0.004
*Serine acetyltransferase	TC17048	0.1889	<b>0.0506</b>	0.004
*Cysteine synthase	TC14692	0.1513	<b>0.0817</b>	0.011
Plastidic cysteine synthase 1	TC17110	<b>0.0317</b>	<b>0.0749</b>	< 0.001
threonine dehydratase/deaminase	TC18952	<b>0.1982</b>	<b>0.1703</b>	< 0.001
*Aspartokinase-homoserine dehydrogenase (HDH)	TC9572	0.0651	<b>0.0083</b>	0.004
threonine synthase	TC9527	0.1998	<b>0.0687</b>	0.004
*pantoate--beta-alanine ligase	TC12836	<b>0.1855</b>	<b>0.1429</b>	< 0.001
*Similarity to ornithine cyclodeaminase	TC11292	<b>0.2302</b>	<b>0.0774</b>	0.001
*Prolyl 4-hydroxylase	TC15896	<b>0.2898</b>	<b>0.1088</b>	< 0.001
*Prolyl 4-hydroxylase, alpha subunit-like protein	TC11925	<b>0.3224</b>	<b>0.1978</b>	0.005
*Branched-chain amino acid aminotransferase-like protein	TC16062	0.1290	<b>0.0137</b>	0.004
<b>Υπόλοιπος μεταβολισμός</b>				
*Chalcone reductase	TC8351	0.0127	<b>0.0046</b>	0.011
*Putative flavanone 3-hydroxylase	TC7931	0.4029	<b>0.1391</b>	0.004
acidic endochitinase	TC14167	<b>0.1551</b>	<b>0.0442</b>	< 0.001
*thiazole biosynthetic enzyme precursor	TC14068	0.0592	<b>0.0163</b>	0.004
Cytochrome P450	TC15466	<b>0.3266</b>	<b>0.0435</b>	0.004
cytochrome P450	TC8343	<b>0.0455</b>	<b>0.0062</b>	< 0.001
*N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase-like protein	TC8570	0.2330	<b>0.0778</b>	0.004
*Isoliquiritigenin 2'-O-methyltransferase (Chalcone O-	TC14525	<b>0.3547</b>	<b>0.1710</b>	< 0.001
*4-coumarate:CoA ligase 2	TC7977	<b>0.4682</b>	<b>0.1583</b>	0.003
*Laccase	TC17617	0.0358	<b>0.0202</b>	0.025
Proline-5-carboxylate reductase	TC15604	<b>0.2539</b>	<b>0.1661</b>	< 0.001

**Πίνακας 2: Γονίδια που καταστέλλονται ισχυρά μετά από εφαρμογή παρατεταμένου σκοταδιού.** Οι τιμές προέκυψαν ως λόγος της έκφρασης που παρατηρήθηκε μετά από συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού προς την έκφραση που μετρήθηκε σε φυτά που μεγάλωναν σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου. Με έντονη γραφή έχουν σημειωθεί οι τιμές που είναι μικρότερες του 0.2, δηλαδή εκεί όπου παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης περισσότερο από 5 φορές (λόγος σκότος/κ.φ. <0.2 και P<0.05). Με αστερίσκο έχουν επισημανθεί τα γονίδια που παρουσίασαν επαγωγή της έκφρασης στα φυτά. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τα επίπεδα έκφρασης του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικιτίνης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους τριών βιολογικών επαναλήψεων.

Στον πίνακα 3 συνοψίζονται τα **16** γονίδια που παρουσίασαν επαγωγή της έκφρασης μετά από εφαρμογή παρατεταμένου σκότους. Πρόκειται για γονίδια που η έκφρασή τους ήταν περισσότερο από 2 φορές αυξημένη από τα βασικά επίπεδα έκφρασης που παρατηρούνται σε φυτά που μεγαλώνουν σε κανονική φωτοπερίοδο (λόγος σκότος/κ.φ. >2 και P<0.05).

Η μεγαλύτερη επαγωγή έκφρασης μετά από παρατεταμένο σκοτάδι παρατηρήθηκε σε γονίδια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του N, και συγκεκριμένα στα γονίδια NADH αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέως (TC10856) και συνθάση ασπαραγίνης (TC14104). Σημαντική επαγωγή της έκφρασης μετά από συνθήκες σκότους παρατηρήθηκε, επίσης, για έναν ισότυπο της αφυδρογονάσης της προλίνης (TC7863).

ΓΟΝΙΔΙΟ		24 ώρες	72 ώρες	P
<b>Μεταβολισμός υδατανθράκων</b>				
*Trehalase I	TC18454	1.880	<b>2.968</b>	0.007
Beta-fructofuranosidase	TC16805	1.761	<b>3.564</b>	0.039
<b>Κύκλος των φωσφορικών πεντοζών</b>				
*Ribulose-phosphate 3-epimerase, chloroplast precursor	TC7925	<b>3.265</b>	<b>2.087</b>	0.004
<b>Κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων</b>				
Aconitase (Aconitate hydratase) (Citrate hydro-lyase)	TC14176	<b>8.798</b>	3.800	0.002
Cytosolic aconitase	TC15109	<b>3.086</b>	2.063	0.011
<b>Αφομοίωση αζώτου</b>				
NADH glutamate dehydrogenase	TC10856	6.967	<b>40.988</b>	0.004
Asparagine synthase	TC14104	12.163	<b>19.192</b>	0.031
<b>Υπόλοιπος μεταβολισμός αμινοξέων</b>				
Ornithine aminotransferase	TC8388	<b>6.314</b>	<b>7.779</b>	0.007
*Proline dehydrogenase	TC7863	<b>4.512</b>	<b>10.837</b>	< 0.001
<b>Υπόλοιπος μεταβολισμός</b>				
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4HPPD)	TC8682	3.509	<b>4.928</b>	0.037
Cytochrome P450, Isoflavone synthase	TC14262	1.763	<b>3.155</b>	0.013
chalcone isomerase	NP591666	<b>4.051</b>	<b>4.465</b>	< 0.001
Isoflavone reductase	TC7899	1.888	<b>5.522</b>	< 0.001
Trans-cinnamate 4-monooxygenase	TC14933	1.572	<b>2.834</b>	0.046
Putative oxidoreductase	TC14685	0.810	<b>4.103</b>	0.026
*NAD-dependent sorbitol dehydrogenase	TC17752	<b>8.456</b>	3.327	0.004

**Πίνακας 3: Γονίδια που επάγονται μετά από εφαρμογή παρατεταμένου σκοταδιού.** Οι τιμές προέκυψαν ως λόγος της έκφρασης που παρατηρήθηκε μετά από συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού προς την έκφραση που μετρήθηκε σε φυτά που μεγάλωναν σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου. Με έντονη γραφή έχουν σημειωθεί οι τιμές όπου παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης περισσότερο από 2 φορές (λόγος σκότος/κ.φ. >2 και P<0.05). Με αστερίσκο έχουν επισημανθεί τα γονίδια που παρουσίασαν επαγωγή της έκφρασης στα φυμάτια. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τα επίπεδα έκφρασης του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικιτίνης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους τριών βιολογικών επαναλήψεων.

### 3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΤΑ ΦΥΜΑΤΙΑ ΤΟΥ *Lotus japonicus* ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΛΛΕΙΨΗΣ C

Η ανάλυση των μεταγραφημάτων στα φυμάτια έδειξε ότι συμβαίνουν αλλαγές στη ρύθμιση των γονιδίων όταν τα φυτά βρεθούν σε συνθήκες έλλειψης C. Για να μελετήσουμε σε ποίο βαθμό οι αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων επηρεάζουν το γενικότερο μεταβολισμό, πραγματοποιήθηκε μεταβολομική ανάλυση με τη χρήση αερίου χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (GC-MS).

#### 3.1. Αέριος χρωματογραφία-Φασματομετρία μαζών (GC-MS)

Η αέριος χρωματογραφία διαχωρίζει σύνθετα μείγματα μεταβολιτών τα οποία στη συνέχεια εισέρχονται στο φασματογράφο μάζας όπου ιονίζονται, διασπώνται και ανιχνεύονται. Το σύνολο των διασπώμενων τμημάτων είναι χαρακτηριστικό για κάθε μεταβολίτη και έχει ονομαστεί MST (mass spectral tag). Τα βασικά χαρακτηριστικά ενός MST είναι ο χρόνος έκλουσης από τη χρωματογραφική κολώνα (RT, retention time) που περιγράφεται καλύτερα από την παράμετρο RI (retention index) και η σύνθεση των φασματομετρικών μαζών που χαρακτηρίζονται από το λόγο m/z (μάζα προς φορτίο).

Στην παρούσα εργασία, για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών λάβαμε υπόψη το λόγο m/z των ιόντων που παρήχθησαν και το συντελεστή RI. Το κάθε δείγμα αναλύθηκε σε τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις και κάποιος μεταβολίτης δεν λαμβανόταν υπόψη εάν δεν επαναλαμβανόταν σε τουλάχιστον τρεις από τις τέσσερις επαναλήψεις. Η ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε κατόπιν σύγκρισης με τα δεδομένα της ηλεκτρονικής MST βιβλιοθήκης και κάποιο αποτέλεσμα γινόταν δεκτό μόνο αν υπήρχε ομοιότητα στα φάσματα μαζών μεγαλύτερη του 700 σε κλίμακα από 0-1000.

Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων έγινε με βάση την τιμή του εμβαδού της καμπύλης του κάθε μεταβολίτη στο χρωματογράφημα. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε ως προς το ξηρό βάρος του κάθε δείγματος και ως προς το μεταβολίτη αναφοράς, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι.

#### 3.2. Ανάλυση μεταβολιτών στα φυμάτια του *Lotus japonicus*

Μεταβολίτες εκχυλίστηκαν από φυμάτια φυτών *L. japonicus* 28 ημέρες μετά από τη μόλυνση των φυτών με ριζόβια *M. loti*. Η εκχύλιση των μεταβολιτών έγινε με 70% Αιθανόλη και ακολούθησε παραγωγοποίηση. Τα δείγματα αναλύθηκαν με GC-MS όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις.

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	Model	RT	RI	Ni
<b>Αμινοξέα</b>				
L-Αλανίνη	116 m/z	4.587	1098.3	0.655
L-Βαλίνη	144 m/z	6.152	1237.9	0.245
L-Λευκίνη	158 m/z	6.939	1308.0	0.250
L-Θρεονίνη	117 m/z	7.218	1333.0	0.537
L-Προλίνη	142 m/z	7.227	1333.8	0.957
L-Ισολευκίνη	158 m/z	7.233	1334.2	0.225
Γλυκίνη	174 m/z	7.381	1347.5	1.490
L-Σερίνη	204 m/z	8.187	1419.3	0.565
L-Θρεονίνη	218 m/z	8.545	1451.2	0.481
β-Αλανίνη	174 m/z	8.962	1488.4	0.486
L-Ομοσερίνη	218 m/z	9.319	1520.3	0.068
Πυρογλουταμικό οξύ	156 m/z	10.101	1589.9	5.653
L-Ασπαρτικό οξύ	232 m/z	10.192	1598.0	0.886
L-Γλουταμικό οξύ	246 m/z	11.337	1700.1	17.002
4-Αμινοβουτυρικό οξύ	174 m/z	10.226	1601.0	10.611
L-Ασπαραγίνη	116 m/z	11.940	1755.2	109.552
L-Λυσίνη	174 m/z	14.510	2008.8	0.509
<b>Οργανικά οξέα</b>				
Νικοτινικό οξύ	180 m/z	7.087	1321.3	0.075
Ηλεκτρικό οξύ	147 m/z	7.454	1354.0	3.235
Γλυκερικό οξύ	189 m/z	7.799	1384.7	0.870
Φουμαρικό οξύ	245 m/z	7.897	1393.4	1.303
Τρανς-Θρεονικό οξύ-1,4-λακτόνη	147 m/z	8.276	1427.2	2.896
Κιτραμλικό οξύ	247 m/z	9.599	1545.2	23.390
Μηλικό οξύ	147 m/z	9.827	1565.5	28.899
Θρεονικό οξύ	147 m/z	10.799	1652.1	29.282
4-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ	267 m/z	11.293	1696.2	0.277
Κιτρικό οξύ	273 m/z	13.587	1914.3	8.997
Εξαδεκανοϊκό οξύ	117 m/z	15.516	2118.3	7.322
<b>Αζωτούχες ενώσεις</b>				
Ουρία	189 m/z	6.439	1262.7	0.288
Πουτρεσκίνη	174 m/z	12.575	1815.2	0.217
Αδενίνη	264 m/z	13.849	1941.0	0.144
Σπερμιδίνη	144 m/z	17.534	2350.2	0.148
Ουριδίνη	217 m/z	19.082	2541.7	0.649
Ινωση	217 m/z	20.114	2671.8	0.292
Αδενοσίνη	230 m/z	20.556	2727.6	4.302
<b>Σάκχαρα</b>				
Σακχαρόζη	361 m/z	20.879	2768.2	104.375
Γαλακτόζη	319 m/z	14.491	2006.7	6.523
Μαλτόζη	361 m/z	21.619	2861.6	1.374
Τζεντιοβιόζη	204 m/z	21.840	2889.4	0.660
Μαλτόζη	361 m/z	22.234	2938.9	0.346
Ραφινόζη	361 m/z	25.840	3393.1	1.149
<b>Πολυόλες</b>				
Γλυκερόλη	205 m/z	7.039	1317.1	1.635
D-Πινιτόλη	260 m/z	13.810	1936.7	139.137
Μαννιτόλη	319 m/z	14.758	2041.1	0.769
4-Ο-μεθυλ-μύο-Ινοσιτόλη	217 m/z	14.996	2061.6	101.395
Ονονιτόλη	217 m/z	15.397	2105.4	0.672
Μύο-Ινοσιτόλη	217 m/z	16.257	2198.9	24.844
<b>Φυτικές στερόλες</b>				
Καμπεστερόλη	129 m/z	24.499	3224.2	1.271
β-σιτοστερόλη	129 m/z	25.028	3290.9	8.790
<b>Φωσφορικές ενώσεις</b>				
Φωσφορικό οξύ	299 m/z	6.991	1312.7	31.550
3-φωσφορο-L-Γλυκερόλη	299 m/z	13.018	1858.4	2.292
<b>Αρωματικές ενώσεις</b>				
Βενζοϊκό οξύ	179 m/z	6.461	1265.5	0.212
3-υδρόξυ-πιριδίνη	152 m/z	4.974	1132.9	0.089

**Πίνακας 4: Μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε 28 ημερών φυμάτια του *L. japonicus*.** Στον πίνακα παρατίθενται ο λόγος m/z του διασπόμενου τμήματος που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση, ο χρόνος έκλουσης από την χρωματογραφική κολώνα RT, η παράμετρος RI (retention index) και οι κανονικοποιημένες τιμές Ni που προέκυψαν μετά την κανονικοποίηση των τιμών που πήραμε από το εμβαδό της κάθε καμπύλης του χρωματογραφήματος.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων με το λογισμικό πρόγραμμα AMDIS ανίχνευσε περίπου 120-150 μεταβολίτες σε κάθε βιολογική επανάληψη, έχοντας ως βάση τα δεδομένα της ηλεκτρονικής MST βιβλιοθήκης. Όλοι οι μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν δεν παρουσίαζαν επαναληψιμότητα στα τέσσερα δείγματα οπότε πραγματοποιήθηκε ένας επιπλέον έλεγχος για κάθε μεταβολίτη χωριστά. Ο επιπλέον έλεγχος έγινε με βάση τα κριτήρια λόγος m/z (μάζα/φορτίο) και παράμετρος RI (retention index). Ο έλεγχος αυτός κατέληξε στην ανίχνευση 78 μεταβολιτών που μπορούμε να ξέρουμε με βεβαιότητα ότι συσσωρεύονται στα φυμάτια του *L. japonicus*.

Από τους 78 μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν, 53 έχουν ταυτοποιηθεί ενώ οι υπόλοιποι 25 δεν είναι ταυτοποιημένοι και γράφονται μέσα σε αγκύλη. Οι μη-ταυτοποιημένοι μεταβολίτες παρατίθενται στον Πίνακα 4 του Παραρτήματος. Στον Πίνακα 4 παρατίθενται όλοι οι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν και σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται πολλά αμινοξέα, οργανικά οξέα, σάκχαρα και πολυόλες. Το βενζοϊκό οξύ που ανιχνεύτηκε είναι μια συνηθισμένη εργαστηριακή μόλυνση.

### 3.3. Αλλαγές στη συσσώρευση των μεταβολιτών στα φυμάτια σε συνθήκες έλλειψης C

Για το πείραμα αυτό, φυτά *L. japonicus* μολύνθηκαν με το *M. loti* και μεγάλωσαν σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι. 28 ημέρες μετά τη μόλυνση τα φυτά χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα φυτών διατηρήθηκε στις συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου, η δεύτερη ομάδα φυτών υποβλήθηκε σε συνθήκες συνεχούς σκότους για 24 ώρες, ενώ η τρίτη ομάδα για 72 ώρες. Τα φυμάτια συλλέχθηκαν μετά το πέρας της σκοτεινής περιόδου, χωρίς τα φυτά να εκτεθούν ξανά σε φως.

Η ανάλυση των μεταβολιτών έγινε ξανά με τον τρόπο που έχει περιγραφεί στις προηγούμενες παραγράφους. Όλοι οι μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν κανονικοποιήθηκαν ως προς το μεταβολίτη αναφοράς και ως προς το ξηρό βάρος του κάθε δείγματος. Για να βρεθούν μεταβολές στη συσσώρευση των μεταβολιτών μετά από συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού, οι κανονικοποιημένες τιμές Ni που πάρθηκαν στις συνθήκες σκότους συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές Ni που παρατηρήθηκαν σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου. Η στατιστική ανάλυση στο σύνολο των μεταβολιτών έγινε με τη μέθοδο ANOVA ON RANKS και σύμφωνα με τα αποτελέσματα φαίνεται να μην υπάρχουν μεγάλες διαφορές στη συσσώρευση των μεταβολιτών σε συνθήκες σκότους μετά από σύγκριση με τη συσσώρευση των μεταβολιτών σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου ( $P=0.637$ ). Για να βρεθεί αν υπάρχουν διαφορές στη συσσώρευση των μεταβολιτών μεταξύ 24 και 72 ωρών παρατεταμένου σκοταδιού, πραγματοποιήθηκε ξανά στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA ON RANKS στο σύνολο των μεταβολιτών και βρέθηκε να υπάρχουν στατιστικώς

σημαντικές διαφορές με τιμή P=0.016. Σε αυτή την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι λόγοι, 'τιμή Ni σε συνθήκες σκότους προς τιμή Ni σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου'.

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	Model	RT	RI	24h/N.Ph	72h/N.Ph	P
<b>Αμινοξέα</b>						
L-Αλανίνη	116 m/z	4.587	1098.3	0.68	1.47	0.018
L-Βαλίνη	144 m/z	6.152	1237.9	3.06	<b>16.40</b>	<0.001
L-Λευκίνη	158 m/z	6.939	1308	1.58		<0.001
L-Θρεονίνη	117 m/z	7.218	1333	0.90	1.85	0.044
L-Ισολευκίνη	158 m/z	7.233	1334.2	3.07	<b>15.80</b>	0.002
Γλυκίνη	174 m/z	7.381	1347.5	1.25	1.51	0.536
L-Σερίνη	204 m/z	8.187	1419.3	0.77	<b>4.72</b>	0.003
L-Θρεονίνη	218 m/z	8.545	1451.2	0.91	<b>3.15</b>	0.011
β-Αλανίνη	174 m/z	8.962	1488.4	2.38	<b>5.61</b>	0.003
Πυρογλουταμικό οξύ	156 m/z	10.101	1589.9	<b>0.34</b>	0.66	<0.001
L-Ασπαρτικό οξύ	232 m/z	10.192	1598	0.52	<b>11.99</b>	0.004
4-Αμινοβουτυρικό οξύ	174 m/z	10.226	1601	1.47		0.276
L-Γλουταμικό οξύ	246 m/z	11.337	1700.1	0.62	1.33	0.030
L-Ασπαραγίνη	116 m/z	11.940	1755.2	0.65	1.34	0.055
L-Λυσίνη	174 m/z	14.510	2008.8	1.76	<b>7.85</b>	0.001
<b>Οργανικά οξέα</b>						
Νικοτινικό οξύ	180 m/z	7.087	1321.3	1.32	1.15	0.702
Ηλεκτρικό οξύ	147 m/z	7.454	1354	1.36	0.46	0.036
Γλυκερικό οξύ	189 m/z	7.799	1384.7	1.21	1.93	0.168
Φουμαρικό οξύ	245 m/z	7.897	1393.4	1.04	<b>0.40</b>	0.002
Τρανς-Θρεονικό οξύ-1,4-λακτόνης	147 m/z	8.276	1427.2	0.76	0.89	0.418
Μηλικό οξύ	147 m/z	9.827	1565.5	1.03	<b>0.32</b>	<0.001
Θρεονικό οξύ	147 m/z	10.799	1652.1	0.87	1.23	0.063
4-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ	267 m/z	11.293	1696.2	0.80	1.37	0.494
Κιτρικό οξύ	273 m/z	13.587	1914.3	0.60	0.92	0.197
Εξαδεκανοϊκό οξύ	117 m/z	15.516	2118.3	1.26	1.19	0.309
<b>Αζωτούχες ενώσεις</b>						
Πουτρεσκίνη	174 m/z	12.575	1815.2	<b>0.27</b>	0.78	0.006
Αδενίνη	264 m/z	13.849	1941	1.07	1.13	0.867
Ινοσίνη	217 m/z	20.114	2671.8	1.17		0.520
Αδενοσίνη	230 m/z	20.556	2727.6	<b>0.48</b>	<b>0.39</b>	0.002
<b>Σάκχαρα</b>						
Σακχαρόζη	361 m/z	20.879	2768.2	<b>0.20</b>	<b>0.07</b>	0.005
Γαλακτόζη	319 m/z	14.491	2006.7	0.90	0.45	0.239
Τζεντιοβιόζη	204 m/z	21.840	2889.4	0.77	0.93	0.342
Μαλτόζη	361 m/z	22.234	2938.9	0.76	1.33	0.101
Ραφινόζη	361 m/z	25.840	3393.1	0.69	<b>0.40</b>	0.008
<b>Πολυόλες</b>						
Γλυκερόλη	205 m/z	7.039	1317.1	1.10		0.532
D-Πινιτόλη	260 m/z	13.810	1936.7	0.98	0.92	0.825
Μανιτόλη	319 m/z	14.758	2041.1	0.00	0.49	0.219
Μυο-Ινοσιτόλη	217 m/z	16.257	2198.9	0.63	<b>0.12</b>	<0.001
<b>Φυτικές στερόλες</b>						
Καμπεστερόλη	129 m/z	24.499	3224.2	0.99	0.97	0.994
β-Σιτοστερόλη	129 m/z	25.028	3290.9	1.03	1.15	0.694
<b>Φωσφορικές ενώσεις</b>						
Φωσφορικό οξύ	299 m/z	6.991	1312.7	1.17	<b>2.39</b>	0.003
3-φωφο L-Γλυκερόλη	299 m/z	13.018	1858.4	0.78	1.01	0.159
<b>Αρωματικές ενώσεις</b>						
Βενζοϊκό οξύ	179 m/z	6.461	1265.5	0.89	0.55	0.019
3-υδρόξυ-πιριδίνη	152 m/z	4.974	1132.9	0.88	1.14	0.654

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Αλλαγές στη συσσώρευση των ταυτοποιημένων μεταβολιτών μετά από συνθήκες παρατεταμένου σκότους.** Στον πίνακα παρατίθενται ο λόγος m/z του διασπόμενου τμήματος που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση, ο χρόνος έκλουσης από την χρωματογραφική κολώνα RT, η παράμετρος RI (retention intex) και οι λόγοι από τις κανονικοποιημένες τιμές Ni που μετρήθηκαν μετά από συνθήκες εκτενούς σκότους 24 ωρών (24h) ή 72 ωρών (72h) προς τις κανονικοποιημένες τιμές Ni που μετρήθηκαν σε συνθήκες κανονικές φωτοπεριόδου (N.Ph). Οι τιμές με έντονη γραφή παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P<0.05). Στην τελευταία στήλη σημειώθηκε η τιμή P που καθορίζει το επίπεδο σημαντικότητας.

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται όλοι οι μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με το πρόγραμμα AMDIS στα φυμάτια φυτών *L. japonicus* τόσο σε συνθήκες κανονικής φωτοπερίοδου όσο και σε συνθήκες παρατεταμένου σκότους. Ένας αντίστοιχος πίνακας με αυτόν είναι ο πίνακας 5 του Παραρτήματος όπου συνοψίζονται οι μη ταυτοποιημένοι μεταβολίτες. Για την άμεση σύγκριση της συσσώρευσης των μεταβολιτών στις συνθήκες σκότους με την αντίστοιχη συσσώρευση στις συνθήκες κανονικής φωτοπερίοδου χρησιμοποιήθηκε ο λόγος, 'Ni σε σκότος / Ni σε κανονική φωτοπερίοδο' (24h/N.Ph και 72h/N.Ph). Για τον κάθε μεταβολίτη χωριστά πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο one way ANOVA και η τιμή P αναφέρεται στην τελευταία στήλη του πίνακα. Για να θεωρηθεί η συσσώρευση ενός μεταβολίτη σημαντικά αυξημένη στις συνθήκες σκότους ελήφθησαν ως κριτήρια τιμή του λόγου σκότος/καν.φωτοπερίοδος >2 και τιμή P<0.05. Αντίστοιχα, για να θεωρηθεί η συσσώρευση ενός μεταβολίτη σημαντικά μειωμένη στις συνθήκες σκότους ελήφθησαν ως κριτήρια τιμή του λόγου σκότος/καν.φωτοπερίοδος <0.5 και τιμή P<0.05.

Η εφαρμογή της παρατεταμένης σκοτεινής περιόδου προκάλεσε αυξημένη συσσώρευση αρκετών αμινοξέων στα φυμάτια, με τις μεγαλύτερες τιμές να εμφανίζονται για τα αμινοξέα Βαλίνη, Ισολευκίνη, Ασπαρτικό οξύ και Λυσίνη. Η μόνη κατηγορία μεταβολιτών που παρουσίασε αυξημένη συσσώρευση ήταν τα αμινοξέα. Η μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε στα επίπεδα της σακχαρόζης, όπως ήταν αναμενόμενο. Τα οργανικά οξέα που παρουσίασαν σημαντική μείωση ήταν το μηλικό και το φουμαρικό. Από την κατηγορία των πολυολών, σημαντική μείωση παρουσίασε η μυο-ινοσιτόλη. Σημαντική μείωση παρατηρήθηκε επίσης στα επίπεδα της πουτρεσκίνης, της αδενοσίνης και του πυρογλουταμικού οξέως. Γενικώς, οι πιο μεγάλες διαφορές στη συσσώρευση των μεταβολιτών παρατηρήθηκαν μετά από εφαρμογή παρατεταμένου σκότους 72 ωρών.





# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

---



# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---



## 1. ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΠΟΥ ΣΥΝΕΠΑΓΕΤΑΙ Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΦΥΜΑΤΙΟΥ

Για την ανίχνευση γονιδίων που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στα φυμάτια του *L. japonicus* χρησιμοποιήθηκε μια πλατφόρμα ποσοτικού PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR). Στην πλατφόρμα συμπεριλαμβανόταν γονίδια που μετέχουν σε βασικές μεταβολικές οδούς του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού. Η έκφραση των γονιδίων αυτών μελετήθηκε σε φυμάτια ηλικίας 14, 21 και 28 ημερών, χρονικά σημεία που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του φυματίου και αντιστοιχούν στη διαμόρφωση του οργάνου, τη διαφοροποίησή του και την ωρίμανσή του. Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων στα φυμάτια έγινε κατόπιν σύγκρισης των επιπέδων έκφρασης στα φυμάτια με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης που παρατηρήθηκαν στη ρίζα μη μολυσμένων φυτών.

Παρόλο που η πλειοψηφία των γονιδίων που μελετήθηκαν παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης στα φυμάτια και στη μη-μολυσμένη ρίζα, περίπου το ένα τρίτο των γονιδίων παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη έκφραση στα φυμάτια. Ελάχιστα από τα γονίδια που συμπεριλαμβάνονται στην πλατφόρμα παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στα φυμάτια από ό,τι στη ρίζα. Πολλά από τα γονίδια που παρουσίασαν υψηλή έκφραση στα φυμάτια κωδικοποιούν για ένζυμα που ανήκουν σε καλά χαρακτηρισμένες μεταβολικές οδούς και έχουν μελετηθεί καλά στα φυμάτια των ψυχανθών.

Η αρχική πηγή άνθρακα για το μεταβολισμό των φυματίων προέρχεται από τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης και μεταφέρεται από το βλαστό στα φυμάτια ως σακχαρόζη (Gordon *et al.*, 1999). Αρκετά γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα που μετέχουν σε διάφορα στάδια του καταβολισμού της σακχαρόζης φάνηκε να επάγονται σημαντικά στα φυμάτια. Πρόκειται για γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα που συμμετέχουν τόσο σε στάδια της γλυκόλυσης όσο και στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών. Ανάμεσά τους περιλαμβάνονται γονίδια που κωδικοποιούν για ισότυπους της συνθάσης της σακχαρόζης, τρεχαλάση, φρουκτοκινάση, ενολάση, κινάση του πυροσταφυλικού οξέως, καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέως και αλκοολική αφυδρογονάση (Πίνακας 2, Παράρτημα). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που είχαν προκύψει από προηγούμενες εργασίες στο *L. japonicus* με τη χρήση μικροσυστοιχιών cDNA, όπου είχε δειχτεί, επίσης, η επαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα του καταβολισμού της σακχαρόζης και της γλυκόλυσης (Colebatch *et al.*, 2004).

Η συνθάση της σακχαρόζης έχει μελετηθεί καλά στο *L. japonicus*, όπου έχουν εντοπιστεί έξι ισότυποι (Horst *et al.*, 2007). Τρεις από αυτούς, οι *LjSUS1*, *LjSUS2* και *LjSUS3* είχε δειχτεί να εκφράζονται στα φυμάτια, ενώ η έκφραση των υπολοίπων τριών

(*LjSUS4*, *LjSUS5* και *LjSUS6*) ήταν ελάχιστη ή μηδενική. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν και οι τρεις ισότυποι που εκφράζονται στα φυμάτια και φάνηκε ότι η επαγωγή των γονιδίων στα φυμάτια ήταν στατιστικώς σημαντική για τους ισότυπους *LjSUS1* και *LjSUS3*. Η υψηλότερη επαγωγή της έκφρασης παρατηρήθηκε στον ισότυπο *LjSUS3* και ήταν αναμενόμενη καθώς ο συγκεκριμένος ισότυπος έχει ήδη προταθεί να παρουσιάζει ενισχυμένη έκφραση στα φυμάτια (Horst *et al.*, 2007).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι γονίδια που κωδικοποιούν για την καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέως και την αλκοολική αφυδρογονάση εκφράζονται ισχυρά σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυματίου (Πίνακας 2, Παράρτημα). Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν στις αντιδράσεις της αναερόβιας αναπνοής, στην περίπτωση έλλειψης οξυγόνου. Στο φυμάτιο επικρατούν συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης  $O_2$  εξαιτίας της ευαισθησίας της νιτρογενάσης σε αυτό και με τη χρήση ψυχανθαιμοσφαιρίνης η συγκέντρωση  $O_2$  διατηρείται στα 3 με 22 nM (Witty, 1991). Γονιδιακή σίγηση της ψυχανθαιμοσφαιρίνης από τα φυμάτια του *L. japonicus* με την τεχνική RNAi, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ελεύθερου  $O_2$  στα φυμάτια, την αποσταθεροποίηση της νιτρογενάσης και τη μη λειτουργία της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης (Ott *et al.*, 2005). Επιπλέον, η μεταβολομική ανάλυση έδειξε τη συσσώρευση αλανίνης και 4-αμινοβουτυρικού οξέως στα φυμάτια (Πίνακας 4), όπου πρόκειται για τα δύο κυριότερα αμινοξέα που συσσωρεύονται στα φυτά σε συνθήκες υποξίας (de Sousa & Sodek, 2003; Miyashita & Good, 2008) και έχουν προταθεί να συμμετέχουν σε έναν προστατευτικό μηχανισμό ενάντια στην έλλειψη οξυγόνου.

Παράλληλα με την αυξημένη έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε διάφορα στάδια της γλυκόλυσης, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση και σε γονίδια που συμμετέχουν στη δέσμευση του  $CO_2$ , δηλαδή σε μεταβολικά μονοπάτια που είναι απαραίτητα για την παραγωγή δικαρβοξυλικών οξέων για την αναπνοή των βακτηριοειδών. Τα γονίδια που φαίνεται να επάγονται στα φυμάτια κωδικοποιούν για ισότυπους της καρβονικής ανυδράσης, της καρβοξυλάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέως (PEP) και της κινάσης του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέως (Πίνακας 2, Παράρτημα). Από την ανάλυση της έκφρασης γονιδίων του μεταβολισμού με μικροσυστοιχίες cDNA είχε βρεθεί να επάγονται στα φυμάτια του *L. japonicus* δύο γονίδια που κωδικοποιούν για καρβονική ανυδράση και δύο γονίδια που κωδικοποιούν για PEP καρβοξυλάση (Colebatch *et al.*, 2004).

Η καρβονική ανυδράση προμηθεύει την PEP καρβοξυλάση με  $CO_2$ , με τη μορφή δισανθρακικών ιόντων. Επαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν για ισότυπους της καρβονικής ανυδράσης έχει αναφερθεί και σε φυμάτια άλλων ψυχανθών (Kavroulakis *et al.*, 2000; de la Pena *et al.*, 1997). Η δράση της PEP καρβοξυλάσης στα φυμάτια του τριφυλιού, της σόγιας, του *Vigna radiata* και του *Lens culinaris* είχε δείχτει να είναι πολύ υψηλότερη από ότι στην υπόλοιπη ρίζα (Miller *et al.*, 1987; Pathinara *et al.*, 1992; Vance & Gantt, 1992; Chopra *et al.*,

2002). Επιπλέον, όταν μειώθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Ljprpc1* περιορίστηκε σημαντικά η αζωτοδέσμευση (Nomura *et al.*, 2006), γεγονός που υποδεικνύει ότι το ένζυμο αυτό παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στο να προμηθεύει τα μολυσμένα κύτταρα με σκελετούς άνθρακα.

Στο μεταβολικό μονοπάτι αφομοίωσης του αζώτου, επάγονται δύο γονίδια που κωδικοποιούν για ισότυπους της συνθετάσης της γλουταμίνης, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για ισότυπο της αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέως και ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για τη συνθάση της ασπαραγίνης (Πίνακας 2, Παράρτημα). Αρκετά γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό είχε βρεθεί, επίσης, ότι παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στα φυμάτια κατά την ανάλυση με τις μικροσυστοιχίες cDNA (Colebatch *et al.*, 2004). Η ασπαραγίνη είναι η κύρια μορφή αζώτου που εξέρχεται από τα φυμάτια (Vance *et al.*, 1987) και η αυξημένη έκφραση των παραπάνω γονιδίων διαβεβαιώνει τη σύνθεση του αμινοξέως αυτού στα φυμάτια. Η μεγάλη συσσώρευση ασπαραγίνης στα φυμάτια επιβεβαιώθηκε και από την μεταβολομική ανάλυση (Πίνακας 4).

27 γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των αμινοξέων βρέθηκε να παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στα φυμάτια (Πίνακας 2, Παράρτημα), ενώ σε 16 από αυτά η έκφραση που παρατηρήθηκε στα φυμάτια ήταν πενταπλάσια από την αντίστοιχη έκφραση που παρατηρήθηκε στη μη-μολυσμένη ρίζα (λόγος φυμάτια/ρίζα>5) (Πίνακας 1). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για ένζυμα που παίρνουν μέρος στο μεταβολισμό διαφόρων αμινοξέων όπως κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, θρεονίνη, ιστιδίνη, μεθειονίνη και λευκίνη (Πίνακας 1). Αρκετά είναι τα γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της προλίνης, η οποία συσσωρεύεται στους φυτικούς ιστούς ως απόκριση σε ωσμωτική καταπόνηση (Liu & Zhu, 1997; Swaraj & Bishnoi, 1999).

Γενικώς, παρατηρήθηκε αυξημένη συσσώρευση μεταγραφημάτων αρκετών γονιδίων που η επαγωγή τους έχει συνδεθεί με ωσμωτική καταπόνηση (Buchanan *et al.*, 2000) όπως το Δ-1-πυρόλινο-5-καρβοξυλικό, το οποίο αποτελεί ένζυμο κλειδί στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης και η αφυδρογονάση της αλδεϋδικής βεταΐνης, η οποία εμπλέκεται στη συσσώρευση βεταΐνης της γλυκίνης. Στη σόγια, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο αναγωγή του πυρόλινο-5-καρβοξυλικού, το οποίο επίσης εμπλέκεται στη βιοσύνθεση προλίνης, βρέθηκε να επάγεται στα φυμάτια και να σχετίζεται με ωσμωρύθμιση (Dalauney & Verma, 1990). Εκτός από την προλίνη, άλλα βιολογικά μόρια που τους έχει αποδοθεί ωσμωπροστατευτικός ρόλος είναι οι μεπαΐνες, οι πολυόλες και κάποια μη-αναγωγικά σάκχαρα, όπως η τρεχαλόζη (Rontein *et al.*, 2002). Η ανάλυση των μεταγραφημάτων στα φυμάτια του *L. japonicus* αποκάλυψε τόσο την επαγωγή γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση βεταΐνων όσο και την επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της τρεχαλόζης (Πίνακας 2, Παράρτημα). Παράλληλα, στην ανάλυση των μεταβολιτών με GC-MS, μεταξύ πολλών άλλων αμινοξέων, εντοπίστηκε η συσσώρευση προλίνης, καθώς επίσης

και η συσσώρευση αρκετών πολυολών, όπου παρατηρήθηκε ιδιαίτερα μεγάλη συσσώρευση πινιτόλης και μυο-ινοσιτόλης (Πίνακας 4).

Μια άλλη κατηγορία ενώσεων που επάγονται σε διάφορες συνθήκες καταπόνησης, μεταξύ των οποίων και σε οσμωτική καταπόνηση (Flores, 1991), είναι οι πολυαμίνες. Παρόλο που η συσσώρευση πολυαμινών διαφέρει μεταξύ των ειδών, τα φυμάτια των ψυχανθών περιέχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τις ενώσεις αυτές από ότι τα υπόλοιπα όργανα (Fujihara *et al.*, 1994). Από την ανάλυση των μεταγραφημάτων των γονιδίων φάνηκε να επάγονται στα φυμάτια κάποια ένζυμα που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση πολυαμινών (αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης και συνθάση της σπερμιδίνης), ενώ από την ανάλυση των μεταβολιτών βρέθηκε η συσσώρευση πουτρεσκίνης και σπερμιδίνης (Πίνακας 4). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα προηγούμενης εργασίας στο *L. japonicus*, όπου βρέθηκε στα φυμάτια αυξημένη συσσώρευση μεταγραφημάτων του γονιδίου *Ljodc* που κωδικοποιεί για αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, και επιπλέον, 2 με 6-φορές αύξηση των επιπέδων πουτρεσκίνης σε ώριμα φυμάτια σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτικά όργανα (Flemetakis *et al.*, 2004).

## 2. ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΦΥΜΑΤΙΟΥ ΠΟΥ ΕΠΙΦΕΡΕΙ Η ΕΛΛΕΙΨΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ

Ο μεταβολισμός του άνθρακα αλληλεπιδρά στενά με το μεταβολισμό του αζώτου (Stitt & Krapp, 1999; Krapp *et al.*, 2005). Ο μεταβολισμός του αζώτου εξασθενεί σοβαρά όταν μειώνεται η φωτοσύνθεση, όπως συμβαίνει, για παράδειγμα, σε συνθήκες σύντομης ημέρας (Matt *et al.*, 1998) ή σε γενοτύπους με μειωμένη έκφραση της καρβοξυλάσης/οξυγονάσης της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (Rubisco) (Matt *et al.*, 2002). Ανάλυση μεταγραφημάτων στο *Arabidopsis thaliana* αποκάλυψε ότι αλλαγές στην παροχή σακχαρόζης οδήγησαν σε αλλαγές της έκφρασης εκατοντάδων γονιδίων που εμπλέκονται στην αφομοίωση του αζώτου, στη σύνθεση αμινοξέων και πρωτεϊνών και στο μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων (Price *et al.*, 2004; Thimm *et al.*, 2004; Blasing *et al.*, 2005).

Στα ψυχανθή, η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης και η αφομοίωση του ανηγμένου N απαιτούν από το φυτό την παροχή φωτοσυνθετικού άνθρακα. Σε περίπτωση έλλειψης C, όπως συμβαίνει σε συνθήκες παράτασης του σκότους, η αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα μειώνεται (Pfeiffer *et al.*, 1983). Για να μελετήσουμε την επίδραση της έλλειψης φωτοσυνθετικού άνθρακα στο μεταβολισμό του φυματίου, επιλέχθηκαν γονίδια που μετέχουν σε βασικές μεταβολικές οδούς του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού και πραγματοποιήθηκε ανάλυση qRT-PCR σε φυμάτια φυτών που είχαν υποστεί συνθήκες παρατεταμένου σκότους. Παράλληλα, με τη χρήση της τεχνικής GC-MS, μελετήθηκαν οι



αλλαγές στη συσσώρευση των μεταβολιτών που επιφέρει στο φυμάτιο η έλλειψη φωτοσυνθετικού άνθρακα.

Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην έκφραση πολλών γονιδίων που συμμετέχουν σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, είναι ενδεικτικές της γενικότερης αλλαγής που συμβαίνει στον κεντρικό μεταβολισμό του φυματίου κάτω από συνθήκες παρατεταμένου σκότους. Το μεγαλύτερο ποσοστό των γονιδίων που αναλύθηκαν, περίπου 80%, παρουσίασε μείωση της έκφρασης μετά από συνθήκες παρατεταμένου σκότους 24 και 72 ωρών, ενώ τα γονίδια που παρουσίασαν επαγωγή της έκφρασης ήταν σε ποσοστό μόλις 9%.

Το συνεχές σκοτάδι επιφέρει την έλλειψη φωτοσυνθετικών προϊόντων και κατά συνέπεια τη διακοπή της παροχής φωτοσυνθετικού άνθρακα στα φυμάτια. Αυτό είναι εμφανές από τη μεγάλη μείωση της σακχαρόζης που μετρήθηκε στα φυμάτια κατά τη μεταβολομική ανάλυση, όπου εμφανίζεται 5 φορές μειωμένη μετά από 24 ώρες σκοτάδι και 14 φορές μειωμένη μετά από 72 ώρες σκοτάδι (Πίνακας 5). Ως φυσικό επακόλουθο της μεγάλης μείωσης της σακχαρόζης ήταν τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου συνθάσης της σακχαρόζης (Πίνακας 2). Η έκθεση φυτών σόγιας σε μικρής διάρκειας συνθήκες σκοταδιού είναι αρκετή για να προκαλέσει γρήγορη μείωση στα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων που κωδικοποιούν για σημαντικές πρωτεΐνες του φυματίου και στη δραστηριότητα του ενζύμου συνθάσης της σακχαρόζης (Gordon *et al.*, 1993).

Όλα τα γονίδια που μελετήθηκαν και που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του αμύλου παρουσίασαν μείωση στην έκφρασή τους. Από αυτά, σημαντική μείωση παρουσίασαν κάποια γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για ένζυμα που παίρνουν μέρος στη σύνθεση του αμύλου, συγκεκριμένα, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για ισότυπο της συνθάσης του αμύλου και δύο γονίδια που κωδικοποιούν για τη μικρή υπομονάδα της πυροφωσφορυλάσης της ADP-γλυκόζης. Επίσης, μείωση της έκφρασης παρατηρήθηκε σε όλα τα γονίδια που συμμετέχουν σε διάφορα στάδια της γλυκόλυσης και σε όλα σχεδόν τα γονίδια που μελετήθηκαν και παίρνουν μέρος στον κύκλο των φωσφορικών πεντόζων. Σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στα ένζυμα ενολάση, ισομεράση των φωσφορικών τριοζών, αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού, αλκοολική αφυδρογονάση, αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, αφυδρογονάση του 6-φωσφογλυκονικού, τρανσκετολάση και τρανσαλδολάση (Πίνακας 3, Παράρτημα).

Έκθεση φυτών φασολιού σε παρατεταμένο σκοτάδι προκάλεσε 76% μείωση της αναπνοής στη ρίζα και 95% μείωση της δραστηριότητας νιτρογενάσης μετά από μία ημέρα, ενώ μετά από δύο ημέρες η αζωτοδέσμευση έπαυε εντελώς. Ο πιο άφθονος υδατάνθρακας ήταν η σακχαρόζη που μειώθηκε κατά 97% σε διάστημα μιας ημέρας, ενώ στο ίδιο χρονικό διάστημα το άμυλο μειώθηκε σε ποσοστό 50%. Η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μειώθηκε αρκετά. Η πιο σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στα ένζυμα καρβοξυλάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέως (PEPC), γλουταμινική συνθετάση (GS) και συνθάση του

γλουταμινικού οξέως (GOGAT) μετά από σκοτάδι μίας ημέρας, και συνθάση της σακχαρόζης, αλκαλική ιμβερτάση και φωσφοφρουκτοκινάση μετά από 2 ημέρες (Gogorcena *et al.*, 1997). Τα περισσότερα από τα ένζυμα αυτά παρουσίασαν μειωμένη έκφραση και στα φυμάτια του *L. japonicus*. Συγκεκριμένα, σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στην καρβοξυλάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέως (PEPC), στη γλουταμινική συνθετάση (GS), στη συνθάση της σακχαρόζης και στη φρουκτοκινάση (Πίνακας 3, Παράρτημα).

