



Διπλωματική Εργασία Τοματσίδου Αναστασία

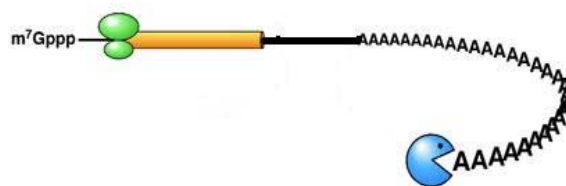
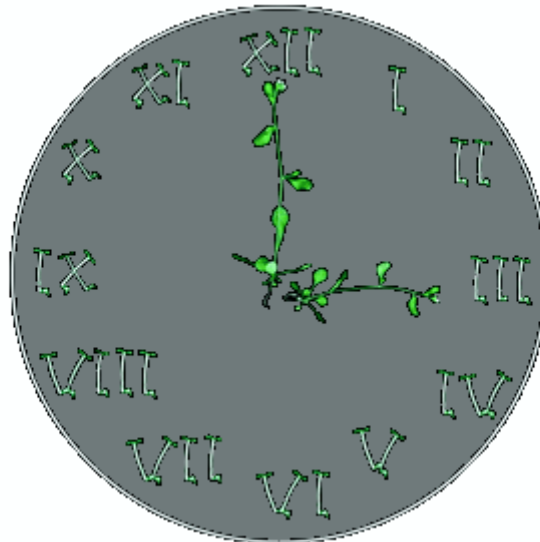


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**AtNOC, μια νέα αποαδενυλάση που ρυθμίζεται από τον κερκάδιο ρυθμό στο *Arabidopsis thaliana***



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ- ΤΟΜΑΤΣΙΔΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2010**

## Διπλωματική Εργασία Τοματσίδου Αναστασία

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνος Καθηγητής:

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Λέκτορας ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Λέκτορας ΤΒΒ, Π.Θ.

**Παπαδοπούλου Καλλιόπη**, Επίκουρη Καθηγήτρια ΤΒΒ, Π.Θ.

**Δελής Κων/νος**, Λέκτορας επί συμβάσει (ΠΔ 407/80), ΤΒΒ, Π.Θ.

### Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα τον καθηγητή μου, κύριο Μπαλατσό Νικόλαο, για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και την κατανόηση του καθώς και τον κύριο Δελή Κων/νο για την αμέριστη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές του. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Μαραγκοζίδη Παναγιώτη, τον μεταπτυχιακό φοιτητή Κυρίτση Αθανάσιο, την υποψήφια διδάκτορα Κροκίδα Αφροδίτη και τον προπτυχιακό φοιτητή Γκααραγκούνη Κων/νο για τη βοήθειά τους. Τέλος, ευχαριστώ όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου μας για τη συνεργασία.

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
Το κirkάδιο ρολόι.....	5
Χαρακτηριστικά κirkάδιου ρυθμού.....	6
Η ιστορία της μελέτης του ρολογιού στα φυτά.....	6
Το φυτό <i>Arabidopsis Thaliana</i> εμφανίζει πολλούς κirkάδιους ρυθμούς.....	9
Το κirkάδιο ρολόι στο <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	10
Αποικοδόμηση mRNA.....	13
Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA στο φυτικό κύτταρο.....	15
Αποαδενυλάσες-Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος δραστηριότητάς τους.....	17
Νοκτουρνίνη (Nocturnin), μια αποαδενυλάση που ελέγχεται από το κirkάδιο ρολόι.....	21
Μεταγραφική ρύθμιση της νοκτουρνίνης.....	22
ΣΚΟΠΟΣ.....	25
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
Υλικά.....	26
Διαλύματα.....	27
Μέθοδοι.....	29
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46
Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης.....	46
Έκφραση και απομόνωση AtNOC.....	47
Πρότυπη καμπύλη πολυ(A).....	48
Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης.....	49
Κινητική με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πολυ(A).....	50
Υπολογισμός κινητικών σταθερών του ενζύμου.....	53
Μελέτη του ρόλου των ιόντων $Mg^{+2}$ .....	54
Η AtNOC είναι μια πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση.....	55
Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης της AtNOC από τον κirkάδιο ρυθμό με real time PCR.....	56
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	60