Η μειωμένη έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στη δέσμευση του CO<sub>2</sub> υποδηλώνει τον περιορισμό της διαδικασίας αυτής σε φυμάτια φυτών που έχουν υποστεί συνθήκες παρατεταμένου σκότους. Τρία γονίδια που κωδικοποιούν για καρβονικές ανυδράσες και δύο γονίδια που κωδικοποιούν για καρβοξυλάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέως (PEP) και κινάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέως, και τα οποία επάγονται στα φυμάτια, εμφανίζουν πολύ σημαντική μείωση στα επίπεδα έκφρασης κάτω από συνθήκες παρατεταμένου σκότους (Πίνακας 2). Επιπλέον, μειωμένα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν και σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για ισότυπο της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέως. Η συνδυασμένη δράση των ενζύμων καρβοξυλάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέως και αφυδρογονάση του μηλικού οξέως καταλήγει στην παραγωγή μηλικού οξέως, που θεωρείται ως η κύρια πηγή άνθρακα για το μεταβολισμό των βακτηριοειδών και για τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης (Day & Copeland, 1991; Streeter, 1995). Η μεγάλη μείωση στη συσσώρευση μηλικού οξέως μετά από 72 ώρες σκοτάδι, που αποκαλύπτεται από τη μεταβολομική ανάλυση (Πίνακας 5), επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα από την ανάλυση των μεταγραφημάτων και ενισχύει την άποψη ότι η αζωτοδέσμευση περιορίζεται από την έλλειψη φωτοσυνθετικού άνθρακα.

Στο μεταβολικό μονοπάτι αφομοίωσης του αζώτου, η εφαρμογή της συνεχούς σκοτεινής περιόδου επιφέρει την καταστολή της έκφρασης ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για ισότυπο της συνθετάσης της γλουταμίνης και ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για ισότυπο της συνθάσης ασπαραγίνης (Πίνακας 2). Το αποτέλεσμα αυτό συνηγορεί στο συμπέρασμα του περιορισμού της διαδικασίας της αφομοίωσης της αμμωνίας στις συνθήκες αυτές.

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι ένα άλλο γονίδιο που κωδικοποιεί για ισότυπο της συνθάσης της ασπαραγίνης (AS), TC14104, επάγεται σημαντικά μετά την εφαρμογή 24 ωρών και ακόμη περισσότερο μετά την εφαρμογή 72 ωρών συνεχούς σκότους (Πίνακας 3). Υψηλά επίπεδα φωτός και υδατανθράκων - συνθήκες που διεγείρουν τα ένζυμα GS και GOGAT στα πλαστίδια - εμποδίζουν την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για AS. Η ρύθμιση των δύο αυτών ανταγωνιστικών μονοπατιών βοηθά στην ισορροπία του μεταβολισμού του άνθρακα και του αζώτου στα φυτά (Lam *et al.*, 1996). Οι συνθήκες αυτές που επάγουν την έκφραση των ενζύμων GS και GOGAT και καταστέλλουν την έκφραση του ενζύμου AS, ευνοούν την αφομοίωση αζώτου σε γλουταμινικό οξύ και γλουταμίνη, ενώσεις

πλούσιες σε άνθρακα που συμμετέχουν στη σύνθεση νέων υλικών για το φυτό. Αντιθέτως, σε συνθήκες περιορισμένης ενέργειας, καταστέλλεται η έκφραση των ενζύμων GS και GOGAT και επάγεται η σύνθεση του ενζύμου AS, επομένως ευνοείται η αφομοίωση αζώτου σε ασπαραγίνη, μια ένωση πλούσια σε άζωτο και αρκετά σταθερή για μεταφορά σε μεγάλες αποστάσεις ή για μεγάλο χρονικό διαστήματος αποθήκευση (Taiz & Zeiger, 2002).

Ένα άλλο γονίδιο που εμπλέκεται στην αφομοίωση του αζώτου και επάγεται σε παρατεταμένο σκοτάδι κωδικοποιεί για το ένζυμο NADP-εξαρτώμενη αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέως (Πίνακας 3). Η επαγωγή του γονιδίου αυτού οφείλεται στην έλλειψη άνθρακα, εξαιτίας του παρατεταμένου σκότους, καθώς η ρύθμιση της επαγωγής του μπορεί να αναστραφεί με την παροχή μιας εξωτερικής πηγής άνθρακα (Melo-Oliveira *et al.*, 1996; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2002; Restivo, 2004). Έχει προταθεί ότι το γλουταμικό οξύ καταβολίζεται από την αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέως και στη συνέχεια εισέρχεται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων, ως μια εναλλακτική πηγή C κατά τη διάρκεια της έλλειψης άνθρακα (Robinson *et al.*, 1991, 1992; Melo-Oliveira *et al.*, 1996).

Εκτός από το ρόλο της NADP-εξαρτώμενης αφυδρογονάσης του γλουταμινικού οξέως ως ένα ένζυμο-κλειδί στον καταβολισμό του γλουταμινικού οξέως, το ένζυμο αυτό φαίνεται να εμπλέκεται και στον καταβολισμό αμινοξέων κάτω από συνθήκες έλλειψης άνθρακα (Miyashita & Good, 2008). Η ανάλυση των μεταβολιτών με GC-MS φανέρωσε τη συσσώρευση πολλών αμινοξέων στο φυμάτιο κάτω από συνθήκες παρατεταμένου σκότους (Πίνακας 5). Η συσσώρευση αμινοξέων κάτω από αυτές τις συνθήκες μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη πρωτεόλυση, καθώς υπάρχουν πολλές αναφορές για επαγωγή πρωτεόλυσης κατά τη διάρκεια έλλειψης άνθρακα (Moriyasu & Ohsumi, 1996; Brouquisse *et al.*, 1998; Thompson & Vierstra, 2005). Επομένως, η NADP-εξαρτώμενη αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέως προφανώς έχει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στο να καταβολίζει τα αμινοξέα που συσσωρεύονται στο φυμάτιο, παρέχοντας με αυτό τον τρόπο μια εναλλακτική πηγή ενέργειας.

Από τους μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν στα φυμάτια στις συνθήκες έλλειψης άνθρακα, τη μεγαλύτερη μείωση (πέραν της σακχαρόζης και του μηλικού οξέως, που έχουν προαναφερθεί) παρουσίασαν τα ωσμοπροστατευτικά μόρια πουτρεσκίνη και μυο-ινοσιτόλη (Πίνακας 5). Παράλληλα, παρατηρούνται αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό διαφόρων ωσμοπροστατευτικών μορίων. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων κυκλοαπομινάση της ορνιθίνης και αναγωγή του πυρόλινο-5-καρβοξυλικού, που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της προλίνης, μειώνονται, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αφυδρογονάση της προλίνης, που συμμετέχει στην αποδόμηση της προλίνης, αυξάνονται. Η έκφραση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για NAD-εξαρτώμενη αφυδρογονάση της σορβιτόλης (TC17752) αυξάνεται, ενώ μειώνεται η έκφραση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για NADPH-εξαρτώμενη αναγωγή της μαννόζης (TC15046). Επιπλέον,

μειώνονται τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων συνθάση της σπερμιδίνης και συνθάση της σπερμίνης, που οδηγούν στη βιοσύνθεση των πολυαμινών σπερμιδίνη και σπερμίνη αντίστοιχα (Πίνακας 3, Παράρτημα). Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι αρκετές από τις ωσμοπροστατευτικές ουσίες που συσσωρεύονται στο φυμάτιο υπό φυσιολογικές συνθήκες, μειώνονται όταν το φυτό βρεθεί κάτω από τις μη φυσιολογικές συνθήκες που δημιουργούνται στην περίπτωση της έλλειψης άνθρακα και παρεμποδίζουν την ομαλή λειτουργία του.

Οι συνθήκες έλλειψης άνθρακα βρέθηκε να ρυθμίζουν τη μεταγραφή αρκετών γονιδίων που συμμετέχουν στο δευτερογενή μεταβολισμό του φυματίου. Σε αυτά περιλαμβάνονται γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φλαβονοειδών, φαινολικών και φαινυλοπροπανίων, τα οποία έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν με απόκριση σε βιοτική και αβιοτική καταπόνηση (Kliebenstein, 2004; Walia *et al.*, 2005). Είναι πιθανό στις συνθήκες έλλειψης άνθρακα το φυμάτιο να έχει μειωμένες απαιτήσεις για σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος. Στο συμπέρασμα αυτό συνηγορεί η πολύ μειωμένη έκφραση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για το ένζυμο λακκάση (TC17617), το οποίο οξυδώνει τις υπομονάδες της λιγνίνης κατά τη βιοσύνθεση του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος. Παρόμοιες παρατηρήσεις στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος είχαν γίνει και στην περίπτωση φυματίων από φυτά *L. japonicus* που είχαν υποστεί καταπόνηση αλατότητας (Sanchez *et al.*, 2008). Επιπλέον, η έκφραση πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που καταλύουν διάφορα στάδια στη σύνθεση της λιγνίνης ήταν μειωμένη στα φυμάτια LbRNAi φυτών που στερούνται ψυχανθοαιμοσφαιρίνες, ενώ ταυτόχρονα ήταν μειωμένα και τα επίπεδα της φαινυλαλανίνης από την οποία συντίθενται φαινολικά και φλαβονοειδή (Ott *et al.*, 2009). Η περιορισμένη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να αντανakλά την έλλειψη ωρίμανσης και την πρόωρη γήρανση στα φυμάτια LbRNAi και κάτι ανάλογο μπορεί να ισχύει και στην περίπτωση μεγάλης παράτασης της σκοτεινής περιόδου.

## *ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ*

---



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

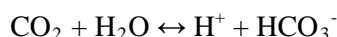
---





## 1. Η ΚΑΡΒΟΝΙΚΗ ΑΝΥΔΡΑΣΗ

Η καρβονική ανυδράση (carbonic anhydrase:CA, EC:4.2.1.1.) είναι ένα μεταλλοένζυμο που καταλύει την αντιστρεπτή αντίδραση ενυδάτωσης και αφυδάτωσης του CO<sub>2</sub>:



Το HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> είναι αρνητικά φορτισμένο και αρκετά διαλυτό σε υδατικά διαλύματα αλλά καθόλου σε λιπίδια, ενώ το CO<sub>2</sub> είναι διαλυτό τόσο σε υδατικά όσο και σε λιπόφιλα διαλύματα. Επομένως, ενώ το CO<sub>2</sub> μπορεί να διαχέεται ελεύθερα εντός και εκτός του κυττάρου, το HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> χρειάζεται να μεταφερθεί κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης. Η μετατροπή του HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> σε CO<sub>2</sub> διευκολύνει τη μεταφορά του στο εσωτερικό του κυττάρου, ενώ η μετατροπή του CO<sub>2</sub> σε HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> μπορεί να είναι σημαντική για να παγιδευτεί το CO<sub>2</sub> στο εσωτερικό του κυττάρου. Η αλληλομετατροπή του CO<sub>2</sub> σε HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> είναι βραδεία σε φυσιολογικό pH και απαιτεί ενζυματική κατάλυση. Η ενζυμική μετατροπή του CO<sub>2</sub> σε HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> επιτρέπει στο κύτταρο να διατηρεί τα συστατικά αυτά σε κατάλληλα επίπεδα για να διεξάγει τις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες (Smith & Ferry, 2000).

Αυτή η απλή μετατροπή ενός αέριου υποστρώματος που διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες, σε ένα μη-διαπερατό ιονικό προϊόν είναι ζωτικής σημασίας για πολλές σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Κατά συνέπεια, τα ένζυμα αυτά είναι ευρέως διαδεδομένα σε όλη τη φύση, βρίσκονται σε αφθονία και έχουν βρεθεί σε πλήθος οργανισμών, συμπεριλαμβάνοντας σπονδηλωτά, ασπόνδηλα, ανώτερα φυτά, φύκη και βακτήρια.

Η καρβονική ανυδράση αποτελεί ένζυμο 'κλειδί' στον μεταβολισμό του CO<sub>2</sub>. Το ένζυμο συμμετέχει σε ευρύ φάσμα φυσιολογικών και βιοχημικών διαδικασιών, συμπεριλαμβάνοντας αντιδράσεις καρβοξυλίωσης και αποκαρβοξυλίωσης σε φωτοσύνθεση και αναπνοή. Επίσης συμμετέχει στη ρύθμιση του pH, τη μεταφορά CO<sub>2</sub> και HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, τη μεταφορά ιόντων (Tsuruoka *et al.*, 2001) και την ισορροπία νερού και ηλεκτρολυτών (Dagher *et al.*, 1993).

Οι πρώτες αλληλουχίες καρβονικών ανυδρασών που αποκτήθηκαν ήταν από τη χαμηλής δράσης ανθρώπινη CA I (Andersson *et al.*, 1972; Lin & Deutsch, 1973) και από την υψηλής δράσης ανθρώπινη CA II (Henderson *et al.*, 1973; Lin & Deutsch, 1974). Και οι δύο πρωτεΐνες απομονώθηκαν από ανθρώπινα ερυθροκύτταρα.

Οι καρβονικές ανυδράσες χωρίζονται σε πέντε διακριτούς τύπους που έχουν ονομαστεί α, β, γ, δ και ζ. Αντιπρόσωποι των διαφορετικών τύπων δεν φαίνεται να μοιράζονται ομοιότητες στις αμινοξικές ακολουθίες τους και πιστεύεται πως οι διαφορετικοί τύποι έχουν

εξελιχθεί ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο (Hewett-Emmett & Tashian, 1996; Tripp, Smith & Ferry, 2001; So *et al.*, 2004). Οι τύποι α και γ λειτουργούν ως μονομερή ή τριμερή αντίστοιχα. Αντιθέτως οι τύπου β CA μπορούν να είναι διμερή, τετραμερή, εξαμερή ή και οκταμερή. Στα ζώα όλα τα ένζυμα που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι στιγμής ανήκουν στον τύπο α ενώ άλλοι ευκαρυώτες κωδικοποιούν καρβονικές ανυδράσες α, β και γ τύπου. Οι δ και ζ τύπου καρβονικές ανυδράσες μέχρι στιγμής περιορίζονται στο θαλάσσιο φυτοπλαγκτόν (Lane *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007).

## 2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΡΒΟΝΙΚΩΝ ΑΝΥΔΡΑΣΩΝ

Οι διαφορετικοί τύποι των καρβονικών ανυδρασών, παρά τις διαφορές τους, φαίνεται να μοιράζονται ένα κοινό μηχανισμό κατάλυσης. Η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών αποκάλυψε ότι στο ενεργό τους κέντρο εντοπίζονται πολλά κοινά σημεία, επομένως, ο βασικός καταλυτικός μηχανισμός είναι πιθανώς αρκετά όμοιος. Το ενεργό κέντρο όλων των ενζύμων μπορεί να λειτουργήσει μόνο με την παρουσία ενός ατόμου ψευδαργύρου (Lindskog, 1997; Christianson *et al.*, 1999). Κινητικές μελέτες έδειξαν ότι ακολουθείται ένας μηχανισμός δύο σταδίων (Northrop & Simpson, 1998):

- Στο πρώτο στάδιο, ένα δεσμευμένο με ψευδάργυρο ιόν υδροξυλίου προσβάλλει ένα μόριο CO<sub>2</sub>  
$$\text{Zn}^{+2}\text{-OH} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{Zn}^{+2} + \text{HCO}_3^-$$
- Στο δεύτερο στάδιο, το ενεργό κέντρο αναγεννάται καθώς ένα δεσμευμένο με ψευδάργυρο μόριο νερού ιονίζεται και το πρωτόνιο απομακρύνεται από το ενεργό κέντρο  
$$\text{Zn}^{+2} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{Zn}^{+2}\text{-OH}$$

## 3. ΚΑΡΒΟΝΙΚΕΣ ΑΝΥΔΡΑΣΕΣ ΤΥΠΟΥ α

Οι καρβονικές ανυδράσες τύπου α είναι οι πιο καλά χαρακτηρισμένες, μέχρι στιγμής, και περιλαμβάνουν ισότυπους που βρέθηκαν στα θηλαστικά και ένζυμα που βρέθηκαν σε βακτήρια (Soltes-Rak *et al.*, 1997; Chirica *et al.*, 2001). Στα θηλαστικά έχουν περιγραφεί 16 α-CA ισότυποι σε διάφορους ιστούς και όργανα ή CA-σχετικές πρωτεΐνες (CARP) (Supuran, 2008). Φυλογενετικές αναλύσεις αποκάλυψαν ότι όλοι οι α-CA ισότυποι του ανθρώπου προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο (Hewett-Emmett & Tashian, 1996; Mori *et al.*, 1999). Εκτός από τα θηλαστικά, α-τύπου CA έχουν βρεθεί σε προκαρυώτες, φυτά, φύκη και μύκητες (Moroney *et al.*, 2001; Tripp *et al.*, 2001; Bahn & Mühlischlegel, 2006).

Αρωματικά και ετεροκυκλικά σουλφοναμίδια δρουν ως ισχυροί παρεμποδιστές των α-τύπου CA. Πολλά α-τύπου ισοένζυμα εμπλέκονται σε διάφορες ασθένειες και πολλές φορές η θεραπεία περιλαμβάνει την εφαρμογή σουλφοναμιδίων που παρεμποδίζουν τη δράση της καρβονικής ανυδράσης (Tipp, 2001). Για παράδειγμα, ο αναστολέας των καρβονικών ανυδρασών δορζολαμίδη προσδένεται στο άτομο ψευδαργύρου του ενεργού κέντρου και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του γλαυκώματος (Palmberg, 1995; Maren, 1995).

Χαρακτηριστικό των α-τύπου ενζύμων των θηλαστικών είναι ότι εκτός από δράση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> παρουσιάζουν επίσης δράση εστεράσης. Δράση εστεράσης βρέθηκε και σε ένζυμα α-τύπου που απομονώθηκαν από προκαρυώτες (Smith & Ferry, 2000).

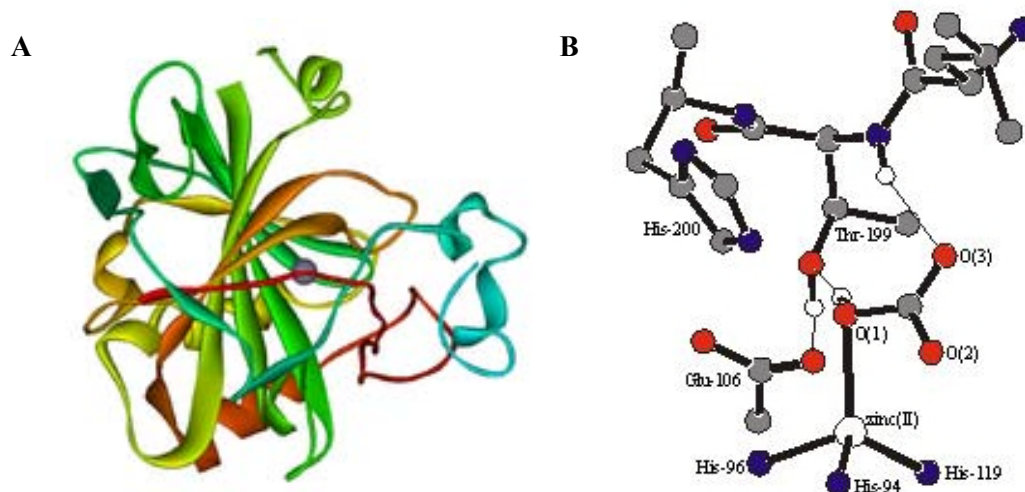
### 3.1. Μηχανισμός κατάλυσης καρβονικών ανυδρασών τύπου α

Οι α-τύπου καρβονικές ανυδράσεις είναι οι πιο καλά μελετημένες όσον αφορά το μηχανισμό κατάλυσης. Τα ένζυμα είναι μονομερή και η δευτεροταγής δομή που φαίνεται να κυριαρχεί είναι δύο αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες. Η πιο καλά μελετημένη CA είναι η ανθρώπινη CA II. Το ένζυμο έχει μια σχεδόν σφαιρική δομή με το ενεργό κέντρο να σχηματίζει μια κωνική σχισμή. Το ένα μέρος της κοιλότητας αποτελείται από υδρόφοβα κατάλοιπα ενώ η άλλη πλευρά αποτελείται από υδρόφιλα κατάλοιπα στα οποία περιλαμβάνονται τα Thr199 και Glu106. Το άτομο ψευδαργύρου βρίσκεται τοποθετημένο στον πυθμένα της κωνικής σχισμής και σχηματίζει μια τετραεδρική διάταξη με τα ιμιδαζόλια τριών καταλοίπων ιστιδίνης, His94, His96 και His119, και με ένα μόριο νερού. Το μόριο νερού ιονίζεται σε OH<sup>-</sup> με τιμή pK κοντά στο 7 (Silverman & Lindskog, 1988). Αυτή η τετραεδρική δομή είναι συντηρημένη ανάμεσα στις α-τύπου CA.

Μελέτες έδειξαν ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα του υδρόφοβου τμήματος της ανθρώπινης CA II έχουν ένα σημαντικό ρόλο στο να κατευθύνουν τις ιστιδίνες-δεσμευτές σε μια γεωμετρία που ευνοεί τη δέσμευση ψευδαργύρου ενώ ταυτόχρονα αποσταθεροποιεί πιθανές γεωμετρίες που θα ευνοούσαν τη δέσμευση άλλων μετάλλων (Cox, 2000; Hunt, 1999).

Τα αμινοξικά κατάλοιπα Thr199 και Glu106 συμμετέχουν σε ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου με το Zn-OH<sup>-</sup>, φτιάχνοντας μια δομή ιδανική για τη νουκλεόφιλη προσβολή του CO<sub>2</sub> από το δεσμευμένο σε ψευδάργυρο OH<sup>-</sup> (Coleman, 1967; Merz, 1990; Merz, 1991; Krebs *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1993; Xue *et al.*, 1993). Η Thr199 σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου, δίνοντας ένα δεσμό υδρογόνου στην καρβοξυλική ομάδα του Glu106 και δεχόμενη ένα δεσμό υδρογόνου από το Zn-OH<sup>-</sup>. Το πεπτιδικό N της Thr199 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με ένα δεύτερο μόριο νερού. Το δίκτυο δεσμών υδρογόνου καθορίζει τον προσανατολισμό του Zn-OH<sup>-</sup> ούτως ώστε ένα ζεύγος ηλεκτρονίων του να κατευθύνεται προς το μόριο CO<sub>2</sub> που βρίσκεται τοποθετημένο σε μια υδρόφοβη κοιλότητα (Merz, 1990; Liang *et al.*, 1993). Επιπλέον, τα δύο αυτά αμινοξικά κατάλοιπα έχουν και ρόλο 'θυρωρού' καθώς

επιλέγουν μόνο πρωτονιομένα μόρια για να προσδεθούν στο ενεργό κέντρο (Hakansson *et al.*, 1992; Eriksson *et al.*, 1988; Lindahl *et al.*, 1993).



**Εικόνα 9:** A) 3-D δομή και B) δομή του ενεργού κέντρου της πολύ καλά μελετημένης ανθρώπινης CA II

Κατά την αντίδραση ενυδάτωσης του  $\text{CO}_2$ , στο πρώτο στάδιο το  $\text{Zn-OH}^-$  προσβάλλει το  $\text{CO}_2$  και παράγεται  $\text{Zn-HCO}_3^-$  ενώ στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης το  $\text{HCO}_3^-$  αντικαθίσταται από ένα μόριο νερού και απελευθερώνεται. Στη συνέχεια, από το παραγόμενο  $\text{Zn-H}_2\text{O}$  απελευθερώνεται ένα πρωτόνιο για να σχηματιστεί ξανά  $\text{Zn-OH}^-$ . Η αντίδραση απελευθέρωσης και μεταφοράς του πρωτονίου διευκολύνεται από την His64 (Silverman & Lindskog, 1988; Tu *et al.*, 1989). Παρεμπόδιση της CA II από βαριά μέταλλα όπως ο χαλκός εξηγείται από μελέτες της δομής που δείχνουν ότι τα μέταλλα αυτά προσδέονται στην His64 (Hakansson, 1994).

Τα τρία κατάλοιπα ιστιδίνης που συμμετέχουν στο ενεργό κέντρο των ενζύμων στα ανθρώπινα ισόενζυμα είναι τελείως συντηρημένα σε όλες τις αλληλουχίες των προκαρυωτικών α τύπου καρβονικών ανυδρασών. Άλλα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι σημαντικά για την κατάλυση όπως τα Thr199 και Glu106 είναι επίσης συντηρημένα στα προκαρυωτικά ένζυμα (Smith & Ferry, 2000).

#### 4. ΚΑΡΒΟΝΙΚΕΣ ΑΝΥΔΡΑΣΕΣ ΤΥΠΟΥ $\beta$

Οι καρβονικές ανυδράσες τύπου  $\beta$  είχαν αρχικά θεωρηθεί ότι είναι ένζυμα φυτικής προέλευσης. Αργότερα όμως αποδείχτηκε ότι τα ένζυμα αυτά είναι ευρέως διαδεδομένα σε ποικιλία από άλγη (Eriksson *et al.*, 1996), βακτήρια και αρχαιοβακτήρια (Smith *et al.*, 1999).

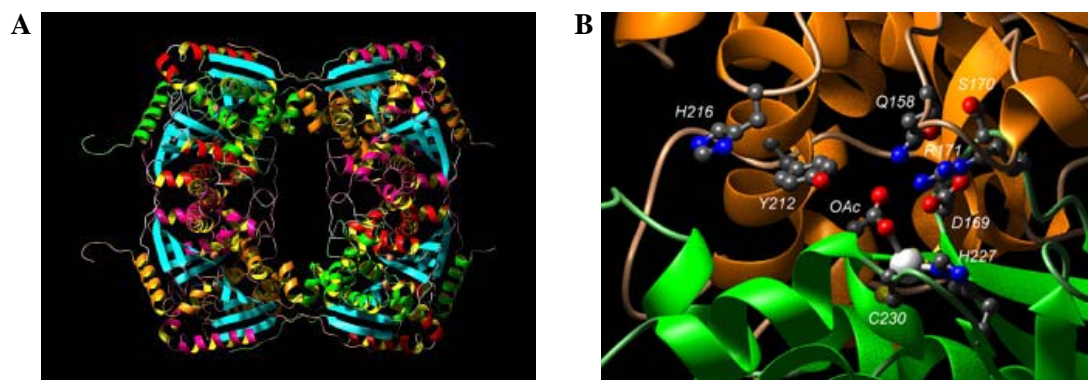
Η πρώτη αμινοξική ακολουθία β-τύπου καρβονικής ανυδράσης προήλθε από το χλωροπλάστη στο σπανάκι το 1984 και δεν μπορούσε να ευθυγραμμιστεί με τις αμινοξικές ακολουθίες των θηλαστικών (Hewett-Emmett *et al.*, 1984). Στη συνέχεια πολλές cDNA αλληλουχίες από φυτικές χλωροπλαστικές CA ανακαλύφθηκαν και δείχτηκε ότι τα ένζυμα αυτά ανήκουν σε ένα ξεχωριστό κλάδο.

Η μελέτη της δομής των β-τύπου καρβονικών ανυδρασών άργησε πολύ, σε σχέση με τις α-τύπου, και η πρώτη κρυσταλλική δομή αναφέρθηκε το 2000 (Mitsuhashi *et al.*, 2000). Ο χαρακτηρισμός των ενζύμων αυτών αποκάλυψε έντονες διαφορές από τα ένζυμα των άλλων τύπων. Η δευτεροταγής δομή που φαίνεται να επικρατεί στα β-τύπου ένζυμα είναι η δομή α-έλικας, σε αντίθεση με τις α-τύπου CA στις οποίες επικρατεί δομή β-πτυχωτής επιφάνειας (Johansson & Forsman, 1993). Το γεγονός ότι τα μέλη των β-τύπου CA εμφανίζονται σε διμερή, τετραμερή, εξαμερή ή και οκταμερή διαμόρφωση σημαίνει ότι η βασική μονάδα των ενζύμων είναι ένα διμερές (Kimber & Pai, 2000).

Φυλογενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι στις β-τύπου CA παρατηρείται μεγαλύτερη ποικιλία από ότι στους άλλους τύπους (Smith *et al.*, 1999). Ευθυγράμμιση ακολουθιών έδειξε ότι πέντε μόνο αμινοξικά κατάλοιπα είναι τελείως συντηρημένα (Smith *et al.*, 2000). Οι φυτικές CA σχηματίζουν δύο διακριτούς κλάδους που αντιστοιχούν σε μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά (Smith *et al.*, 1999). Τα ένζυμα των δικοτυλήδονων φυτών φαίνεται να είναι οκταμερή στα οποία δύο τετραμερή ενώνονται με δισουλφιδικές γέφυρες (Bjorkbacka *et al.*, 1997) ενώ τα ένζυμα των μονοκοτυλήδονων φυτών προτάθηκε πως είναι διμερή (Reed & Graham, 1981).

#### 4.1. Μηχανισμός κατάλυσης καρβονικών ανυδρασών τύπου β

Οι δεσμευτές του ψευδαργύρου στις β τύπου καρβονικές ανυδράσες διαφέρουν από αυτούς των α-τύπου καρβονικών ανυδρασών. Κρυσταλλικές δομές των β τύπου CA αποκάλυψαν ότι ο ψευδάργυρος δεσμεύεται σε δύο συντηρημένες κυστεΐνες και μια συντηρημένη ιστιδίνη (Mitsuhashi *et al.*, 2000; Kimber & Pai, 2000; Strop *et al.*, 2001).



Εικόνα 10: Α) 3-D δομή και Β) δομή του ενεργού κέντρου της β-τύπου CA από το *P. sativum*

Στην περίπτωση της β-τύπου CA του *P. sativum*, τα αμινοξικά κατάλοιπα Asp162 και Gln151 συμμετέχουν σε ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου, όπως ακριβώς συμβαίνει με τα αμινοξικά κατάλοιπα Thr199 και Glu106 της α-τύπου CA II. Επομένως, τα αμινοξικά Asp162 και Gln151 των ενζύμων β-τύπου πιστεύεται πως έχουν ένα ρόλο παρόμοιο με τα Thr199 και Glu106 των ενζύμων α-τύπου (Kimber & Pai, 2000). Τα δύο αυτά αμινοξικά κατάλοιπα μαζί με τους τρεις δεσμευτές ψευδαργύρου είναι τελείως συντηρημένα σε όλες τις β-τύπου CA (Smith *et al.*, 2000).

Από την κρυσταλλική δομή του ενζύμου Cab που απομονώθηκε από το *Methanobacterium thermoautotrophicum*, φαίνεται ότι σημαντικό ρόλο στην μεταφορά του πρωτονίου κατά τη διάρκεια της κατάλυσης παίζει ένα συντηρημένο ασπαρτικό. Πρόκειται για το αμινοξικό κατάλοιπο Asp34 το οποίο σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το δεσμευμένο σε ψευδάργυρο μόριο νερού (Strop *et al.*, 2001). Πιθανώς το πρωτόνιο μεταφέρεται από το δεσμευμένο σε ψευδάργυρο μόριο νερού στο αμινοξικό κατάλοιπο Asp34 και στη συνέχεια στο ρυθμιστικό διάλυμα.

Οι δομές των β-τύπου ενζύμων από τα *P. purpureum* και *E. coli* προτείνουν ένα δεύτερο ρόλο για το συντηρημένο ασπαρτικό το οποίο φαίνεται να λειτουργεί ως τέταρτος δεσμευτής του ψευδαργύρου (Mitsuhashi *et al.*, 2000; Cronk *et al.*, 2001). Επειδή τα ένζυμα από τα *P. purpureum* και *E. coli* έδειξαν δραστικότητα πάνω από τις ουδέτερες τιμές pH, προτάθηκε ένα υποθετικό μοντέλο που ενισχύει την άποψη ότι το συντηρημένο ασπαρτικό λειτουργεί ως τέταρτος δεσμευτής του ψευδαργύρου. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, σε pH πάνω από τις ουδέτερες τιμές, το ασπαρτικό-δεσμευτής ανταλλάσσεται με ένα μόριο νερού, ενεργοποιώντας με αυτό τον τρόπο το ένζυμο (Cronk *et al.*, 2001).

## 5. ΚΑΡΒΟΝΙΚΕΣ ΑΝΥΔΡΑΣΕΣ ΤΥΠΟΥ $\gamma$

Οι καρβονικές ανυδράσεις τύπου  $\gamma$  πιστεύεται πως έχουν εξελιχθεί πριν από 3 με 4,5 εκατομμύρια χρόνια (Smith *et al.*, 1999) και προηγούνται εξελικτικά των α-τύπου καρβονικών ανυδρασών. Το μόνο  $\gamma$ -τύπου ένζυμο που έχει χαρακτηριστεί είναι το 'Cam' από το αρχαιοβακτήριο *Methanosarcina thermophila* (Alber & Ferry, 1994). Το ένζυμο 'Cam' είναι ένα ομοτριμερές με δευτεροταγή δομή αριστερόστροφης β-έλικας (Kisker *et al.*, 1996).

### 5.1. Μηχανισμός κατάλυσης των καρβονικών ανυδρασών τύπου $\gamma$

Το σημείο δέσμευσης του μετάλλου αποτελείται από τρία κατάλοιπα ιστιδίνης σε μια τετραεδρική γεωμετρική διαμόρφωση, που μοιάζει με εκείνη των μονομερών α-τύπου (Kisker *et al.*, 1996). Όμως στο ένζυμο 'Cam' οι δύο από τις τρεις ιστιδίνες τοποθετούνται στο ένα

μονομερές (His81, His122), ενώ η τρίτη ιστιδίνη τοποθετείται σε διπλανό μονομερές (His117).



**Εικόνα 11:** 3-D δομή της γ-τύπου CA από το *Methanosarcina thermophila*

Κρυσταλλικές δομές υψηλής ανάλυσης έδειξαν πως και άλλα αμινοξικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου έχουν σημαντικό ρόλο στην κατάλυση (Iverson *et al.*, 2000). Το αμινοξικό κατάλοιπο Gln75 τοποθετείται πολύ κοντά στο άτομο ψευδαργύρου και σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το αμινοξικό κατάλοιπο Asn73 το οποίο με τη σειρά του σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με τη Ser114. Αυτό το δίκτυο δεσμών υδρογόνου δείχνει ότι η πλευρική αλυσίδα του Gln75 είναι αυστηρά κατευθυνόμενη και το οξυγόνο του καρβονυλίου του σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με ένα από τα δύο μόρια νερού που βρίσκονται σε αλληλεπίδραση με το άτομο ψευδαργύρου (Iverson *et al.*, 2000). Είναι πολύ πιθανό το Gln75 να έχει έναν λειτουργικό ρόλο παρόμοιο με εκείνον της Thr199 της α-τύπου CA II.

Επιπλέον το αμινοξικό κατάλοιπο Glu62 βρέθηκε από την κρυσταλλική δομή να τοποθετείται πολύ κοντά στο άτομο ψευδαργύρου, πράγμα που υποδηλώνει κάποιο πιθανό ρόλο στην κατάλυση (Iverson *et al.*, 2000). Αντικατάσταση του Glu62 από άλλα αμινοξέα μείωσαν τις τιμές των κινητικών σταθερών σε κινητικές αναλύσεις αποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο του αμινοξέως αυτού στην ενυδάτωση του CO<sub>2</sub> (Tripp & Ferry, 2000).

Σημαντικό για την κατάλυση αμινοξύ φαίνεται να είναι και το Glu84 το οποίο τοποθετείται δίπλα στο Glu62 και παίρνει δύο διαφορετικές διαμορφώσεις, σε αναλογία με το αμινοξικό κατάλοιπο His64 του α-τύπου CA II ισοενζύμου (Iverson *et al.*, 2000). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει και το αμινοξύ Arg59 το οποίο συμμετέχει σε μια γέφυρα μεταξύ των αμινοξέων Asp61 και Asp76 που τοποθετούνται σε διπλανά μονομερή (Kisker *et al.*, 1996). Η Arg59 φαίνεται να ευθύνεται για την σύνδεση των μονομερών στο τριμερές.

## 6. ΚΑΡΒΟΝΙΚΕΣ ΑΝΥΔΡΑΣΕΣ ΤΥΠΟΥ δ, ε ΚΑΙ ζ

Η πρώτη καρβονική ανυδράση τύπου δ (TWCA1) απομονώθηκε από το *Thalassiosira weissflogii* (Roberts, Lane & Morel, 1997; Tripp *et al.*, 2001). Το ενεργό κέντρο του ενζύμου παρουσιάζει παρόμοια δομή με το ενεργό κέντρο των α και γ τύπου CA, αποτελούμενο από τρεις ιστιδίνες και ένα μόριο νερού τα οποία αλληλεπιδρούν με το μόριο ψευδαργύρου (Cox *et al.*, 2000). Είναι πολύ πιθανό ο μηχανισμός κατάλυσης να είναι παρόμοιος με τους άλλους τύπους καρβονικών ανυδρασών.

Έρευνες BLAST ως προς την αλληλουχία CA του *Thalassiosira weissflogii* αποκάλυψαν την ύπαρξη ομόλογων αλληλουχιών σε μεγάλο εύρος ευκαρυωτικού φυτοπλακτού. Στο *Thalassiosira pseudonana* παρατηρήθηκε μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης όταν μειώθηκε η συγκέντρωση Zn, ενώ παράλληλα μετρήθηκε μειωμένη δραστηριότητα καρβονικής ανυδράσης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης τριών γονιδίων που πιθανώς κωδικοποιούν για δ-τύπου CA τόσο σε συνθήκες μειωμένης συγκέντρωσης Zn όσο και σε συνθήκες μειωμένης συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> (McGinn & Morel, 2008).

Μία δ-τύπου καρβονική ανυδράση εντοπίστηκε επίσης στο *Lingulodinium polyedrum* και εμφανίζεται να παίζει ρόλο στην απόκτηση άνθρακα. Το ένζυμο αυτό σχετίζεται αποκλειστικά με την κυτταρική μεμβράνη και είναι πολύ πιθανό στο να βοηθάει να αυξηθεί η διαθεσιμότητα σε CO<sub>2</sub> στην επιφάνεια των κυττάρων (Lapointe, Mackenzie & Morse, 2008).

Το 2004 είχε προταθεί από τους So *et al.*, η ύπαρξη ενός πέμπτου τύπου καρβονικής ανυδράσης που αντιπρόσωποι της εντοπίζονται σε θαλάσσια κυανοβακτήρια και σε κάποιους χημολιθοαυτότροφους μικροοργανισμούς. Μία πιθανή ε-τύπου καρβονική ανυδράση από το *Halothiobacillus neapolitanus* (CsoS3) εντοπίστηκε στο καρβοξύσωμα και ο ρόλος που της αποδόθηκε ήταν ο εφοδιασμός της Rubisco με CO<sub>2</sub> για να επιτυγχάνεται ικανοποιητική δραστηριότητα δέσμευσης του CO<sub>2</sub> (So *et al.*, 2004). Δύο χρόνια αργότερα, η μελέτη της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης CsoS3 που απομονώθηκε από το καρβοξύσωμα του *Halothiobacillus neapolitanus*, αποκάλυψε ότι το ένζυμο είναι μια παραλλαγή των β-τύπου καρβονικών ανυδρασών, αμφισβητώντας την ύπαρξη των ε-τύπου καρβονικών ανυδρασών (Sawaya *et al.*, 2006).

Κατά τη διάρκεια συνθηκών στις οποίες τα επίπεδα έκφρασης της δ-τύπου TWCA1 του *Thalassiosira weissflogii* είναι χαμηλά, εκφράζεται μια άλλη καρβονική ανυδράση που στο ενεργό της κέντρο δεσμεύεται κάδμιο (Cd) αντί για ψευδάργυρος (Lane & Morel, 2000). Ο χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης έγινε από τους Lane *et al.* το 2005 και ονομάστηκε CDCA. Η πρωτεΐνη αυτή αντιπροσωπεύει ένα νέο τύπο καρβονικών ανυδρασών, τις ζ-τύπου CA. Έρευνες έδειξαν ότι τα ένζυμα αυτά είναι ευρέως διαδεδομένα στο θαλάσσιο φυτοπλακτόν και αρκετά άφθονα στο περιβάλλον. Εντοπίστηκαν πολλά γονίδια που η αμινοξική τους ακολουθία παρουσιάζει περισσότερο από 64% ομοιότητα με την αλληλουχία της πιθανής ζ-



τύπου CA από το *Thalassiosira pseudonana* (Park *et al.*, 2007). Η επικράτηση των ενζύμων που περιέχουν κάδμιο στο ενεργό τους κέντρο, πιθανώς αντανακλά τη χαμηλή συγκέντρωση Zn στο θαλάσσιο περιβάλλον.



**Εικόνα 12:** 3-D δομή της πρωτεΐνης CDCA1 από το *Thalassiosira weissflogii* που στο ενεργό της κέντρο δεσμεύεται κάδμιο (Cd) αντί για ψευδάργυρος

Ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας της CDCA έδειξε ότι η πιθανή θέση πρόσδεσης του καδμίου στο ενεργό κέντρο μοιάζει με εκείνο των β-τύπου καρβονικών ανυδρασών. Η CDCA εύκολα εναλλάσει Cd και Zn στο ενεργό της κέντρο, μια προφανώς μοναδική προσαρμογή στη ζωή στον ωκεανό, που εξηγείται από ένα σταθερό άνοιγμα του σημείου πρόσδεσης του μετάλλου στην περίπτωση απουσίας του μετάλλου (Xu *et al.*, 2008). Δεδομένου του κεντρικού ρόλου των ευκαριωτικών φυκών στο να εξάγουν άνθρακα στα βαθιά νερά, η χρήση του καδμίου σε ένα ένζυμο πολύ σημαντικό για την απόκτηση άνθρακα δηλώνει μια αξιοσημείωτη σύνδεση ανάμεσα στους κύκλους καδμίου και άνθρακα.

## 7. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΑΡΒΟΝΙΚΗΣ ΑΝΥΔΡΑΣΗΣ

### 7.1 Θηλαστικά

Στα θηλαστικά, τα α-τύπου ισοένζυμα έχουν διαφορετικές κινητικές ιδιότητες και εντοπίζονται σε διάφορους ιστούς και κυτταρικά διαμερίσματα (Sly & Hu, 1995; Breton, 2001). Οι ανθρώπινες CA I, II, III και VII εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, η CA V στο μιτοχόνδριο και η CA VI στους σιαλογόνους αδένες. Η CA IV είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που προσδέεται στη μεμβράνη, ενώ οι CA IX, XII και XIV είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Επιπλέον υπάρχουν πρωτεΐνες που φαίνεται να σχετίζονται με τις CA καθώς οι αλληλουχίες τους παρουσιάζουν ομολογία, όμως οι πρωτεΐνες αυτές δεν παρουσιάζουν δράση καρβονικής ανυδράσης.

Η ποικιλομορφία σε ιστούς και ο υποκυτταρικός διαχωρισμός των CA ισοενζύμων των θηλαστικών, αντανακλά την συμμετοχή τους σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες (Sly & Hu,

1995) που περιλαμβάνουν τη ρύθμιση του pH, τη μεταφορά CO<sub>2</sub> και HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, τη μεταφορά ιόντων (Tsuruoka *et al.*, 2001) και την ισορροπία νερού και ηλεκτρολυτών (Dagher *et al.*, 1993). Ο μεταβολικός ρόλος των ενζύμων αυτών περιλαμβάνει σημαντικά στάδια στη βιοσύνθεση των πυριμιδινών, στη γλυκονογένεση και στη λιπογένεση, καθώς όλες αυτές οι διαδικασίες απαιτούν HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> στις αρχικές αντιδράσεις καρβοξυλίωσης.

Η έλλειψη της CA II προκαλεί μια σειρά μεταβολικών ανωμαλιών που μπορούν να επηρεάσουν τα κόκκαλα, τον εγκέφαλο και το συκώτι (Tashian, 1984). Γνωστό είναι το σύνδρομο έλλειψης CA II (Sly *et al.*, 1995) που σχετίζεται με οστεοπόρωση, οξέωση του νεφρικού αγωγού και εγκεφαλική αποτιτάνωση. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι οι CA IX και XII σχετίζονται με κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ογκογένεση (Tureci *et al.*, 1998; Pastorek *et al.*, 1994).

## 7.2 Φυτά

Στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς ο καλύτερα χαρακτηρισμένος φυσιολογικός ρόλος των β-τύπου καρβονικών ανυδρασών είναι να παρέχουν ικανοποιητικά επίπεδα ανόργανου άνθρακα για την αρχική αντίδραση καρβοξυλίωσης που καταλύεται από τη Rubisco (Badger & Price, 1994). Στα φύλλα των C3 φυτών η περισσότερη δραστηριότητα καρβονικής ανυδράσης εντοπίζεται στο στρώμα των χλωροπλαστών. Εκεί θεωρείται ότι επιταχύνει την αφυδάτωση του HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> σε CO<sub>2</sub>, παρέχοντας ένα συνεχή εφοδιασμό σε CO<sub>2</sub> για τη Rubisco κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης (Badger & Price, 1994; Majeau & Coleman, 1994). Στα C4 φυτά, η αρχική αντίδραση καρβοξυλίωσης καταλύεται από το ένζυμο PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase) που χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> αντί για CO<sub>2</sub>. Στα φυτά αυτά, η καρβονική ανυδράση εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του μεσόφυλλου όπου παρέχει HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, απαραίτητο για τη δράση του ενζύμου PEPC (Hatch & Burnell, 1990; Ludwig *et al.*, 1998).

Εκτός από τη φωτοσύνθεση, η καρβονική ανυδράση εμπλέκεται και σε άλλες φυσιολογικές και μεταβολικές διαδικασίες στα ανώτερα φυτά. Ο Atkins το 1974 ανέφερε ότι φυτικός ιστός από φυμάτια διαφόρων ψυχανθών δείχνουν σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα καρβονικής ανυδράσης σε σύγκριση με ιστό από τη ρίζα. Επιπλέον μελέτες επιβεβαίωσαν την παρουσία δραστηριότητας καρβονικής ανυδράσης σε μεγάλο αριθμό ψυχανθών συμπεριλαμβάνοντας τα *Pisum sativum*, *Vicia faba* και *Lupinus angustifolius* (Atkins *et al.*, 2001). Παρόλο που μεταγραφήματα CA έχουν ανιχνευτεί στα φυμάτια της σόγιας (Kavroulakis *et al.*, 2000) και του αλάφα (Coba de la Pena *et al.*, 1997), ο φυσιολογικός ρόλος της CA δεν είναι ακόμα γνωστός. Η σκοτεινή δέσμευση του CO<sub>2</sub> από την PEPC στα φυμάτια των ψυχανθών συμβαίνει σε ρυθμούς παρόμοιους με τα φύλλα των C4 φυτών, αν λάβουμε υπόψη μας το γεγονός ότι η PEPC συσσωρεύεται στα φυμάτια σε ποσοστό 2% της συνολικής διαλυτής πρωτεΐνης (Miller *et al.*, 1987). Το οξαλοξικό που

παράγεται από τη συνδυασμένη δράση της CA και της PEPC θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί είτε για τη σύνθεση οργανικών οξέων που θα χρησιμοποιηθούν από τα βακτηριοειδή ως πηγή άνθρακα και ενέργειας (King *et al.*, 1986), είτε για τη σύνθεση σκελετών άνθρακα που χρειάζονται για την αφομοίωση του συμβιωτικά δεσμευόμενου αζώτου (Vance *et al.*, 1994). Εναλλακτικά, στα ώριμα φυμάτια η έκφραση της CA στο παρέγχυμα των φυματίων θεωρήθηκε ότι σχετίζεται με τον έλεγχο της διάχυσης του O<sub>2</sub>, μέσω της επιτόπου βιοσύνθεσης μηλικού και οσμωρύθμισης (Coba de la Pena *et al.*, 1997). Η καρβονική ανυδράση έχει επίσης εμπλακεί στη βιοσύνθεση λιπιδίων στα πλαστίδια, καθώς η παραγωγή μαλόνυλ-CoA μέσω της δράσης της καρβοξυλάσης ακέτυλ-CoA, απαιτεί ως υπόστρωμα HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Ohlrogge & Jaworski, 1997). cDNA κλώνοι που κωδικοποιούν για λειτουργικές CA και φέρουν πιθανά πεπτίδια οδηγούς για πλαστίδια ανιχνεύτηκαν σε βιβλιοθήκη φυταρίων βαμβακιού που μεγάλωναν σε σκοτάδι (Hoang *et al.*, 1999). Επιπλέον, σε ώριμα έμβρυα αναπτυσσόμενων σπόρων βαμβακιού, σε κυτταροκαλλιέργειες και σε φύλλα γενετικά τροποποιημένων φυτών καπνού, βιοχημική και μοριακή παρεμπόδιση των καρβονικών ανυδρασών των πλαστιδίων είχε ως αποτέλεσμα το μειωμένο ρυθμό σύνθεσης λιπιδίων (Hoang & Chapman, 2002).

Οι α-τύπου καρβονικές ανυδράσες σε ανώτερα φυτά δεν έχουν μελετηθεί το ίδιο καλά με τα θηλαστικά και ο φυσιολογικός τους ρόλος δεν είναι ακόμα γνωστός. Ελάχιστα ένζυμα φυτικής προέλευσης έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής να παρουσιάζουν ομοιότητα με τις α-τύπου CA των θηλαστικών. Μία νεκταρίνη που μοιάζει με διοσκουρίνη (Nectarin III, *NEC3*) από φυτά καπνού φαίνεται να ανήκει στις α-τύπου CA, παρουσιάζει ομοιότητα με την ανθρώπινη CA II και έχει αναφερθεί να παρουσιάζει δράση καρβονικής ανυδράσης (Carter & Thornburg, 2004). Επίσης, αποθηκευτικές πρωτεΐνες (διοσκουρίνες DB2 και DB3) από το *Dioscorea batatas* παρουσιάζουν σε σημαντικό βαθμό ομοιότητα με τις α-τύπου CA των θηλαστικών αλλά δράση καρβονικής ανυδράσης δεν έχει ανιχνευτεί στις πρωτεΐνες αυτές (Gaidamashvili *et al.*, 2004). Στο *Arabidopsis thaliana* φαίνεται να υπάρχουν οκτώ γονίδια που κωδικοποιούν για α-τύπου CA (Fabre *et al.*, 2007). Έχει ελεγχθεί η έκφραση των γονιδίων αυτών και ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός, αλλά δεν έχει γίνει μέχρι στιγμής κάποια μελέτη για τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν.

### 7.3 Προκαρυώτες

Στους προκαρυώτες αντιπροσωπεύονται και οι τρεις γενετικά διακριτοί τύποι καρβονικών ανυδρασών α, β και γ. Παρόλο που οι β και γ τύποι καρβονικών ανυδρασών φαίνεται να κυριαρχούν στους προκαρυώτες, έχουν βρεθεί και γονίδια που κωδικοποιούν για α-τύπου καρβονικές ανυδράσες. Ένα παράδειγμα μιας καλά χαρακτηρισμένης βακτηριακής CA α-τύπου είναι αυτό της *Neisseria gonorrhoeae* (Chirica *et al.*, 1997). Το ένζυμο αυτό πιστεύεται ότι συμμετέχει στη μεταφορά CO<sub>2</sub> κατά μήκος της μεμβράνης.

Ένα άλλο παράδειγμα βακτηριακής α-τύπου CA είναι αυτό του *Helicobacter pylori* (Chirica *et al.*, 2001; Marcus *et al.*, 2005). Πρόκειται για μια περιπλασμική CA η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση του περιπλασμικού pH και είναι απαραίτητη για την επιβίωση του *Helicobacter pylori* στο όξινο περιβάλλον του στομάχου των θηλαστικών. Η επιβίωση των βακτηρίων σε όξινο περιβάλλον μειωνόταν τόσο στην περίπτωση βακτηρίων από τα οποία απουσίαζε η α-τύπου CA όσο και στην περίπτωση παρουσίας του αναστολέα των καρβονικών ανυδρασών ακεταζολαμίδιο.

Ένας παρόμοιος μηχανισμός ρύθμισης του περιπλασμικού pH φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση της α-τύπου CA του αζωτοδεσμευτικού βακτηρίου *Mesorhizobium loti* (Kalloniati *et al.*, 2009). Η παρουσία της α-τύπου CA στον όξινο περιβακτηριακό χώρο φαίνεται να λειτουργεί ως πηγή πρωτονίων και να διευκολύνει την μετατροπή του  $\text{NH}_3$  σε  $\text{NH}_4^+$  και κατά συνέπεια τη μεταφορά του κατά μήκος της περιβακτηριακής μεμβράνης.

Από το φυλογενετικό δέντρο των αλληλουχιών που κωδικοποιούν για εξωκυττάριας καρβονικές ανυδράσες προκύπτει ότι η αρχέγονη καρβονική ανυδράση ήταν προσδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη ή βρισκόταν στο εξωτερικό της μεμβράνης και ότι οι ενδοκυττάριας κυτοπλασματικές μορφές εξελίχθηκαν αργότερα. Όλες οι προκαρυωτικές CA φαίνεται να έχουν εξελιχθεί από την αρχική αυτή εξωκυττάρια μορφή (Smith & Ferry, 2000).

Τα β-τύπου ένζυμα είναι ευρέως διαδεδομένα στους προκαρυώτες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα β-τύπου καρβονικών ανυδρασών είναι η μιτοχονδριακή CA του *C. reinhardtii* (Ericsson *et al.*, 1996), η *CynT* από το *E. coli* (Guilloton *et al.*, 1992) και η *Cab* από το μεθανοαρχαίον *M. thermoautotrophicum* (Smith & Ferry, 1999). Κάποιοι προκαρυώτες διαθέτουν πολλές αλληλουχίες β-τύπου καρβονικών ανυδρασών. Για παράδειγμα, τα *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium avium* και *Streptomyces coelicolor* περιέχουν από δύο αλληλουχίες το καθένα, ενώ τα *Mycobacterium tuberculosis* και *Pseudomonas aeruginosa* περιέχουν από τρεις (Smith & Ferry, 2000).

Η πρώτη β-τύπου καρβονική ανυδράση που εντοπίστηκε στους προκαρυώτες ήταν το προϊόν του γονιδίου *cynT* από το *E. coli* (Guilloton *et al.*, 1992). Πρόκειται για ένα τετραμερές το οποίο τοποθετείται στο κυτταρόπλασμα (Sung & Fuchs, 1988). Ένας ρόλος που του έχει αποδοθεί είναι ότι καταλύει την ενυδάτωση του  $\text{CO}_2$  το οποίο παράγεται από τη δράση ενός άλλου ενζύμου, της κυανάσης. Το παραγόμενο  $\text{HCO}_3^-$  είναι απαραίτητο για την περαιτέρω αποδόμηση του μεθανίου από το ένζυμο κυανάση, το οποίο αποτελεί πηγή αζώτου για την ανάπτυξη των κυττάρων, ή για άλλες μεταβολικές διεργασίες (Guilloton *et al.*, 1993).

Ο πιο χαρακτηριστικός αντιπρόσωπος των γ-τύπου καρβονικών ανυδρασών στους προκαρυώτες είναι το ένζυμο *Cam* από το *M. thermophila* (Alber & Ferry, 1994) που πιθανώς τοποθετείται στο εξωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης. Η *Cam* φαίνεται να παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του *M. thermophila* σε υπόστρωμα οξικού οξέως (Alber & Ferry, 1994; Alber & Ferry, 1996). Όταν χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά θρεπτικά

υποστρώματα για το *M. thermophila* η ποσότητα της Cam που ανιχνεύτηκε ήταν σχεδόν 10 φορές λιγότερη από εκείνη που είχε ανιχνευτεί σε οξικό. Είναι πιθανό η Cam να απομακρύνει το κυτταροπλασματικό CO<sub>2</sub> μετατρέποντάς το σε HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ή να βοηθά στη μεταφορά του οξικού εντός του κυττάρου καθώς το παραγόμενο H<sup>+</sup> από την ενυδάτωση του CO<sub>2</sub> χρησιμοποιείται στο μηχανισμό συµμεταφοράς H<sup>+</sup>/οξικού.

Πρωτεΐνες που παρουσιάζουν οµολογία µε την Cam, είναι η caiE του *E. coli* και η phaM του *P. putida*. Κάποιοι προκαρυώτες περιέχουν πολλαπλές γ-τύπου CA αλληλουχίες. Το *E. coli* έχει δύο και το *P. aeruginosa* έχει τρεις. Οι γ-τύπου CA φαίνεται να είναι αρκετά αρχαίας προέλευσης ένζυµα (4,2 εκατομμύρια χρόνια πριν). Καρβονικές ανυδράσες από Αρχαία και Βακτήρια πιστεύεται πως προέρχονται από ένα κοινό πρόγονο, πράγµα που υποδηλώνει ότι τα ένζυµα αυτά προϋπήρχαν του διαχωρισµού ανάµεσα στα Αρχαία και Βακτήρια (Smith & Ferry, 2000).

Γενικοί ρόλοι που έχουν αποδοθεί στις καρβονικές ανυδράσες είναι να μεταφέρουν CO<sub>2</sub> / HCO<sub>3</sub> και να παρέχουν CO<sub>2</sub> / HCO<sub>3</sub> σε βιοχηµικές αντιδράσεις. Ένας µεγάλος αριθµός ενζύµων µη-φωτοσυνθετικών προκαρυωτών καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες οι καρβονικές ανυδράσες παρέχουν CO<sub>2</sub> / HCO<sub>3</sub> στην περιοχή του ενεργού κέντρου ή απομακρύνουν CO<sub>2</sub> / HCO<sub>3</sub> για να βελτιώσουν την ενεργητική της αντίδρασης. Η τελευταία περίπτωση θα µπορούσε να είναι σηµαντική σε αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης οι οποίες συνδέονται µε αναγέννηση ενέργειας. Επιπλέον, ένα σηµαντικό ποσό δέσµευσης του CO<sub>2</sub> συμβαίνει σε µεγάλο εύρος µη-φωτοσυνθετικών προκαρυωτών όπου η καρβονική ανυδράση αναµένεται να παίζει σηµαντικό ρόλο στη µεταφορά και τη συγκέντρωση CO<sub>2</sub> εντός του κυττάρου. Η καρβονική ανυδράση µπορεί να είναι σηµαντική στο να αλληλοµετατρέπει τα CO<sub>2</sub> / HCO<sub>3</sub> και να διασφαλίζει µια κατάλληλη συγκέντρωση πλησίον του ενζύµου (Smith & Ferry, 2000).

#### 7.4 Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια υπάρχουν στη γη ως φωτοσυνθετικά βακτήρια για τουλάχιστον 2,7 εκατομμύρια χρόνια (Buick, 1992). Κατά τη διάρκεια αυτών των χρόνων, οι αλλαγές στην ατµόσφαιρα όπου το CO<sub>2</sub> μειωνόταν και το O<sub>2</sub> αυξανόταν, άσκησαν επάνω τους πίεση επιλογής. Για το λόγο αυτό, τα κυανοβακτήρια ανέπτυξαν ένα µηχανισµό συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> (CCM) για να αποκτήσουν αρκετό ανόργανο άνθρακα, απαραίτητο για τη φωτοσύνθεση και κατά συνέπεια να βελτιώσουν την αντίδραση καρβοξυλίωσης από τη Rubisco (Badger & Price, 1992; Price *et al.*, 1998; Kaplan & Reinhold, 1999).

Οι καρβονικές ανυδράσες παίζουν κεντρικό ρόλο στο µηχανισµό CCM και έχει βρεθεί δράση τους τόσο στην πλασµατική µεµβράνη όσο και στο καρβοξύσωµα (Bedu & Joset, 1991; Price *et al.*, 1992). Η δράση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> που σχετίζεται µε την πλασµατική µεµβράνη είναι σχεδόν µισή από τη δράση που παρατηρείται στο καρβοξύσωµα (Price &

Badger, 1989). Τα καρβοξυσώματα περιέχουν το μεγαλύτερο μέρος (αν όχι όλο) της Rubisco και χρησιμεύουν ως εμπόδιο για να μη διαφύγει το CO<sub>2</sub> από το κύτταρο. Το HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> του κυτταροπλάσματος διαχέεται εντός του καρβοξυσώματος όπου η καρβονική ανυδράση το μετατρέπει σε CO<sub>2</sub> για να χρησιμοποιηθεί από τη Rubisco. Η καρβονική ανυδράση που εντοπίστηκε στη μεμβράνη πιστεύεται πως συμβάλλει στη μεταφορά, πιθανώς μετατρέποντας το CO<sub>2</sub> σε HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Price & Badger, 1989).

Στα κυανοβακτήρια έχουν ανιχνευτεί και οι τρεις τύποι α, β και γ καρβονικών ανυδρασών. Γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με αμινοξική ακολουθία που έχει ομοιότητα με τα α-τύπου ισοένζυμα από τον άνθρωπο απομονώθηκαν τόσο από το *Anabaena* στέλεχος PCC7120 όσο και από *Synechococcus* στέλεχος PCC7942 (Soltes-Rak *et al.*, 1997). Υψηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών ανιχνεύτηκαν σε κύτταρα τα οποία μεγάλωναν σε αυξημένα επίπεδα CO<sub>2</sub>. Μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη EcaA του *Anabaena* είναι πολύ πιθανό να τοποθετείται στον περιπλαστικό χώρο και να σχετίζεται με το κυτταρικό τοίχωμα ή την κυτταρική μεμβράνη. Είναι πολύ πιθανό οι πρωτεΐνες αυτές να παίζουν ρόλο στη μεταφορά CO<sub>2</sub> ή HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Soltes-Rak *et al.*, 1997) είτε να λειτουργούν ως αισθητήρες του επιπέδου συσσώρευσης CO<sub>2</sub> στο περιβάλλον (So *et al.*, 1998).

Από το *Synechococcus* στέλεχος PCC7942 απομονώθηκε επίσης ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με αμινοξική ακολουθία που έχει ομοιότητα με τη β-τύπου CA από το *E. coli* (Fukuzawa *et al.*, 1992). Το προϊόν του γονιδίου αυτού, που ονομάστηκε *isfA*, φαίνεται να εντοπίζεται στο καρβοξύσωμα και να παρέχει CO<sub>2</sub> στο ένζυμο Rubisco. Ένα άλλο γονίδιο που παρουσιάζει υψηλή ομοιότητα με το *isfA* του *Synechococcus*, είναι το *ccaA* που απομονώθηκε από το *Synechocystis* στέλεχος PCC6803 (So & Espie, 1998). Το προϊόν του γονιδίου αυτού φαίνεται επίσης να τοποθετείται στο καρβοξύσωμα και να έχει παρόμοιο ρόλο με το *isfA*. Στο *Synechocystis* εντοπίστηκε και ένα δεύτερο γονίδιο, το *ecaB*, που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη η οποία παρουσιάζει ομοιότητα με τη β-τύπου CA του *E. coli* (So & Espie, 1998). Μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή είτε εντοπίζεται στον περιπλαστικό χώρο ή σχετίζεται με την κυτταρική μεμβράνη. Είναι πιθανό η β-τύπου EcaB του *Synechocystis* να έχει παρόμοιο ρόλο με την α-τύπου EcaA του *Synechococcus*. Επομένως, δύο διαφορετικά γένη κυανοβακτηρίων χρησιμοποιούν διαφορετικού τύπου καρβονικές ανυδράσες για την ίδια λειτουργία.

Στο *Synechococcus* στέλεχος PCC7942 έχει εντοπιστεί και ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με αμινοξική ακολουθία που έχει ομοιότητα με τη γ-τύπου CA Cam από το *M. thermophila* (Price *et al.*, 1993). Το γονίδιο αυτό *ccmM* εντοπίζεται στο καρβοξύσωμα και ο ρόλος του μπορεί να είναι δομικός, συμμετέχοντας στη σωστή διαμόρφωση του καρβοξυσώματος αλλά και λειτουργικός, προλαμβάνοντας διαρροή του CO<sub>2</sub> από το καρβοξύσωμα.

## 7.5. Μύκητες

Η πρώτη καρβονική ανυδράση από μύκητες ήταν η Nce103 που ανακαλύφθηκε στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* και ανήκει στις β-τύπου CA. Αποδείχτηκε να είναι απαραίτητη σε αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης και η μεταγραφική της ρύθμιση καθορίζεται από τη συγκέντρωση ανόργανου άνθρακα. Μεταλλαγμένη ζύμη ως προς το γονίδιο *nce103* έδειξε ρυθμό ανάπτυξης παρόμοιο με αυτό της αγρίου τύπου ζύμης, μόνο όταν εκτέθηκε σε συγκέντρωση 5% CO<sub>2</sub> (Gotz *et al.*, 1999; Amoroso *et al.*, 2005).

Επιπλέον, ένα γονίδιο (*nce103*) που κωδικοποιεί για μια β τύπου CA βρέθηκε στην παθογόνο ζύμη *Candida albicans* και δύο ακόμη γονίδια (*can1* και *can2*) στον παθογόνο βασιδιομύκητα *Cryptococcus neoformans* (Bahn *et al.*, 2005; Klengel *et al.*, 2005). Διαγραφή του γονιδίου *nce103* του *C. albicans* κατέληξε σε θανατηφόρο φαινότυπο κάτω από συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub>, ενώ στο *C. neoformans* μόνο το γονίδιο *can2*, που κωδικοποιεί για την κυρίαρχη CA, αποδείχτηκε να είναι απαραίτητο σε αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης. Ετερόλογη έκφραση του γονιδίου *can2* από το *C. neoformans* αποκατέστησε πλήρως το φαινότυπο υψηλής απαίτησης σε CO<sub>2</sub> σε μεταλλαγμένα στελέχη *S. cerevisiae* και *E. coli* (Bahn *et al.*, 2005; Mogensen *et al.*, 2006). Σε αντίθεση με το *S. cerevisiae* που η έκφραση της CA επάγεται σε χαμηλή συγκέντρωση CO<sub>2</sub> (Amoroso *et al.*, 2005), η Nce103 του *C. albicans* και η Can2 του *C. neoformans* φαίνεται να εκφράζονται διαρκώς (Bahn *et al.*, 2005; Klengel *et al.*, 2005).

Τα γενώματα των βασιδιομυκήτων και των ημι-ασκομυκήτων περιέχουν μόνο β-τύπου CAs, ενώ οι νηματώδεις ασκομύκητες περιέχουν επίσης γονίδια που κωδικοποιούν για α-τύπου CAs. Τρεις ισότυποι που ανήκουν στις β-τύπου CAs και τουλάχιστον μία α-τύπου CA βρίσκονται συχνά στο γένωμα των ασκομυκήτων, ενώ οι περισσότεροι ημι-ασκομύκητες περιέχουν μόνο μία β-τύπου CA (Elleuche & Poggeler, 2009). Μέχρι στιγμής μόνο β-τύπου καρβονικές ανυδράσες έχουν χαρακτηριστεί στους μύκητες.

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης διπλασιασμοί και ελλείψεις γονιδίων φαίνεται να προκάλεσαν την ποικιλομορφία που παρατηρείται στις CAs των ασκομυκήτων. Ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μια β-CA διπλασιάστηκε, καταλήγοντας σε δύο στενά συγγενικούς ισότυπους, εκ των οποίων ο ένας έφερε αμινοτελική αλληλουχία για υποκυτταρική τοποθέτηση στο μιτοχόνδριο. Η απόκτηση αυτής της αμινοτελικής αλληλουχίας ήταν ένα γεγονός που συνέβη μετά το διπλασιασμό του γονιδίου και μετά τον εξελικτικό διαχωρισμό των Sordariales και Eurotiales (Elleuche & Poggeler, 2009).

Στο *Sordaria macrospora* ανιχνεύτηκαν τρία γονίδια που κωδικοποιούν για β-CAs (*cas1*, *cas2* και *cas3*). Μελέτες υποκυτταρικής τοποθέτησης αποκάλυψαν ότι η CAS2 μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο, ενώ οι CAS1 και CAS3 είναι κυτοπλασματικές. Γενετική ανάλυση από τα νοκάουτ στελέχη, *Δcas1*, *Δcas2*, και *Δcas3*, έδειξε ότι η CAS2 είναι

πιθανότατα η κυρίαρχη CA στο *S. macrospora*, και συμμετέχει στην ανάπτυξη και τη βλάστηση των ασκοσπορίων (Elleuche & Roggeler, 2009b).



# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---



## 1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

### 1.1. Σύμφωνα με τη μέθοδο του βρασμού

Η μέθοδος βασίζεται στην τεχνική που ανέπτυξαν οι Holmes & Quigley το 1981.

5 ml θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό, εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E. coli*, τα οποία έχουν μετασηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C με συνεχή ανακίνηση για 12 με 16 ώρες.

- 1,5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 6.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 150 μl διαλύματος STET. Προσθέτουμε 1μl λυσοζύμη (50mg/ml) και αναδεύουμε.
- Επώαση του δείγματος στους 100°C για 45 δευτερόλεπτα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το ίζημα απομακρύνεται με την βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας και το πλασμιδιακό DNA, που βρίσκεται στο υπερκείμενο, κατακρημνίζεται με την προσθήκη 180μl ισοπροπανόλης.
- Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για την συλλογή του πλασμιδιακού DNA.
- Ακολουθεί ξέπλυμα με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση σε 20μl ρυθμιστικού διαλύματος TE ή ddH<sub>2</sub>O.

## 2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

### 2.1. Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος του μεγέθους των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αγαρόζης με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, μια χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και φθορίζει υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η αναλυτική ικανότητα της πηκτής αγαρόζης είναι ανάλογη της περιεκτικότητάς της σε αγαρόζη. Η συνήθης συγκέντρωση κυμαίνεται από 0.7%-2% αγαρόζη. Για την πιστοποίηση του μεγέθους χρησιμοποιείται μάρτυρας DNA γνωστού μοριακού βάρους.

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε **1x TAE**.

- Θέρμανση του μείγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αгарόζη και το διάλυμα να γίνει διάφανο.
- Προσθήκη διαλύματος **βρωμιούχου αιθιδίου** σε τελική συγκέντρωση 0.005% v/v.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά την πήξη, απομακρύνεται η χτένα και προστίθεται στη συσκευή κατάλληλος όγκος διαλύματος 1x TAE που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης.
- Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται κατάλληλη ποσότητα **διαλύματος φόρτωσης**.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120V, ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού και την περιεκτικότητά της σε αгарόζη.

## 2.2. Απομόνωση DNA υψηλής καθαρότητας από πηκτή αгарόζης

- Το δείγμα αναλύεται ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 0.8-2%.
- Όταν η ζώνη που πρόκειται να απομονωθεί έχει διαχωριστεί ικανοποιητικά από τις υπόλοιπες, αφαιρείται με τη χρήση κοπιδίου.
- Για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκε η στήλη καθαρισμού QuickSpin της εταιρίας Qiagen ακολουθώντας το QIAquick Gel Extraction Kit Protocol.

## 2.3. Αντίδραση ενοποίησης τμημάτων DNA

Η αντίδραση ενοποίησης είναι μια αντίδραση κατά την οποία δίκλινα μόρια DNA, με κολλώδη (5' ή 3' εξέχοντα άκρα) ή τυφλά άκρα ενώνονται μεταξύ τους.

Ο πλασμιδιακός φορέας και το τμήμα DNA προς ενοποίηση απομονώνονται και καθαρίζονται. Η συνήθης αναλογία άκρων πλασμιδιακού φορέα προς ένθετο DNA είναι 1:3. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι συνήθως 20μl.

- Σε φιαλίδιο erpendorf τοποθετείται κατάλληλη ποσότητα DNA από τον πλασμιδιακό φορέα και από το προς υποκλωνοποίηση ένθετο, σε μέγιστο τελικό όγκο 17μl.
- Προσθήκη 2μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης
- Προσθήκη 1μl T4 DNA λιγάσης (1 unit/μl) (Promega)
- Το δείγμα επωάζεται στους 4<sup>0</sup>C για 14-16 ώρες

Στην περίπτωση ενοποίησης κομματιών με τυφλά άκρα, στην αντίδραση ενοποίησης χρησιμοποιείται μεγαλύτερη ποσότητα T4 DNA λιγάσης και η συνιστώμενη θερμοκρασία επώασης είναι οι 25<sup>0</sup> C.

#### 2.4. Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Σε φιαλίδιο erpendorf προστίθενται κατάλληλος όγκος ddH<sub>2</sub>O, 1/10 του όγκου του κατάλληλου 10x ρυθμιστικού διαλύματος ανάλογα με το ένζυμο, 1/10 του όγκου 10x BSA (Bovine Serum Albumin) εάν απαιτείται, κατάλληλη ποσότητα DNA και τέλος το ένζυμο περιορισμού.

10x ρυθμιστικό διάλυμα, τελικό ποσοστό	10%
10x BSA (όπου απαιτείται)	
Δείγμα DNA	≤80%
Ένζυμο περιορισμού	≤10%
ddH <sub>2</sub> O	μέχρι 100%

Ανάμειξη του δείγματος και επώαση 1-12 ώρες στους 37°C. Η άριστη θερμοκρασία δράσης διαφέρει μεταξύ των ενζύμων περιορισμού, αλλά για τα περισσότερα η άριστη θερμοκρασία είναι 37°C.

#### 2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση ακολουθιών DNA. Ο πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών του DNA γίνεται με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Τα απαραίτητα συστατικά μιας αντίδρασης PCR είναι:

- Το δίκλωνο μόριο DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε.
- Ένα ζεύγος κατάλληλων εκκινητών που υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA και προσδιορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής (0,1-1μM).
- Μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (20-25 units/ml),
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (200μM από το καθένα) και
- Ιόντα Mg<sup>+2</sup>

Μια τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει σε πρώτη φάση την αποδιάταξη του DNA στόχου σε υψηλή θερμοκρασία. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας και υβριδισμός των εκκινητών στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες. Στην συνέχεια αυξάνουμε την θερμοκρασία για να γίνει η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων από την πολυμεράση. Οι τρεις αυτές διαδικασίες επαναλαμβάνονται από 20 έως 30 φορές με αποτέλεσμα η αλληλουχία στόχος να πολλαπλασιάζεται εκθετικά.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των κωδικών περιοχών των γονιδίων που κωδικοποιούν για καρβονικές ανυδράσες στο φυτό *L. japonicus* καθώς και για την δημιουργία κατάλληλων άκρων που επιτρέπουν την

κλωνοποίησή τους στον φορέα έκφρασης. Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκαν κλώνοι που προέρχονταν από cDNA βιβλιοθήκη φυματίων. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε, DyNAzyme II (FINNZYMES), παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό λαθών κατά την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA.

Η αντίδραση πολυμεράσης που πραγματοποιήθηκε είχε ως εξής:

Αντιδραστήρια PCR	Πυκνό διάλυμα	όγκος	Τελική συγκέντρωση
Μήτρα DNA	-	-	10ng
Εκκινητής 1	30μM	1μl	0,6μM
Εκκινητής 2	30μM	1μl	0,6μM
Μείγμα dNTP's	10mM	1μl	200μM
Ρυθμιστικό διάλυμα	10X	5μl	1X
DyNAzyme II	1unit/μl	1μl	1 unit
ddH <sub>2</sub> O	-	εώς 50μl	-

Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που ακολουθήθηκε είχε την μορφή:

Συνθήκες ενίσχυσης	
Αρχική αποδιάταξη	94 <sup>0</sup> C για 3 λεπτά
Αποδιάταξη	94 <sup>0</sup> C για 1 λεπτό
Σύνδεση εκκινητή	48 <sup>0</sup> C για 1 λεπτό
Επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C για 1 λεπτό
	αριθμός κύκλων 5
Αποδιάταξη	94 <sup>0</sup> C για 1 λεπτό
Σύνδεση εκκινητή	58 <sup>0</sup> C για 1 λεπτό
Επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C για 1 λεπτό
	αριθμός κύκλων 30
	72 <sup>0</sup> C για 10 λεπτά

Μετά από κάθε αντίδραση PCR ακολουθούσε καθαρισμός των δειγμάτων σύμφωνα με το QIAquick PCR Purification kit της QIAGEN.

### 3. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ *ESCHERICHIA COLI*

#### 3.1. Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασχηματισμό

Τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων ήταν τα XL1 Blue, BL21(DE3) και C43(DE3).

- 10ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό εμβολιάζονται με μεμονωμένη αποικία *E. coli* και επωάζονται για περίπου 18 ώρες στους 37°C, με συνεχή ανακίνηση.
- 2ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C, με συνεχή ανακίνηση έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι  $O.D._{600}=0,2-0,3$ .
- Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται με 50ml παγωμένου διαλύματος 0,1M  $MgCl_2$ .
- Η επαναδιάλυση γίνεται πάντα με ανακίνηση μέσα σε πάγο ώστε τα κύτταρα να παραμένουν παγωμένα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα που σχηματίζεται επαναδιαλύεται σε 25ml παγωμένου διαλύματος 0,1M  $CaCl_2$  και αφήνεται στον πάγο για 20 λεπτά.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C και επαναδιαλύονται σε 10 ml παγωμένου διαλύματος 0,1M  $CaCl_2$ .
- Τέλος προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% v/v και γίνεται απαλή ανάμειξη.
- Τα ικανά κύτταρα αποθηκεύονται σε έτοιμα προς χρήση κλάσματα των 100μl, σε σωλήνες erpendorf και διατηρούνται στους -80°C.

#### 3.2. Μετασχηματισμός ικανών κυττάρων *E. coli*

- Σε σωλήνα erpendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 100μl ικανά προς μετασχηματισμό κύτταρα *E. coli*.
- Αφού τα κύτταρα ξεπαγώσουν, προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακό DNA σε όγκο που δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των κυττάρων που χρησιμοποιούνται.
- Το μείγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ στους 42°C για 1-2 λεπτά.

- Προστίθενται 200 μl θρεπτικού διαλύματος LB και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 1 ώρα.
- Τα κύτταρα απλώνονται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.
- Ακολουθεί επώαση στους 37°C για περίπου 18 ώρες.

#### 4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ *ESCHERICHIA COLI* ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥΣ

##### 4.1. Έλεγχος βακτηριακών καλλιιεργειών για την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

- 5ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί το αντιβιοτικό καναμυκίνη (25μg/ml) εμβολιάζονται με μια αποικία μετασχηματισμένων *E. coli* που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και επωάζονται για περίπου 14 ώρες στους 37°C, με συνεχή ανακίνηση.
- 1,5ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 30ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB (καναμυκίνη 25μg/ml). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C, με συνεχή ανακίνηση έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι  $O.D._{600}=0,6$ .
- Δείγμα 1ml από την καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 50μl ddH<sub>2</sub>O
- Προσθέτονται 50μl **Sample buffer**, ακολουθεί επώαση στους 100°C για 5 λεπτά, σύντομη φυγοκέντρηση και αποθήκευση του δείγματος στους -20°C
- Στην υπόλοιπη καλλιέργεια, προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5mM.
- Η καλλιέργεια συνεχίζει να αναπτύσσεται στους 37°C, με συνεχή ανακίνηση για 5 ώρες.
- Δείγμα 1ml από την καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf και ακολουθείται η ίδια διαδικασία με πριν
- Η υπόλοιπη καλλιέργεια τοποθετείται στον πάγο και ακολουθεί φυγοκέντρησή της στις 6.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά, στους 4°C
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 500μl **διαλύματος λύσης**
- Ακολουθεί σπάσιμο των κυττάρων με υπέρηχους και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά, στους 4°C.



- Συλλέγεται το υπερκείμενο που περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες των κυττάρων.
- Σε 100μl διαλυτών πρωτεϊνών προσθέτονται 100μl Sample buffer, ακολουθεί επώαση στους 100 °C για 5 λεπτά, σύντομη φυγοκέντρωση και φύλαξη των δειγμάτων στους -20°C
- Τα κυτταρικά θραύσματα επαναδιαλύονται σε 500μl διαλύματος 50mM Tris-HCl pH.8 / 8M ουρία.
- Σε 100μl του παραπάνω μείγματος προσθέτονται 100μl Sample buffer, ακολουθεί επώαση στους 100°C για 5 λεπτά, σύντομη φυγοκέντρωση και φύλαξη των δειγμάτων στους -20°C
- Η έκφραση και παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ελέγχεται με την ανάλυση όλων των παραπάνω δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

#### 4.2. Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Οι πρωτεΐνες με θέρμανσή τους με το απορρυπαντικό δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS), παρουσία ενός ισχυρού αναγωγικού παράγοντα όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη αποδιατάσσονται στις πολυπεπτιδικές τους αλυσίδες και όλες αποκτούν αρνητικό φορτίο. Επειδή ο αριθμός των μορίων SDS που προσδένονται σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα είναι σχεδόν ανάλογος με το μοριακό της βάρος ο διαχωρισμός τους γίνεται βάση του μοριακού τους μεγέθους. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε ακρυλαμίδη.

Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες (σε ml) που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και της πηκτής επιστοιβάσης.

	Πηκτή διαχωρισμού (30 ml)				Πηκτή επιστοιβάσης (10ml)
	7.5%	10%	15%	20%	
30% Ακρυλαμίδη	7.5	10	15	20	1.30
1% δις-Ακρυλαμίδη	5.20	3.90	2.60	1.90	1.00
3M Tris pH:8,6	3.75	3.75	3.75	3.75	-
1M Tris pH:6,8	-	-	-	-	1.25
10% SDS	0.30	0.30	0.30	0.30	0.10
dH <sub>2</sub> O	13.09	11.90	8.19	3.84	6.24
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
10% APS	0.15	0.15	0.15	0.15	0.10

Τα παραπάνω υλικά αναμειγνύονται με τη σειρά που αναγράφονται. Στο τέλος και σχεδόν ταυτόχρονα προσθέτονται το TEMED και το APS. Η τετραμεθυλαινο-διαμίνη (TEMED) επιταχύνει τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης με την *N,N'*-μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδη και το υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) παρέχει τις ελεύθερες ρίζες που είναι

απαραίτητες για τον πολυμερισμό. Το μείγμα τοποθετείται στο κενό ανάμεσα στα τζάμια της συσκευής και αφήνεται να πολυμεριστεί για τουλάχιστον 1 ώρα.

Αφότου πολυμεριστεί η κυρίως πηκτή διαχωρισμού, με τον ίδιο τρόπο παρασκευάζεται η πηκτή επιστοίβασης και τοποθετείται ανάμεσα στα τζάμια. Αφού τοποθετήσουμε τη χτένα, η πηκτή αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου μισή ώρα.

Μετά τον πολυμερισμό και της πηκτής επιστοίβασης η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στην συσκευή προστίθεται **1X ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης** και αφαιρείται προσεκτικά η χτένα.

Τα πρωτεϊνικά δείγματα πριν την εφαρμογή τους στην πηκτή, αναμειγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος 2X Sample Buffer, ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 100°C για 5 λεπτά και φυγοκέντρησή τους στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται με 8Volts/cm όσο βρίσκονται στη πηκτή επιστοίβασης και με 15Volts/cm στην πηκτή διαχωρισμού. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εμβαπτίζεται σε **διάλυμα χρώσης** για 30 λεπτά στους 60°C με ελαφρά ανακίνηση. Στη συνέχεια ακολουθεί αποχρωματισμός της πηκτής με εμβάπτισή της σε **διάλυμα αποχρωματισμού 1** σε θερμοκρασία δωματίου, με ελαφρά ανακίνηση, για δύο ώρες. Το διάλυμα αποχρωματισμού αντικαθίσταται με νέο ανά 1 ώρα. Μετά το πέρας των 2 ωρών μεταφέρεται σε **διάλυμα αποχρωματισμού 2**, όπου και διατηρείται.

#### 4.3 Απομόνωση ανασυνδρασμένων πολυπεπτιδίων με χρωματογραφία συγγένειας

- 30 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί το αντιβιοτικό καναμυκίνη (25μg/ml) εμβολιάζονται με μονή αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων *E. coli* που φέρουν το ανασυνδρασμένο πλασμίδιο και επωάζονται για περίπου 15 ώρες στους 37°C, με συνεχή ανακίνηση.
- 20 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 400 ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB (στο οποίο έχει προστεθεί καναμυκίνη 25 μg/ml). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 23°C, με συνεχή ανακίνηση έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι  $O.D._{600}=0,6$ .
- Όταν  $O.D._{600}=0,6$ , προστίθονται IPTG και  $ZnSO_4$  σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM.
- Η καλλιέργεια συνεχίζει να αναπτύσσεται στους 23°C, με συνεχή ανακίνηση για 4 ώρες.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρωση στις 4.000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο.
- Επαναδιάλυση των κυττάρων με 2-5 ml, διαλύματος λύσης ανά gr κυττάρων
- Προστίθεται λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.

- Λύση των κυττάρων με υπέρηχους (6 φορές για 10sec στα 200-300Watt με ενδιάμεση παύση 10 sec).
- Φυγοκέντρωση στις 10.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά, στους 4°C.
- Συλλέγεται προσεκτικά το υπερκείμενο
- Στο υπερκείμενο προστίθεται 0.5ml 50% Ni-NTA. Επώαση υπό συνεχή ήπια ανακίνηση στους 4°C για 1 ώρα.
- Το παραπάνω δείγμα τοποθετείται σε ειδική στήλη χρωματογραφίας
- Το διάλυμα που διαπερνά την στήλη συλλέγεται.
- Ακολουθεί καθαρισμός της στήλης αρχικά με τετραπλάσιο όγκο στήλης **διαλύματος ξεπλύματος** που περιέχει 20mM ιμιδαζολίου και στη συνέχεια με τετραπλάσιο όγκο στήλης διαλύματος ξεπλύματος που περιέχει 50mM ιμιδαζολίου.
- Ακολουθεί έκλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από την στήλη με 0,25 ml **διαλύματος έκλυσης**, επαναλαμβάνουμε τέσσερις φορές.

#### 4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα όταν αυτή αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465nm ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595nm. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη για πρωτεϊνικά δείγματα των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από περίπου 0,04mg/ml έως 0,20mg/ml (40-200μg/ml).

Για τον προσδιορισμό άγνωστου δείγματος πρωτεΐνης προσθέτουμε σε κυβέτα 950μl **διαλύματος χρωστικής** και 50μl διαλύματος πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε στην κυβέτα να υπάρχουν 2-10 μg πρωτεΐνης. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος για 20-35 min και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595nm. Αναφορά για τις μετρήσεις, αποτελεί η απορρόφηση που παίρνεται από ένα δείγμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από πρωτεΐνη. Εφαρμόζοντας τον τύπο  $ABS = \epsilon \cdot d \cdot c$ , όπου ABS η απορρόφηση και  $\epsilon$  ο συντελεστής απόσβεσης, υπολογίζεται η συγκέντρωση c του δείγματος πρωτεΐνης.

Για τον υπολογισμό του συντελεστή απόσβεσης  $\epsilon$ , δημιουργήθηκε μια καμπύλη αναφοράς με τη χρήση διαφόρων γνωστών ποσοτήτων της πρωτεΐνης BSA. Πάρθηκαν μετρήσεις απορρόφησης στις διάφορες συγκεντρώσεις BSA και από τα αποτελέσματα σχεδιάστηκε η καμπύλη αναφοράς από την κλίση της οποίας προέκυψε ο συντελεστής απόσβεσης  $\epsilon$ .

#### 4.5. Διαπίδυση

Τα κλάσματα της έκλουσης που περιείχαν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη υποβλήθηκαν σε διαπίδυση έναντι 2000 όγκων κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για κάθε πρωτεΐνη. Η διαπίδυση πραγματοποιήθηκε με ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης (Sigma). Η διαδικασία πραγματοποιείται για 16-18 ώρες στους 4°C υπό συνεχή ήπια ανάδευση.

Οι μεμβράνες διαπίδυσης προετοιμάζονται με βρασμό τους για 1 ώρα σε 1 λίτρο διαλύματος που περιέχει 5 gr EDTA και 8,5 gr NaHCO<sub>3</sub>. Στη συνέχεια οι μεμβράνες ξεπλένονται καλά με απιονισμένο νερό και φυλάσσονται στους 4°C βυθισμένες σε αποστειρωμένο δις- απιονισμένο νερό.

### 5. ΕΛΕΓΧΟΣ ENZYΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ

#### 5.1. Δοκιμή δραστηριότητας καρβονικής ανυδράσης

Η μελέτη δραστηριότητας καρβονικής ανυδράσης βασίστηκε σε μετρήσεις στην αλλαγή του pH κατά τη διάρκεια της βιοχημικής αντίδρασης με τη χρήση μιας χρωμοφόρου ουσίας (Khalifah, 1971). Η αμφίδρομη μετατροπή του CO<sub>2</sub> σε HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> επιφέρει αλλαγές στη συγκέντρωση ιόντων H<sup>+</sup> κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και οι αλλαγές αυτές μπορούν να μετατραπούν σε αλλαγή απορρόφησης όταν προστεθεί στην αντίδραση η κατάλληλη χρωμοφόρος ουσία. Οι αλλαγές στην απορρόφηση μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-2800 (Tokyo, Japan) στο κατάλληλο μήκος κύματος και σε θερμοκρασία 4°C.

Για να ελέγξουμε την ικανότητα των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων να καταλύουν την μετατροπή του CO<sub>2</sub> σε HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, χρησιμοποιήθηκε η χρωμοφόρος ουσία ερυθρό της φαινόλης σε συγκέντρωση 0.005% (w/v) και σε συνδυασμό με το ρυθμιστικό διάλυμα HEPES σε συγκέντρωση 50mM και σε τιμή pH 7,5. Ως υπόστρωμα της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε νερό κορεσμένο σε CO<sub>2</sub>, σε διάφορες συγκεντρώσεις που κυμαινόταν από 7 μέχρι 52 mM. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 557nm.

Για να ελέγξουμε την ικανότητα των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων να καταλύουν την αντίστροφη φορά της αντίδρασης, δηλαδή την μετατροπή του HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> σε CO<sub>2</sub>, χρησιμοποιήθηκε η χρωμοφόρος ουσία κυανό της βρωμοθυμόλης σε συγκέντρωση 0.005% (w/v) και σε συνδυασμό με το ρυθμιστικό διάλυμα MES σε συγκέντρωση 50mM και σε τιμή pH 6,3. Ως υπόστρωμα της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το NaHCO<sub>3</sub>, σε διάφορες συγκεντρώσεις που κυμαινόταν από 18 μέχρι 225 mM. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 615nm.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Σε κυβέτα αναμιγνύουμε γρήγορα

1. 50μl καθαρισμένου ανασυνδυασμένου πολυπεπτιδίου στο οποίο έχει γίνει διαπίδυση είτε σε 50mM MES pH=6,3 είτε σε 50mM HEPES pH=7,5.
2. 200μl διαλύματος που περιέχει 250mM ρυθμιστικού διαλύματος (MES, pH=6.3 ή HEPES, pH=7.5), 0.025% χρωμοφόρου ουσίας (κυανό της βρωμοθυμόλης ή ερυθρό της φαινόλης) και 250mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> για τη διατήρηση μιας σχετικά σταθερής ιοντικής ισχύος
3. 750μl υποστρώματος της αντίδρασης (NaHCO<sub>3</sub> ή νερό κορεσμένο σε CO<sub>2</sub>) σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 1ml.

- Κλείνουμε το φωτόμετρο και αμέσως ξεκινάμε να παίρνουμε τις τιμές απορρόφησης στο κατάλληλο μήκος κύματος και για χρονικό διάστημα 1 λεπτού.
- Από τα 5 πρώτα δευτερόλεπτα της αντίδρασης όπου η κλίση της καμπύλης είναι ευθεία, υπολογίζουμε το ρυθμό απορρόφησης ΔABS/min.
- Παράλληλα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες, μετρήθηκε και η ταχύτητα της μη καταλυόμενης αντίδρασης. Στην περίπτωση αυτή, λαμβάνεται απορρόφηση από ένα δείγμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από πρωτεΐνη.
- Πριν ξεκινήσουμε να παίρνουμε μετρήσεις, το φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται. Στην περίπτωση αυτή, αντί για 750μl υποστρώματος προσθέτουμε στην κυβέτα 750μl H<sub>2</sub>O.

## 5.2. Υπολογισμός κινητικών παραμέτρων

Από τις τιμές του ρυθμού απορρόφησης που πάρθηκαν από τις μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο, προέκυψαν καμπύλες που κατασκευάστηκαν στο πρόγραμμα GraFit v3.5 (Erithacus Software, Surrey, UK). Για να κατασκευαστούν οι καμπύλες, από τις τιμές του ρυθμού απορρόφησης που παρατηρήθηκαν, αφαιρέθηκαν οι αντίστοιχες τιμές που προέκυψαν από τις μετρήσεις απουσία των πολυπεπτιδίων. Οι κινητικές παράμετροι  $K_M$  και  $V_{MAX}$  υπολογίστηκαν κατόπιν εφαρμογής των διορθωμένων ρυθμών απορρόφησης στην εξίσωση Michaelis-Menten με τη χρήση του προγράμματος GraFit v3.5.

Ως συντελεστής μοριακής απόσβεσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της χρωστικής κυανό της βρωμοθυμόλης μέσω του τύπου των Beer & Lambert χρησιμοποιήθηκε η τιμή 0,0443 L/mmol cm η οποία προέκυψε μέσω φασματοφωτομετρικής τιτλοδότησης πρότυπων διαλυμάτων NaOH. Αντίστοιχα, για τη χρωστική ερυθρό της φαινόλης χρησιμοποιήθηκε η τιμή 0,0517 L/mmol cm η οποία προέκυψε μέσω φασματοφωτομετρικής τιτλοδότησης πρότυπων διαλυμάτων HCl.

## 6. *IN SITU* ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

Για να μελετηθεί η χωροταξική και χρονική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του *in situ* RNA-RNA υβριδισμού σε λεπτές τομές φυματίων. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, αποτελεί τροποποίηση των τεχνικών που έχουν δημοσιευτεί μέχρι σήμερα (Van de Wiel *et al.*, 1990, Kouchi & Hata, 1993, Flemetakis *et al.*, 2004).

### 6.1. Προετοιμασία λεπτών φυτικών τομών

#### 6.1.1 Μονιμοποίηση ιστών

- Τα φυτικά όργανα (φυμάτια στην παρούσα εργασία) που βρίσκονται στο κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο, συλλέγονται προσεκτικά και τοποθετούνται σε διάλυμα μονιμοποίησης σε γυάλινα φιαλίδια.
- Οι ιστοί παραμένουν στο διάλυμα μονιμοποίησης για 1 ώρα σε κενό αέρος. Το στάδιο αυτό έχει σκοπό την απομάκρυνση του αέρα που βρίσκεται παγιδευμένος στον ιστό.
- Στη συνέχεια το διάλυμα μονιμοποίησης αντικαθιστάται με νέο όπου οι ιστοί παραμένουν για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για 12 ώρες στους 4<sup>0</sup>C.
- Οι ιστοί ξεπλένονται με εμβάπτισή τους για 20 λεπτά σε 1x ρυθμιστικό διάλυμα μονιμοποίησης
- Ακολουθεί αφυδάτωση των ιστών με εμβάπτισή τους σε σειρά διαλυμάτων αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλη (10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%) για 20 λεπτά στο κάθε διάλυμα.
- Όταν οι ιστοί βρίσκονται στο διάλυμα αφυδάτωσης 50% αιθανόλη γίνεται η χρώση των ιστών με την προσθήκη 5% (w/v) σαφρανίνης όπου οι ιστοί πρέπει να παραμείνουν στο διάλυμα αυτό για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τέλος, οι ιστοί εμβαπτίζονται σε 100% αιθανόλη με τρεις αλλαγές ανά μία ώρα.

#### 6.1.2 Διαφανοποίηση ιστών

- Η 100% αιθανόλη αντικαθίσταται με διάλυμα 25% ξυλενίου (v/v σε αιθανόλη) όπου οι ιστοί παραμένουν για 1 ώρα
- Ακολουθούν αλλαγές του διαλύματος με 50%, 75% και 100% ξυλένιο ανά 1 ώρα.
- Η εμβάπτισή σε 100% ξυλένιο για μία ώρα επαναλαμβάνεται 3 φορές.

### 6.1.3 Εγκλεισμός ιστών σε παραφίνη

- Στα φιαλίδια που περιέχουν τους φυτικούς ιστούς εντός 100% ξυλένιου, προστίθενται σταδιακά κομμάτια παραφίνης σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά τον κορεσμό του ξυλένιου, η διαδικασία συνεχίζεται στους 42°C, μέχρι να επέλθει εκ νέου κορεσμός του ξυλένιου με παραφίνη.
- Το μείγμα ξυλένιου-παραφίνης απομακρύνεται γρήγορα και αντικαθίσταται με λιωμένη και φιλτραρισμένη παραφίνη στους 60°C.
- Οι ιστοί τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 60°C, όπου η παραφίνη αντικαθίσταται με νέα δύο φορές την ημέρα. Σε κάθε περίπτωση, η θερμοκρασία του θαλάμου δε θα πρέπει να υπερβεί τους 62°C, για να μην αλλοιωθεί η δομή της παραφίνης. Η διάρκεια αυτής της διαδικασίας εξαρτάται από το είδος και το μέγεθος του φυτικού τμήματος. Στην περίπτωση των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, 7 ημέρες ήταν αρκετές.
- Μετά το πέρας της παραπάνω διαδικασίας, η παραφίνη με τους ιστούς μεταφέρεται σε προθερμασμένα ειδικά μεταλλικά εκμαγεία, τα οποία περιέχουν λιωμένη παραφίνη στους 60°C.
- Οι ιστοί προσανατολίζονται, κατά το δυνατό, εντός της παραφίνης με τη βοήθεια προθερμασμένης βελόνας και τα εκμαγεία μεταφέρονται προσεκτικά σε κρύα επιφάνεια, όπου αφήνονται μέχρι να στερεοποιηθεί η παραφίνη.
- Οι εγκλεισμένοι ιστοί μπορούν να φυλαχτούν στους 4°C για μεγάλο χρονικό διάστημα, μέχρι τη λήψη των τομών.

### 6.1.4 Καθαρισμός και προετοιμασία των αντικειμενοφόρων

- Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται σε γυάλινα δοχεία χρώσεως και πλένονται σχολαστικά με απορρυπαντικό για 4 ώρες τουλάχιστον.
- Ακολούθως, ξεπλένονται καλά με άφθονο νερό για 2 ώρες και εμβαπτίζονται σε 10% v/v διάλυμα HCl.
- Το υδροχλωρικό οξύ ξεπλένεται καλά με απιονισμένο νερό και οι αντικειμενοφόροι αποστειρώνονται.
- Πριν στεγνώσουν από την αποστείρωση, οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται σε διάλυμα πόλυ-L-λυσίνης για τουλάχιστον 10 λεπτά.
- Η περίσσεια του διαλύματος απομακρύνεται και οι αντικειμενοφόροι αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι αντικειμενοφόροι φυλάσσονται στους -20°C μέχρι τη χρήση τους, μέσα σε καλά κλεισμένα κουτιά, ώστε να αποφευχθεί η είσοδος υγρασίας.

### 6.1.5 Τομές ιστών

Οι λεπτές τομές των ιστών (7  $\mu\text{m}$ ) γίνονται με τη βοήθεια μικροτόμου (LEICA Jung RM2025) με αναλώσιμο μεταλλικό μαχαίρι. Οι κατάλληλες τομές επιλέγονται στο στερεοσκόπιο και μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους στους  $42^{\circ}\text{C}$ . Πάνω στις αντικειμενοφόρους έχει τοποθετηθεί μία σταγόνα αποστειρωμένου νερού για το καλύτερο τέντωμα της τομής. Η περίσσεια του νερού απομακρύνεται και οι τομές αφήνονται στους  $42^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 12 ώρες.

### 6.1.6 Απομάκρυνση της παραφίνης από τις τομές

Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές εμβαπτίζονται σε 100% ξυλένιο για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με τακτική ανακίνηση. Το ξυλένιο αντικαθίσταται με διάλυμα 50% ξυλένιου (σε 100% αιθανόλη) για 15 λεπτά. Τέλος, οι αντικειμενοφόροι μεταφέρονται σε 100% αιθανόλη για 15 λεπτά. Αφού στεγνώσουν καλά, σε θερμοκρασία δωματίου, οι τομές φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  σε καλά κλεισμένα κουτιά, ώστε να αποφευχθεί η είσοδος υγρασίας.

## 6.2. Προετοιμασία του μη ραδιενεργά σημασμένου RNA ανιχνευτή

### 6.2.1. Πέψη του πλασμιδιακού φορέα για την *in vitro* μεταγραφή του ένθετου DNA.

Ο πλασμιδιακός φορέας pSPORT1 που φέρει το ένθετο DNA, υπόκειται σε πέψη με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού με σκοπό την παραγωγή γραμμικού πλασμιδιακού DNA. Στην περίπτωση μεταγραφής πληροφοριακού (sense) RNA το ένζυμο περιορισμού επιλέγεται έτσι ώστε να κόβει το πλασμίδιο στο 3'-άκρο του ένθετου DNA. Αντίστοιχα, για την παραγωγή αντιπληροφοριακού (anti-sense) RNA, το ένζυμο περιορισμού επιλέγεται έτσι ώστε να κόβει το πλασμίδιο στο 5'-άκρο του ένθετου DNA.

- Μετά το τέλος της πέψης το πλασμίδιο καθαρίζεται με εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο.
- Το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 0,1 όγκου 3M οξικού νατρίου pH:5,2 και 2 όγκων απόλυτης αιθανόλης. Το δείγμα επωάζεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 2 ώρες.
- Ακολουθεί συλλογή του DNA με φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Το γραμμικό πλασμίδιο ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου νερού.



### 6.2.2. *In vitro* μεταγραφή σημασμένου RNA

Σε κάθε πείραμα *in situ* υβριδισμού προετοιμάζεται πληροφοριακό και αντιπληροφοριακό σημασμένο RNA. Το πρώτο χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση υβριδισμού ώστε να εντοπιστεί τυχόν μη εξειδικευμένο σήμα υποβάθρου. Η μεταγραφή των δύο τύπων RNA καθορίζεται από την πέψη του πλασμιδίου, αλλά και από την επιλογή της κατάλληλης RNA πολυμεράσης. Η σήμανση γίνεται με την χρήση DIG-11-dUTP σημασμένων νουκλεοτιδίων. Μια τυπική αντίδραση *in vitro* μεταγραφής πραγματοποιείται ως εξής:

- Σε σωλήνα erppendorf προστίθενται τα ακόλουθα:

Γραμμικό πλασμιδιακό DNA	11 μl (1-2 μg)
10x σημασμένα NTPs (Boehringer-Mannheim)	2 μl
5x ρυθμιστικό διάλυμα RNA πολυμεράσης	4 μl
RNasin™ (40u/μl)(Boehringer-Mannheim)	1 μl
SP6 ή T7 πολυμεράση (20u/μl)(Boehringer-Mannheim)	2 μl

- Το μείγμα επωάζεται στους 37°C για δύο ώρες.
- Για την απομάκρυνση του πλασμιδιακού DNA προστίθεται 1 μl DNase (2 u/μl) και η επώαση στους 37°C συνεχίζεται για 10 λεπτά.
- Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 2 μl διαλύματος 0,2M EDTA pH:8,0 και το σημασμένο RNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 2,5μl 4M LiCl και 75μl αιθανόλης.
- Ακολουθεί επώαση στους -20°C για τουλάχιστον 2 ώρες και το RNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά, στους 4°C.
- Το ίζημα ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 100μl dH<sub>2</sub>O.
- Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίζεται φωτομετρικά ενώ η ποιότητά του ελέγχεται με ανάλυση δείγματος σε πηκτή αγαρόζης.

### 6.2.3. Υδρόλυση του σημασμένου RNA ανιχνευτή.

Η υδρόλυση μέρους του ανιχνευτή που θα χρησιμοποιηθεί (περίπου το 80% της συνολικής ποσότητας ανιχνευτή) κρίνεται αναγκαία για την καλύτερη διείδυση του ανιχνευτή μέσα στην τομή του ιστού. Έχει βρεθεί ότι το ιδανικό μέγεθος του ανιχνευτή είναι περίπου 150 βάσεις.

- Στην κατάλληλη ποσότητα ανιχνευτή προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 0,2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>.
- Το μείγμα επωάζεται στους 60°C για χρονικό διάστημα που εξαρτάται από το αρχικό μέγεθος του ανιχνευτή και δίνεται από τον τύπο:

- $t = (L_{\text{αρχ}} - L_{\text{τελ}}) / K \times L_{\text{αρχ}} \times L_{\text{τελ}}$

- όπου:  $t$  η διάρκεια της υδρόλυσης σε λεπτά,  $L_{αρχ}$  το αρχικό μέγεθος του ανιχνευτή (σε kb),
- $L_{τελ}=0.15$  kb και  $K$  σταθερά που ισούται με  $0,11$  kb/λεπτό.
- Η υδρόλυση σταματά με την προσθήκη  $2$  μl  $5\%$  οξικού οξέος.
- Ο υδρολυμένος ανιχνευτής κατακρημνίζεται με την προσθήκη  $2,5$  μl  $3M$  οξικού νατρίου pH:5,2, διπλάσιου όγκου αιθανόλης και  $1$ μl γλυκογόνου ( $1$  μg/μl), το οποίο δρα ως φορέας καθίζησης.
- Το δείγμα επωάζεται στους  $-20^{\circ}C$  για τουλάχιστον  $12$  ώρες και ο ανιχνευτής συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις  $13.000$  στροφές/λεπτό για  $20$  λεπτά, στους  $4^{\circ}C$ .
- Το ίζημα ξεπλένεται με  $70\%$  v/v αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου νερού.

### 6.3. Διαδικασία *in situ* RNA-RNA υβριδισμού

#### 6.3.1. Διαδικασία προετοιμασίας των τομών για τον υβριδισμό

- Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον μία ώρα, χωρίς να ανοιχθούν, για να ξεπαγώσουν.
- Ακολούθως, οι τομές ενυδατώνονται με εμβάπτισή τους σε διαλύματα αιθανόλης  $100\%$  δύο φορές,  $90\%$ ,  $70\%$ ,  $50\%$ ,  $30\%$ ,  $10\%$ , για  $1$  λεπτό σε κάθε συγκέντρωση.
- Αφού ξεπλυθούν μία φορά με ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνάσης  $K$ , μεταφέρονται σε νέο διάλυμα πρωτεΐνάσης που περιέχει  $1$  μg/ml πρωτεΐνάση  $K$ , όπου και επωάζονται για  $30$  λεπτά στους  $37^{\circ}C$ .
- Μετά την επώαση, οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται δύο φορές με αποστειρωμένο νερό.
- Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε διάλυμα  $0,1M$  τριαιθανολαμίνης/ $0,25\%$  οξικού ανυδρίτη, όπου και επωάζονται για  $10$  λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση.
- Ακολούθως ξεπλένονται σε διάλυμα  $2x$  SSC για  $5$  λεπτά και αφυδατώνονται περνώντας αντίστροφα από τη σειρά αλκοολών.
- Τέλος, οι αντικειμενοφόροι αφήνονται να στεγνώσουν για τουλάχιστον  $1$  ώρα σε κενό αέρος.

#### 6.3.2. Προετοιμασία διαλύματος υβριδισμού

Οι παρακάτω ποσότητες έχουν υπολογιστεί για μία αντικειμενοφόρο.

- Σε 8 μl υδρολυμένου ανιχνευτή προστίθενται 2 μl μη υδρολυμένου. Η συγκέντρωση του ανιχνευτή έχει ρυθμιστεί έτσι ώστε στα 10 μl τελικού όγκου να περιέχονται 100-500 ng RNA.
- Για την αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής του RNA προστίθενται 10 μl απιονισμένου φορμαμίδιου και το μείγμα επωάζεται στους 68°C για 10 λεπτά.
- Μετά το τέλος της αποδιάταξης, το δείγμα μεταφέρεται στον πάγο.
- Στον αποδιατεταγμένο ανιχνευτή προστίθενται 80 μl διαλύματος υβριδισμού που περιέχει:

Απιονισμένο φορμαμίδιο	40 μl
5M NaCl	6 μl
50x Denhardt's	2 μl
100x TE pH:7,5	1 μl
1M DTT (BDH)	7 μl
50% Dextran sulphate (BDH)	20 μl
dH <sub>2</sub> O	4 μl

- Το μείγμα θερμαίνεται στους 60°C για 3 λεπτά και αφού ανακατευτεί καλά τοποθετείται πάνω στις τομές. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται ώστε να αποφευχθεί ο εγκλωβισμός φυσαλίδων αέρα μέσα στο διάλυμα υβριδισμού.

### 6.3.3. Διαδικασία υβριδισμού

Οι αντικειμενοφόροι σκεπάζονται με καλυπτρίδες. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε κουτί, η βάση του οποίου καλύπτεται με διηθητικό χαρτί εμποτισμένο σε διάλυμα 2x SSC, για να μη στεγνώσουν οι τομές. Ο υβριδισμός πραγματοποιείται στους 42°C, για τουλάχιστον 12-16 ώρες.

### 6.3.4. Ξεπλύματα υβριδισμού

- Οι καλυπτρίδες απομακρύνονται με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε διάλυμα 4x SSC /5mM DTT, για 10 λεπτά
- Το διάλυμα αντικαθίσταται με νέο ίδιας σύστασης, όπου οι αντικειμενοφόροι αφήνονται για 10 λεπτά με τακτική ήπια ανακίνηση.
- Το παραπάνω ξέπλυμα επαναλαμβάνεται τρεις φορές.
- Ακολούθως, οι αντικειμενοφόροι επωάζονται σε 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 50 μg/ml RNase A, στους 37°C για 30 λεπτά.
- Η RNase απομακρύνεται με 4 ξεπλύματα σε ρυθμιστικό διάλυμα RNase στους 37°C για 20 λεπτά το καθένα.

- Τέλος, οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται με διάλυμα 2x SSC/1mM DTT σε θερμοκρασία δωματίου με τακτική ήπια ανακίνηση.

### 6.3.5. Ανοσολογική ανίχνευση του υβριδισμένου ανιχνευτή

Η ανίχνευση του σήματος υβριδισμού γίνεται με τη χρήση ενός συμπλόκου αντισώματος αντι-DIG που φέρει συζευγμένη αλκαλική φωσφατάση. Το αντίσωμα αναγνωρίζει και προσκολλάται στο σημασμένο με διγοξιγενίνη ανιχνευτή ενώ η αλκαλική φωσφατάση καταλύει το σχηματισμό χρωμοφόρου ιζήματος με την προσθήκη των αντιδραστηρίων BCIP και NBT.

- Οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα Buf.1 για 3-5 λεπτά.
- Ακολούθως, μεταφέρονται σε διάλυμα Buf.1, που περιέχει 0,5% αντιδραστήριο μπλοκαρίσματος, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα αντικαθίσταται με ρυθμιστικό διάλυμα TBB, όπου οι αντικειμενοφόροι αφήνονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι τομές καλύπτονται με ρυθμιστικό διάλυμα Buf.1 που περιέχει 1:500 αντίσωμα αντι-DIG και αφήνονται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνεται με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε διάλυμα TBB για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούν τρία ξεπλύματα με ρυθμιστικό διάλυμα Buf.1, για 20 λεπτά το καθένα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι τομές εξισορροπούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα Buf.3 για 10 λεπτά και καλύπτονται με διάλυμα χρωματικής αντίδρασης.
- Η χρωματική αντίδραση λαμβάνει χώρα στο σκοτάδι και η ανάπτυξη του χρώματος ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα στο μικροσκόπιο.
- Η χρωματική αντίδραση τερματίζεται με ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων με ρυθμιστικό διάλυμα TE
- Οι τομές αφυδατώνονται με σειρά διαλυμάτων αιθανόλης 10%, 30%, 50%, 70%, 90% και δύο φορές σε 100% για ένα λεπτό σε κάθε διάλυμα.
- Τέλος, αφού στεγνώσουν καλά οι τομές μονιμοποιούνται με την κάλυψη τους με DPX πριν την τοποθέτηση της καλυπτρίδας.

## 7. ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΖΥΜΗΣ

Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται στέλεχος της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* το οποίο στερείται το γονίδιο της β τύπου καρβονικής ανυδράσης. Το αγρίου τύπου στέλεχος

CEN.PK2 και το μεταλλαγμένο στέλεχος CEN.HE28-1A προέρχονται από το Euroscarf. Το μεταλλαγμένο στέλεχος δεν μπορεί να αναπτυχθεί αερόβια και η ενζυμική δράση μιας άλλης καρβονικής ανυδράσης μπορεί να επιφέρει τη συμπλήρωση του φαινοτύπου αυτού. Το μεταλλαγμένο στέλεχος μετασχηματίζεται με τον πλασμιδιακό φορέα pYES3 που περιέχει τις cDNA αλληλουχίες των γονιδίων που πιθανά κωδικοποιούν ισοτύπους της καρβονικής ανυδράσης. Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιούνται σε αποστειρωμένο περιβάλλον.

### 7.1 Μετασχηματισμός της ζύμης

- 10ml θρεπτικού διαλύματος **YPD** εμβολιάζονται με μονή αποικία ζύμης και αναπτύσσονται για 2-3 μέρες στους 30°C χωρίς ανάδευση (αναερόβια ανάπτυξη)
- 50ml YPD εμβολιάζονται με 1, 2 ή 3 ml από την αρχική καλλιέργεια και αναπτύσσονται στους 30°C μέχρι την επόμενη μέρα.
- Οι καλλιέργειες ελέγχονται στο μικροσκόπιο για τυχόν μόλυνση από βακτήρια.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 2500 στρ/λεπτό για 10' στους 20°C.
- Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 40ml διαλύματος TE (10x TE: 1M Tris-HCl, pH 7,5, 0.5M EDTA, pH 8) και φυγοκεντρώνονται ξανά.
- Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 2ml διαλύματος 1x LiAc/0.5x TE (1x LiAc: 2.04g οξικού λιθίου σε 15ml dH<sub>2</sub>O, pH 7.5 με οξικό οξύ, αποστείρωση με φίλτρο).
- Επώαση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σε σωλήνα erpendorf προσθέτουμε:
  1. 1μg πλασμιδιακού DNA
  2. 100μg αποδιαταγμένο DNA σπέρματος σολομού (βρασμός για 10' πριν τη χρήση)
  3. 100μl από τα δεκτικά κύτταρα ζύμης που παρασκευάστηκαν στο προηγούμενο στάδιο
  4. 700μl 1x LiAc/40% PEG-3350/1x TE (αποστειρώνεται με φίλτρο και παρασκευάζεται ακριβώς πριν από τη χρήση)
- Αναδεύουμε καλά και επωάζουμε για 30' στους 30°C.
- Προσθέτουμε 88μl DMSO και αναδεύουμε.
- Τα δείγματα θερμαίνονται στους 42°C για 7'.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στρ/λεπτό για 10'' και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Επαναδιαλύουμε σε 1ml 1x TE.
- Ξανά φυγοκέντρηση στις 12000 στρ/λεπτό για 10'' και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Επαναδιαλύουμε σε 80μl 1x TE και απλώνουμε τα κύτταρα σε τρυβλία SC-U με γλυκόζη.

- Οι ζύμες αναπτύσσονται αναερόβια στους 30°C για τουλάχιστον 1 εβδομάδα
- Μόλις εμφανιστούν οι αποικίες, δέκα αποικίες από κάθε τρυβλίο χρησιμοποιούνται για να εμβολιαστούν νέα τρυβλία **SC-U με γλυκόζη** (δεύτερη επιλογή) και αφήνονται να αναπτυχθούν αναερόβια στους 30°C.
- Αφού αναπτυχθούν αρκετά, γίνεται εμβολιασμός σε τρυβλία **SC-U με γαλακτόζη και ραφινόζη** για επαγωγή της έκφρασης. Οι ζύμες αναπτύσσονται αρχικά αναερόβια για 2-3 μέρες ώστε να επαχθεί η παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και στη συνέχεια αφήνονται να αναπτυχθούν αερόβια. Στις περιπτώσεις που η ανάπτυξη συνεχίζεται έχουμε συμπλήρωση του φαινοτύπου.
- Ως μάρτυρες χρησιμοποιούνται το στέλεχος αγρίου τύπου και το μεταλλαγμένο στέλεχος μετασχηματισμένο με το πλασμίδιο pYES3 που δεν φέρει κάποια ένθεση.

## 8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΝΙΤΡΟΓΕΝΑΣΗΣ

Η δραστηριότητα νιτρογενάσης των ριζοβίων εκτιμήθηκε με τη μέθοδο αναγωγής του ακετυλενίου, όπως αυτή περιγράφεται από τους Hardy *et al.* (1973). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του ακετυλενίου προς αιθυλένιο, η οποία καταλύεται από το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης που υπάρχει στους αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς. Η νιτρογενάση καταλύει αναγωγικές ATP-εξαρτώμενες αντιδράσεις μορίων που περιέχουν τριπλούς δεσμούς ( $N\equiv N$ ,  $CH\equiv CH$ ). Το παραγόμενο αιθυλένιο ανιχνεύεται με τη βοήθεια αέριο-χρωματογράφου.

Μολυσμένα φυτά *L. japonicus* τοποθετούνται σε φυαλίδια όγκου 28ml (universal bottles) και κλείνονται αεροστεγώς με πώματα σιλικόνης (silicon rubber). Στη συνέχεια, σε κάθε φυαλίδιο εισάγεται ακετυλένιο, ώστε η περιεκτικότητά του να είναι περίπου 10%. Τα φυαλίδια επωάζονται στους 28°C. Γίνεται δειγματοληψία από την αέρια φάση των δειγμάτων σε διάφορες χρονικές στιγμές (1h, 2h και 3h) και προσδιορισμός του παραγόμενου αιθυλενίου σε αέριο-χρωματογράφο.

Χρησιμοποιήθηκε ο αέριο-χρωματογράφος Perkin-Elmer 8500 (GC) με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID), κολώνα χρωματογραφίας Poropak-R 2m με τις εξής συνθήκες ανάλυσης: θερμοκρασία εισόδου 200°C, θερμοκρασία φούρνου 60°C, φέρον αέριο He με ροή 20ml/λεπτό. Η δραστηριότητα της νιτρογενάσης εκφράζεται σε ppm αιθυλενίου/h.mg νωπού βάρους φυματίων.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

## ΣΥΝΘΕΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ & ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

### Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

**LB:** θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *E. coli*

0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 1%(w/v) NaCl, 1% (w/v) πεπτόνη. Στην περίπτωση στερεού υποστρώματος, προστίθεται 1,5% (w/v) άγαρ.

**YMB:** Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ριζοβίων *M. loti*.

Για την παρασκευή 1lt θρεπτικού διαλύματος YMB: σε 1lt απιονισμένου νερού προστίθενται 10gr μαννιτόλη, 0,5gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2gr MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1gr NaCl, 0,5gr εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract). Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% άγαρ.

### **YPD:**

Για 100ml θρεπτικού υποστρώματος ζυγίζουμε 1g εκχύλισμα ζύμης, 2g πεπτόνη, 2g D-γλυκόζη (dextrose), H<sub>2</sub>O. Για την παρασκευή στερεού υποστρώματος προστίθενται 2g αγαρ. Η δεξτρόζη προστίθεται μετά την αποστείρωση.

### **SC-U με γλυκόζη:**

Για 100ml θρεπτικού υποστρώματος ζυγίζουμε 0.67g yeast nitrogen base, 0.01g λευκίνη, 0.01g τρυπτοφάνη, 0.05g ιστιδίνη, 0.14g drop-out, συμπληρώνουμε με H<sub>2</sub>O μέχρι όγκο 90 ml και αποστειρώνουμε. Μετά την αποστείρωση, προσθέτουμε 10ml 20% glucose που έχουμε αποστειρώσει με τη χρήση φίλτρου. Για την παρασκευή στερεού υποστρώματος προστίθενται 2g αγαρ.

### **SC-U με ραφινόζη και γαλακτόζη:**

Για 100ml θρεπτικού υποστρώματος ζυγίζουμε 0.67g yeast nitrogen base, 0.01g λευκίνη, 0.01g τρυπτοφάνη, 0.05g ιστιδίνη, 0.14g drop-out συμπληρώνουμε με H<sub>2</sub>O μέχρι όγκο 80ml και αποστειρώνουμε. Μετά την αποστείρωση προσθέτουμε 10ml 20% γαλακτόζη και 10ml 10% ραφινόζη (αποστείρωση με φίλτρο).

**Hogland:** Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης φυτών.

Για την παρασκευή 1lt θρεπτικού διαλύματος χωρίς N προστίθενται: 2ml 1M MgSO<sub>4</sub>, 1ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1ml 0,1M FeEDTA, 1ml διαλύματος ιχνοστοιχείων, 10 ml 0,5M CaCl<sub>2</sub> και 5ml 1M KCl.

Για την παρασκευή 1lt θρεπτικού διαλύματος με N προστίθενται: 2ml 1M MgSO<sub>4</sub>, 1ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1ml 0,1M FeEDTA, 1ml διαλύματος ιχνοστοιχείων, 5ml 1M CaNO<sub>3</sub> και 5ml 1M KNO<sub>3</sub>

Διάλυμα ιχνοστοιχείων: Σε 1lt dH<sub>2</sub>O προστίθενται 2,86gr H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81gr MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,11 gr ZnCl<sub>2</sub>, 0,05gr CuCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O και 0,02gr H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.

#### Ρυθμιστικά διαλύματα

##### **1M HEPES pH: 7,5**

Για 100ml τελικού όγκου διαλύματος, ζυγίζουμε 23,8 gr HEPES, ρυθμίζουμε το διάλυμα στο επιθυμητό pH με την προσθήκη NaOH, ακολουθεί αποστείρωση με φίλτρο και φύλαξη στους -20°C.

##### **1M MES pH: 6,3**

Για 100ml τελικού όγκου διαλύματος, ζυγίζουμε 19,52 gr MES, ρυθμίζουμε το διάλυμα στο επιθυμητό pH με την προσθήκη KOH, ακολουθεί αποστείρωση με φίλτρο και φύλαξη στους -20°C.

#### Μητρικά διαλύματα

##### **0,1M Ισοπροπυλ- β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG)**

23,8 gr IPTG διαλύονται σε 1 ml dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα και φυλάσσεται στους -20°C.

##### **Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο 10% (SDS)**

Σε 100ml τελικό όγκο διαλύματος διαλύονται 10gr SDS. Φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου.

##### **Υπερθειϊκό αμμώνιο 10% (APS)**

Σε 100ml τελικό όγκο διαλύματος διαλύονται 10gr APS. Φύλαξη στους -20°C.

#### Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

##### **STET**

8% σακχαρόζη, 0,5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH:8,0.

##### **Διάλυμα λυσοζύμης**

50 mg λυσοζύμης διαλύονται σε 1 ml dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C

##### **TE**

10 mM Tris-HCl pH:8,0, 1 M EDTA.

#### Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων

##### **1x TAE**

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 50x TAE το οποίο αραιώνεται 50 φορές,



50x TAE: 242 gr Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 0,5 ml EDTA pH: 8,0 σε ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 1lt.

#### **Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml.**

0.5 gr βρωμιούχου αιθιδίου προστίθεται σε 100 ml dH<sub>2</sub>O και αναδεύεται καλά. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό δοχείο στους 4<sup>0</sup>C. Η τελική συγκέντρωση του στην πηκτή αγαρόζης είναι 0,5 μg/ml.

#### **Διάλυμα φόρτωσης**

0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη.

#### Διαλύματα απομόνωσης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

##### **Διάλυμα λύσης**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο

##### **Διάλυμα ξεπλύματος**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο (ή 50 mM ιμιδαζόλιο)

##### **Διάλυμα έκλουσης**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM ιμιδαζόλιο

#### Διαλύματα ανάλυσης πρωτεϊνών

##### **30% Ακρυλαμίδη**

60 gr ακρυλαμίδης διαλύονται σε 200 ml dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αναδεύεται παρουσία ιοντοανταλλακτικής ρητίνης για 30 λεπτά, φιλτράρεται και φυλάσσεται στους 4<sup>0</sup>C.

##### **1% Δις-ακρυλαμίδη**

0,5 gr BIS-ακρυλαμίδης διαλύονται σε 50 ml dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4<sup>0</sup>C.

##### **10x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης**

144 gr/lit γλυκίνη, 30,25 gr/lit Tris και 10 gr/lit SDS.

##### **Διάλυμα χρώσης**

450 gr/lit Μεθανόλη, 100 ml/lit οξικό οξύ, 0,25 gr/lit Coomassie Brilliant Blue R250.

##### **Διάλυμα αποχρωματισμού 1**

30% Μεθανόλη, 10% οξικό οξύ.

##### **Διάλυμα αποχρωματισμού 2**

5% Μεθανόλη, 7% οξικό οξύ.

##### **Sample Buffer**

4% SDS, 10% 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0,1 M Tris-HCl pH: 6,8, 20% γλυκερόλη

### Διαλύματα ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών (μέθοδος Bradford)

#### **Πυκνό διάλυμα χρωστικής**

Για την παρασκευή 200 ml πυκνού διαλύματος χρωστικής διαλύονται προσεκτικά 100 mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 σε 100 ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50% v/v), στη συνέχεια προστίθενται σιγά σιγά 100 ml πυκνού φωσφορικού οξέος (85% w/w). Το διάλυμα τοποθετείται σε γυάλινο δοχείο σκούρου χρώματος και ακολουθεί απαέρωση του σε συσκευή υπερήχων. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος.

#### **Διάλυμα χρωστικής**

1 μέρος πυκνού διαλύματος χρωστικής αραιώνεται με 4 μέρη νερού. Το διάλυμα είναι σταθερό για 1 μέρα.

### Διαλύματα *in situ* υβριδισμού

#### **Διάλυμα μονιμοποίησης**

Σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη προστίθενται 10 ml διαλύματος 10% παραφολμαδεΰδης, 0,25 ml γλουταραλδεΰδης, 2,5 ml 10X ρυθμιστικό διάλυμα μονιμοποίησης και 12,5 ml dH<sub>2</sub>O. Το pH του διαλύματος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 7,2 και 7,4.

**Διάλυμα 10% παραφολμαδεΰδης:** 10 gr παραφολμαδεΰδης διαλύονται σε 100 ml dH<sub>2</sub>O με έντονη ανάδευση. Για την υποβοήθηση της διάλυσης προστίθενται μερικές σταγόνες διαλύματος 10N NaOH. Το διάλυμα παραφολμαδεΰδης φυλάσσεται στους 4°C στο σκοτάδι.

#### **10x Ρυθμιστικό διάλυμα μονιμοποίησης**

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH:6,8, 1 M NaCl. Για την παρασκευή 100 ml αναμιγνύονται 68,4 ml 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 31,6 ml 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> και 5,84 gr NaCl.

#### **0,5% σαφρανίνη**

0,5 gr σαφρανίνης διαλύονται σε 100 ml 50% αιθανόλη.

#### **Πόλυ-L-Λυσίνη**

100 μg/ml πολυ-L-λυσίνη προστίθενται σε αποστειρωμένο διάλυμα 10 mM Tris-HCl pH:8,0. Το διάλυμα φιλτράρεται και φυλάσσεται στους -20°C.

#### **20x SSC:**

Σε τελικό όγκο 1lt dH<sub>2</sub>O προστίθενται 175,3gr NaCl και 88,2gr κιτρικού νατρίου. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

#### **0,2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> /NaHCO<sub>3</sub>**

Σε 100 ml dH<sub>2</sub>O διαλύονται 1,59 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 0,42 gr NaHCO<sub>3</sub>. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα.

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνάσης K**

100 mM Tris-HCl pH:7,5 , 50 mM EDTA.

**50x Denhardt's**

1% Ficoll, 1% Polyvinylpyrrolidone, αλβουμίνη βοδινού ορού, (BSA)

**50% Dextran sulphate**

500 μl Dextran sulfate διαλύονται σε 500 μl αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O. Για την υποβοήθηση της διάλυσης το μείγμα θερμαίνεται στους 65<sup>0</sup>C. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20<sup>0</sup>C.

**Ρυθμιστικό διάλυμα RNase**

500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH:7,5.

**TBB**

0,3% Tween 20 και 1% αλβουμίνης βοδινού ορού, (BSA) σε Buf.1.

**BCIP**

5% BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) διαλύεται σε 100% διμεθυλφορμαμίδιο. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20<sup>0</sup>C.

**NBT**

5% NBT (nitro blue tetrazolium choride, Sigma) διαλύεται σε 70% διμεθυλφορμαμίδιο. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20<sup>0</sup>C.

**Buf 1:**

150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH:7,5.

**Buf 2:**

1% αντιδραστήριο μπλοκαρίσματος σε διάλυμα Buf.1.

**Buf 3:**

100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH:9,2.

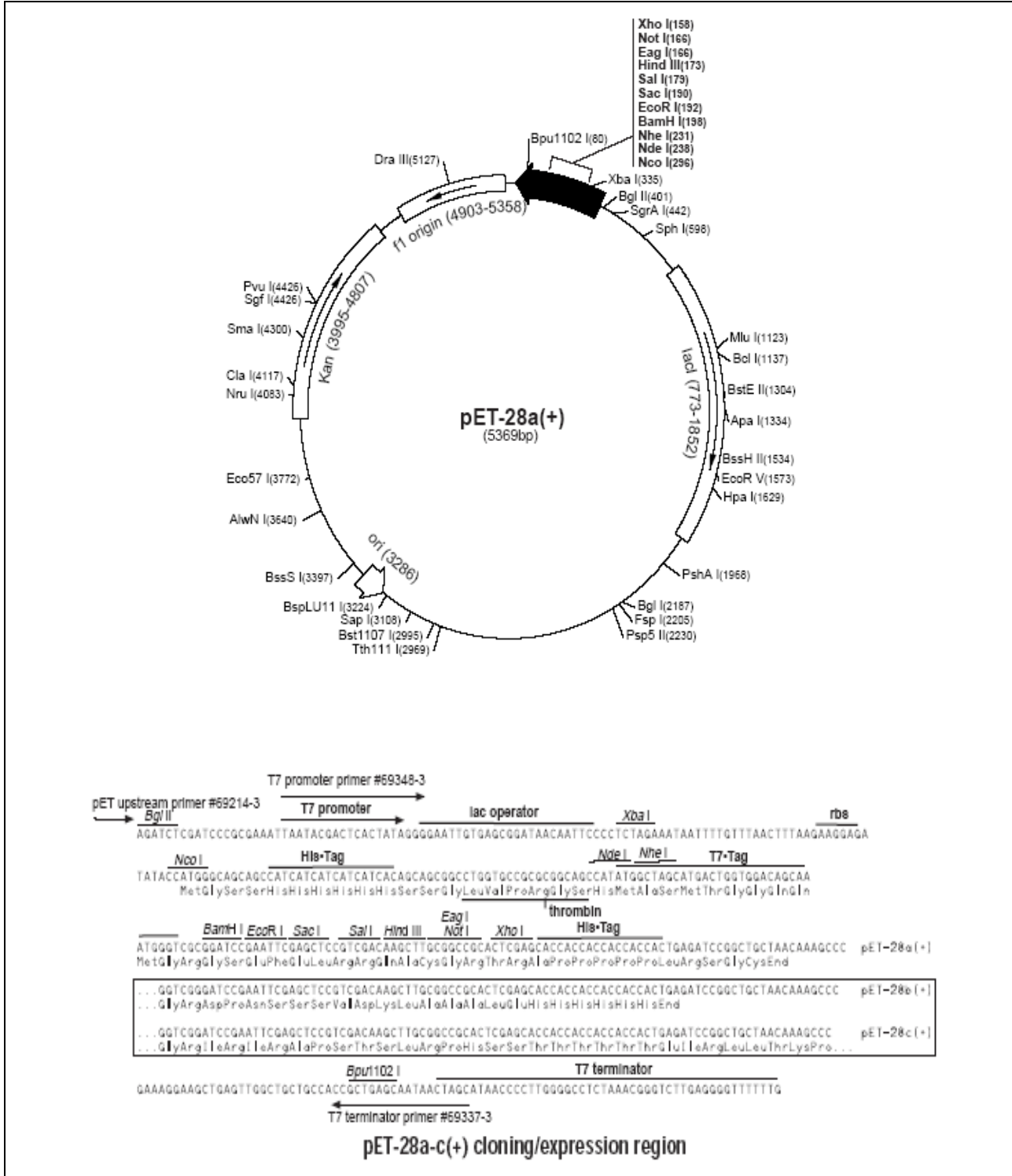
**Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης:**

0,34 gr/ml NBT, 0,175 mg/ml BCIP διαλύονται σε διάλυμα ανίχνευσης Buf.3. Σε 10ml διαλύματος Buf.3 προστίθενται 35μl διαλύματος BCIP και 35μl διαλύματος NBT (DIG-system kit, Boehringer-Mannheim)

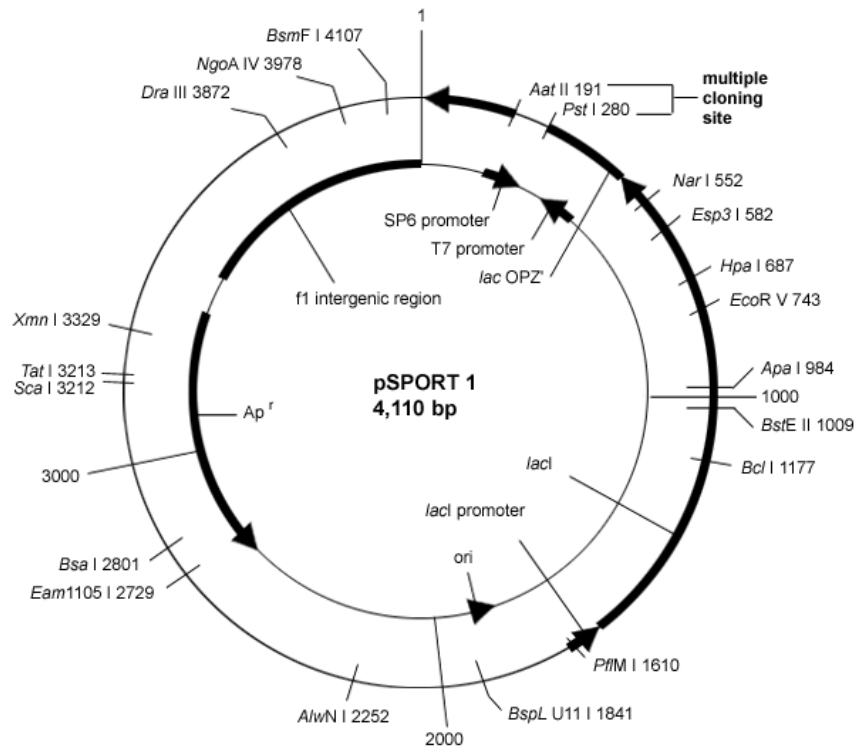
# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

## ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

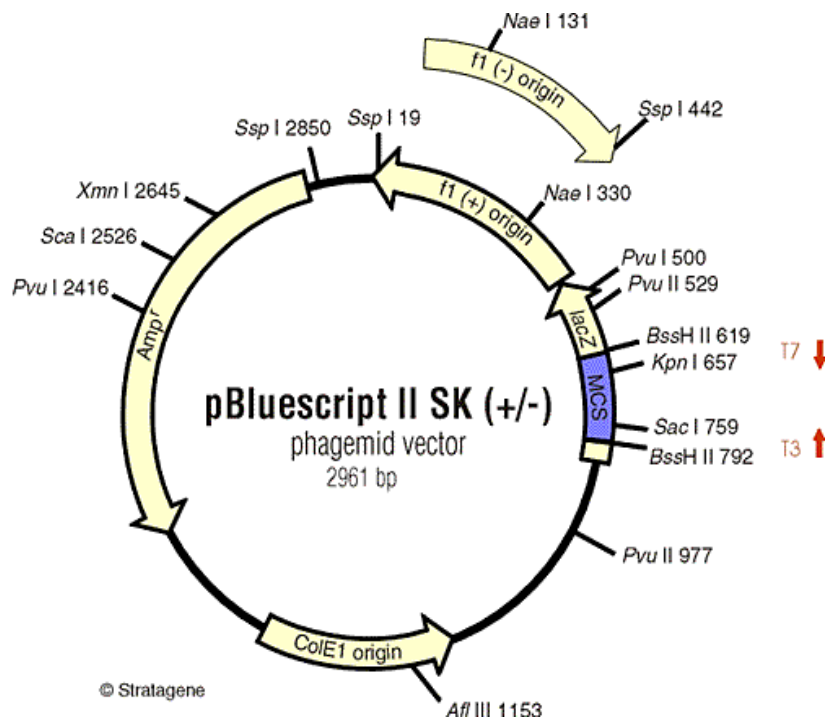
### Ο πλασμιδιακός φορέας pET28a(+)



## Ο πλασμιδιακός φορέας pSPORT1



## Ο πλασμιδιακός φορέας pBlueScriptII/SK





# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---





## 1. *IN SILICO* ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΙΑ $\alpha$ -ΤΥΠΟΥ ΚΑΡΒΟΝΙΚΕΣ ΑΝΥΔΡΑΣΕΣ ΣΤΟ ΦΥΤΟ *Lotus japonicus*

Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει διαθέσιμος σε βάσεις δεδομένων μεγάλος αριθμός ESTs (expressed sequences tags) που προέρχεται από συμβιωτικά και μη συμβιωτικά όργανα του ψυχανθούς φυτού *L. japonicus*. Με σκοπό τον εντοπισμό cDNA κλώνων που κωδικοποιούν για ισότυπους της αφυδατάσης των ανθρακικών στα φυμάτια, πραγματοποιήθηκε *in silico* έρευνα των βάσεων δεδομένων ESTs του *L. japonicus*. Από την έρευνα προέκυψαν δύο αλληλουχίες cDNA, που θα αναφέρονται στο εξής ως *LjCAA1* και *LjCAA2*, οι οποίες είναι πιθανό να κωδικοποιούν για αφυδατάσες των ανθρακικών τύπου  $\alpha$ , καθώς παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με αφυδατάσες των ανθρακικών  $\alpha$ -τύπου από άλλους οργανισμούς. Επιπλέον, στις αλληλουχίες αυτές παρουσιάζονται συντηρημένα κάποια συγκεκριμένα αμινοξέα που χαρακτηρίζουν τα ένζυμα  $\alpha$ -τύπου. Σ' αυτά περιλαμβάνονται οι τρεις ιστιδίνες που συμμετέχουν στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου του ενζύμου όπου δεσμεύεται το άτομο ψευδαργύρου.

Η *in silico* προβλεπόμενη αλληλουχία του ώριμου mRNA, που προκύπτει από το γονίδιο *Ljcaa1* (TC20553), αποτελείται από 1165 βάσεις. Η μετάφρασή της σε αμινοξική ακολουθία, έδειξε την ύπαρξη ενός ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου 807 βάσεων, που πιθανά κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτίδιο 269 αμινοξέων. Το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου υπολογίστηκε στα 30294.62 Da, ενώ η θεωρητική τιμή ισοηλεκτρικού σημείου είναι  $pI=9,05$ . Η αντίστοιχη *in silico* ανάλυση για το γονίδιο *Ljcaa2* (TC20414), προέβλεψε μια αλληλουχία ώριμου mRNA μήκους 1239 βάσεων. Η μετάφρασή της σε αμινοξική ακολουθία, έδειξε την ύπαρξη ενός ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου 822 βάσεων, που πιθανά κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτίδιο 274 αμινοξέων, με μοριακό βάρος 30740.77 Da και θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο  $pI=6,63$ . Οι δύο αλληλουχίες cDNA δείχνουν να εκπροσωπούν δύο πλήρους μήκους κλώνους καθώς ένα κωδικόνιο λήξης βρίσκεται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την πιθανή αρχική μεθειονίνη.

Τα δύο πολυπεπτίδια που προέκυψαν από τη μετάφραση των cDNA αλληλουχιών, αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος PSORT για την πρόβλεψη της πιθανής υποκυτταρικής τοπολογίας τους. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης έδειξε ότι είναι πολύ πιθανό οι δύο πρωτεΐνες να οδηγούνται στον εξωκυττάριο χώρο ενώ για την *LjCAA2* υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι είναι πιθανόν να εντοπίζεται στο λυσόσωμα (πίνακας 6). Επιπλέον, μέσω του προγράμματος iPSORT ερευνήθηκε η ύπαρξη πιθανού πεπτιδίου οδηγού. Και οι δύο πρωτεΐνες φαίνεται να φέρουν πεπτίδια οδηγούς και συγκεκριμένα στην *LjCAA1* το πιθανό πεπτίδιο οδηγός

αποτελείται από 29 αμινοξέα, ενώ η *LjCAA2* φέρει πιθανό πεπτίδιο οδηγό 21 αμινοξέων (πίνακας 6 και εικόνα 13).

Πολυπεπίδιο	Υποκυτταρικός εντοπισμός	Πιθανό πεπτίδιο οδηγός
<i>LjCAA1</i>	Εξωκυττάριος χώρος 0.82	MTLPTNHNLFSLVFLVTILCSSLFLTSTA
<i>LjCAA2</i>	Λυσόσωμα 0.55	MALRIYISTLSIAIFSLCTSA
	Εξωκυττάριος χώρος 0.49	

**Πίνακας 6:** Πρόβλεψη της υποκυτταρικής τοπολογίας και της παρουσίας πεπτιδίου οδηγού των πιθανών α-τύπου καρβονικών ανυδρασών του *L. japonicus*

Συγκριτικές αναλύσεις έδειξαν ότι η αμινοξική ακολουθία του *LjCAA1* παρουσιάζει ομοιότητα 64% με πιθανή α-τύπου καρβονική ανυδράση του *Arabidopsis thaliana*, 60% με την αποθηκευτική πρωτεΐνη (διοσκουρίνη) του *Dioscorea batatas* και 52% με τη νεκταρίνη (nectarin III) του *Oryza sativa*. Η *LjCAA1* παρουσιάζει, επίσης, 47% ομοιότητα με μια χαρακτηρισμένη α-τύπου καρβονική ανυδράση από το *Helicobacter pylori*. Αντίστοιχη ανάλυση για την *LjCAA2* έδειξε να υπάρχει ομοιότητα 61% με την πιθανή καρβονική ανυδράση (CAH1) του *Arabidopsis thaliana*, 53% με αποθηκευτική πρωτεΐνη (διοσκουρίνη) του *Dioscorea batatas*, 57% με πιθανή νεκταρίνη (nectarin III) του *Oryza sativa*, 45% με τη χαρακτηρισμένη α-τύπου καρβονική ανυδράση του αζωτοδεσμευτικού βακτηρίου *Mesorhizobium loti* και 44% με τη χαρακτηρισμένη α-τύπου καρβονική ανυδράση του *Helicobacter pylori*.

Οι αμινοξικές ακολουθίες των πιθανών α-τύπου καρβονικών ανυδρασών του *L. japonicus* ευθυγραμμίστηκαν με τη νεκταρίνη *NEC3* από τον καπνό, τη χαρακτηρισμένη καρβονική ανυδράση (CAH) από το *N. gonorrhoeae* και τις καρβονικές ανυδράσες II και IV από τον άνθρωπο (εικόνα 13). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ανάμεσα στις προαναφερθείσες αμινοξικές ακολουθίες υπάρχουν έντονα συντηρημένες περιοχές, αλλά και περιοχές με μικρότερη ή καθόλου ομολογία.

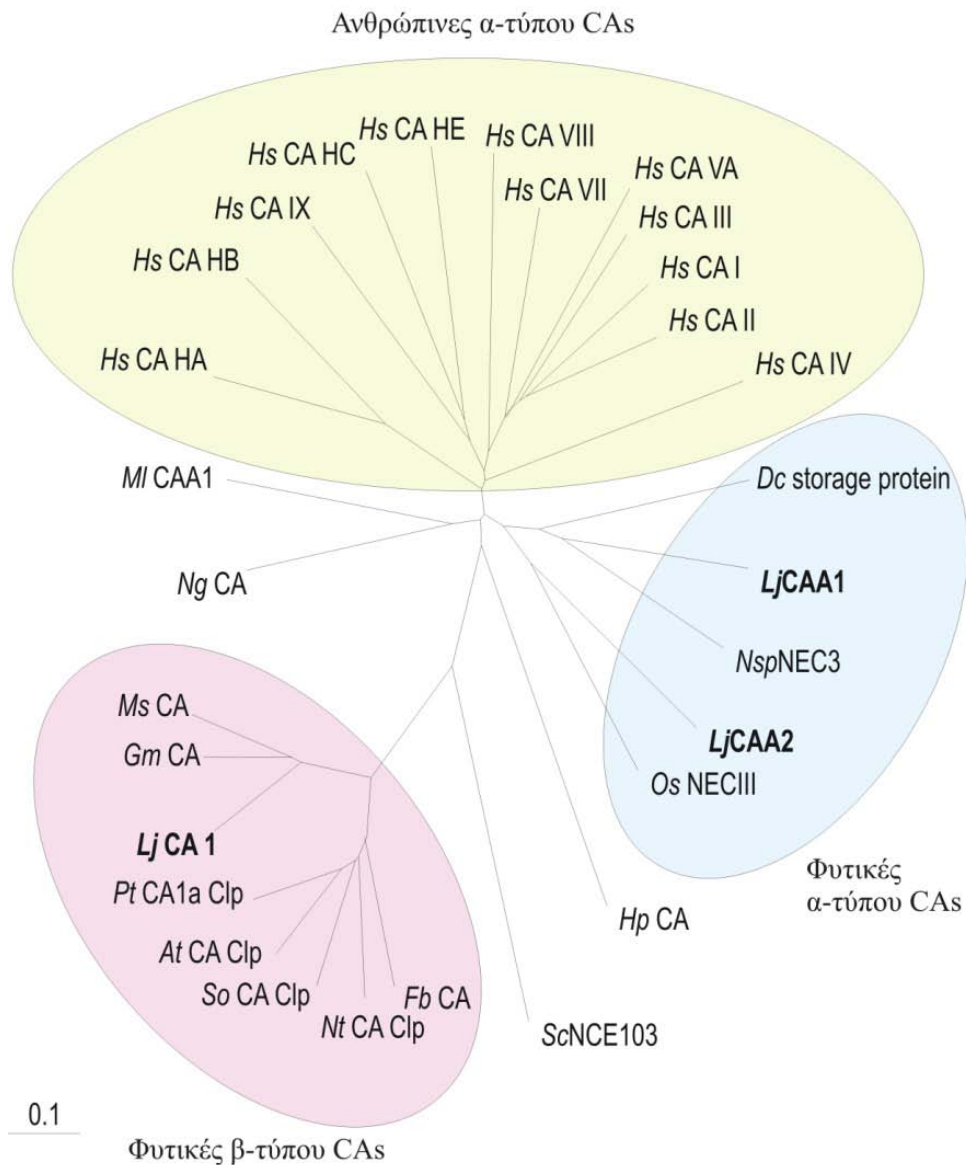
Στην εικόνα 13 έχουν επισημανθεί με αστερίσκο τα αμινοξικά κατάλοιπα που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενζυματική κατάλυση. Τα αμινοξέα His94, His96 και His119 της ανθρώπινης καλά χαρακτηρισμένης CAII, που συμμετέχουν στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου και ευθύνονται για τη δέσμευση του ψευδαργύρου είναι συντηρημένα και στις δύο ακολουθίες που πιθανώς κωδικοποιούν για τις α-τύπου καρβονικές ανυδράσες του *L. japonicus*. Επιπλέον, τα αμινοξέα Thr199 και Glu106 της *HsCAII*, που συμμετέχουν στο σχηματισμό δεσμού υδρογόνου είναι, επίσης, συντηρημένα στις δύο ακολουθίες του *L. japonicus*. Το αμινοξύ His64 της *HsCAII*, το οποίο μετέχει στη μεταφορά του πρωτονίου που παράγεται κατά την ενυδάτωση του CO<sub>2</sub> προς το εξωτερικό διάλυμα, είναι συντηρημένο μόνο στην πρωτεΐνη *LjCAA1* και όχι στην *LjCAA2* (στην εικόνα 13 έχει επισημανθεί με κύκλο).

Η ομοιότητα των αμινοξικών ακολουθιών μεταξύ των αντιπροσώπων των α-τύπου καρβονικών ανυδρασών, επέτρεψε την αναγνώριση συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων που είναι σημαντικά στην καταλυτική δράση των ενζύμων *LjCAA1* και *LjCAA2*. Τα αμινοξικά κατάλοιπα His 125, His 127 και His 144 της πρωτεΐνης *LjCAA1* και His 117, His 119 και His 136 της *LjCAA2* είναι οι καλύτεροι υποψήφιοι δεσμευτές του ψευδαργύρου. Επιπλέον, τα αμινοξικά κατάλοιπα Glu131 και Thr211 της πρωτεΐνης *LjCAA1* και Glu123 και Thr212 της *LjCAA2* είναι οι καλύτεροι υποψήφιοι για συμμετοχή στο σχηματισμό δεσμού υδρογόνου.

<i>LjCAA1</i>	MTLPTNHNLFSLVFLVTLTLCSSLFLTTTASESKGEEYIYTKGARNGPENWG-SLKPEWEVCRNGKSKQSPFIDIKN--VEGF	77
<i>LjCAA2</i>	-----MALRIYISTLSIAIFSLCTSA YDYSANFSYTGSS--NGPEKWG-TLSPDFAACSNKGAQSPVDIAYPDIVMN	68
<i>NspNEC3</i>	MRMAA---ITKMLFISFLFLLSSVFLARSGEVDDSEFSYDEKSENGPANWG-NIRPDWKECS-GKLOSPIDITFDLRAEVV	75
<i>NgCA</i>	-----MPRFPRTLPRLLTAVLLLLACTAFSAAAHGNHHTHWGVTGH--DSPESWG-NLSEEFRLCSTGKNQSPVNIITET--VS	70
<i>HsCA II</i>	-----MSHHWGYGKH--NGPEFWHKDFPIAKG-----ERQSPVDIDTHTAKYD	41
<i>HsCA IV</i>	-----MRMLLALLALSAAARPSASAESHWCYEVQ--AESSNYPCLVFVKWGGNCQKDRQSPINIVTTKAKVD	64
<i>LjCAA1</i>	SQMGKLLKRD--YKVPATLKNRGHDI MLQWDG-DAGKLNING--TYYKFEVQSHWHTE-----SEHTLNGSKEDMEMHA	145
<i>LjCAA2</i>	MELESIDRD--YLSNATLVNKNKFNIGVHFQGVGDINING--KNYSLKQLHWHSP-----AEHRAHGRVHEAELHL	137
<i>NspNEC3</i>	SNRIRILQKD--YKPSNATLKNRGHDI MLRLD--DGGYLLKINE--TQYQLKQLHWHTE-----SEHTINGERFNLEAHL	142
<i>NgCA</i>	GKLPFAIKVN--YKPSMVDVENNGHTIQVNYPE-GGNTLTVNG--RTYTLKQFHHHVE-----SENQIKGRTEPMAHF	138
<i>HsCA II</i>	PSLKPILSVS-YDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGTYRLIQFHHHWSLDGQGESEHTVDDKKKYAAELHL	120
<i>HsCA IV</i>	KKLGRFFFSGYDKQQTWTVQVNNGHSMMLLEN---KASISGGGLPAPYQAKQLHLHWSDLPYKGESEHSLDGEHFAMEMHI	141
<i>LjCAA1</i>	VHEN-----SKGERAVIGIWTYTGQ-PDPLLSKLLDNIKLSGD-----NKDID--LGILNPGLIKFGSR---	201
<i>LjCAA2</i>	VHLTP-----DNNGI AVAVLVNIGD-PDPIISQMEDKFFVALAKENRAGNKDAQIPIGTFDFEENARTHS--	202
<i>NspNEC3</i>	VHES-----NNGKFVVGIVYEI GLWDPDFLSMIENDLKV PAN----KKGIERGIGIIDPNQIKLDGK---	201
<i>NgCA</i>	VHLD-----ENKQPLVLAVLYEACK-TNGRLSSIWNVMPMTAG-----KVKLNQPFDASTLLPKRL--	193
<i>HsCA II</i>	VHWNTKYG--DFGKAVQPPDGLAVLGI FLKVG-SAKFGLQKVVVDVLD SIKT-----KGSADFTNFP RGLLPES---	188
<i>HsCA IV</i>	VHEKEKGT SRNVKEAQDFEDETAVLAFVLEAGTQVNEGFQFLVEALSNI PK-----PEMSTTMAESSLLDLLPKKEKLR	215
<i>LjCAA1</i>	KYRYRYVGSLLTTPPCSEGVIIWTVKVRTVSRQOLKALKEAVHDGF-----EINARPTQELNCRKV-WLYTFNVV---	269
<i>LjCAA2</i>	KYRYRYVGSLLTTPPCKEGVIIWTVKVRTVSRQOLLELLKAPLSQEY-----EINARPTQELNCRKIEYDHYNHRQGI-	274
<i>NspNEC3</i>	KYRYRYVGSLLTTPPCTEGVVIIDRKVKTVTRRQIKLLQEA VHDGF-----ETNARPTQEPENRYINSTYHSFGIEKQQ	274
<i>NgCA</i>	KYRYRYVGSLLTTPPCTEGVSWLVKTYDHDIDQAQAEKFTRAVGS-----ENNRPVQPLNARVVI E-----	252
<i>HsCA II</i>	DYWTYVGSLLTTPPLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEPEELMVDNWRPAOPLKNRQIKASFK-----	260
<i>HsCA IV</i>	HYRYRYVGSLLTTPPCDEKVVVTVVFRPEIQLHREQILAFSQKLYYDK-EQTVSMKDNVRPQQLGQRTVIKSGAPGRPLFWA	294
<i>LjCAA1</i>	-----	269
<i>LjCAA2</i>	-----	274
<i>NspNEC3</i>	-----	274
<i>NgCA</i>	-----	252
<i>HsCA II</i>	-----	260
<i>HsCA IV</i>	LPALLGPLMACLLAGFLR	312

**Εικόνα 13:** Σύγκριση των αμινοξικών ακολουθιών των α-τύπου καρβονικών ανυδρασών (CAs) του *L. japonicus* (*LjCAA1* και *LjCAA2*) με α-τύπου CAs από άλλους οργανισμούς: *NspNEC3* *Nicotiana langsdorffii* x *Nicotiana sanderae* nectarin III (Af492468), *NgCA* *N.gonorrhoeae* CAH (Y11152), *HsCAII* *Homo sapiens* Carbonic anhydrase II (P00918) και *HsCAIV* *Homo sapiens* Carbonic anhydrase IV (P22748). Τα πιθανά πεπτιδία οδηγού έχουν υπογραμμιστεί με κόκκινη γραμμή. Με αστερίσκο έχουν επισημανθεί τα αμινοξικά κατάλοιπα που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενζυματική κατάλυση. Οι αλληλουχίες έχουν ευθυγραμμιστεί με το πρόγραμμα BioEdit.

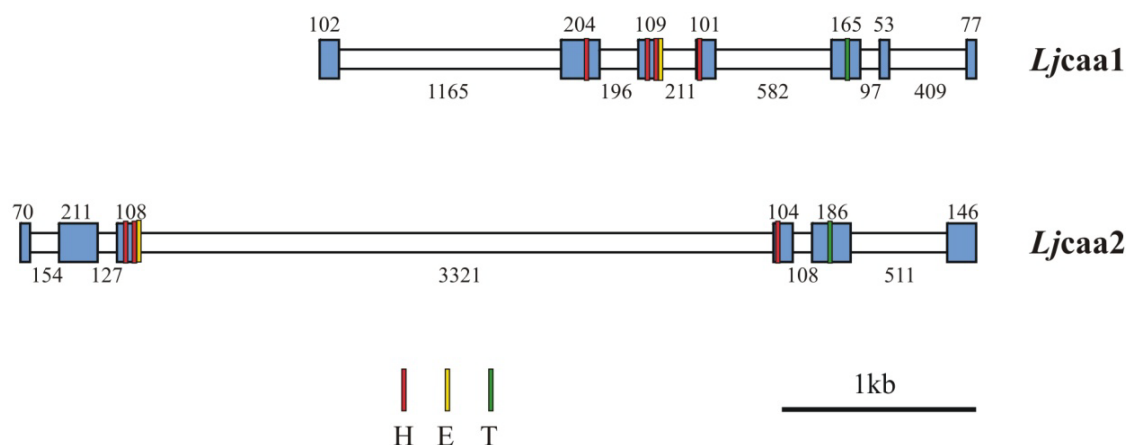
Με τη χρήση του αλγόριθμου ClustalX κατασκευάστηκε το δένδρογραμμα της εικόνας 14. Από το δένδρογραμμα προκύπτει ότι οι καρβονικές ανυδράσες του ανθρώπου διαμορφώνουν ένα ξεχωριστό κλάδο από όλες τις φυτικές πρωτεΐνες, ενώ οι φυτικές πρωτεΐνες μεταξύ τους χωρίζονται σε δύο διακριτούς κλάδους που διαχωρίζουν τις α-τύπου από τις β-τύπου καρβονικές ανυδράσες. Στον κλάδο των α-τύπου καρβονικών ανυδρασών έχουν ενταχθεί και οι δύο υπό μελέτη πρωτεΐνες του *L. japonicus*, ενώ στον κλάδο των β-τύπου καρβονικών ανυδρασών υπάρχει και η β-τύπου *LjCA1* του *L. japonicus*.



**Εικόνα 14:** Φυλογενετική σχέση των καρβονικών ανυδρασών του *L. japonicus* CAs (έντονη γραφή) με CAs από άλλους οργανισμούς: *HsCAHA* *H. sapiens* Carbonic anhydrase-related protein 10 (Q9NS85), *HsCAHB* *H. sapiens* Carbonic anhydrase-related protein 2 precursor (Q9UEC4), *HsCAIX* *H. sapiens* Carbonic anhydrase IX (AAH14950), *HsCAHC* *H. sapiens* Carbonic anhydrase XII precursor (O43570), *HsCAHE* *H. sapiens* Carbonic anhydrase XIV precursor (Q9ULX7), *HsCAVIII* *H. sapiens* Carbonic anhydrase-related protein (CARP) (P35219), *HsCAVII* *H. sapiens* Carbonic anhydrase VII (P43166), *HsCAVA* *H. sapiens* Carbonic anhydrase VA, mitochondrial precursor (P35218), *HsCAIII* *H. sapiens* Carbonic anhydrase III (AAH04897), *HsCAI* *H. sapiens* Carbonic anhydrase I (P00915), *HsCAII* *H. sapiens* Carbonic anhydrase II (P00918), *HsCAIV* *H. sapiens* Carbonic anhydrase IV precursor (P22748), *Dc storage protein* *D. cayenensis* storage protein (X76187), *NspNEC3* *Nicotiana langsdorffii* x *Nicotiana sanderae* nectarin III (AF492468), *OsNECIII* *O. sativa* putative nectarin III (BAD29283), *HpCA* *H. pylori* carbonic anhydrase (AAD08232), *ScNCE103* *S. cerevisiae* Carbonic anhydrase (NP\_014362), *FbCA* *F. bidentis* Carbonic anhydrase (P46510), *NtCA* *N. tabacum* Carbonic anhydrase chloroplast precursor (P27141), *SoCA* *S. oleracea* Carbonic anhydrase chloroplast precursor (P16016), *AtCA* *A. thaliana* AT3g01500/F4P13\_5 (AAL16228), *PtCA1a* *Populus tremula* x *Populus tremuloides* carbonic anhydrase (U55837), *GmCA* *G. max* carbonic anhydrase (CAB43571), *MsCA* *M. sativa* Carbonic anhydrase (CAA63712), *NgCA* *N. gonorrhoeae* (Y11152), *MICAA1* *M. loti* (Q98EQ3)

Το δενδρόγραμμα κατασκευάστηκε με τη χρήση του προγράμματος ClustalX

Οι δομές των δύο γονιδίων παρουσιάζονται στην εικόνα 15. Το γονίδιο *Ljcaa1*, αποτελείται από 7 εξόνια που το μέγεθός τους ποικίλει από 53 ως 204 νουκλεοτίδια. Το γονίδιο *Ljcaa2*, αποτελείται από 6 εξόνια που το μέγεθός τους ποικίλει από 70 ως 211 νουκλεοτίδια. Χαρακτηριστικό είναι ένα μεγάλο μήκους εσόνιο (3321 νουκλεοτίδια) που βρίσκεται μεταξύ του τρίτου και τέταρτου εξονίου στο γονίδιο *Ljcaa2*.

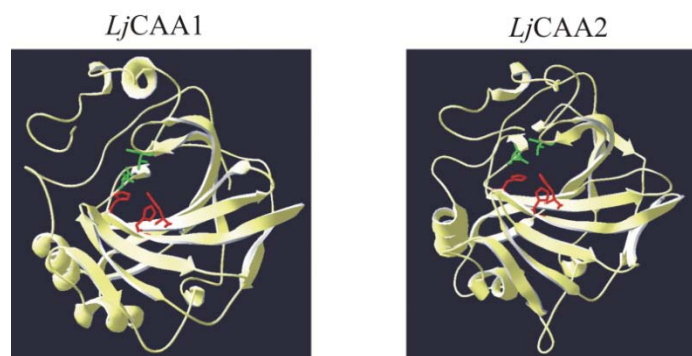


**Εικόνα 15:** Δομή των γονιδίων που πιθανά κωδικοποιούν για ισότυπους της α-τύπου καρβονικής ανυδράσης στο *L. japonicus*. Τα μπλε ορθογώνια απεικονίζουν τα εξόνια ενώ τα λευκά τα εσόνια. Οι αριθμοί δηλώνουν το μέγεθος των εσονίων και εξονίων σε νουκλεοτίδια. Με τις χρωματιστές γραμμές απεικονίζονται οι θέσεις των κωδικονίων τα οποία κωδικοποιούν για τα αμινοξέα που συμμετέχουν στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου. Η: ιστιδίνη, Ε: γλουταμινικό οξύ, Τ: θρεονίνη.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα σημαντικά για την κατάλυση αμινοξέα κατανέμονται ουσιαστικά σε τρία συγκεκριμένα εξόνια. Και στα δύο γονίδια οι δύο από τις τρεις ιστιδίνες δεσμευτές του ψευδαργύρου εντοπίζονται στο τρίτο εξόνιο, ενώ η τρίτη ιστιδίνη βρίσκεται στην αρχή του τέταρτου εξονίου. Το σημαντικά αμινοξέα γλουταμινικό οξύ και θρεονίνη που πιθανά συμμετέχουν στο σχηματισμό υδρογόνου εντοπίζονται στο τρίτο και πέμπτο εξόνιο, αντίστοιχα, και στα δύο γονίδια. Το αμινοξύ His64 της *HsCAII*, το οποίο μετέχει στη μεταφορά του πρωτονίου που παράγεται κατά την ενυδάτωση του  $\text{CO}_2$  προς το εξωτερικό διάλυμα, είναι συντηρημένο μόνο στην πρωτεΐνη *LjCAA1* και εντοπίζεται στο δεύτερο εξόνιο.

*In silico* ανάλυση της τριτοταγούς δομής των δύο α-τύπου καρβονικών ανυδρασών του *L. japonicus*, προέβλεψε ότι το ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών έχει μια διαμόρφωση παρόμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε στις α-τύπου καρβονικές ανυδράσες των θηλαστικών (εικόνα 16). Η πρόβλεψη της πιθανής δομής των πρωτεϊνών στο χώρο έγινε με τη χρήση της ιστοσελίδας του SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org/>), που πρόκειται για ένα αυτοματοποιημένο σύστημα σύγκρισης πρωτεϊνών άγνωστης δομής με πρωτεΐνες γνωστής

δομής. Το ιόν ψευδαργύρου είναι διατεταγμένο τετραεδρικά στα ιμιδαζόλια των τριών ιστιδινών (στην εικόνα 4 με χρώμα κόκκινο) και σε ένα μόριο νερού ή υδροξυλίου (OH<sup>-</sup>). Τα κατάλοιπα Glu και Thr που συμμετέχουν στο σχηματισμό δεσμού υδρογόνου, φαίνονται στην εικόνα 16 με χρώμα πράσινο.



**Εικόνα 16:** *In silico* μοριακό μοντέλο των α-τύπου καρβονικών ανυδρασών στα φυμάτια του *L. japonicus*

## 2. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ α-ΤΥΠΟΥ ΚΑΡΒΟΝΙΚΩΝ ΑΝΥΔΡΑΣΩΝ ΤΟΥ *Lotus japonicus*

Τα cDNA που κωδικοποιούν για τις πιθανές α-τύπου καρβονικές ανυδράσες στα φυμάτια του *L. japonicus* κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο φορέα έκφρασης με σκοπό την επαγόμενη έκφραση των πρωτεϊνών *LjCAA1* και *LjCAA2* σε σύστημα *E. coli* και την απομόνωσή τους.

Για την κλωνοποίηση των αλληλουχιών, ενισχύθηκε η κωδική περιοχή των αντίστοιχων cDNA με τη χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, PCR (Polymerase Chain Reaction). Σχεδιάστηκαν εκκινητές για την κάθε κωδική περιοχή που έφεραν αλληλουχίες αναγνώρισης από ενδονουκλεάσες περιορισμού για την κλωνοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR στον φορέα έκφρασης (Πίνακας 7). Ο ευθύς εκκινητής της κωδικής αλυσίδας έφερε τη θέση αναγνώρισης NcoI και ο ανάστροφος εκκινητής έφερε τη θέση αναγνώρισης XhoI. Ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε είναι ο pET-28a. Ένθεση των κωδικών περιοχών των γονιδίων στον φορέα αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες που εκφράζονται να φέρουν στο καρβόξυ τελικό τους άκρο μια ουρά συγγένειας έξι ιστιδινών που είναι απαραίτητη για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη αгарόζης που φέρει ακινητοποιημένα μεταλλικά ιόντα νικελίου. Για το λόγο αυτό, ο ανάστροφος εκκινητής δεν έφερε το κωδικόνιο λήξης που θα τερμάτιζε τη μετάφραση.

cDNA	Αλληλουχίες εκκινητών
<i>LjCAA1</i>	Ευθύς: 5' - CATGCCATGGCTGAATCTAAAGGTGAAG -3' Ανάστροφος: 5'-AAACTCGAGCACCACATTTGGAGTATATAA-3'
<i>LjCAA2</i>	Ευθύς: 5' - CATGCCATGGCATATGACTATTCTGC -3' Ανάστροφος: 5'-AAACTCGAGAATCCCCTGCCTATGGTTGTA-3'

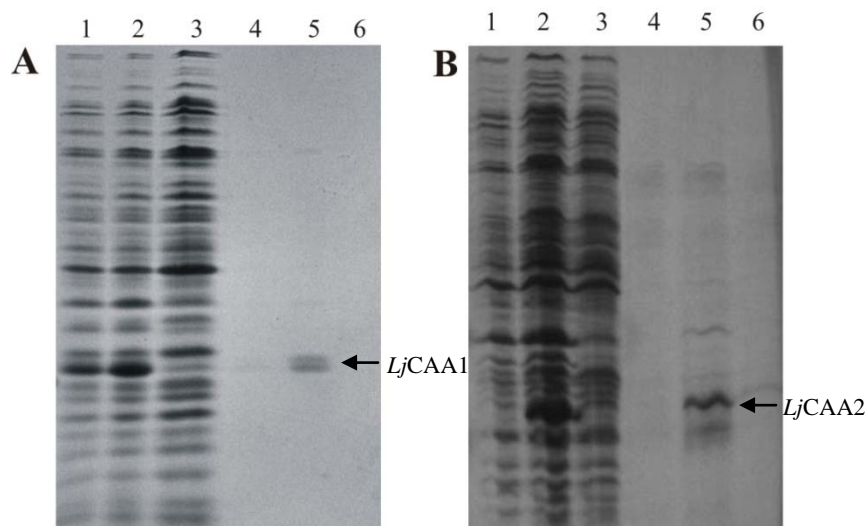
**Πίνακας 7:** Αλληλουχίες εκκινητών για την κλωνοποίηση των *LjCAA1* και *LjCAA2* στον φορέα έκφρασης pET-28a

Για την κλωνοποίηση των *LjCAA1* και *LjCAA2*, αφαιρέθηκε από τις αλληλουχίες cDNA το τμήμα εκείνο που αντιστοιχεί στα πιθανά πεπτιδία οδηγούς. Αυτό έγινε γιατί όταν δοκιμάστηκε να χρησιμοποιηθούν ολόκληρες οι αλληλουχίες cDNA (συμπεριλαμβανομένων των πεπτιδίων οδηγών) παρατηρήθηκε τοξικότητα στα κύτταρα στα οποία παραγόταν οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Πιθανότατα η παρουσία του πεπτιδίου οδηγού προκαλούσε τη συσσώρευση της παραγόμενης πρωτεΐνης γύρω από μεμβράνες του κυττάρου και εμπόδιζε λειτουργίες ζωτικής σημασίας για το κύτταρο.

Μετά την κλωνοποίηση, έγινε αλληλούχιση των πλασμιδίων που έφεραν τα *LjCAA1* και *LjCAA2* cDNAs και ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων έκφρασης. Για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *LjCAA1* χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα έκφρασης BL21(DE3) (Studier & Moffatt, 1986), ενώ για την πρωτεΐνη *LjCAA2* χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα έκφρασης C43 (DE3) (Miroux & Walker, 1996), τα οποία έχουν προέλθει από τα κύτταρα BL21(DE3) αλλά φέρουν κάποιες μεταλλάξεις. Τα κύτταρα C43 (DE3) δοκιμάστηκαν γιατί η παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης *LjCAA2* ήταν πολύ μειωμένη στα κύτταρα BL21(DE3).

Από την έκφραση των πρωτεϊνών έγινε φανερό ότι και οι δύο πρωτεΐνες συσσωρεύονται στα κύτταρα *E. coli* κυρίως σε αδιάλυτη μορφή, ενώ ένα μικρό ποσοστό των εκφραζόμενων πρωτεϊνών βρίσκεται σε διαλυτή μορφή. Για να αποφευχθεί η υπερσυσσώρευση των εκφραζόμενων πολυπεπτιδίων στα κύτταρα *E. coli* και να αυξηθεί το ποσοστό της διαλυτής πρωτεΐνης, η θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων μειώθηκε στους 23°C (άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 37°C) και ο χρόνος επαγωγής της πρωτεΐνης μειώθηκε στις 4 ώρες (προτεινόμενος χρόνος 6 ώρες).

Ακολούθως, τα εκφραζόμενα πολυπεπτιδία καθαρίστηκαν με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη αγαρόζης που φέρει ακινητοποιημένα μεταλλικά ιόντα νικελίου (Ni-NTA Agarose, QIAGEN), καθώς φέρουν στο καρβόξυ-τελικό άκρο τους ουρά συγγένειας έξι ιστιδινών. Τα εκφραζόμενα πολυπεπτιδία (απουσία του πεπτιδίου οδηγού) έχουν μοριακό βάρος περίπου 28,3 kDa όσο αφορά την *LjCAA1* και 29,7 kDa όσο αφορά την *LjCAA2* όταν αναλυθούν σε πηκτή πολυακριαμίδης (Εικόνα 17).



**Εικονα 17:** Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός των ανασυνδυασμένων *LjCAA1* (A) και *LjCAA2* (B) πολυπεπτιδίων απουσία του αμινο-τελικού πεπτιδίου οδηγού. Στήλη 1, ολικές πρωτεΐνες από κύτταρα *E. coli* πριν την επαγωγή με IPTG; στήλη 2, ολικές πρωτεΐνες από κύτταρα *E. coli* μετά την επαγωγή με IPTG; στήλη 3, ολικές διαλυτές πρωτεΐνες από κύτταρα *E. coli*; στήλες 4, 5, 6, κλάσματα καθαρισμού των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων.

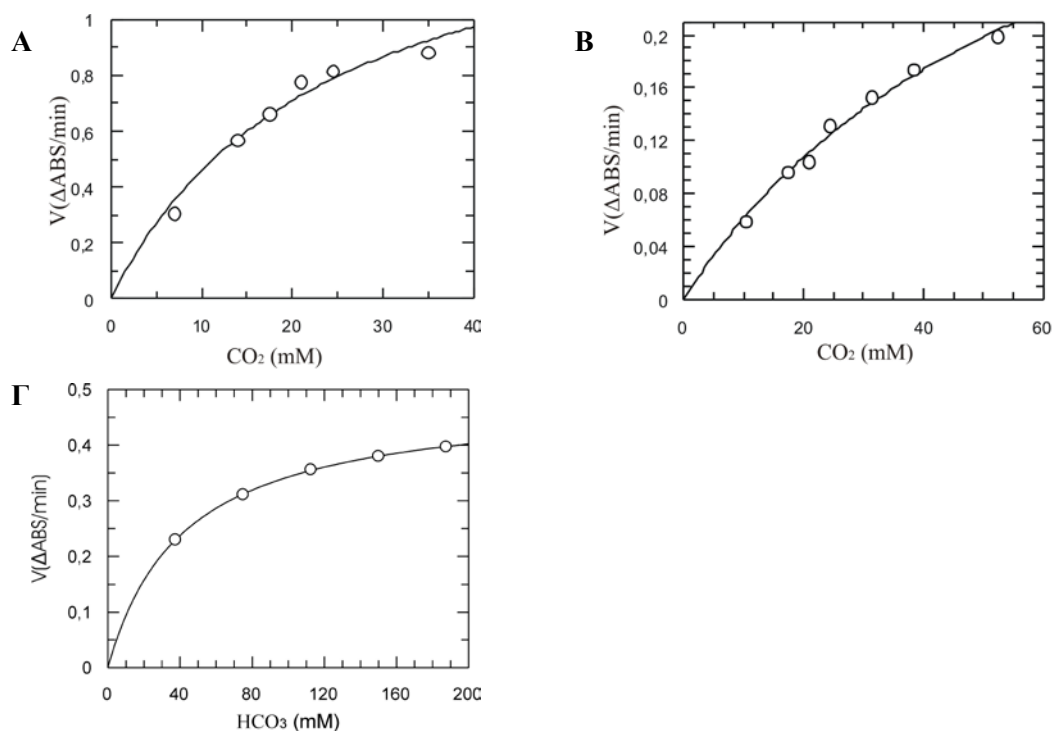
Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν σε σχετικά καθαρή μορφή (ποσοστό καθαρότητας 70-80%). Η πρωτεΐνη *LjCAA1* απομονώθηκε σε συγκέντρωση 0,4mg ανά λίτρο καλλιέργειας, ενώ η *LjCAA2* σε συγκέντρωση 0,5mg ανά λίτρο καλλιέργειας.

Στη συνέχεια οι καθαρισμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν σε βιοχημικές δοκιμές με σκοπό το βιοχημικό τους χαρακτηρισμό. Πριν από τον έλεγχο της ενζυμικής τους δραστηριότητας οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες υποβλήθηκαν σε διαπίδυση για την απομάκρυνση της υψηλής συγκέντρωσης ιμαδαζολίου.

### 3. ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ $\alpha$ -ΤΥΠΟΥ ΚΑΡΒΟΝΙΚΩΝ ΑΝΥΔΡΑΣΩΝ ΤΟΥ *Lotus japonicus*

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για να διαπιστωθεί αν τα ανασυνδυασμένα πολυπεπτιδία παρουσιάζουν δραστηριότητα καρβονικής ανυδράσης. Η μελέτη δραστηριότητας καρβονικής ανυδράσης βασίστηκε σε μετρήσεις στην αλλαγή του pH κατά τη διάρκεια της βιοχημικής αντίδρασης με τη χρήση μιας χρωμοφόρου ουσίας (Khalifah, 1971). Η αμφίδρομη μετατροπή του  $\text{CO}_2$  σε  $\text{HCO}_3^-$  επιφέρει αλλαγές στη συγκέντρωση ιόντων  $\text{H}^+$  κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και οι αλλαγές αυτές μπορούν να μετατραπούν σε αλλαγή απορρόφησης όταν προστεθεί στην αντίδραση η κατάλληλη χρωμοφόρος ουσία. Η αλλαγές στην απορρόφηση μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο στο κατάλληλο μήκος κύματος και σε θερμοκρασία 4°C.





**Εικόνα 18:** Ενζυματικές δοκιμές στα ανασυνδυασμένα πολυπεπίδια *LjCAA1* και *LjCAA2* για να ελεγχθεί πιθανή δράση καρβονικής ανυδράσης: **A)** Κινητική μελέτη της *LjCAA1* για δράση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> που πραγματοποιήθηκε σε pH=7,5 σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES/NaOH, **B)** Κινητική μελέτη της *LjCAA2* για δράση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> που πραγματοποιήθηκε σε pH=7,5 σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES/NaOH, **Γ)** Κινητική μελέτη της *LjCAA1* για δράση αφυδάτωσης των δισανθρακικών ιόντων που πραγματοποιήθηκε σε pH=6,3 σε ρυθμιστικό διάλυμα MES/KOH. Οι κινητικές παράμετροι υπολογίστηκαν κατόπιν εφαρμογής των διορθωμένων δεδομένων στην εξίσωση Michaelis- Menten χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraFit v3.5. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων.

Οι τιμές pH στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι βιοχημικές δοκιμές είναι pH=6,3 και pH=7,5. Στην τιμή pH=6,3 χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα MES σε συνδυασμό με τη χρωμοφόρο ουσία κυανό της βρωμοθυμόλης και η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 615nm. Ως υπόστρωμα της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το NaHCO<sub>3</sub>. Στην τιμή pH=7,5 χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα HEPES σε συνδυασμό με τη χρωμοφόρο ουσία ερυθρό της φαινόλης. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 557nm, ενώ ως υπόστρωμα της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε νερό κορεσμένο σε CO<sub>2</sub>.

Πάρθηκαν τιμές ρυθμού απορρόφησης (ΔAbs/min) σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρωμάτων και από τις τιμές αυτές προέκυψαν οι καμπύλες της εικόνας 18. Οι τιμές με τις οποίες κατασκευάστηκαν οι καμπύλες είναι διορθωμένες, καθώς από το ρυθμό απορρόφησης που μετρήθηκε παρουσία ενζύμου έχει αφαιρεθεί ο ρυθμός απορρόφησης που καταγράφεται κατά την αυθόρμητη αντίδραση.

Από τις καμπύλες αυτές γίνεται φανερό ότι τα ένζυμα ακολουθούν κινητική Michaelis-Menten, οπότε έγινε υπολογισμός των κινητικών σταθερών  $k_{cat}$ ,  $K_M$ ,  $V_{MAX}$  και της ειδικής δραστηριότητας των ενζύμων (πίνακας 8).

	Ενυδάτωση CO <sub>2</sub> <i>LjCAA1</i>	Ενυδάτωση CO <sub>2</sub> <i>LjCAA2</i>	Αφυδάτωση HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <i>LjCAA1</i>
<b>K<sub>M</sub> (mM)</b>	23,8±6,5	65,4±11,7	41,8±0,6
<b>V<sub>MAX</sub></b>	1,6±0,2	0,45±0,05	0,5
<b>k<sub>cat</sub> (sec<sup>-1</sup>)</b>	7,9x10 <sup>5</sup>	3,5x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>
<b>k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> (sec<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>)</b>	33x10 <sup>6</sup>	5,4x10 <sup>6</sup>	10,7x10 <sup>6</sup>
<b>Ειδική δραστηριότητα (units/mg)</b>	1,7(±0,2)x10 <sup>6</sup>	0,7(±0,08)x10 <sup>6</sup>	0,95(±0,004)x10 <sup>6</sup>

**Πίνακας 8:** Κινητικές σταθερές και ειδική δραστηριότητα των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων *LjCAA1* και *LjCAA2* που υπολογίστηκαν από τις ενζυμικές αντιδράσεις ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> και αφυδάτωσης των δισανθρακικών ιόντων.

Το ανασυνδυασμένο πολυπεπίδιο *LjCAA1* παρουσίασε κινητική Michaelis–Menten τόσο στο ρυθμιστικό διάλυμα HEPES όσο και στο ρυθμιστικό διάλυμα MES σε τιμές pH 7.5 και 6.3, αντίστοιχα. Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου που υπολογίστηκε κατά την αντίδραση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> είναι σχεδόν διπλάσια από την ειδική δραστηριότητα που υπολογίστηκε κατά την αντίδραση αφυδάτωσης των δισανθρακικών ιόντων. Το ανασυνδυασμένο πολυπεπίδιο *LjCAA2* παρουσίασε κινητική Michaelis–Menten μόνο στο ρυθμιστικό διάλυμα HEPES σε τιμή pH=7,5. Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου *LjCAA2* στην αντίδραση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> υπολογίστηκε να είναι αρκετά μικρότερη από την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε στο ένζυμο *LjCAA1*.

Οι μετρήσεις αυτές αποδεικνύουν ότι και τα δύο ανασυνδυασμένα πολυπεπίδια *LjCAA1* και *LjCAA2* είναι ενεργές καρβονικές ανυδράσεις.

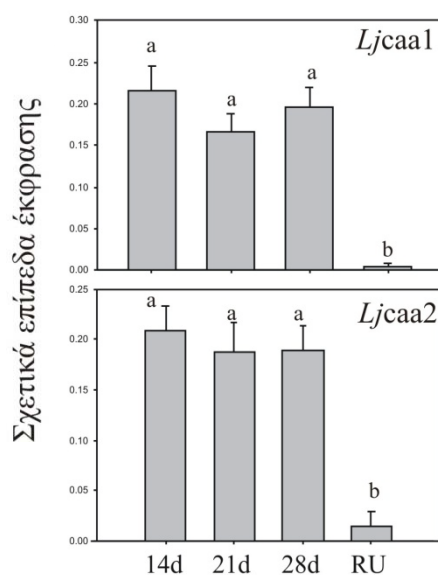
#### 4. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *Ljcaa1* ΚΑΙ *Ljcaa2* ΣΤΟ *Lotus japonicus*

Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2* μελετήθηκε τόσο σε συμβιωτικούς όσο και σε μη συμβιωτικούς ιστούς του φυτού *L. japonicus*, καθώς και σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του φυματίου. Επιπλέον, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων αυτών σε φυμάτια φυτών που είχαν υποστεί συνθήκες σκότους, καθώς επίσης και σε μη αζωτοδεσμευτικά φυμάτια που είχαν μολυνθεί με τα μεταλλαγμένα ριζόβια *ΔNifA* και *ΔNifH*.

Η μελέτη του προτύπου έκφρασης πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της μεθόδου ποσοτικού RT-PCR πραγματικού χρόνου (real time RT-qPCR). Ολικό RNA απομονώθηκε από τους διαφορετικούς ιστούς του φυτού και μετατράπηκε σε cDNA με ανάστροφη

μεταγραφή χρησιμοποιώντας τον εκκινητή oligo(dT). Τα τελικά προϊόντα ενισχύθηκαν με αντίδραση PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τα επίπεδα έκφρασης του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικιτίνης.

Για να μελετήσουμε το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2* κατά τη διάρκεια της συμβίωσης, πραγματοποιήσαμε qRT-PCR σε ολικό RNA που απομονώθηκε από φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών, καθώς και από μη-μολυσμένες ρίζες (RU) για σύγκριση (εικόνα 19).



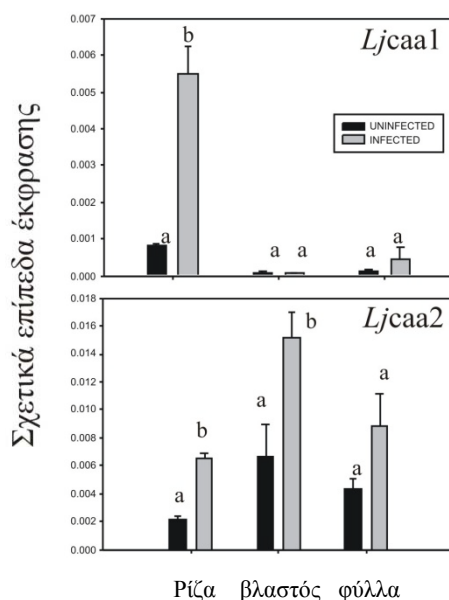
**Εικόνα 19:** Συσσώρευση μεταγραφημάτων των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2* σε φυμάτια 14 (14d), 21 (21d), 28 (28d) ημερών και σε μη-μολυσμένες ρίζες (RU) του *L. japonicus*. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν μέσους όρους τριών βιολογικών επαναλήψεων

Η μεγαλύτερη συσσώρευση μεταγραφημάτων παρατηρήθηκε 14 μέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με τα ριζόβια. Στα φυμάτια 14 ημερών, τα μεταγραφικά επίπεδα των *Ljcaa1* και *Ljcaa2* ήταν αντίστοιχα 46 και 14 φορές υψηλότερα από εκείνα στη μη-μολυσμένη ρίζα. Στα 21 και 28 ημερών φυμάτια, τα μεταγραφικά επίπεδα των *Ljcaa1* και *Ljcaa2* εμφανίζονται μειωμένα σε σύγκριση με εκείνα των 14 ημερών, αλλά παραμένουν υψηλά σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης στη μη-μολυσμένη ρίζα.

Ολικό RNA απομονώθηκε επίσης από φύλλα, βλαστούς και ρίζα μολυσμένων και μη-μολυσμένων 28 ημερών φυτών *L. japonicus*. Τα μεταγραφήματα των γονιδίων στους μη συμβιωτικούς ιστούς των μολυσμένων φυτών είναι αυξημένα σε σχέση με εκείνα στους αντίστοιχους ιστούς των μη μολυσμένων φυτών και παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές για το *Ljcaa1* στη ρίζα και για το *Ljcaa2* σε ρίζα και βλαστό (εικόνα 20). Παρόλα αυτά, τα μεταγραφικά επίπεδα και των δύο γονιδίων στους μη συμβιωτικούς ιστούς

θεωρούνται μη σημαντικά όταν τα συγκρίνουμε με τη συσσώρευση μεταγραφημάτων που παρατηρείται στα φυμάτια.

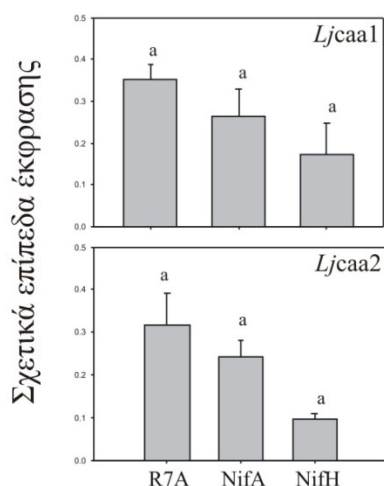
Τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης και των δύο γονιδίων στους μη-συμβιωτικούς ιστούς αποκάλυψε ότι τα γονίδια *Ljcaa1* και *Ljcaa2* κωδικοποιούν για ισότυπους καρβονικών ανυδρασών που επάγονται ισχυρά στα φυμάτια.



**Εικόνα 20:** Συσσώρευση μεταγραφημάτων των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2* σε μη-συμβιωτικούς ιστούς μολυσμένων και μη-μολυσμένων φυτών *L. japonicus*. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν μέσους όρους τριών βιολογικών επαναλήψεων

Για να εξετάσουμε το ενδεχόμενο κάποιας συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2* με την αζωτοδέσμευση και την οργανογένεση του φυματίου, τα επίπεδα έκφρασης μελετήθηκαν επίσης σε μη-αζωτοδεσμευτικά φυμάτια που είχαν μολυνθεί με τα μεταλλαγμένα στελέχη του *Mesorhizobium loti*,  $\Delta NifA$  και  $\Delta NifH$  (εικόνα 21). Το γονίδιο *nifH* κωδικοποιεί για την ομοδιμερή Fe-πρωτεΐνη που αποτελεί τμήμα της νιτρογενάσης (Hadfield & Bulen, 1969), ενώ το γονίδιο *nifA* κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη NifA που αποτελεί μεταγραφικό ενεργοποιητή πολλών *nif* και *fix* γονιδίων του *Mesorhizobium loti* (Gussin *et al.*, 1986). Στα μεταλλαγμένα στελέχη  $\Delta NifA$  και  $\Delta NifH$  έχει επηρεαστεί, επομένως, η έκφραση του γονιδίου της νιτρογενάσης, και κατά συνέπεια η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης.

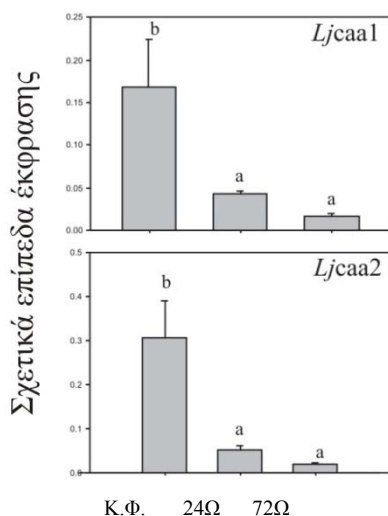
Απομονώθηκε ολικό RNA από φυμάτια που είχαν μολυνθεί με τα μεταλλαγμένα ριζόβια και επίσης από φυτά που είχαν μολυνθεί με το αγρίου-τύπου ριζόβιο (R7A) για σύγκριση. Τα φυμάτια ήταν ηλικίας 21 ημερών γιατί φυτά που μολύνονται με τα μεταλλαγμένα ριζόβια δεν καταφέρνουν να επιβιώσουν περισσότερο από 21 ημέρες.



**Εικόνα 21:** Συσσώρευση μεταγραφημάτων των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2* σε φυμάτια φυτών *L. Jaronicus* που έχουν μολυνθεί με τα μεταλλαγμένα στελέχη του *Mesorhizobium loti*,  $\Delta NifA$  και  $\Delta NifH$ . Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν μέσους όρους τριών βιολογικών επαναλήψεων

Τα μεταγραφικά επίπεδα του *Ljcaa1* είναι 1,3-φορές χαμηλότερα στα φυμάτια των μεταλλαγμένων  $\Delta NifA$  ριζοβίων και 2-φορές χαμηλότερα στα φυμάτια των μεταλλαγμένων  $\Delta NifH$  ριζοβίων σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης που παρατηρήθηκαν στα φυμάτια των αγρίου-τύπου ριζοβίων. Όσο αφορά το γονίδιο *Ljcaa2*, τα αντίστοιχα επίπεδα μεταγραφημάτων είναι 1,3-φορές χαμηλότερα στα φυμάτια των μεταλλαγμένων  $\Delta NifA$  ριζοβίων και 3,2-φορές χαμηλότερα στα φυμάτια των μεταλλαγμένων  $\Delta NifH$  ριζοβίων.

Επιπλέον, στο πρώτο μέρος της εργασίας αυτής, η έκφραση των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2* είχε μελετηθεί και σε 28 ημερών φυμάτια φυτών *L. jaronicus* που είχαν υποστεί συνθήκες παρατεταμένου σκότους για 24 και 72 ώρες (εικόνα 22). Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκε ολικό RNA από φυμάτια φυτών που είχαν υποστεί τις συνθήκες σκότους και επίσης από φυμάτια φυτών που αναπτυσσόταν σε κανονική φωτοπερίοδο.



**Εικόνα 22:** Συσσώρευση μεταγραφημάτων των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2* σε φυμάτια φυτών *L. jaronicus* που έχουν υποστεί συνθήκες σκότους για 24 ώρες (24Ω), 72 ώρες (72Ω) και σε κανονική φωτοπερίοδο (Κ.Φ.). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν μέσους όρους τριών βιολογικών επαναλήψεων

Τα επίπεδα μεταγραφημάτων είχε βρεθεί να μειώνονται σημαντικά μετά από συνθήκες παρατεταμένου σκότους και για τα δύο γονίδια. Συγκεκριμένα, τα μεταγραφικά επίπεδα του *Ljcaa1* παρουσιάζονται σχεδόν 4 φορές μειωμένα μετά από 24 ώρες σκοτάδι και περίπου 10 φορές μειωμένα μετά από 72 ώρες σκοτάδι σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μεταγραφικά επίπεδα που μετρήθηκαν σε φυτά που αναπτυσσόταν σε κανονική φωτοπερίοδο. Όσο αφορά το γονίδιο *Ljcaa2*, τα μεταγραφικά επίπεδα εμφανίζονται σχεδόν 6 φορές μειωμένα μετά από 24 ώρες σκοτάδι και περίπου 16 φορές μειωμένα μετά από 72 ώρες σκοτάδι.

##### 5. *IN SITU* ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ mRNA ΤΩΝ *LjCAA1* ΚΑΙ *LjCAA2* ΣΤΑ ΦΥΜΑΤΙΑ ΤΟΥ *Lotus japonicus*

Για το χρονικό και χωροταξικό εντοπισμό των mRNA των *LjCAA1* και *LjCAA2* στα φυμάτια του *L. japonicus* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του RNA-RNA *in situ* υβριδισμού. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν προσεκτικά φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών και εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα μονιμοποίησης. Τα φυμάτια αφυδατώθηκαν, εγκλείστηκαν σε παραφίνη και στη συνέχεια ελήφθησαν τομές πάχους 7μm, οι οποίες μεταφέρθηκαν σε κατάλληλα επεξεργασμένες αντικειμενοφόρους.

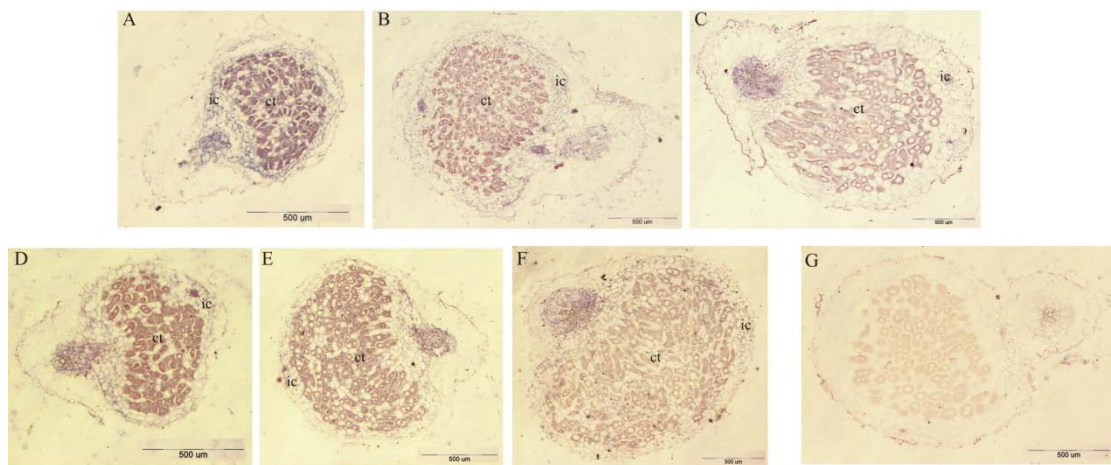
Η υβριδοποίηση των τομών έγινε με σημασμένο αντιπληροφοριακό RNA, το οποίο προέκυψε με *in vitro* μεταγραφή από τους cDNA κλώνους *Ljnest13e5* και *Ljnest20a7rc* που κωδικοποιούν αντίστοιχα για τις *LjCAA1* και *LjCAA2*, με τη χρήση της κατάλληλης, κάθε φορά, RNA πολυμεράσης. Η σήμανση του RNA έγινε με τη χρήση ουριδινο-τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων σημασμένων με διγοξιγενίνη (DIG-11-rUTP). Η ανίχνευση του σήματος υβριδισμού έγινε με τη χρήση αντι-DIG αντισωμάτων τα οποία φέρουν δεσμευμένο το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης. Η αλκαλική φωσφατάση καταλύει το σχηματισμό χρωμοφόρου ιζήματος, παρουσία του υποστρώματος NBT/BCIP. Το σήμα του υβριδισμού εμφανίζεται ως μπλε-μωβ ίζημα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τομές οι οποίες υβριδίστηκαν με πληροφοριακό RNA.

Σε νεαρής ηλικίας φυμάτια, 14 ημέρες μετά τη μόλυνση με το *M. loti*, μεταγραφήματα και των δύο γονιδίων εμφανίζονται σε όλους τους ιστούς του φυματίου (εικόνα 23, A και D). Κατά το στάδιο αυτό, αν και το φυμάτιο δεν έχει αποκτήσει ακόμη το τελικό του μέγεθος, διακρίνεται ο κεντρικός ιστός, ο οποίος αποτελείται από μολυσμένα και μη μολυσμένα κύτταρα, που έχουν περίπου το ίδιο μέγεθος αλλά διαφέρουν ως προς την πυκνότητα του κυτταροπλάσματος. Σήμα υβριδισμού ανιχνεύτηκε τόσο στο παρέγχυμα και στις αναπτυσσόμενες ημιαγγειώδεις δεσμίδες όσο και στον κεντρικό ιστό.

Τα φυμάτια ηλικίας 21 ημερών είναι πλήρως λειτουργικά και έχουν λάβει σχεδόν το τελικό τους μέγεθος. Σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο ο κεντρικός ιστός είναι πλήρως

διαφοροποιημένος σε μολυσμένα και μη μολυσμένα κύτταρα και περιβάλλεται από το παρέγχυμα του φυματίου, εντός του οποίου βρίσκονται τα αγωγά στοιχεία, τα οποία και διακλαδίζονται γύρω από τον κεντρικό ιστό. Σε φυμάτια ηλικίας 21 ημερών, μεταγραφήματα του *Ljcaa1* εντοπίζονται σε όλους τους ιστούς, αν και η ανίχνευση έντονου σήματος περιορίζεται στο παρέγχυμα και τα αγωγά στοιχεία, ενώ στον κεντρικό ιστό το σήμα υβριδισμού εξασθενεί και είναι λιγότερο ευδιάκριτο. Αντιθέτως, όσο αφορά το γονίδιο *Ljcaa2*, μεταγραφήματά του συνεχίζουν να εντοπίζονται σε όλους τους ιστούς του φυματίου.

Σε ώριμα φυμάτια, 28 ημέρες μετά τη μόλυνση με το *M. loti*, τα μεταγραφήματα και των δύο γονιδίων εντοπίζονται κυρίως στο παρέγχυμα του φυματίου.



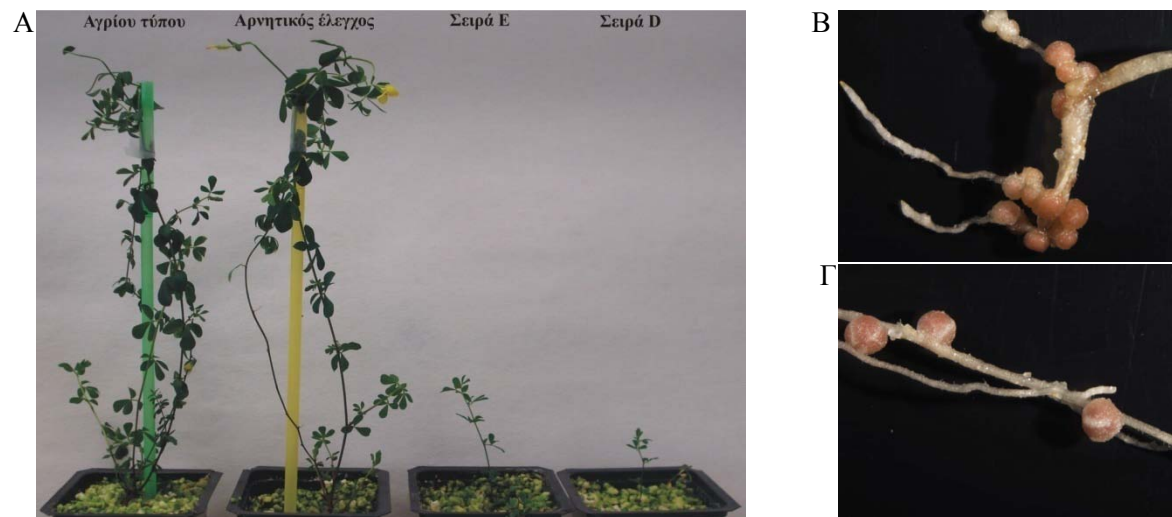
**Εικόνα 23:** *In situ* υβριδισμός για την ανίχνευση των *Ljcaa1* (TC20553) και *Ljcaa2* (TC20414) μεταγραφημάτων σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του φυματίου στο *L. japonicus*. Το σήμα υβριδισμού εμφανίζεται ως μπλε-μωβ ίζημα. Στα εικονίδια A, B και C παρουσιάζονται τομές που έχουν υβριδιστεί με αντιπληροφοριακό RNA από τον cDNA κλώνο του *Ljcaa1*, ενώ στα εικονίδια D, E και F παρουσιάζονται τομές που έχουν υβριδιστεί με αντιπληροφοριακό RNA από τον cDNA κλώνο του *Ljcaa2*.

A,D) 14 ημέρες μετά τη μόλυνση, B,E) 21 ημέρες μετά τη μόλυνση, C,F) 28 ημέρες μετά τη μόλυνση και G) τομή φυματίου που υβριδίστηκε με πληροφοριακό RNA και χρησιμοποιείται ως μάρτυρας.

## 6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ *LjCAA1* ΚΑΤΟΠΙΝ ΣΙΩΠΗΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Για να μελετηθεί ο πιθανός φυσιολογικός ρόλος των α-τύπου καρβονικών ανυδρασών του *L. jaronicus* πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός γενετικά τροποποιημένων σειρών *L. jaronicus* στις οποίες είχε πραγματοποιηθεί σιώπηση των γονιδίων με την τεχνική RNAi. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν πέντε σειρές φυτών που πιθανώς παρουσίαζαν σίγηση ως προς το γονίδιο *Ljcaa1* και τρεις σειρές φυτών που πιθανώς παρουσίαζαν σίγηση ως προς το γονίδιο *Ljcaa2*. Το ποσοστό βλαστικότητα των σπόρων που προέκυψαν από τα φυτά αυτά ήταν σχετικά χαμηλό και στην περίπτωση του *Ljcaa1* μόνο τρεις από τις πέντε σειρές έδωσαν ικανοποιητικό αριθμό φυτών για την πραγματοποίηση πειραμάτων. Στην περίπτωση του *Ljcaa2* καμία από τις τρεις σειρές δεν έδωσε ικανοποιητικό αριθμό για την πραγματοποίηση πειραμάτων, καθώς το ποσοστό βλαστικότητα των σπόρων της T<sub>0</sub> ήταν σχεδόν μηδαμινό.

Τα φυτά όλων των σειρών παρουσίασαν φαινότυπο μειωμένης ανάπτυξης. Στην εικόνα 24A φαίνεται η καθυστερημένη ανάπτυξη των φυτών αυτών όταν συγκριθούν με φυτά αγρίου τύπου και αρνητικού ελέγχου της ίδιας ηλικίας. Ως αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκαν φυτά που είχαν μετασχηματιστεί με το αρχικό πλασμίδιο στο οποίο δεν είχε κλωνοποιηθεί κάποιο ένθετο. Επιπλέον, η ρίζα των φυτών αυτών έχει μικρό μήκος και ο αριθμός των φυματίων παρουσιάζεται αυξημένος (εικόνα 24B).



**Εικόνα 24:** Φαινότυπος μειωμένης ανάπτυξης σε φυτά που έχουν υποστεί σίγηση στο γονίδιο *Ljcaa1* κατόπιν σύγκρισής τους με φυτά αγρίου τύπου και αρνητικού ελέγχου της ίδιας ηλικίας (A), καθώς επίσης και μικρού μήκους ρίζας και αυξημένου αριθμού φυματίων (B) σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου (Γ).

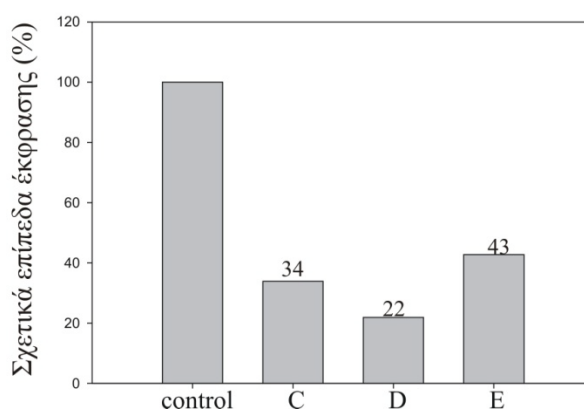


Για να βρεθεί το ποσοστό σίγησης του γονιδίου *Ljcaa1* στις τρεις σειρές φυτών, απομονώθηκε ολικό RNA από φυμάτια φυτών ηλικίας 30 ημερών και πραγματοποιήθηκε αντίδραση ποσοτικού PCR πραγματικού χρόνου. Για να ελεγχθεί η έκφραση του γονιδίου *Ljcaa1* στα φυτά αυτά χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι εκκινητών:

**Ευθύς εκκινητής 5'-GCTTTCAAAGCTGCTCGACA-3'**

**Ανάστροφος εκκινητής 5'-TGCTTCCAAACTTGATGAGTCC-3'**

Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε ως προς το σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο της ουβικιτίνης. Η έκφραση του γονιδίου *Ljcaa1* στις τρεις σειρές φυτών που ονομάστηκαν C, D και E συγκρίθηκε με τα επίπεδα έκφρασης στα φυτά αρνητικού ελέγχου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε σίγηση του γονιδίου *Ljcaa1* και στις τρεις σειρές φυτών (εικόνα 25). Η έκφραση του γονιδίου στις διαφορετικές σειρές εκφράστηκε σε ποσοστό επί τις 100, όπου 100% θεωρήθηκε η έκφραση που μετρήθηκε στα φυτά αρνητικού ελέγχου. Τα επίπεδα έκφρασης για τις σειρές C, D και E υπολογίστηκαν να είναι 34%, 22% και 43% αντίστοιχα, επομένως τα ποσοστά σίγησης του γονιδίου είναι 66%, 78% και 57%.

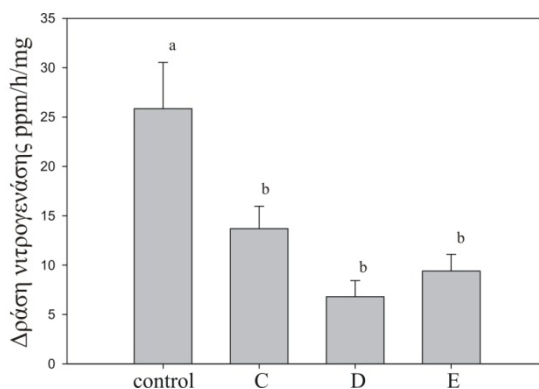


**Εικόνα 25:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Ljcaa1* στις τρεις σειρές φυτών (B, C, D) που προέκυψαν από το μετασχηματισμό φυτών *L. japonicus*, με χρήση της τεχνικής RNAi, εκφραζόμενα ως ποσοστά επί τις 100. Έκφραση 100% θεωρήθηκε εκείνη που μετρήθηκε στα φυτά αρνητικού ελέγχου (control). Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε ως προς το σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο της ουβικιτίνης.

Για να μελετηθεί η επίδραση της μειωμένης έκφρασης του γονιδίου *Ljcaa1* στη λειτουργία των φυματίων και στη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης, πραγματοποιήθηκε δοκιμή της δραστηριότητας της νιτρογενάσης στα φυμάτια των μετασχηματισμένων φυτών. Για το σκοπό αυτό, μετασχηματισμένα φυτά *L. japonicus* των σειρών C, D και E καθώς επίσης και φυτά αρνητικού ελέγχου ηλικίας 30 ημερών υποβλήθηκαν σε δοκιμή της δραστηριότητας της νιτρογενάσης όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Η μέθοδος στηρίζεται στην ικανότητα της νιτρογενάσης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων να ανάγει το ακετυλένιο σε αιθυλένιο. Η δραστηριότητα της νιτρογενάσης περιγράφεται από το ρυθμό

παραγωγής του αιθυλενίου (ppm/h) και κανονικοποιείται ως προς το νωπό βάρος των φυματίων (mg). Κάθε δοκιμή μελετήθηκε σε τέσσερις τουλάχιστον βιολογικές επαναλήψεις.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, και στις τρεις σειρές των μετασχηματισμένων φυτών παρατηρείται μειωμένη δραστηριότητα νιτρογενάσης (εικόνα 26). Για να βρεθεί αν η μείωση στη δραστηριότητα της νιτρογενάσης στις σειρές C, D και E διαφέρει σημαντικά από τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης που παρατηρήθηκε στα φυτά αρνητικού ελέγχου, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο one way ANOVA και βρέθηκε ότι υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές με τιμή  $P < 0.001$ . Από τις τρεις σειρές φυτών που εξετάστηκαν, η σειρά D παρουσιάζει τη χαμηλότερη έκφραση του γονιδίου *Ljcaa1* και επομένως το υψηλότερο ποσοστό σίγησης (78%) και ταυτόχρονα τη μικρότερη τιμή δραστηριότητας νιτρογενάσης.



**Εικόνα 26:** Δραστηριότητα νιτρογενάσης στις τρεις σειρές φυτών (C, D και E) που παρουσίασαν σίγηση του γονιδίου *Ljcaa1* και στα φυτά αρνητικού ελέγχου (control)

## 7. ΣΥΜΠΛΗΡΩΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΜΙΑΣ $\beta$ -ΤΥΠΟΥ ΚΑΡΒΟΝΙΚΗΣ ΑΝΥΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ *Lotus japonicus* ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΖΥΜΗΣ

Εκτός από τις δύο  $\alpha$ -τύπου καρβονικές ανυδράσεις, είχε βρεθεί σε προηγούμενη εργασία ότι στα φυμάτια του *L. japonicus* εντοπίζεται και μια  $\beta$ -τύπου καρβονική ανυδράση. Η  $\beta$ -τύπου CA, *LjCA1*, είχε μελετηθεί από τους Flemetakis *et al.* (2003) και είχε βρεθεί να εκφράζεται αποκλειστικά στα φυμάτια. Για να επιβεβαιωθεί η λειτουργικότητα του πλήρους μήκους cDNA που κωδικοποιεί για τη  $\beta$ -τύπου καρβονική ανυδράση, πραγματοποιήθηκε δοκιμή συμπλήρωσης του φαινοτύπου σε σύστημα ζύμης, χρησιμοποιώντας ένα μεταλλαγμένο στέλεχος ζύμης το οποίο στερείται το γονίδιο της  $\beta$ -τύπου καρβονικής ανυδράσης. Το μεταλλαγμένο στέλεχος ζύμης (CEN.HE28-1A, Euroscarf) δεν μπορεί να αναπτυχθεί αερόβια, ενώ η παρουσία μιας καρβονικής ανυδράσης επιτρέπει την αερόβια ανάπτυξη.

Το πλήρους μήκους cDNA, κλωνοποιήθηκε στο φορέα pYES3 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης. Η επαγωγή της έκφρασης της β-τύπου καρβονικής ανυδράσης έγινε με την προσθήκη ραφινόζης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης της ζύμης. Για λόγους σύγκρισης, παράλληλα με την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων ζυμών, αναπτύχθηκαν κύτταρα ζύμης αγρίου τύπου και αρνητικού ελέγχου. Ως αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ζύμης που είχαν μετασχηματιστεί με το φορέα pYES3 ο οποίος δεν έφερε κάποια ένθεση. Στην εικόνα 15 φαίνεται η ανικανότητα των κυττάρων ζύμης που φέρουν το φορέα pYES3 να αναπτυχθούν σε αερόβιες συνθήκες, ενώ τα κύτταρα ζύμης που έχουν μετασχηματιστεί με την κατασκευή pYES3-LjCA1 καταφέρνουν να αναπτυχθούν σε αερόβιο περιβάλλον. Η παρουσία του *LjCA1* στα μετασχηματισμένα κύτταρα ζύμης καταφέρει να συμπληρώσει το φαινότυπο ο οποίος δεν διαφέρει από εκείνον της ζύμης αγρίου τύπου.



**Εικόνα 27:** Η παρουσία της *LjCA1* στα μεταλλαγμένα κύτταρα ζύμης συμπληρώνει το φαινότυπο καθώς τα κύτταρα καταφέρνουν να αναπτυχθούν σε αερόβιες συνθήκες και να δώσουν ένα φαινότυπο ανάπτυξης που δεν διαφέρει από εκείνον των αγρίου τύπου κυττάρων.

## 8. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ β-ΤΥΠΟΥ ΚΑΡΒΟΝΙΚΗΣ ΑΝΥΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ *Lotus japonicus*

Για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης *LjCA1*, πραγματοποιήθηκε ετερόλογη έκφρασή της σε σύστημα *E. coli* και στη συνέχεια καθαρισμός της με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας.

Το cDNA που κωδικοποιεί για την πιθανή β-τύπου καρβονική ανυδράση στα φυμάτια του *L. japonicus* κλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης pET-28a που οδηγεί σε έκφραση πολυπεπτιδίων που φέρουν στο καρβόξυ-τελικό άκρο τους ουρά έξι ιστιδινών. Η κλωνοποίηση του cDNA (792 βάσεων) έγινε στις θέσεις αναγνώρισης από τα ένζυμα περιορισμού NcoI και SalI της πολλαπλής περιοχής κλωνοποίησης του πλασμιδιακού φορέα

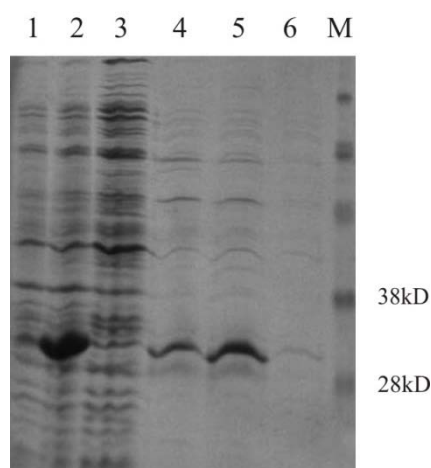
και για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν εκκινητές που φέραν στα άκρα τους τις αντίστοιχες θέσεις αναγνώρισης (Πίνακας 9) και πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR.

cDNA	Αλληλουχίες εκκινητών
<i>LjCA1</i>	Ευθύς: 5'-CATGCC <u>CATGG</u> CAAAGCATTCACCTGAC-3' Ανάστροφος: 5'-ACGCGT <u>CGAC</u> GTGACAGTGAGGGATAG-3'

**Πίνακας 9:** Αλληλουχίες εκκινητών για την κλωνοποίηση του *LjCA1* στον φορέα έκφρασης pET-28a

Μετά την κλωνοποίηση, έγινε αλληλούχιση του πλασμιδίου που έφερε το *LjCA1* cDNA και ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων έκφρασης BL21(DE3). Η θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων κατά την επαγόμενη έκφραση της πρωτεΐνης διατηρήθηκε σε χαμηλή τιμή (24°C), για να αποφευχθεί η υπερσυσσώρευση του εκφραζόμενου πολυπεπτιδίου στα κύτταρα *E. coli* και να αυξηθεί το ποσοστό της διαλυτής παραγόμενης πρωτεΐνης.

Ακολούθως, το εκφραζόμενο πολυπεπτίδιο καθарίστηκε με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη αгарόζης που φέρει ακινητοποιημένα μεταλλικά ιόντα νικελίου, καθώς φέρει στο καρβόξυ-τελικό άκρο του ουρά συγγένειας έξι ιστιδινών. Το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου υπολογίστηκε στα 29865.21 Da, ενώ η θεωρητική τιμή ισοηλεκτρικού σημείου είναι pI=6. Τα κλάσματα έκλουσης του ανασυνδρασμένου πολυπεπτιδίου φαίνονται στην εικόνα 28.



**Εικόνα 28:** Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός του ανασυνδρασμένου πολυπεπτιδίου *LjCA1*. Στήλη 1, ολικές πρωτεΐνες από κύτταρα *E. coli* πριν την επαγωγή με IPTG; στήλη 2, ολικές πρωτεΐνες από κύτταρα *E. coli* μετά την επαγωγή με IPTG; στήλη 3, ολικές διαλυτές πρωτεΐνες από κύτταρα *E. coli*; στήλες 4, 5, 6, κλάσματα καθαρισμού του ανασυνδρασμένου πολυπεπτιδίου; τελευταία στήλη μάρτυρας μοριακών βαρών.

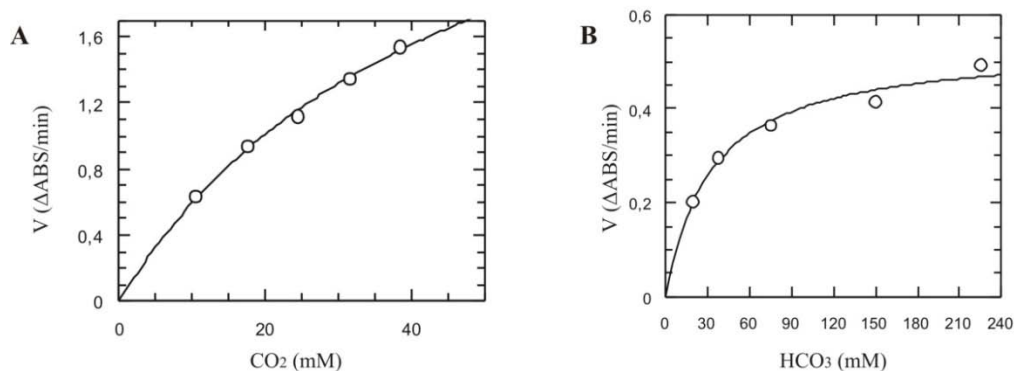
Η πρωτεΐνη *LjCA1* απομονώθηκε σε αρκετά μεγάλη ποσότητα, περίπου 0.7mg ανά λίτρο καλλιέργειας. Κάποιες από τις επιπλέον ζώνες που παρατηρούνται κατά την ανάλυση

των κλασμάτων καθαρισμού στην πηκτή πολυακρυλαμίδης μπορεί να οφείλονται στην δημιουργία διμερών, τετραμερών ή και οκταμερών.

Για να διαπιστωθεί αν το καθαρισμένο ανασυνδυασμένο πολυπεπτιδίο παρουσιάζει δραστηριότητα καρβονικής ανυδράσης, ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος που είχε εφαρμοστεί στις  $\alpha$ -τύπου καρβονικές ανυδράσες του *L. japonicus*.

Οι τιμές pH στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι βιοχημικές δοκιμές είναι pH=6,3 και pH=7,5. Στην τιμή pH=6,3 χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα MES σε συνδυασμό με τη χρωμοφόρο ουσία κυανό της βρωμοθυμόλης και η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 615nm. Ως υπόστρωμα της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το  $\text{NaHCO}_3$ . Στην τιμή pH=7,5 χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα HEPES σε συνδυασμό με τη χρωμοφόρο ουσία ερυθρό της φαινόλης. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 557nm, ενώ ως υπόστρωμα της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε νερό κορεσμένο σε  $\text{CO}_2$ .

Πάρθηκαν τιμές ρυθμού απορρόφησης ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ) σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρωμάτων και από τις τιμές αυτές προέκυψαν οι καμπύλες της εικόνας 29. Οι τιμές με τις οποίες κατασκευάστηκαν οι καμπύλες είναι διορθωμένες, καθώς από το ρυθμό απορρόφησης που μετρήθηκε παρουσία ενζύμου έχει αφαιρεθεί ο ρυθμός απορρόφησης που καταγράφεται κατά την αυθόρμητη αντίδραση.



**Εικόνα 29:** Ενζυματικές δοκιμές στο ανασυνδυασμένο πολυπεπτιδίο *LjCA1* για να ελεγχθεί πιθανή δραστηριότητα καρβονικής ανυδράσης: A) Κινητική μελέτη της *LjCA1* για δράση ενυδάτωσης του  $\text{CO}_2$  που πραγματοποιήθηκε σε pH=7,5 σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES/NaOH, B) Κινητική μελέτη της *LjCA1* για δράση αφυδάτωσης των δισανθρακικών ιόντων που πραγματοποιήθηκε σε pH=6,3 σε ρυθμιστικό διάλυμα MES/KOH. Οι κινητικές παράμετροι υπολογίστηκαν κατόπιν εφαρμογής των διορθωμένων δεδομένων στην εξίσωση Michaelis- Menten χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraFit v3.5. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων.

Από τις καμπύλες αυτές γίνεται φανερό ότι το ανασυνδυασμένο πολυπεπτιδίο ακολουθεί κινητική Michaelis- Menten, οπότε έγινε υπολογισμός των κινητικών σταθερών  $k_{\text{cat}}$ ,  $K_M$ ,  $V_{\text{MAX}}$  και της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου (πίνακας 10).

	Ενυδάτωση CO <sub>2</sub>	Αφυδάτωση HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<b>K<sub>M</sub> (mM)</b>	46,4±6,8	32±6
<b>V<sub>MAX</sub></b>	3,3±0,3	0,5±0,03
<b>k<sub>cat</sub> (sec<sup>-1</sup>)</b>	8,7x10 <sup>6</sup>	1,6x10 <sup>6</sup>
<b>k<sub>cat</sub>/ K<sub>M</sub> (sec<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>)</b>	1,9x10 <sup>8</sup>	5x10 <sup>7</sup>
<b>Ειδική δραστηριότητα (units/mg)</b>	17,5(±1,6)x10 <sup>6</sup>	3,3(±0,2)x10 <sup>6</sup>

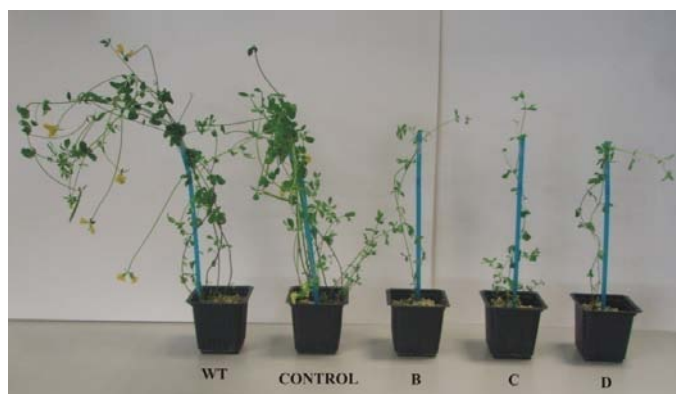
**Πίνακας 10:** Κινητικές σταθερές και ειδική δραστηριότητα του ανασυνδυασμένου πολυπεπτιδίου *LjCA1* που υπολογίστηκαν από τις ενζυμικές αντιδράσεις ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> και αφυδάτωσης των δισανθρακικών ιόντων.

Το ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο *LjCA1* παρουσίασε κινητική Michaelis–Menten τόσο στο ρυθμιστικό διάλυμα HEPES όσο και στο ρυθμιστικό διάλυμα MES σε τιμές pH 7.5 και 6.3, αντίστοιχα. Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου που υπολογίστηκε κατά την αντίδραση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> είναι σχεδόν πενταπλάσια από την ειδική δραστηριότητα που υπολογίστηκε κατά την αντίδραση αφυδάτωσης των δισανθρακικών ιόντων. Οι μετρήσεις αυτές αποδεικνύουν ότι το ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο *LjCA1* είναι μια ενεργή καρβονική ανυδράση.

## 9. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ β-ΤΥΠΟΥ CA, *LjCA1*, ΚΑΤΟΠΙΝ ΣΙΩΠΗΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

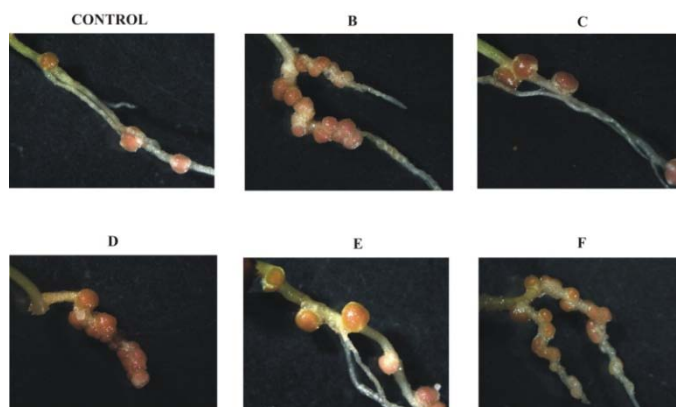
Για να μελετηθεί ο πιθανός φυσιολογικός ρόλος της β-τύπου καρβονική ανυδράσης του *L. japonicus* πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός γενετικά τροποποιημένων σειρών *L. japonicus* στις οποίες είχε πραγματοποιηθεί σιώπηση του γονιδίου με την τεχνική RNAi. Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής έδωσε έξι σειρές φυτών που πιθανώς παρουσίαζαν σίγηση ως προς το γονίδιο *Ljca1* και ονομάστηκαν *Ljca1*- A, B, C, D, E και F. Η βλαστικότητα των σπόρων που προέκυψαν από τη σειρά A ήταν πολύ μικρή και δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθούν πειράματα.

Τα φυτά των σειρών B, D και F παρουσίασαν φαινότυπο μειωμένης ανάπτυξης ενώ ο φαινότυπος στις σειρές C και E δεν διέφερε από τα φυτά αγρίου τύπου και τα φυτά αρνητικού ελέγχου (εικόνα 30). Ως αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκαν φυτά που είχαν μετασηματιστεί με το αρχικό πλασμίδιο στο οποίο δεν είχε κλωνοποιηθεί κάποιο ένθετο.



**Εικόνα 30:** Φαινότυπος καθυστερημένης ανάπτυξης σε φυτά των σειρών B, C και D που έχουν υποστεί σίγηση στο γονίδιο *Ljca1* κατόπιν σύγκρισής τους με φυτά αγρίου τύπου (W.T.) και αρνητικού ελέγχου (CONTROL) της ίδιας ηλικίας

Παράλληλα με το φαινότυπο μειωμένης ανάπτυξης στο υπέργειο τμήμα, παρατηρείται μειωμένη ανάπτυξη και στη ρίζα των φυτών αυτών, ενώ ο αριθμός των φυματίων παρουσιάζεται αυξημένος (εικόνα 31).



**Εικόνα 31:** Φαινότυπος μειωμένης ανάπτυξης της ρίζας και αυξημένου αριθμού φυματίων στις σειρές *Ljca1*- B, D, και F. Οι σειρές *Ljca1*- C και E δεν παρουσιάζουν διαφορά από τα φυτά αρνητικού ελέγχου.

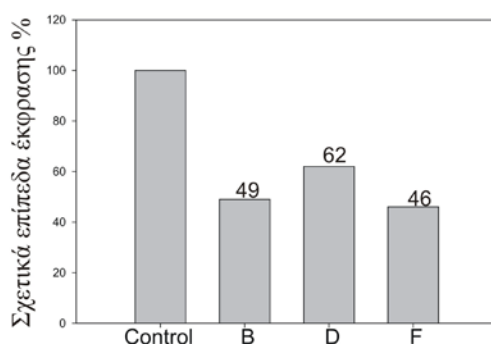
Για να βρεθεί το ποσοστό σίγησης του γονιδίου *Ljca1* στις διαφορετικές σειρές φυτών, απομονώθηκε ολικό RNA από φυμάτια φυτών ηλικίας 30 ημερών και πραγματοποιήθηκε αντίδραση ποσοτικού PCR πραγματικού χρόνου. Για να ελεγχθεί η έκφραση του γονιδίου *Ljca1* στα φυτά αυτά χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι εκκινητών:

**Ευθύς εκκινητής 5' - GGGTGAAAATTGGTTTACCTGC -3'**

**Ανάστροφος εκκινητής 5' - TCACTGACTCCTTTTCACAGAG -3'**

Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε ως προς το σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο της ουβικιτίνης. Η έκφραση του γονιδίου *Ljca1* στις διαφορετικές σειρές μεταλλαγμένων φυτών συγκρίθηκε με τα επίπεδα έκφρασης στα φυτά αρνητικού ελέγχου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε σίγηση του γονιδίου *Ljca1* στις σειρές φυτών *Ljca1*- B, D, και F (εικόνα 32). Η έκφραση του γονιδίου στις διαφορετικές σειρές εκφράστηκε σε ποσοστό επί τις 100, όπου 100% θεωρήθηκε η έκφραση που μετρήθηκε στα φυτά αρνητικού ελέγχου. Τα

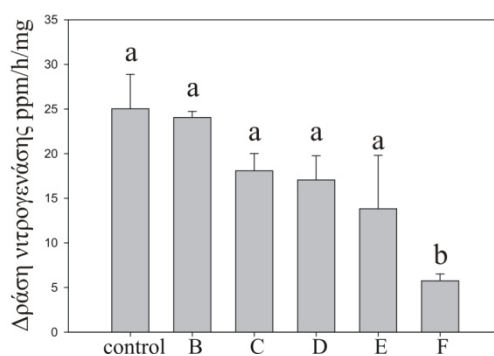
επίπεδα έκφρασης για τις σειρές B, D, και F υπολογίστηκαν να είναι 49%, 62% και 46% αντίστοιχα, επομένως τα ποσοστά σίγησης του γονιδίου στις σειρές αυτές είναι 51%, 38% και 54%. Σίγηση του γονιδίου παρατηρήθηκε επομένως μόνο στις σειρές εκείνες στις οποίες είχε παρατηρηθεί και ο εμφανής φαινότυπος.



**Εικόνα 32:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Ljca1* στις σειρές B, D, F, που προέκυψαν από το μετασχηματισμό φυτών *L. japonicus*, με χρήση της τεχνικής RNAi, εκφραζόμενα ως ποσοστά επί τις 100. Έκφραση 100% θεωρήθηκε εκείνη που μετρήθηκε στα φυτά αρνητικού ελέγχου (control). Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε ως προς το σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο της ουβικιτίνης.

Για να μελετηθεί η επίδραση της μειωμένης έκφρασης του γονιδίου *Ljca1* στη λειτουργία των φυματίων και στη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης, πραγματοποιήθηκε δοκιμή της δραστηριότητας της νιτρογενάσης στα φυμάτια των μετασχηματισμένων φυτών. Για το σκοπό αυτό, μετασχηματισμένα φυτά *L. japonicus* των σειρών *Ljca1*- B, C, D, E και F καθώς επίσης και φυτά αρνητικού ελέγχου ηλικίας 30 ημερών υποβλήθηκαν σε δοκιμή της δραστηριότητας νιτρογενάσης. Κάθε δοκιμή μελετήθηκε σε τέσσερις τουλάχιστον βιολογικές επαναλήψεις.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, σε όλες τις σειρές των μετασχηματισμένων φυτών παρατηρείται δραστηριότητα νιτρογενάσης μικρότερη από εκείνης που παρατηρείται στα φυτά αρνητικού ελέγχου αλλά οι διαφορές δεν είναι μεγάλες (εικόνα 33). Στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο one way ANOVA έδειξε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μόνο στην περίπτωση της σειράς F με τιμή  $P=0.023$ .



**Εικόνα 33:** Δραστηριότητα νιτρογενάσης στις σειρές φυτών *Ljca1*- B, C, D, E, F και στα φυτά αρνητικού ελέγχου (control).



# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---



1. ΜΟΡΙΑΚΟΣ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ  $\alpha$ -ΤΥΠΟΥ ΚΑΡΒΟΝΙΚΩΝ ΑΝΥΔΡΑΣΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΦΥΜΑΤΙΑ ΤΟΥ *Lotus japonicus*

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διατριβής παρουσιάζεται ο χαρακτηρισμός και η φυσιολογική μελέτη cDNA κλώνων που κωδικοποιούν για καρβονικές ανυδράσες που εκφράζονται στα φυμάτια του *L. japonicus*. Δύο cDNA κλώνοι που κωδικοποιούν για καρβονικές ανυδράσες τύπου  $\alpha$  ονομάστηκαν *Ljcaa1* και *Ljcaa2*.

Οι  $\alpha$ -τύπου καρβονικές ανυδράσες έχουν χαρακτηριστεί πολύ καλά στα θηλαστικά αλλά όχι στα ανώτερα φυτά. Ελάχιστα ένζυμα από ανώτερα φυτά έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής να έχουν ομοιότητα με τις  $\alpha$ -τύπου CA των θηλαστικών. Μια νεκταρίνη (Nectarin III, *NEC3*) που μοιάζει με διοσκουρίνη και έχει απομονωθεί από φυτά καπνού, παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την ανθρώπινη καρβονική ανυδράση II και έχει αναφερθεί να παρουσιάζει δράση καρβονικής ανυδράσης (Carter & Thornburg, 2004). Επιπλέον, αποθηκευτικές πρωτεΐνες (διοσκουρίνες, DB2 και DB3) από το *Dioscorea batatas*, παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομοιότητας με τις  $\alpha$ -τύπου καρβονικές ανυδράσες των θηλαστικών, αλλά δεν έχει ανιχνευτεί δραστηριότητα καρβονικής ανυδράσης στις πρωτεΐνες αυτές (Gaidamashvili *et al.*, 2004).

Η ευθυγράμμιση των αμινοξικών ακολουθιών των *LjCAA1* και *LjCAA2* με αμινοξικές ακολουθίες από αντιπροσώπους των  $\alpha$ -τύπου ενζύμων έδειξε ότι και οι δύο πρωτεΐνες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με χαρακτηρισμένα ένζυμα από άλλους οργανισμούς. Η ομοιότητα μεταξύ των αμινοξικών ακολουθιών επέτρεψε τον εντοπισμό συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων που μπορεί να είναι σημαντικά για την καταλυτική δράση. Τα αμινοξικά κατάλοιπα His125, His127 και His144 του *LjCAA1* και His117, His119 και His136 του *LjCAA2* είναι οι καλύτεροι υποψήφιοι δεσμευτές του ατόμου ψευδαργύρου, ενώ τα Glu131 και Thr211 του *LjCAA1* και Glu123 και Thr212 του *LjCAA2* είναι οι καλύτεροι υποψήφιοι για συμμετοχή στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου με το Zn-OH. Το αμινοξύ His64 της *HsCAII*, το οποίο μετέχει στη μεταφορά του πρωτονίου που παράγεται κατά την ενυδάτωση του CO<sub>2</sub> προς το εξωτερικό διάλυμα, είναι συντηρημένο μόνο στην πρωτεΐνη *LjCAA1* και όχι στην *LjCAA2*. Στην *LjCAA2* είναι πιθανό το αμινοξύ His64 να έχει αντικατασταθεί από κάποιο άλλο αμινοξικό κατάλοιπο που μπορεί να λειτουργήσει ως δέκτης πρωτονίου. Το συμπέρασμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία και με την πρόταση ότι η μεταφορά του πρωτονίου συμβαίνει μέσω διαφορετικών δομών από παρεμβαλλόμενες αλυσίδες νερού (Tu *et al.*, 1998). Η ανάλυση της δομής των δύο γονιδίων έδειξε ότι οι δύο από τις τρεις ιστιδίνες δεσμευτές του ψευδαργύρου εντοπίζονται στο τρίτο εξόνιο, ενώ η τρίτη ιστιδίνη βρίσκεται στην αρχή του τέταρτου εξονίου. Τα σημαντικά αμινοξέα

γλουταμινικό οξύ και θρεονίνη που πιθανά συμμετέχουν στο σχηματισμό υδρογόνου εντοπίζονται στο τρίτο και πέμπτο εξόνιο, αντίστοιχα, και στα δύο γονίδια.

Για το χαρακτηρισμό των ενζύμων πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ενζυμικής δραστηριότητας μέσω φωτομετρικού προσδιορισμού. Η έκφραση των πρωτεϊνών έγινε στο ετερόλογο σύστημα *E coli* κατόπιν κλωνοποίησης των *Ljcaa1* και *Ljcaa2* cDNA στον φορέα έκφρασης pET28 και μετασχηματισμού των κυττάρων έκφρασης BL21(DE3) και C43(DE3). Η κλωνοποίηση στον συγκεκριμένο φορέα έχει ως αποτέλεσμα οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες που εκφράζονται να φέρουν στο καρβόξυ τελικό άκρο τους μια ουρά συγγένειας έξι ιστιδινών που καθιστά ικανό τον καθαρισμό των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη αгарόζης που φέρει ακινητοποιημένα μεταλλικά ιόντα νικελίου.

Η μελέτη δραστηριότητας καρβονικής ανυδράσης βασίστηκε σε μετρήσεις στην αλλαγή του pH κατά τη διάρκεια της βιοχημικής αντίδρασης με τη χρήση μιας χρωμοφόρου ουσίας (Khalifah, 1971). Η αμφίδρομη μετατροπή του CO<sub>2</sub> σε HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> επιφέρει αλλαγές στη συγκέντρωση ιόντων H<sup>+</sup> κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και οι αλλαγές αυτές μπορούν να μετατραπούν σε αλλαγή απορρόφησης όταν προστεθεί στην αντίδραση η κατάλληλη χρωμοφόρος ουσία.

Οι βιοχημικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν στο φωτόμετρο και από τις μετρήσεις του ρυθμού απορρόφησης της χρωστικής κατασκευάστηκαν καμπύλες, από τις οποίες γίνεται φανερό ότι τα ένζυμα ακολουθούν κινητική Michaelis-Menten. Οι λειτουργικές δοκιμές έδειξαν ότι τόσο το *Ljcaa1* όσο και το *Ljcaa2* κωδικοποιούν για δύο ενεργές α-τύπου καρβονικές ανυδράσες, ικανές να καταλύουν την αντίδραση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub>. Η πρωτεΐνη *LjCAA1* αποδείχτηκε να μπορεί να καταλύει, επίσης, την αντίδραση αφυδάτωσης των δισανθρακικών ιόντων, ενώ η *LjCAA2* δε φαίνεται να καταλύει αυτή την αντίστροφη αντίδραση. Κάτι παρόμοιο είχε παρατηρηθεί και στη β-τύπου καρβονική ανυδράση (Rv3588c) του *Mycobacterium tuberculosis*, όπου σε pH 8.4 η Rv3588c αποδείχθηκε να είναι μια λειτουργική καρβονική ανυδράση, ενώ σε pH 7.5 δεν ανιχνεύτηκε δραστηριότητα CA (Covarrubias *et al.*, 2005).

Το ένζυμο *LjCAA1* δείχνει μεγαλύτερη συγγένεια προς το CO<sub>2</sub> και μικρότερη συγγένεια στα δισανθρακικά ιόντα καθώς η ειδική δραστηριότητα που υπολογίστηκε κατά την αντίδραση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> (1,671±0,236 x10<sup>6</sup> units/mg) είναι σχεδόν διπλάσια από την ειδική δραστηριότητα που υπολογίστηκε κατά την αντίδραση αφυδάτωσης των δισανθρακικών ιόντων (0,945±0,004 x10<sup>6</sup> units/mg). Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου *LjCAA2* στην αντίδραση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> (0,708±0,08 x10<sup>6</sup> units/mg) υπολογίστηκε να είναι αρκετά μικρότερη από την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε στο ένζυμο *LjCAA1*. Η μικρότερη δραστηριότητα της *LjCAA2* είναι πιθανό να οφείλεται εν μέρη στην απουσία του αμινοξέως His64. Κάτι παρόμοιο έχει παρατηρηθεί και στις ανθρώπινες CA, όπου για παράδειγμα, η CA

III που της λείπει το αμινοξύ His64 εμφανίζεται λιγότερο δραστική από την CA II. Τόσο στην περίπτωση της ανθρώπινης CA III (Jewell *et al.*, 1991) όσο και στην περίπτωση της CA V του ποντικού (Heck *et al.*, 1996), η ταχύτητα κατάλυσης αυξήθηκε 7 με 50 φορές όταν εισείχθει στις αμινοξικές τους αλληλουχίες το αμινοξύ His64 με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση.

Οι τιμές ειδικής δραστικότητας που υπολογίστηκαν για τα φυτικά ένζυμα *LjCAA1* και *LjCAA2* είναι χαμηλότερες από εκείνες που είχαν μετρηθεί για την α-τύπου καρβονική ανυδράση του συμβιώτη του *L. japonicus*. Στο *Mesorhizobium loti*, η ειδική δραστικότητα που υπολογίστηκε κατά την αντίδραση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> ήταν 19,14x10<sup>6</sup> ενώ η ειδική δραστικότητα που υπολογίστηκε κατά την αντίδραση αφυδάτωσης των δισανθρακικών ιόντων ήταν 2,85x10<sup>6</sup> (Kalloniati *et al.*, 2009).

Η τιμή της σταθεράς εξειδίκευσης  $k_{cat}/k_M$  που χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό της αποδοτικότητας των *LjCAA1* και *LjCAA2* έναντι του CO<sub>2</sub> υπολογίστηκε να είναι στα ίδια περίπου επίπεδα με την σταθερά εξειδίκευσης που έχει υπολογιστεί για τη χαρακτηρισμένη α-τύπου CA του βακτηρίου *Helicobacter pylori* (Chirica *et al.*, 2001). Πιο συγκεκριμένα, η τιμή του λόγου  $k_{cat}/k_M$  της α-τύπου CA του *H. pylori* είναι 1.4x10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τα φυτικά ένζυμα *LjCAA1* και *LjCAA2* είναι 3.3x10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> και 0.54 x10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Επιπλέον, η τιμή του λόγου  $k_{cat}/k_M$  της *LjCAA1* έναντι του CO<sub>2</sub> είναι παρόμοια και με την αντίστοιχη τιμή  $k_{cat}/k_M$  (5.5x10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) που είχε υπολογιστεί για τη χαρακτηρισμένη α-τύπου CA από το *Neisseria gonorrhoeae* (Chirica *et al.*, 1997). Η δραστικότητα των φυτικών ενζύμων *LjCAA1* και *LjCAA2* είναι μικρότερη από την υψηλή δραστικότητα του ανθρώπινου ισοενζύμου CA II, αλλά παρόμοια με τη δραστικότητα του ανθρώπινου ισοενζύμου CA I (Lindskog, 1997).

Για να μελετήσουμε τον πιθανό φυσιολογικό ρόλο των α-τύπου καρβονικών ανυδρασών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυματίου, ελέγξαμε το πρότυπο της χρονικής και χωροταξικής συσσώρευσης των μεταγραφημάτων των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2*. Για τη μελέτη της συσσώρευσης των μεταγραφημάτων σε επίπεδο φυτικών οργάνων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) και για το χωροταξικό πρότυπο συσσώρευσης μεταγραφημάτων στους διαφορετικούς ιστούς του φυματίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του *in situ* RNA-RNA υβριδισμού.

Το γεγονός ότι τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης και των δύο γονιδίων στους μη συμβιωτικούς ιστούς (φύλλα, βλαστός και ρίζα) είναι μη σημαντικά όταν συγκριθούν με τα επίπεδα έκφρασης στα φυμάτια, δηλώνει ότι και τα δύο γονίδια κωδικοποιούν για ισότυπους που επάγονται ισχυρά στα φυμάτια. Παρόλο που τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων είναι πολύ χαμηλά στους μη συμβιωτικούς ιστούς, εντοπίστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην έκφραση των γονιδίων στους ιστούς αυτούς μεταξύ μολυσμένων και μη-μολυσμένων

φυτών. Η έκφραση του *Ljcaa1* είναι αυξημένη σε ρίζες μολυσμένων φυτών, ενώ η έκφραση του *Ljcaa2* παρουσιάζεται αυξημένη τόσο σε ρίζες όσο και βλαστούς μολυσμένων φυτών, γεγονός που πιθανώς δηλώνει κάποια συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων αυτών με τη συμβίωση.

Έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2* σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του φυματίου, έδειξε ότι και τα δύο γονίδια εκφράζονται καθ'όλη τη διάρκεια της συμβίωσης. Συγκεκριμένα, η έκφραση των γονιδίων μελετήθηκε σε φυμάτια ηλικίας 14, 21 και 28 ημερών, χρονικά σημεία που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του φυματίου και αντιστοιχούν στη διαμόρφωση του οργάνου, τη διαφοροποίησή του, που συμπίπτει και με την έναρξη της αζωτοδέσμευσης, και την ωρίμανσή του. Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης, γεγονός που δηλώνει ότι τα ένζυμα αυτά παίζουν ρόλο τόσο στα νεαρά όσο και στα ώριμα φυμάτια.

Το αποτέλεσμα της RT-qPCR ότι τα γονίδια εκφράζονται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυματίου επιβεβαιώθηκε και από τις εικόνες των τομών των φυματίων κατά τον *in situ* RNA-RNA υβριδισμό. Κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του φυματίου, μεταγραφήματα και των δύο γονιδίων εντοπίζονται σε όλους τους ιστούς, γεγονός που ίσως υποδεικνύει ότι τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται σε πλήθος βιοσυνθετικών μονοπατιών, απαραίτητων για τη διαμόρφωση του οργάνου. Στα ώριμα φυμάτια, το σήμα υβριδισμού περιορίζεται κυρίως στο παρέγχυμα του φυματίου, περιμετρικά του κεντρικού ιστού, προσδίδοντας στα γονίδια κάποιο ιδιαίτερο ρόλο που είναι πιθανό να σχετίζεται με ωσμωρύθμιση και με διάχυση αερίων.

Για να ελεγχθεί πιθανή συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2* με τη συμβίωση και τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης, χρησιμοποιήθηκαν φυτά *L. japonicus* στα οποία οι διαδικασίες αυτές απέκλιναν από τα φυσιολογικά επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα, τα φυτά μολύνθηκαν με ριζόβια τα οποία έφεραν τις μεταλλάξεις *ΔnifH* και *ΔnifA*. Η μετάλλαξη *ΔnifH* επηρεάζει αρνητικά την έκφραση της νιτρογενάσης (Hadfield & Bulen, 1969) και η μετάλλαξη *ΔnifA* επηρεάζει αρνητικά την έκφραση πολλών *nif* και *fix* γονιδίων του *Mesorhizobium loti* (Gussin *et al.*, 1986). Τα φυτά αυτά δείχνουν συμπτώματα έλλειψης αζώτου και δεν καταφέρνουν να επιβιώσουν περισσότερες από 21 ημέρες.

Ποσοτική qRT-PCR ανάλυση συσσώρευσης μεταγραφημάτων των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2* στα φυμάτια των φυτών που μολύνθηκαν με τα μεταλλαγμένα στελέχη ριζοβίων έδειξε ότι η έκφραση και των δύο γονιδίων μειώνεται σε σχέση με την έκφραση που παρατηρείται σε φυμάτια φυτών που μολύνθηκαν με το αγρίου τύπου στέλεχος R7a. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν δεν είναι στατιστικώς σημαντικές, παρόλα αυτά, η έκφραση των *Ljcaa1* και *Ljcaa2* στα φυμάτια των φυτών που μολύνθηκαν με το μεταλλαγμένο

στέλεχος *ΔnifH* παρουσιάζεται, αντίστοιχα, 2 και 3 φορές χαμηλότερη από ότι στα φυμάτια των φυτών που μολύνθηκαν με το αγρίου τύπου στέλεχος R7a.

Μειωμένη έκφραση των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2* παρατηρήθηκε και στην περίπτωση φυματίων από φυτά που είχαν υποστεί συνθήκες παρατεταμένου σκότους για 24 και 72 ώρες. Το παρατεταμένο σκοτάδι επηρεάζει τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης καθώς σταματά η παροχή φωτοσυνθετικών προϊόντων στο φυμάτιο, που είναι απαραίτητα για το μεταβολισμό των βακτηριοειδών και την αφομοίωση του αζώτου. Η πολύ μεγάλη μείωση στην έκφραση των *Ljcaa1* και *Ljcaa2* μετά από παρατεταμένο σκοτάδι 24 ωρών και η ακόμη μεγαλύτερη μείωση μετά από παρατεταμένο σκοτάδι 72 ωρών, ενισχύει την άποψη ότι η έκφραση των γονιδίων αυτών σχετίζεται με το μεταβολισμό του άνθρακα.

Για να μελετηθεί ο φυσιολογικός ρόλος των *LjCAA1* και *LjCAA2* κατά το σχηματισμό και τη λειτουργία του φυματίου, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός μετασχηματισμένων σειρών *L. japonicus* στις οποίες είχε γίνει σίγηση των γονιδίων *Ljcaa1* και *Ljcaa2*. Η σίγηση των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της μεθόδου RNAi. Στην περίπτωση σίγησης του *Ljcaa1* προέκυψαν τρεις σειρές φυτών με διαφορετικά ποσοστά σίγησης, ενώ στην περίπτωση σίγησης του *Ljcaa2* οι μεταλλαγμένες σειρές που προέκυψαν ήταν μη βιώσιμες καθώς το ποσοστό εκβλάστησης των σπόρων ήταν σχεδόν μηδαμινό. Τα ποσοστά σίγησης του γονιδίου *Ljcaa1* στις τρεις σειρές φυτών που προέκυψαν, ήταν 66%, 78% και 57%.

Σε όλες τις σειρές τα φυτά παρουσίασαν φαινότυπο μειωμένης ανάπτυξης τόσο στο υπέργειο όσο και στο υπόγειο τμήμα, ενώ παράλληλα, ο αριθμός των φυματίων ήταν αξιοσημείωτα αυξημένος. Ο αυξημένος αριθμός φυματίων είναι ένας συνηθισμένος φαινότυπος μεταλλαγμένων φυτικών σειρών που παρουσιάζουν μείωση της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας των φυματίων. Γενικά, οι φαινότυποι που έχουν παρατηρηθεί σε μεταλλαγμένα συμβιωτικά φυτά μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις τύπους: φυτά που δεν σχηματίζουν φυμάτια, φυτά στα οποία η οργανογένεση του φυματίου σταματά πρόωγα, φυτά με αυξημένο ή μειωμένο αριθμό φυματίων και φυτά στα οποία καθυστερεί ο σχηματισμός του φυματίου (Stougaard, 2001). Στην περίπτωση μεταλλαγμένων φυτών με αυξημένο αριθμό φυματίων συνήθως συμβαίνει απενεργοποίηση του φυσιολογικού μηχανισμού αυτορύθμισης (Caetano-Anolles & Gresshoff, 1991; Szczyglowski *et al.*, 1998; Wopereis *et al.*, 2000; Penmetsa & Cook, 1997). Μεταλλάξεις με αυξημένο αριθμό φυματίων έχουν βρεθεί στη σόγια, το μπιζέλι, το *Medicago* και το *L. japonicus*. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις ο φαινότυπος αυτός ελέγχεται από το βλαστό. Έχει προταθεί ένας μηχανισμός κατά τον οποίο στο διαιρούμενο αρχέφυτρο του φυματίου συντίθεται ένα σήμα το οποίο μεταφέρεται στο βλαστό και έχει ως αποτέλεσμα την επιστροφή ενός αναστολέα (Caetano-Anolles & Gresshoff, 1991). Σε αντίθεση με τα φυτά αγρίου τύπου, μεταλλάξεις με

υπεράριθμα φυμάτια στο *L. japonicus* (Wopereis *et al.*, 2000) και στο *Medicago* (Penmetsa & Cook, 1997) επιτρέπουν την ανάπτυξη περισσότερων μολυσματικών νηματίων.

Αυξημένος αριθμός φυματίων είχε παρατηρηθεί και σε φυτά *L. japonicus* που μολύνθηκαν με μεταλλαγμένο στέλεχος *M. loti*, στο οποίο είχε αδρανοποιηθεί η α-τύπου καρβονική ανυδράση. Τα φυτά αυτά ήταν ικανά να σχηματίζουν αζωτοδεσμευτικά φυμάτια με αυξημένο νωπό βάρος, αυξημένη δραστηριότητα νιτρογενάσης και αυξημένη περιεκτικότητα σε άζωτο, όμως, η αυξημένη αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα δεν αποδείχτηκε ωφέλιμη για το φυτό καθώς δεν βελτίωσε τη θρεπτική του κατάσταση και την ανάπτυξή του (Kalloniati *et al.*, 2009).

Για να μελετηθεί η επίδραση της μειωμένης έκφρασης του γονιδίου *Ljcaa1* στη λειτουργία των φυματίων και στη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της δραστηριότητας της νιτρογενάσης στα φυμάτια των μετασχηματισμένων φυτών. Η μέθοδος μέτρησης της δραστηριότητας νιτρογενάσης στηρίζεται στην ικανότητα της νιτρογενάσης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων να ανάγει το ακετυλένιο σε αιθυλένιο. Η δραστηριότητα της νιτρογενάσης περιγράφεται από το ρυθμό παραγωγής του αιθυλενίου (ppm/h) και εκφράζεται ως ppm/h/mg νωπού βάρους φυματίων (Hardy *et al.*, 1973).

Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δοκιμής δραστηριότητας νιτρογενάσης έδειξαν ότι και στις τρεις σειρές φυτών που παρουσίασαν σίγηση του γονιδίου *Ljcaa1* η δραστηριότητα της νιτρογενάσης είναι πολύ μειωμένη, σε σύγκριση με τη δραστηριότητα νιτρογενάσης που μετρήθηκε σε φυτά αρνητικού ελέγχου. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν είναι στατιστικώς σημαντικές σε όλες τις σειρές, αλλά είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι σε μια από τις τρεις σειρές που παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό σίγησης (78%), μετρήθηκε και η πιο χαμηλή δραστηριότητα νιτρογενάσης. Η μειωμένη δραστηριότητα νιτρογενάσης και κατ'επέκταση η μη φυσιολογική λειτουργία της αζωτοδέσμευσης εξαιτίας της ελλιπούς έκφρασης του γονιδίου *Ljcaa1*, δηλώνει το σημαντικό ρόλο του γονιδίου αυτού στη λειτουργία του φυματίου γενικότερα και συνδέει άμεσα το φυσιολογικό του ρόλο με τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης.

## 2. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ β-ΤΥΠΟΥ ΚΑΡΒΟΝΙΚΗΣ ΑΝΥΔΡΑΣΗΣ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΕΤΑΙ ΣΤΑ ΦΥΜΑΤΙΑ ΤΟΥ *Lotus japonicus*

Σε προηγούμενη ερευνητική εργασία μια β-τύπου καρβονική ανυδράση είχε απομονωθεί από cDNA βιβλιοθήκη φυματίων του *L. japonicus* και είχε βρεθεί να εκφράζεται αποκλειστικά στα φυμάτια. Η β-τύπου καρβονική ανυδράση που ονομάστηκε *LjCA1* παρουσίασε 77.4% και 80.2% ομοιότητα με καρβονικές ανυδράσες από φυμάτια του *Medicago sativa* και της σόγιας, αντίστοιχα, ενώ παρουσίασε μόνο 45% ομοιότητα με



καρβονικές ανυδράσες από φωτοσυνθετικούς ιστούς. Επιπλέον, η αμινοξική ακολουθία φέρει όλα τα αμινοξικά κατάλοιπα που έχουν προταθεί να συμμετέχουν στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου (Flemetakis *et al.*, 2003).

Η λειτουργικότητα του πλήρους μήκους cDNA που κωδικοποιεί για τη β-τύπου καρβονική ανυδράση επιβεβαιώθηκε με δοκιμή συμπλήρωσης του φαινότυπου σε σύστημα ζύμης. Η *LjCA1* κατάφερε να συμπληρώσει το φαινότυπο ανάπτυξης σε αερόβιο περιβάλλον όταν εκφράστηκε σε μεταλλαγμένο στέλεχος ζύμης το οποίο στερείται το γονίδιο της β-τύπου καρβονικής ανυδράσης και αναπτυσσόταν υποχρεωτικά αναερόβια.

Για το βιοχημικό χαρακτηρισμό της *LjCA1*, η πρωτεΐνη εκφράστηκε στο ετερόλογο σύστημα *E coli* κατόπιν κλωνοποίησης του *Ljca1* cDNA στον φορέα έκφρασης pET28 και καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη αγαρόζης που φέρει ακινητοποιημένα μεταλλικά ιόντα νικελίου, καθώς το εκφραζόμενο πολυπεπτίδιο έφερε ουρά συγγένειας έξι ιστιδινών. Η ενζυμική δραστηριότητα του πολυπεπτιδίου ελέγχθηκε μέσω φωτομετρικού προσδιορισμού.

Οι βιοχημικές δοκιμές έδειξαν ότι το *Ljca1* κωδικοποιεί για μια ενεργή β-τύπου καρβονική ανυδράση, ικανή να καταλύει τόσο την αντίδραση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> όσο και την αντίστροφη αντίδραση αφυδάτωσης των δισανθρακικών ιόντων. Από τις κινητικές καμπύλες που κατασκευάστηκαν έγινε φανερό ότι το ένζυμο ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten. Οι κινητικές σταθερές που υπολογίστηκαν από τις καμπύλες κινητικής του ενζύμου παρουσίασαν ιδιαίτερα υψηλές τιμές, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές που έχουν υπολογιστεί για β-τύπου καρβονικές ανυδράσες από άλλα φυτά, γεγονός που αποδεικνύει ότι πρόκειται για ένα αρκετά ενεργό ένζυμο. Συγκεκριμένα, η  $k_{cat}$  της *LjCA1* κατά την αντίδραση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> υπολογίστηκε να είναι  $8.7 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$  ενώ οι αντίστοιχες τιμές  $k_{cat}$  για το ρύζι και το μπιζέλι είναι  $1.1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  (Yu *et al.*, 2007) και  $2.3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  (Johansson & Forsman, 1992). Ομοίως κατά την αντίδραση αφυδάτωσης των ανθρακικών, η τιμή  $k_{cat}$  για την *LjCA1* υπολογίστηκε να είναι  $1.62 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ , ενώ η τιμή  $k_{cat}$  της καρβονικής ανυδράσης του μπιζελιού είχε υπολογιστεί να είναι  $1.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  (Johansson & Forsman, 1992). Ο λόγος  $k_{cat}/k_M$  κατά την αντίδραση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> υπολογίστηκε να είναι  $1.87 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , μια τιμή αρκετά υψηλή, καθώς είναι της τάξεως μεγέθους που είχε υπολογιστεί και για το πολύ δραστικό α-τύπου ανθρώπινο ισοένζυμο CA II (Lindskog, 1997). Η αντίστοιχη τιμή του λόγου  $k_{cat}/k_M$  στο ρύζι υπολογίστηκε στα  $1.3 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  (Yu *et al.*, 2007). Το ένζυμο *LjCA1* δείχνει μεγαλύτερη συγγένεια προς το CO<sub>2</sub> και μικρότερη συγγένεια στα δισανθρακικά ιόντα καθώς η ειδική δραστηριότητα που υπολογίστηκε κατά την αντίδραση ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> ( $17.523 \pm 1.62 \times 10^6 \text{ units/mg}$ ) είναι πολύ μεγαλύτερη από την ειδική δραστηριότητα που υπολογίστηκε κατά την αντίδραση αφυδάτωσης των δισανθρακικών ιόντων ( $3.259 \pm 0.176 \times 10^6 \text{ units/mg}$ ).

Για να επιβεβαιωθεί η συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου *Ljca1* με τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης, ελέγχθηκε η ικανότητα αζωτοδέσμευσης σε φυτά στα οποία είχε γίνει σίγηση του γονιδίου αυτού με τη χρήση της μεθόδου RNAi. Από τη μέθοδο σίγησης προέκυψαν έξι σειρές φυτών από τις οποίες η μία δεν μελετήθηκε γιατί το ποσοστό εκβλάστησης των σπόρων ήταν σχεδόν μηδαμινό. Από τις πέντε σειρές φυτών που μελετήθηκαν, οι δύο δεν παρουσίασαν κάποιο ιδιαίτερο φαινότυπο και εφαρμογή της ποσοτικής RT-qPCR έδειξε ότι στις σειρές αυτές το γονίδιο *Ljca1* δεν παρουσίασε σίγηση. Στις υπόλοιπες τρεις σειρές παρατηρήθηκε φαινότυπος παρόμοιος με εκείνον που είχε παρατηρηθεί και στην περίπτωση σίγησης των α-τύπου καρβονικών ανυδρασών. Τα φυτά παρουσίασαν φαινότυπο μειωμένης ανάπτυξης τόσο στο υπέργειο όσο και στο υπόγειο τμήμα και υπεράριθμα φυμάτια. Τα ποσοστά σίγησης του γονιδίου στις τρεις σειρές ήταν 51%, 38% και 54%.

Για να μελετηθεί η επίδραση της μειωμένης έκφρασης του γονιδίου *Ljca1* στη λειτουργία των φυματίων και στη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης, πραγματοποιήθηκε δοκιμή της δράσης της νιτρογενάσης στα φυμάτια των μετασχηματισμένων φυτών. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δοκιμής δραστηριότητας νιτρογενάσης έδειξαν ότι η δραστηριότητα της νιτρογενάσης είναι μειωμένη σε όλες τις σειρές φυτών αλλά στατιστικώς σημαντική διαφορά, σε σχέση με την έκφραση που μετρήθηκε στα φυτά αρνητικού ελέγχου, παρατηρήθηκε μόνο σε μια σειρά φυτών, στην οποία είχε μετρηθεί το μεγαλύτερο ποσοστό σίγησης (54%). Το γεγονός ότι στις υπόλοιπες σειρές φυτών δεν παρουσιάστηκε αρκετά μειωμένη δραστηριότητα νιτρογενάσης ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι τα ποσοστά σίγησης δεν είναι ιδιαίτερα υψηλά (51% και 38%). Η πολύ μειωμένη δραστηριότητα νιτρογενάσης στη σειρά φυτών με 54% σίγηση του γονιδίου *Ljca1*, δηλώνει το σημαντικό ρόλο του γονιδίου αυτού στη λειτουργία του φυματίου.

### 3. ΠΙΘΑΝΟΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΩΝ ΚΑΡΒΟΝΙΚΩΝ ΑΝΥΔΡΑΣΩΝ ΣΤΑ ΦΥΜΑΤΙΑ ΤΟΥ *Lotus japonicus*

Ο προφανής φυσιολογικός ρόλος της καρβονικής ανυδράσης στα φυμάτια είναι να παρέχει δισανθρακικά ιόντα στην PEPC η οποία καταλύει τη μετατροπή του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέος και των δισανθρακικών ιόντων σε οξαλοξικό οξύ (Chollet *et al.*, 1996). Από το οξαλοξικό οξύ μπορούν να παραχθούν δικαρβοξυλικά οξέα που είναι απαραίτητα για την αναπνοή των βακτηριοειδών (Tajima *et al.*, 1990; Streeter, 1991). Η μειωμένη έκφραση ενός ισότυπου του ενζύμου PEPC που επάγεται ισχυρά στα φυμάτια του *L. japonicus* (κατόπιν σίγησης του γονιδίου *Ljperc1*) παρεμπόδισε τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης και επηρέασε το μεταβολισμό του άνθρακα και του αζώτου στα φυμάτια. Η συσσώρευση πολλών μεταβολιτών, όπως μηλικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, ασπαρτικό οξύ και

ασπαραγίνη, εμφανίστηκε αρκετά μειωμένη στα φυμάτια των φυτών αυτών (Nomura *et al.*, 2006). Είναι πολύ πιθανό η καρβονική ανυδράση να έχει παρόμοια επίδραση στη λειτουργία του φυματίου καθώς συμμετέχει στο ίδιο βιοσυνθετικό μονοπάτι με την PEPC. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της δραστηριότητας της νιτρογενάσης σε φυτά που παρουσίασαν σίγηση ως προς τα γονίδια που κωδικοποιούν για καρβονικές ανυδράσες

Σε νεαρά φυμάτια, 14 ημέρες μετά τη μόλυνση με το *M. loti*, βρέθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των καρβονικών ανυδρασών είναι πολύ αυξημένα και επιπλέον, μεταγραφήματα τόσο των α-τύπου καρβονικών ανυδρασών (*LjCAA1* και *LjCAA2*) όσο και της β-τύπου *LjCA1* (Flemetakis *et al.*, 2003) εντοπίστηκαν σε όλους τους τύπους κυττάρων του φυματίου. Κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του φυματίου, το αρχέφυτρο του φυματίου ενεργοποιεί το μεταβολισμό του άνθρακα και καταναλώνει μεγάλες ποσότητες σακχαρόζης, που μεταφέρεται εκεί από τα υπέργεια όργανα του φυτού, με σκοπό να εκπληρωθούν οι ανάγκες για τη σύνθεση νέων κυτταρικών τοιχωμάτων και τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών μεμβρανών (Vance & Gantt, 1992). Επομένως, είναι πολύ πιθανό να υποτεθεί ότι αυξημένα επίπεδα καρβονικής ανυδράσης σε όλους τους ιστούς είναι απαραίτητα για να μετατρέψουν το CO<sub>2</sub> που παράγεται από την αναπνοή σε δισανθρακικά ιόντα, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές βιοσυνθετικές διαδικασίες όπως βιοσύνθεση αμινοξέων, λιπογένεση, βιοσύνθεση πυριμιδινών και γλυκονεογένεση (Hoang & Charman, 2002; Sly & Hu, 1995).

Σε προηγούμενες μελέτες είχε υπολογιστεί ότι ο μη-καταλυόμενος ρυθμός της ενυδάτωσης του CO<sub>2</sub> στα μολυσμένα κύτταρα είναι επαρκής για τη σύνθεση του οξυαλοξικού, που είναι απαραίτητο για την αναπνοή των βακτηριοειδών, επομένως, αποδόθηκαν στην καρβονική ανυδράση και άλλοι φυσιολογικοί ρόλοι όπως ρύθμιση του pH και μεταφορά ιόντων (Raven & Newman, 1994). Το γεγονός ότι στα ώριμα φυμάτια, 28 ημέρες μετά τη μόλυνση με το *M. loti*, τα μεταγραφήματα τόσο των α-τύπου CA όσο και της β-τύπου CA (Flemetakis *et al.*, 2003) περιορίζονται στο παρέγχυμα του φυματίου, προσδίδει στην καρβονική ανυδράση και άλλους εναλλακτικούς φυσιολογικούς ρόλους εκτός του προφανούς της ρόλου στα κύτταρα του κεντρικού ιστού. Έχει προταθεί ότι η δραστηριότητα καρβονικής ανυδράσης στα εσωτερικά παρεγχυματικά κύτταρα μπορεί να συμμετέχει στην εγκαθίδρυση ενός φυσικού εμποδίου για τη διάχυση αερίων προς τον κεντρικό ιστό (Atkins *et al.*, 2001; de la Pena *et al.*, 1997). Η καρβονική ανυδράση μπορεί να συμμετέχει στην ανταλλαγή αερίων είτε διευκολύνοντας τη ροή αερίων (συμπεριλαμβανομένου του O<sub>2</sub>) προς το φυμάτιο (Atkins *et al.*, 2001) είτε διευκολύνοντας την απομάκρυνση της περίσσειας CO<sub>2</sub> προς τη ριζόσφαιρα.



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---



**Abd-Alla M.H., Koyro H.W., Yan F., Schubert S. and E. Peiter** (2000) Functional structure of the indeterminate *Vicia faba* L. root nodule: implications for metabolite transport. *J Plant Physiol* **157**: 335–343

**Alber B.E. and J.G. Ferry** (1994) A carbonic anhydrase from the archaion *Methanosarcina thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**:6909-6913

**Alber B.E. and J.G. Ferry** (1996) Characterization of heterologously produced carbonic anhydrase from *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* **178**:3270-3274

**Allaway D., Ludwig E., Crompton L.A., Wood M., Parsons T.R., Wheeler T. and P.S. Poole** (2000) Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids. *Mol Microbiol* **36**: 508–515

**Allen N.S., Bennett M.N., Cox D.N., Shipley A., Ehrhardt D.W. and S.R. Long** (1994) Effects of Nod factors on alfalfa root hair  $Ca^{+2}$  and  $H^{+}$  currents and on cytoskeleton behavior. *Advances in Mol. Gen. of Plant-Microbe Interaction* **3**:107-114

**Amor B.B., Shaw S.L., Oldroyd G.E., Maillet F., Penmetsa R.V., Cook D., Long S.R., Denarie J. and C. Gough** (2003) The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J* **34**: 495–506

**Amoroso G., Morell-Avrahov L., Muller D., Klug K. and D. Sóltemeyer** (2005) The gene NCE103 (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. *Mol Microbiol* **56**:549–558

**Andersson B., Nyman P.O. and L. Strid** (1972) Amino acid sequence of human erythrocyte CA. *B. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**:670-677

**Ane J.M., Kiss G.B., Riely B.K., Penmetsa R.V., Oldroyd G.E., Ayax C., Levy J., Debelle F., Baek J.M., Kalo P., et al** (2004) *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* **303**:1364–1367

**Atkins C.A.**, (1974) Occurrence and some properties of carbonic anhydrase from legume root nodules, *Phytochemistry* **13**: 93–98

**Atkins C.A., Smith P., Mann A. and P. Thumfort** (2001) Localization of carbonic anhydrase in legume nodules. *Plant Cell Environ.* **24**:317-326

**Badger M.R. and G.D. Price** (1992) The CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. *Physiologia Plantarum* **84**:606±615.

**Badger M.R. and G.D. Price** (1994) The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**:369-392

**Bahn Y.S., Cox G.M., Perfect J.R. and J. Heitman** (2005) Carbonic anhydrase and CO<sub>2</sub> sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. *Curr Biol* **15**:2013–2020

**Bahn Y.S. and F.A. Mühlischlegel** (2006) CO<sub>2</sub> sensing in fungi and beyond. *Curr Opin Microbiol* **9**:572–578

- Barsch A., Carvalho H.G., Cullimore J.V. and K. Niehaus** (2006a) GC-MS based metabolite profiling implies three interdependent ways of ammonium assimilation in *Medicago truncatula* root nodules. *J Biotechnol* **127**: 79–83
- Basset B., Goodman R.N. and A. Novacky** (1977) Ultrastructure of soybean nodules: Release of rhizobia from the infection thread. *Can. J. Microbiol.* **23**:573-582
- Bauer W.D.** (1981) Infection of legumes by rhizobia. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**:407-449
- Becana M. and R.V. Klucas** (1992) Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:8958-8962
- Bedu S. and F. Joset** (1991) Studies on the carbonic anhydrase activity in *Synechocystis* PCC6803 wild type and an acetazolamide-resistant mutant. *Can. J. Bot* **69**:1103-1108
- Bergersen F.J.** (1982) *Root nodules of legumes: Structure and Functions*. Chichester: Wiley pp 164
- Bethlenfalvay G.J. and D.A. Phillips** (1977a) Effect of light intensity on efficiency of carbon dioxide and nitrogen reduction in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology* **60**:868-871.
- Bjorkbacka H., Johansson I.M., Skarfstad E. and C. Forsman** (1997) The sulfhydryl groups of Cys269 and Cys272 are critical for the oligomeric state of chloroplast carbonic anhydrase from *Pisum sativum*. *Biochemistry* **36**:4287-4294
- Blasing O.E., Gibon Y., Gunther M., Hohne M., Morcuende R., Osuna D., Thimm O., Usadel B., Scheible W.R., Stitt M.** (2005) Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**:3257–3281
- Blumwald E., Fortin M.G., Rea P.A., Verma D.P.S. and R.J. Poole** (1985) Presence of host-plasma membrane type H1-ATPase in the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *Plant Physiol* **78**: 665–672
- Breton S.** (2001) The cellular physiology of carbonic anhydrase. *JOP. J. Pancreas* **2(4)**:159-164
- Brewin N.J.** (1991) Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**:191-226
- Brouquisse R., Gaudillere J.P. and P. Raymond** (1998) Induction of a carbon-starvation-related proteolysis in whole maize plants submitted to light/dark cycles and to extended darkness. *Plant Physiology* **117**:1281–1291
- Buchanan B.B, Gruissem W. and R. Jones** (2000) *Biochemistry and Molecular biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD
- Buick R.** (1992) The antiquity of oxygenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-depleted ancient lakes. *Science* **255**:74
- Cabanes D., Boistard P. and J. Batut** (2000) Symbiotic induction of pyruvate dehydrogenase genes from *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 483–493



- Caetano-Anolles G. and P.M. Gresshoff** (1991) Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:345-382
- Callaham D.A. and J.G. Torrey** (1981) The structural basis of infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **59**:1647-1664
- Cardenas L., Holdawa-Clarke T.L., Sanchez F., Quinto C., Feijo J.A., Kunkel J.G. and P.K. Hepler** (2000) Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant Physiol* **123**: 443–451
- Carroll B.J., Hansen A.P., McNeil D.L. and P.M. Gresshoff** (1987) Effect of oxygen supply on nitrogenase activity of nitrate- and darkstressed soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants. *Aust J Plant Physiol* **14**:679–687
- Carter C.J. and R.W. Thornburg** (2004) Tobacco nectarin III is a bifunctional enzyme with monodehydroascorbate reductase and carbonic anhydrase activities. *Plant Molecular Biology* **54**:415-425
- Catoira R., Galera C., de Billy F., Penmetsa R.V., Journet E., Maillet F., Rosenberg C., Cook D., Gough C. and J. Denarie** (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**: 1647–1665
- Charpy-Roubaud C., Charpy L. and A.W. Larkum** (2001) Atmospheric dinitrogen fixation by benthic communities of Tikehau Lagoon and its contribution to benthic primary production. *Mol. Biol.* **139**:991-997
- Chirica L.C., Elleby B., Jonsson B.H. and S. Lindskog** (1997) The complete sequence, expression in *Escherichia coli*, purification and some properties of carbonic anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae*. *Eur. J. Biochem.* **244**:755-760
- Chirica L.C., Elleby B. and S. Lindskog** (2001) Cloning, expression and some properties of a  $\alpha$ -carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1544**:55-63
- Chollet R., Vidal J. and M.H. O’Leary** (1996) Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**:273-298
- Chopra J., Kaur N. and A.K. Gupta** (1998) Carbohydrate status and sucrose metabolism in mungbean roots and nodules. *Phytochemistry* **49**:1891–1895
- Chopra J., Kaur N., A.K. Gupta** (2002) A comparative developmental pattern of enzymes of carbon metabolism and pentose phosphate pathway in mungbean and lentil nodules. *Acta Physiol Plant* **24**: 67–72
- Christianson D.W. and J.D. Cox** (1999) *Annu. Rev. Biochem.* **68**:33-57
- Coba de la Pena T.C., Frugier F., McKhann H.I., Bauer P., Brown S., Kondorosi A. and M. Crespi** (1997) A carbonic anhydrase gene is induced in the nodule primordium and its cell-specific expression is controlled by the presence of *Rhizobium* during development, *Plant J.* **11**: 407–420.
- Cohen H.P., Sarath G., Lee K. and F.W. Wagner** (1986) Soybean root nodule ultrastructure during dark-induced stress and recovery. *Protoplasma* **132**:69-75

**Colebatch G., Desbrosses G., Ott T., Krusell L., Montanari O., Kloska S., Kopka J. and M.K. Udvardi** (2004) Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant J* **39**: 487–512

**Colebatch G., Trevaskis B. and M. Udvardi** (2002) Symbiotic nitrogen fixation research in the postgenomics era. *New Phytol* **153**: 37–42

**Coleman J.E.** (1967) *Nature* **214**:193-194

**Covarrubias A.S., Larsson A.M., Hogbom M., Lindberg J., Bergfors T., Bjorkelid C., Mowbray S., Unge T. and T.A. Jones** (2005) Structure and function of carbonic anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry* **280**:18782-18789

**Cox J.D., Hunt J.A., Compher K.M. Fierke C.A. and D.W. Christianson** (2000) *Biochemistry*. **39**:13687-13694

**Cox E.H., McLendon G.L., Morel F.M., Lane T.W., Prince R.C., Pickering I.J. and G.N. George** (2000) *Biochemistry*. **39**:12128-12130

**Cralle H.T. and G.H. Heichel** (1985) Interorgan photosynthate partitioning in alfalfa. *Plant Physiol.* **79**:381-385

**Cralle H.T., Heichel G.H. and D.K. Barnes** (1987) Photosynthate partitioning in plants of alfalfa populations selected for high and low nodule mass. *Crop Sci.* **27**:96-100

**Cronk J.D., Endrizzi J.A., Cronk M.R., O'Neill J.W. and K.Y.J. Zhang** (2001) *Protein Sci* **10**:911-922

**Dagher P.C., Egnor R.W. and A.N. Charney**, (1993) Effect of intracellular acidification on colonic NaCl absorption, *Am. J. Physiol.* **264**: G569–G575

**Day D.A. and L. Copeland** (1991) Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen-fixing legume nodules. *Plant Physiol Biochem* **29**: 185–201

**Day D.A., Poole P.S., Tyerman S.D. and L. Rosendahl** (2001) Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell Mol Life Sci* **58**: 61–71

**de la Pena T.C., Frugier F., McKhann H.I., Bauer P., Brown S., Kondorosi A. and M. Crespi** (1997) A carbonic anhydrase gene is induced in the nodule primordium and its cell-specific expression is controlled by the presence of *Rhizobium* during development. *Plant J* **11**:407-420

**de Sousa C.A.F. and L. Sodek** (2003) Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *J. Exp. Bot.* **50**(1):1-8

**Delauney A.J. and D.P.S. Verma** (1990) A soybean gene encoding delta-1-pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. *Mol. Gen. Genet.* **221**:299–305

**Denarie J., Debelle F. and J.C. Prome** (1996) *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* **65**: 503–535

**Desbrosses G.G., Kopka J. and M.K. Udvardi** (2005) *Lotus japonicus* metabolic profiling: development of gas chromatography-mass spectrometry resources for the study of plant-microbe interactions. *Plant Physiol* **137**:1302–1318

**Dixon R and D. Kahn** (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* **2**:621–631

**Dixon R.A. and L.W. Sumner** (2003) Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiol.* **131**:878-885

**Dixon R.A.** (2004) Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**:225-261

**Driscoll B.T. and T.M. Finan** (1993) NAD1-dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti* is required for symbiotic nitrogen fixation. *MolMicrobiol* **7**:865–873

**Driscoll B.T. and T.M. Finan** (1996) NADP1-dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **178**: 2224–2231

**Doyle J.J.** (1998) Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends Plant Sci* **3**: 473–478

**Ehrhardt D.W., Atkinson E.M. and S.R. Long** (1992) Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**:998-1000

**Ehrhardt D.W., Wais R. and S.R. Long** (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**: 673–681

**El Yahyaoui F., Kuster H., Ben Amor B., Hohnjec N., Puhler A., Becker A., Gouzy J., Vernie T., Gough C., Niebel A., et al** (2004) Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiol* **136**:3159–3176

**Elleuche S. and S. Poggeler** (2009) Evolution of carbonic anhydrase in fungi. *Curr. Genet.* **55**(2):211-222

**Elleuche S. and S. Poggeler** (2009b) Beta-carbonic anhydrase play a role in fruiting body development and ascospore germination in the filamentous fungus *Sordaria macrospora*. *PLoS One* **4**(4): e5177

**Endo M., Matsubara H., Kokubun T., Masuko H., Takahata Y., Tsuchiya T., Fukuda H., Demura T. and M. Watanabe** (2002) The advantages of cDNA microarray as an effective tool for identification of reproductive organ-specific genes in a model legume, *Lotus japonicus*. *FEBS Lett* **514**:229-237

**Endre G., Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kalo P. and G.B. Kiss** (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**:962–966

**Eriksson A.E., Kylsten P.M, Jones T.A. and A. Liljas** (1988) Crystallographic studies of inhibitor binding sites in human carbonic anhydrase II: a pentacoordinated binding of the SCNG ion to the zinc at high pH. *Protein Struct. Funct. Genet.* **4**:283-293

**Eriksson M., Karlsson J., Ramazanov Z., Gardestrom P. and G. Samuelsson** (1996) Discovery of an algal mitochondrial carbonic anhydrase: molecular cloning and

characterization of a low-CO<sub>2</sub>-induced polypeptide in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**: 12031-12034

**Escuredo P.R., Minchin F.R., Gogorcena Y., Iturbe-Ormaetxe I., Klucas R.V. and M. Becana** (1996) Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules. Plant Physiol **110**:1187–1195

**Feigenbaum S. and K. Mengel** (1979) The effect of reduced light intensity and sub-optimal potassium supply on N<sub>2</sub> fixation and N turnover in *Rhizobium*-infected lucerne. Physiologia Plantarum **45**:245-249

**Fiehn O. et al.** (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. Nat. Biotechnol. **18**:1157-1161

**Finan T.M., Mcwhinnie E., Driscoll B. and R.J. Watson** (1991) Complex symbiotic phenotypes result from gluconeogenic mutations in *Rhizobium meliloti*. Mol Plant Microbe Interact **4**: 386–392

**Finn G.A. and W.A. Brun** (1982) Effect of atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment on growth, non-structural carbohydrate content and root nodule activity in soybean. Plant Physiology **69**:327-331

**Flemetakis, E., M. Dimou, D. Cotzur, G. Aivalakis, R. C. Efrose, C. Kenoutis, M. Udvardi, and P. Katinakis.** (2003) A *Lotus japonicus* beta-type carbonic anhydrase gene expression pattern suggests distinct physiological roles during nodule development. Biochim. Biophys. Acta **1628**:186-194.

**Flemetakis E., Dimou M., Cotzur D., Efrose R.C., Aivalakis G., Colebatch G., Udvardi M. and P. Katinakis** (2003) A sucrose transporter, *LjSUT4*, is upregulated during *Lotus japonicus* nodule development. J Exp Bot **54**:1789–1791

**Flemetakis E., Efrose R.C., Desbrosses G., Dimou M., Delis C., Aivalakis G., Udvardi M.K. and P. Katinakis** (2004) Induction and spatial organization of polyamine biosynthesis during nodule development in *Lotus japonicus*. Molecular Plant Microbe Interactions **17**(12):1283-1293

**Flemetakis E., Efrose R.C., Ott T., Stedel C., Aivalakis G., Udvardi M.K. and P. Katinakis** (2006) Spatial and temporal organisation of sucrose metabolism in *Lotus japonicus* nitrogen-fixing nodules suggests a role for the elusive alkaline/neutral invertase. Plant Mol Biol **62**: 53–69

**Flores H.E.** (1991) Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. In: Slocum RD, Flores HE (eds) The biochemistry and physiology of polyamines in plants. CRC Press, Boca Raton, pp 214–255

**Fujihara S., Abe H., Minakawa Y., Akao S. and T. Yoneyama** (1994) Polyamines in nodules from various plant–microbe symbiotic associations. Plant Cell Physiol. **35**:1127–1134

**Fujita K, Masuda T and S. Ogata** (1988) Dinitrogen fixation, ureide concentration in xylem exudate and translocation of photosynthates in soybean as influenced by pod removal and defoliation. Soil Science and Plant Nutrition **34**:265-275

**Fukuzawa H., Suzuki E., Komukai Y. and S. Miyachi** (1992) A gene homologous to chloroplast carbonic anhydrase (*icfA*) is essential to photosynthetic carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:4437-4441

**Gaidamashvili M., Yuki O., Iijima S, Takayama T., Ogawa T., and K. Muramoto** (2004) Characterization of the yam tuber storage proteins from *Dioscorea batatas* exhibiting unique lectin activities. *The journal of biological chemistry* **279**: 26028-26035

**Georgiadis M.M, Komiya H., Chakrabarti P., Woo D., Kornuc J.J. and D.C. Rees** (1992) Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science* **257**:1653-1659

**Goggin D.E., Lipscombe R., Fedorova E., Millar A.H., Mann A., Atkins C.A. and P.M.C. Smith** (2003) Dual intracellular localization and targeting of aminoimidazole ribonucleotide synthetase in cowpea. *Plant Physiol* **131**: 1033–1041

**Gogorcena Y., Gordon A.J., Escuredo P.R., Minchin F.R., Witty J.F., Moran J.F. and M. Becana** (1997) N<sub>2</sub> fixation, carbon metabolism, and oxidative damage in nodules of dark-stressed common bean plants. *Plant Physiol* **113**:1193–1201

**Gonzales E.M., Gordon A.J., James C.L. and C. Arrese-Igor** (1995) The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *Journal of Experimental Botany* **46**:1515-1523.

**Gordon A.J., Ougham H.J. and C.L. James** (1993) Changes in the levels of gene transcripts and their corresponding proteins in nodules of soybean plants subjected to dark-induced stress. *Journal of Experimental Botany* **44**:1453-1460.

**Gordon A.J., Ryle G.J.A., Mitchell D.F. and C.E. Powell** (1985) The flux of <sup>14</sup>C labeled photosynthate through soybean root nodules during N<sub>2</sub> fixation. *J. Exp. Bot.* **36**:756-759

**Gordon A.J., Minchin F.R., James C.L. and O. Komina** (1999) Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol* **120**:867–878

**Gotz R., Gnann A. and F.K. Zimmermann** (1999) Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. *Yeast* **15**:855–864

**Graham P.H. and C.P. Vance** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* **131**:872-877

**Gregerson R.G., Miller S.S., Petrowski M., Gantt J.S. and C.P. Vance** (1994) Genomic structure, expression and evolution of the alfalfa aspartate aminotransferase genes. *Plant Mol Biol* **25**: 387–399

**Guilloton M.B., Korte J.J., Lamblin A.F., Fuchs J.A. and P.M. Andersson** (1992) Carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. A product of the cyn operon. *J. Biol. Chem.* **267**:3731-3734

**Guilloton M.B., Lamblin A.F., Kozliak E.I., Gerami-Nejad M., Tu C., Silverman D. Anderson P.M. and J.A.Fuchs** (1993) A physiological role for cyanate-induced carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:1443-1451

**Gussin G.N., Ronson C.W. and F.M. Ausubel** (1986) Regulation of nitrogen fixation genes. *Annu. Rev. Genet.* **20**:567-591

**Hadfield K.L. and W.A. Bulen** (1969) Adenosine triphosphate requirement of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry* **8**:5103-5108

**Hakansson K., Carlsson M., Svensson L.A. and A. Liljas** (1992) The structure of native and apo carbonic anhydrase II and some of its anion-ligand complexes. *J. Mol. Biol.* **227**:1192-1204

**Hakansson K., Wehnert A. and A. Liljas** (1994) *Acta Crystallogr. D* **50**:101-104

**Handberg K. and J. Stougaard**, (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics, *Plant J.* **2**:487-496.

**Hardy R.W.F. and U.D. Havelka** (1975) Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybean. *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*, ed. P.S. Nutman, pp 421-439

**Hardy R.W.F., Burns R.C. and Holsten R.D.** (1973) Application of acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil. Biol. and Biochem.* **5**: 47-81

**Hatch M.D. and J.N. Burnell** (1990) Carbonic anhydrase activity in leaves and its role in the first step of C4 photosynthesis. *Plant Physiol.* **93**:380-383

**Havelka U.D. and R.W.F. Hardy** (1976) Legume N<sub>2</sub> fixation as a problem in carbon nutrition. *Proceedings 1<sup>st</sup> International Symposium Nitrogen Fixation*. ed. W.E. Newton, C.J. Nyman, **2**:456-475

**Heck R.W., Boriack-Sjodin P.A., Qian M., Tu C.K., Christianson D.W., Laipis P.J. and D.N. Silverman** (1996) Structure-based design of an intramolecular proton transfer site in murine carbonic anhydrase V. *Biochemistry* **35**:11605-11611

**Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spaink H.P., van Kammen A. and T. Bisseling** (1994) Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant physiol.* **105**:787-797

**Henderson L.E., Henriksson D and P.O. Nyman** (1973) Amino acid sequence of human erythrocyte carbonic anhydrase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**:1388-1394

**Herrada G., Puppo A. and J. Rigaud** (1989) Uptake of metabolites by bacteriod-containing vesicles and by free bacteroids from french bean nodules. *J Gen Microbiol* **135**: 3165-3177

**Hewett-Emmett D. and R.E. Tashian** (1996) Functional diversity, conservation and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma carbonic anhydrase gene families, *Mol. Phylogenet. Evol.* **5**: 50-77

**Hewett-Emmett D., Hopkins P.J., Tashian R.E. and J. Czelusniak** (1984) Origins and molecular evolution of the carbonic anhydrase isozymes. *Ann. NY Acad. Sci* **429**:338-358

**Hoang C.V. and K.D. Chapman** (2002) Biochemical and molecular inhibition of plastidial carbonic anhydrase reduces the incorporation of acetate into lipids in cotton embryos and tobacco cell suspensions and leaves. *Plant Physiol.* **128**:1417-1427

- Hoang C.V., Wessler H.G., Local A., Turley R.B., Benjamin R.C. and K.D. Chapman** (1999) Identification and expression of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plastidial carbonic anhydrase. *Plant Cell Physiol.* **40**:1262-1270
- Hoagland D.R. and D.I. Arnon** (1950) The water-culture method for growing plants without soil, *Calif AES Circular* **347**: 1–39.
- Holmes D.S. and M. Quigley** (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, **114**:193-197
- Horst I., Welham T., Kelly S., Kaneko T., Sato S., Tabata S., Parniske M. and T.L. Wang** (2007) TILLING mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase. *Plant Physiology* **144**:806–820
- Hostak M.S., Henson C.A., Duke S.H. and K.A. Vandebosch** (1987) Starch granule distribution between cell types of alfalfa nodules as affected by symbiotic development. *Can. J. Bot.* **65**:1108-1115
- Hunt S. and B.D. Layzell** (1993) Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* **44**:483-511.
- Hunt J.A., Ahmed M. and C.A. Fierke** (1999) *Biochemistry* **38**:9054-9062
- Iannetta P.P.M., de Lorenzo C., James E.K., Fernandez-Pascual M., Sprent J.I., Lucas M.M., Witty J.F., de Felipe M.R. and F.R. Minchin** (1993) Oxygen diffusion in lupin nodules I. Visualization of diffusion barrier operation. *J Exp Bot* **44**:1461-1467
- Imaizumi-Anraku H., Kawaguchi M., Koiwa H., Akao S. and K. Syono** (1997) Two ineffective nodulating mutants of *Lotus japonicus*: different phenotypes caused by the blockage of endocytotic bacterial release and nodule maturation. *Plant Cell Physiol.* **38**:871-881.
- Ito M. et al.** (2000) Genome and chromosome dimensions of *Lotus japonicus*. *J.Plant Res.* **113**:435-442
- Iverson T.M., Alber B.E., Kisker C., J.G. Ferry and D.C. Rees** (2000) *Biochemistry* **39**:9222-9231
- Jewell D.A., Tu C.K., Paranawithana S.R., Tanhauser S.M., LoGrasso P.V., Laipis P.J. and D.N. Silverman** (1991) Enhancement of the catalytic properties of human carbonic anhydrase III by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **30**:1484–1490
- Jiang Q. and P. M. Gresshoff** (1997) Classical and molecular genetics of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**:59-68.
- Johansson I.M. and C. Forsman** (1992) Processing of the chloroplast transit peptide of pea carbonic anhydrase in chloroplasts and in *Escherichia coli*. Identification of two cleavage sites. *FEBS Lett.* **314**:232-236
- Johansson I.M. and C. Forsman** (1993) Kinetic studies of pea carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.* **218**:439-446
- Kalloniati C., Tsikou D., Lampiri V., Fotelli M., Rennenberg H., Chatzipavlidis I., Fasseas C., Katinakis P. and E. Flemetakis** (2009) Characterization of a *Mesorhizobium*

*loti*  $\alpha$ -type carbonic anhydrase and its role in symbiotic nitrogen fixation. Journal of Bacteriology, **191**: 2593-2600

**Kaplan A. and L. Reinhold** (1999) CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology **50**:539-559

**Kavroulakis N., Fletmetakis E., Aivalakis G. and P. Katinakis** (2000) Carbon metabolism in developing soybean root nodules: the role of carbonic anhydrase. Mol. Plant-Microbe Interact. **13**: 14–22

**Khalifah R. G.** (1971) J. Biol. Chem. **246**: 2561–2573

**Kijne J.W.** (1992) The *Rhizobium* infection process. Biological Nitrogen Fixation pp. 349-398

**Kim J. and D.C. Rees** (1992) Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*. Nature **360**:553-560

**Kim J., Woo D. and D.C. Rees** (1993) X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0-Å resolution. Biochemistry **32**:7104-7115

**Kimber M.S. and E.F. Pai** (2000) EMBO J. **19**:1407-1418

**King B.J., Layzell D.B. and D.T. Canvin** (1986) The role of dark carbon-dioxide fixation in root nodules of soybean, Plant Physiol. **81**:200–205

**Kisker C., Schindelin H., Alber B.E., J.G. Ferry and R.D. Rees** (1996) EMBO J. **15**:2323-2330

**Klengel T., Liang W.J., Chaloupka J., Ruoff C. and K. Schroppel** (2005) Fungal adenyl cyclase integrates CO<sub>2</sub> sensing with cAMP signaling and virulence. Curr Biol **15**:2021–2026

**Kliebenstein D.J.** (2004) Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis* tinted glasses. Plant Cell Environ. **27**:675–684

**Kouchi H. and S. Hata** (1993) Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. Molecular and General Genetics **238**:106-119

**Kouchi H., Shimomura K., Hata S., Hirota A., Wu G.J., Kumagai H., Tajima S., Suganuma N., Suzuki A., Aoki T., et al** (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

**Kouchi H., Nakaji K., Yoneyama T. and J. Ishizuka** (1985) Dynamics of carbon photosynthetically assimilated in nodulated soybean plants under steady state conditions. 3. Time course study on <sup>14</sup>C incorporation into soluble metabolites and respiratory evolution of CO<sub>2</sub> from roots and nodules. Ann. Bot. **56**:333-346

**Krapp A., Saliba-Colombani V. and F. Daniel-Vedele** (2005) Analysis of C and N metabolisms and of C/N interactions using quantitative genetics. Photosynth Res **83**:251–263



- Krebs J.F., Ippolito J.A., Christianson D.W. and C.A. Fierke** (1993) *J. Biol. Chem.* **268**:27458-27466
- Lam H.M., Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R. and G.M. Coruzzi** (1996) The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol.* **47**:569-593
- Lane T.W. and F.M. Morel** (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**:4627-4631
- Lane T.W., Saito M.A., George G.N., Pickering I.J., Prince R.C. and F.M. Morel** (2005) Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **435**:42
- Lapointe M., Mackenzie T.D. and D. Morse** (2008) An external delta-carbonic anhydrase in a free-living marine dinoflagellate may circumvent diffusion-limited carbon acquisition. *Plant Physiol.* **147**(3):1427-1436
- Lawn R.J. and W.A. Brun** (1974) Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthate source-sink manipulation. *Crop Science* **14**:11-16
- Layzell D.B., Hunt S. and G.R. Palmer** (1990) Mechanisms of nitrogenase inhibition in soybean nodules: pulse-modulated spectroscopy indicates that nitrogenase activity is limited by O<sub>2</sub>. *Plant Physiol* **92**:1101-1107
- Levy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E.P., Ane J.M., Lauber E., Bisseling T., et al** (2004) A putative Ca<sup>+2</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* **303**: 1361-1364
- Liang Z.W., Xue Y.F., Behravan G., Jonsson B.H. and S. Lindskog** (1993) *Eur. J. Biochem.* **211**:821-827
- Limpens E., Franken C., Smit P., Willemse J., Bisseling T and R. Geurts** (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**: 630-633
- Lin K-T.D. and H.F. Deutsch** (1973) Human carbonic anhydrase XII. The complete primary structure of carbonic anhydrase. *B. J. Biol. Chem.* **248**:1885-1893
- Lin K-T.D. and H.F. Deutsch** (1974) Human carbonic anhydrase XI. The complete primary structure of carbonic anhydrase. *C. J. Biol. Chem.* **249**:2329-2337
- Lindahl M., Svensson L.A. and A. Liljas** (1993) Metal poison inhibition of carbonic anhydrase. *Protein Struct. Funct. Genet.* **15**:177-182
- Lindskog, S.** (1997) Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther.* **74**: 1-20
- Liu J.P. and J.K. Zhu** (1997) Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **114**:591-596
- Lodwig E. and P. Poole** (2003) Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *CRC Crit Rev Plant Sci* **22**: 37-78
- Lombari P. et al.** (2003) A new transformation-regeneration procedure in the model legume *Lotus japonicus*: root explants as a source of large number of cells susceptible to Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* **21**:771-777

- Long S.R.** (1996) *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**: 1885–1898
- Ludwig M., von Caemmerer S., Price D.G., Badger M.R. and R.T. Furbank** (1998) Expression of tobacco carbonic anhydrase in C4 dicot *Flaveria bidentis* leads to increased leakiness of the bundle sheath and defective CO<sub>2</sub>-concentration mechanism. *Plant Physiol.* **117**:1071-1081
- Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalska M., Szczyglowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., et al** (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637–640
- Mahon J.D.** (1982) Field evaluation of growth and nitrogen fixation in peas selected for high and low photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange. *Can. J. Plant Sci.* **62**:5-17
- Majeau N. and J.R. Coleman** (1994) Correlation of carbonic anhydrase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase expression in pea. *Plant Physiol.* **104**:1393-1399
- Marcus E.A., Moshfegh A.P., Sachs G. and D.R. Scott** (2005) The periplasmic  $\alpha$ -carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. *Journal of Bacteriology.* **187**:729-738
- Maren T.H.** (1995) *J. Glaucoma* **4**:49-62
- Masclaux-Daubresse C., Valadier M.H., Carrayol E., M. Reisdorf-Cren and B. Hirel** (2002) Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. *Plant, Cell and Environment* **25**:1451–1462
- Matamoros M.A., Baird L.M., Escuredo P.R., Dalton D.A., Minchin F.R., Iturbe-Ormaetxe I., Rubio M.C., Moran J.F., Gordon A.J. and M. Becana** (1999) Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical and structural alterations. *Plant Physiology* **121**:97-111
- Matt P., Krapp A., Haake V., Mock H.P. and M. Stitt** (2002) Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of phenylpropanoids and nicotine in tobacco antisense RBCS transformants. *Plant J* **30**:663–677
- Matt P., Schurr U., Krapp A. and M. Stitt** (1998) Growth of tobacco in short day conditions leads to high starch, low sugars, altered diurnal changes of the Nia transcript and low nitrate reductase activity, and an inhibition of amino acid synthesis. *Planta* **207**:27–41
- McGinn P.J. and F.M. Morel** (2008) Expression and regulation of carbonic anhydrases in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* and in natural phytoplankton assemblages from Great Bay, New Jersey. *Physiol. Plant* **133**(1):78-91
- McKay I.A., Dilworth M.J. and A.R. Glenn** (1988) C4-dicarboxylate metabolism in free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. *J Gen Microbiol* **134**: 1433–1440
- Melo-Oliveira R., Oliveira I.C. and G.M. Coruzzi** (1996) *Arabidopsis* mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proceedings of the National Academic Sciences, USA* **93**, 4718–4723.
- Merz K.M. Jr.** (1990) *J. Mol. Biol.* **214**:799-802

- Merz K.M. Jr.** (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**:406-411
- Mett V.L., Podivinsky E., Tennant A.M., Lochhead L.P., Jones W.T. and P.H. Reynolds** (1996) A system for tissue-specific copper-controllable gene expression in transgenic plants: nodule-specific antisense of aspartate aminotransferase-P2. *Transgenic Res* **5**: 105–113
- Miller S.S., Boylan K.L.M. and C.P. Vance** (1987) Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation: III. Immunological studies of nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **84**:501– 508.
- Minchin F.R., Summerfield R.J., Hadley P., Roberts E.H. and S. Rawsthorn** (1981) Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. *Plant Cell Environ.* **4**:5-26
- Minchin F.R., Minguez I., Sheehy J.E., Witty J.F. and L. Skot** (1986) Relationships between nitrate and oxygen supply in symbiotic nitrogen fixation by white clover. *Journal of Experimental Botany* **37**:1103-1113.
- Miroux and Walker** (1996) *J.Mol. Bio.* **260**: 289-298
- Mitra R.M., Gleason C.A., Edwards A., Hadfield J., Downie J.A., Oldroyd G.E. and S.R. Long** (2004a) A  $Ca^{+2}$ /calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 4701–4705
- Mitsch M.J., Cowie A. and T.M. Finan** (2007) Malic enzyme cofactor and domain requirements for symbiotic  $N_2$  fixation by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **189**: 160–168
- Mitsuhashi S., Mizushima T., Yamashita E., Yamamoto M., Kumasaka T., Moriyama H., Ueki T., Miyachi S and T. Tsukihara** (2000) *J. Biol. Chem.* **275**:5521-5526
- Miyashita Y. and A.G. Good** (2008) NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. *J. Exp. Bot.* **59**(3):667-680.
- Mogensen E.G., Janbon G., Chaloupka J., Steegborn C. and M.S. Fu** (2006) *Cryptococcus neoformans* senses  $CO_2$  through the carbonic anhydrase Can2 and the adenylyl cyclase Cac1. *Eukaryot Cell* **5**:103–111
- Mori K. et al** (1999) Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney. *J Biol Chem* **274**:15701–15705
- Moriyasu Y. and Y. Ohsumi** (1996) Autophagy in tobacco suspensioncultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiology* **111**:1233–1241
- Moroney J.V., Bartlett S.G. and G. Samuelsson** (2001) Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell Environ* **24**:141–153
- Murphy P.M.** (1986) The effect of light and atmospheric carbon dioxide concentration on nitrogen fixation by herbage legumes. *Plant Soil* **95**:399-409
- Newcomb W.** (1981) Nodule morphogenesis and differentiation. In *Biology of the Rhizobiaceae*. pp. 247-297

- Niemietz C.M. and S.D. Tyerman** (2000) Channel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett* **465**: 110–114
- Nomura M., Mai H.T., Fujii M., Hata S., Izui K. and S. Tajima** (2006) Phosphoenolpyruvate carboxylase plays a crucial role in limiting nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant Cell Physiol* **47**: 613–621
- Northrop D.B. and F.B. Simpson** (1998) *Arch. Biochem. Biophys.* **353**:288-292
- Ohlrogge J.B. and J.G. Jaworski** (1997) Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**:109-136
- Oldroyd G.E. and J.A. Downie** (2004) Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 566–576
- Oldroyd G.E.D** (2001) Dissecting symbiosis: developments in Nod factor signal transduction. *Ann Bot (Lond)* **87**: 709–718
- Ott T., van Dongen J.T., Gunther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P. and M.K. Udvardi** (2005) Symbolic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* **15**: 531–535
- Ott T., Sullivan J., James E.K., Flegmetakis E., Günther C., Gibon Y., Ronson C. and M. Udvardi** (2009) Absence of symbiotic leghemoglobins alters bacteroid and plant cell differentiation during development of *Lotus japonicus* root nodules. **22**:800-808
- Ouyang L., Udvardi M.K. and D. Day** (1990) Specificity and regulation of the dicarboxylate carrier on the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Planta* **182**: 437–444
- Ouyang L.J. and D.A. Day** (1992) Transport properties of symbiosomes isolated from siratro nodules. *Plant Physiol Biochem* **30**: 613–623
- Palmberg P.** (1995) *Arch. Ophthalmol.* **113**:985-986
- Park H., Song B. and F.M. Morel** (2007) Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters. *Environ Microbiol* **9**:403–413
- Pastorek J., Pastorekova S., Callebaut I., Mornon J.P., Zelnik V., Opavsky R., Zat'ovicova M., Liao S., Portetelle D., Stanbridge E.J. et al.** (1994) Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene* **9**:2877-2888
- Pathirana S.M., Vance C.P., Miller S.S. and J.S. Gantt** (1992) Alfalfa root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase-characterization of the cDNA and expression in effective and plant-controlled ineffective nodules. *Plant Mol Biol* **20**: 437–450
- Patriarca E.J., Tate R. and M. Iaccarino** (2002) Key role of bacterial NH<sub>4</sub><sup>+</sup> metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:203–222
- Pawlowski K. and T.Bisseling** (1996) Rhizobial and actinorhizal symbioses: What are the shared features? *Plant Cell* **8**: 1899–1913

**Peiter E. and S. Schubert** (2003) Sugar uptake and proton release by protoplasts from the infected zone of *Vicia faba* L. nodules: evidence against apoplastic sugar supply of infected cells. *J Exp Bot* **54**: 1691–1700

**Peiter E., Yan F. and S. Schubert** (2004) Amino acid export from infected cells of *Vicia faba* root nodules: evidence for an apoplastic step in the infected zone. *Physiol Plant* **122**: 107–114

**Penmetsa R.V. and D.R. Cook** (1997) A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* **275**:527-530

**Perry JA, Wang TL, Welham TJ, Gardner S, Pike JM, Yoshida S, Parniske M:** (2003) A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **131**:866-871

**Pfeiffer N.E., Malik N.S.A., and F.W Wagner** (1983). Reversible Dark-Induced Senescence of Soybean Root-Nodules. *Plant Physiology* **71**, 393-399.

**Pirozynski K.A. and D.W. Malloch** (1975) The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* **6**: 153–164

**Price G.D., SuÈltemeyer D., Klughammer B., Ludwig M. and M.R. Badger** (1998) The functioning of the CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in several cyanobacterial strains: a review of general physiological characteristics, genes, proteins and recent advances. *Canadian Journal of Botany* **76**:973-1002

**Price G.D., Coleman J.R. and M.R. Badger** (1992) Accosiation of carbonic anhydrase activity with carboxysomes isolated from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Physiol.* **100**:784-793

**Price G.D. and M.R. Badger** (1989) Ethoxzolamide inhibition of CO<sub>2</sub> uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 without apparent inhibition of internal carbonic anhydrase activity. *Plant Physiol.* **89**:37-43

**Price G.D. and M.R. Badger** (1989) Ethoxzolamide inhibition of CO<sub>2</sub>-dependent photosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC794. *Plant Physiol.* **89**:44-50

**Price G.D., Howitt S.M., Harrison K. and M.R. Badger** (1993) Analysis of a genomic DNA region from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 involved in carboxysome assembly and function. *J. Bacteriol.* **175**:2871-2879

**Price J., Laxmi A., St Martin S.K. and J.C. Jang** (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**:2128–2150

**Puskas L.G., Inui M. Zahn K. and H. Yukawa** (2000) A periplasmic, alpha-type carbonic anhydrase from *Rhodospseudomonas palustris* is essential for bicarbonate uptake. *Microbiology* **146**:2957-2966

**Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Gronlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., et al** (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**: 585–592

- Ramakers C., Ruijter J.M., Deprez R.H. and A.F. Moorman** (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* **339**:62-66
- Raven J.A. and J.R. Newman** (1994) Requirement for carbonic anhydrase activity in processes other than photosynthetic inorganic carbon assimilation. *Plant Cell Environ.* **17**:123-130
- Reed M.L. and D. Graham** (1981) Carbonic anhydrase in plants: distribution, properties, and possible physiological roles. *Progress in Phytochemistry* **7**: 47-94
- Reid C.J. and P.S. Poole** (1998) Roles of DctA and DctB in signal detection by the dicarboxylic acid transport system of *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* **180**: 2660–2669
- Remy W., Taylor T.N., Hass H. and H. Kerp** (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11841–11843
- Restivo F.M.** (2004) Molecular cloning of glutamate dehydrogenase genes of *Nicotiana plumbaginifolia*: structure analysis and regulation of their expression by physiological and stress conditions. *Plant Science* **166**:971–982
- Roberts S.B., Lane T.W. & Morel F.M.M.** (1997) Carbonic anhydrase in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Baccillariophyceae). *Journal of Phycology* **33**:845–850.
- Robertson J.G. and P. Lyttleton** (1984) Division of peribacteroid membranes in root nodules of white clover. *J. Cell Sci.* **69**:147-157
- Robinson S.A., Slade A.P., Fox G.G., Phillips R., Ratcliffe R.G. and G.R. Stewart** (1991) The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiology* **95**:509–516
- Robinson S.A., Stewart G.R. and R. Phillips** (1992) Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiology* **98**:1190–1195
- Rontein D., Basset G. and A.D. Hanson** (2002) Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic Engineering* **4**:49–56
- Rosendahl L., Vance C.P. and W.B. Pedersen** (1990) Products of dark CO<sub>2</sub> fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiol* **93**: 12–19
- Saalbach G., Erik P. and S. Wienkoop** (2002) Characterisation by proteomics of peribacteroid space and peribacteroid membrane preparations from pea (*Pisum sativum*) symbiosomes. *Proteomics* **2**: 325–337
- Salminen S.O. and J.G. Streeter** (1992) Labeling of carbon pools in *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum* bv viciae bacteroids following incubation of intact nodules with <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. *Plant Physiol* **100**: 597–604
- Sanchez D.H., Lippold F., Redestig H., Hannan M.A., Erban A., Kramer U., Kopka J. and M.K. Udvardi** (2008) Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03381.x

**Sato S. et al.** (2001) Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fifty-six TAC clones which cover the 5.4 Mb regions of the genome. *DNA Res.* **8**:311-318

**Sawaya M.R., Cannon G.C., Heinhorst S., Tanaka S., Williams E.B., Yeates T.O. and C.A. Kerfeld** (2006) The structure of b-carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two. *Journal of Biological Chemistry* **281**:7546–7555.

**Schortemeyer J., Atkin O.K., McFarlane N. and J.R. Evans** (1999) The impact of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and nitrate supply on growth, biomass allocation, nitrogen partitioning and N<sub>2</sub> fixation of *Acacia melanoxylon*. *Australian Journal of Plant Physiology* **26**:737-747

**Schubert K.R.** (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis and transport, and metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* **37**: 539–574

**Selker J.M.L.** (1988) Three-dimensional organization of uninfected tissue in soybean root nodules and its relation to cell specialization in the central region. *Protoplasma* **147**: 178–190

**Shaw S.L. and S.R. Long** (2003) Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiol* **131**:976–984

**Silverman D.N. and S. Lindskog** (1988) *Acc. Chem. Res.* **21**:30-36

**Singh R., Karamdeep L., Bhullar S.S. and A.K. Gupta** (1994) Metabolism of free sugars in relation to the activities of enzymes involved in sucrose metabolism and nitrogen assimilation in the developing nodules of chickpea. *Plant Physiol Biochem* **32**: 875–882

**Sly W.S. and Hu R.Y.** (1995) Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:375-401

**Smil V.** (1999) Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochem. Cycles* **13**:547-662

**Smith K. S., Jakubzick C., Whittam T. S. and J. G. Ferry** (1999) Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:15184-15189.

**Smith K and G.J. Ferry** (2000) Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiology Reviews* **24**:335-366

**Smith K and G.J. Ferry** (1999) A plant type (b-class) carbonic anhydrase from the thermophilic methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* **181**:6247-6253

**Smith K. S., Cospser N.J., Stalhandske C., Scott R.A. and J. G. Ferry** (2000) *J. Bacteriol.* **182**:6605-6613

**So A.K.-C., Espie G.S., Williams E.B., Shively J.M., Heinhorst S. & Cannon G.C.** (2004) A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (e class) is a component of the carboxysome shell. *Journal of Bacteriology* **186**:623–630.

**So A.K.C., Van Spall H.G.C., Coleman J.R. and G.S.Espie** (1998) Catalytic exchange of <sup>18</sup>O from <sup>13</sup>C<sup>18</sup>O-labelled CO<sub>2</sub> by wild type cells and *ecaA*, *ecaB* and *ccaA* mutants of the cyanobacteria *Synechococcus* PCC7942 and *Synochocystis* PCC6803. *Can. J. Bot.* **76**:1153-1160

- So A.K.C. and G.S.Espie** (1998) Cloning, characterization and expression of carbonic anhydrase from the cyanobacterium *Synochocystis* PCC6803. *Plant Mol. Biol.* **37**:205-215
- Soltes-Rak E., Mulligan M.E. and J.R. Coleman** (1997) Identification and characterization of a gene encoding a vertebrate-type carbonic anhydrase in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **179**:769-774
- Soussana J.F. and U.A. Hartwig** (1996) The effect of elevated CO<sub>2</sub> on symbiotic N<sub>2</sub> fixation: a link between the carbon and nitrogen cycles in grassland ecosystems. *Plant and Soil* **187**:321-332
- Stitt M. and A. Krapp** (1999) The molecular physiological basis for the interaction between elevated carbon dioxide and nutrients. *Plant Cell Environ* **22**:583–622
- Stougaard J.** (2001) Genetics and genomics of root symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **4**:328-335
- Stracke S., Kistner C., Yoshida S., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Szczyglowski K. and M. Parniske** (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**: 959–962
- Streeter J. G.** (1991) Transport and metabolism of carbon and nitrogen in legume nodules. *Adv. Bot. Res.* **18**:129-187
- Streeter J.G.** (1995) Recent developments in carbon transport and metabolism in symbiotic systems. *Symbiosis* **19**:175–196
- Strop P., Smith K.S., Iverson T.M., G.J. Ferry and D.C. Rees** (2001) *J. Biol. Chem.* **276**:10299-10305
- Studier F.W. and B.A. Moffatt** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113–130
- Sung Y.C. and J.A. Fuchs** (1988) Characterization of the *cyn* operon in *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **263**:14769-14775
- Supuran C.T.** (2008) Carbonic anhydrases-an overview. *Curr Pharm Des* **14**:603–614
- Swaraj K. and N.R. Bishnoi** (1999) Effect of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Indian J. Exp. Biol.* **37**:843–848.
- Szafran M.M. and H. Haaker** (1995) Properties of the peribacteroid membrane atpase of pea root-nodules and its effect on the nitrogenase activity. *Plant Physiol* **108**: 1227–1232
- Szczyglowski K., Shaw R.S., Wopereis J., Copeland S., Hamburger D., Kasiborski B., Dazzo F.B. and F.J. de Bruijn** (1998) Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**:684-697
- Taiz L. and E. Zeiger** (2002) *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts
- Tajima S., Kimura I., Kouzai K. and T. Kasai** (1990) Succinate degradation through the citric acid cycle in *Bradyrhizobium japonicum* J501 bacteroids under low oxygen concentration. *Agric. Biol. Chem.* **54**:891-897



**Takane K., Tajima S. and H. Kouchi** (2000) Structural and expression analysis of uricase mRNA from *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**:1156-1160

**Tashian R.E., Hewett-Emmett D., eds** (1984) Biology and chemistry of the carbonic anhydrase. *Ann. NY Acad. Sci* **429**:1-640

**Temple S.J., Vance C.P. and J.S. Gantt** (1998) Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends Plant Sci* **3**: 51–56

**Thimm O., Blasing O., Gibon Y., Nagel A., Meyer S., Kruger P., Selbig J., Muller L.A., Rhee S.Y. and M. Stitt** (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* **37**:914–939

**Thompson A.R. and R.D. Vierstra** (2005) Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 165–173

**Trepp G.B., Plank D.W., Stephen Gantt J. and C.P. Vance** (1999a) NADH-glutamate synthase in alfalfa root nodules: immunocytochemical localization. *Plant Physiol* **119**: 829–838

**Tricot F.** (1993) Mise en place des nodosités du pois protéagineux de printemps (*Pisum sativum* L.). Influence de la nutrition carbonée. PhD thesis, Université Paris-Sud Orsay, France.

**Tripp B.C., Smith K. & Ferry J.G.** (2001) Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **276**:48615–48618

**Tripp B.C. and J.G. Ferry** (2000) *Biochemistry* **39**:9232-9240

**Tsuruoka S., Swenson E.R., Petrovic S., Fujimura A. and G.J. Schwartz,** (2001) Role of basolateral carbonic anhydrase in proximal tubular fluid and bicarbonate absorption, *Am. J. Physiol.-Renal Physiol.* **280**: F146– F154.

**Tu C., Qian M., Earnhardt J.N., Laipis P.J. and D.N. Silverman** (1998) *Biophys. J.* **74**:3182-3189

**Tureci O., Sahin U., Vollmar E., Siemer S., Gottert E., Seitz G., Parkkila A.K., Shah G.N., Grubb J.H., Pfreundschuh M. and W.S. Sly** (1998) Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:7608-7613

**Udvardi M.K. and D.A. Day** (1997) Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**:493–523

**Udvardi M.K., Lister D.L. and D.A. Day** (1991) ATPase activity and anion transport across the peribacteroid membrane of isolated soybean symbiosomes. *Arch. Microbiol.* **156**:362-366

**Udvardi M.K., Price G.D., Gresshoff P.M. and D.A. Day** (1988) A dicarboxylate transporter on the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett.* **231**:36-40

**Van de Wiel C., Scheres B., Franssen H., van Lierop M.J., van Lammeren A., van Kammen A. and T. Bisseling** (1990) The early nodulin transcript *ENOD2* is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO Journal* **9**:1-7

**Van Spronsen P.C., Bakhuizen R., van Brussel A.A.N. and J.W. Kijne** (1994) Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur. J. Cell Biol.* **64**:88-94

**Vance C.P., Reibach P.H. and C.E. Pankhurst** (1987) Symbiotic properties of *Lotus pedunculatus* root nodules induced by *Rhizobium loti* and *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) *Physiol. Plantarum* **69**:435-442

**Vance C.P. and G.H. Heichel** (1991) Carbon in N<sub>2</sub> fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**:373-392.

**Vance C.P., Miller S.S., Driscoll B.T., Robinson D.L., Trepp G., Gant J.S., and D.A. Samas** (1998) Nodule carbon metabolism: organic acids for N<sub>2</sub> fixation. I. Elmerich C et al. eds. *Biological nitrogen fixation for the 21st century*. Paris: Kluwer Academic Publishers, 443-448.

**Vance C.P., Gregerson R.G., Robinson D.L., Miller S.S. and J.S. Gantt** (1994) Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules-molecular features of the enzymes involved, *Plant Sci.* **101**: 51-64

**Vance C.P. and J.S. Gantt** (1992) Control of nitrogen and carbon metabolism in root-nodules. *Physiol Plant* **85**: 266-274

**Vance C.P., Miller S.S., Gregerson R.G., Samac D.A., Robinson D.L. and J.S. Gantt** (1995) Alfalfa NADH-dependent glutamate synthase-structure of the gene and importance in symbiotic N<sub>2</sub> fixation. *Plant J* **8**: 345-358

**Vance C.P., Heichel G.H., Barnes D.K., Bryan J.W. and L.E. Johnson** (1979) Nitrogen fixation, nodule development, and vegetative regrowth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following harvest. *Plant Physiol* **64**:1-8

**Vasse J., de Billy F., Camut S. and G. Truchet** (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* **172**:4295-4306

**Verma D.P.S** (1992) Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* **4**:373-382

**Voisin A.S., Salon C., Jeudy C. and F.R. Warembourg** (2003) Symbiotic N<sub>2</sub> fixation activity in relation to C economy of *Pisum sativum* L. as a function of plant phenology. *Journal of Experimental Botany* **54**:2733-2744

**Wais R.J., Galera C., Oldroyd G., Catoira R., Penmetsa R.V., Cook D., Gough C., Denarie J. and S.R. Long** (2000) Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13407-13412

**Walia H., Wilson C., Condamine P. et al.** (2005) Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiol.* **139**:822-835

**Wang T.L.** (2003) Can we improve the nutritional quality of legume seeds? *Plant Physiol* **131**:886-891

**Watson R.J.** (1990) Analysis of the C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport genes of *Rhizobium meliloti*: nucleotide sequence and deduced products of *dctA*, *dctB* and *dctD*. *Mol Plant Microbe Interact* **3**: 174–181

**White J., Prell J., James E.K. and P. Poole** (2007) Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiology* **144**:604-614

**Wienkoop S. and G. Saalbach** (2003) Proteome analysis: novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Physiol* **131**: 1080–1090

**Wilson P.W., Fred E.B. and M.R. Salmon** (1933) Relation between carbon dioxide and elemental nitrogen assimilation in leguminous plants. *Soil Sci.* **35**:145-165

**Witty J.F., Minchin F.R., Skøt L. and J.E. Sheehy** (1986) Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Oxf Surv Plant Mol Cell Biol* **3**:275–314

**Witty J.F.** (1991) Microelectrode measurements of hydrogen concentrations and gradients in legume nodules. *J Exp Bot* **42**: 765–771

**Wopereis J., Pajuelo E., Dazzo F.B., Jiang Q., Gresshoff P.M., de Bruijn F.J., Stougaard J. and K. Szczyglowski** (2000) Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant J.* **23**:97-114

**Xu Y, Feng L, Jeffrey PD, Shi Y, Morel FM** (2008) Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature* **452(7183)**:56-61

**Xue Y.F., Liljas A., Jonsson B.H. and S. Lindskog** (1993) Proteins Struct. Funct. Genet. **17**:93-106

**Yu S., Xia D., Luo Q., Cheng Y., Takano T. and S. Liu** (2007) Purification and characterization of carbonic anhydrase of rice (*Oryza sativa* L.) expressed in *E. coli*. *Protein Expression & Purification* **52**:379-383

**Yurgel S., Mortimer M.W., Rogers K.N. and M.L. Kahn** (2000) New substrates for the dicarboxylate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **182**: 4216–4221

**Yurgel S.N. and M.L. Kahn** (2004) Dicarboxylate transport by rhizobia. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 489–501

**Yurgel S.N. and M.L. Kahn** (2005) *Sinorhizobium meliloti* *dctA* mutants with partial ability to transport dicarboxylic acids. *J Bacteriol* **187**: 1161–1172