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αποαδενυλίωση είναι διαδικασία βράχυνσης των πολυ(A)-ουρών. Είναι το πρώτο και καθοριστικό βήμα της αποικοδόμησης των mRNAs σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών από τη ζύμη ως τα ανώτερα θηλαστικά. Τα ένζυμα που καταλύουν τη διαδικασία είναι γνωστά ως αποαδενυλάσες. Στο *Arabidopsis thaliana* η AtPARN είναι μια αποαδενυλάση, απαραίτητη κατά την πρώιμη φάση της ανάπτυξης. Βασιζόμενοι στην αναζήτησή μας *in silico* για νέες αποαδενυλάσες στο *Arabidopsis*, αναγνωρίσαμε και κλωνοποιήσαμε έναν πλήρη κλώνο cDNA που ανταποκρίνεται σε ένα πιθανό ομόλογο αποαδενυλάσης. Η ετερόλογη έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου σε *E. coli* έδωσε μια πρωτεΐνη που αποικοδομεί πολυ(A), *in vitro*. Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε πως η καμπύλη ταχύτητας είναι σιγμοειδής, γεγονός που υπαινίσσεται πως πρόκειται για ένα αλλοστερικό ένζυμο. Η δραστηριότητα του ενζύμου εξαρτάται από την παρουσία ιόντων Mg(II), κατατάσσοντάς το στις νουκλεάσες που εξαρτώνται από μαγνήσιο. Η κατατομή της έκφρασης του mRNA της αποαδενυλάσης στο βλαστό μετά από ένα κύκλο φωτός/σκότους περιόδου 16/8h έδειξε πως τα επίπεδά του αυξάνονται λίγο πριν το σκοτάδι, υπαινίσσοντάς έκφραση που ελέγχεται από τον κirkάδιο ρυθμό. Ονομάζουμε την νέα πρωτεΐνη AtNOC, σε σχέση με το ομόλογο nocturnin (NOC) που ελεγχεται από τον κirkάδιο ρυθμό. Από όσο γνωρίζουμε, η AtNOC είναι η πρώτη κirkάδια-ελεγχόμενη αποαδενυλάση στο *Arabidopsis*.

## ABSTRACT

Deadenylation is the process of poly(A) tail shortening. It is the first and rate-limiting step in the degradation of many mRNAs in a wide-range of organisms from yeast to higher eukaryotes. A family of enzymes known as deadenylases catalyses the process. In *Arabidopsis thaliana* the AtPARN deadenylase homolog is essential during early development. Based on our *in silico* analysis for other functional deadenylases throughout *Arabidopsis* genome, we identified and cloned a full-length cDNA clone that corresponds to a putative deadenylase homolog. We demonstrate that heterologous expression of the cloned gene in *E. coli* results to a protein with poly(A)-degrading activity *in vitro*. Data analysis revealed that the enzyme yields sigmoidal velocity curves, suggesting an allosteric behavior. The enzyme's activity depends on the presence of Mg(II) ions, thus it can be classified among the magnesium-dependent family of nucleases. Expression profile analysis in shoots grown under a photoperiod of 16/8 h light/dark cycle, shows that the mRNA expression of the novel deadenylase is significantly increased just before dark, suggesting a circadian-regulated profile. We designate the novel protein AtNOC, in relation to the circadian-regulated nocturnin (NOC) homolog. To our knowledge, AtNOC is the first circadian-regulated deadenylase in plants.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Το Κιρκάδιο Ρολόι

Η Γη περιστρέφεται γύρω από τον άξονά της κάθε 24 ώρες και έτσι κάθε κομμάτι της επιφάνειάς της έρχεται κοντά στον Ήλιο ή απομακρύνεται από αυτόν με αποτέλεσμα την ημέρα και τη νύχτα αντίστοιχα. Ο μεταβολισμός, η φυσιολογία και η συμπεριφορά των περισσότερων οργανισμών αλλάζει μεταξύ ημέρας και νύχτας. Αυτές οι βιολογικές ταλαντώσεις γίνονται προφανείς ως ημερήσιοι ρυθμοί. Οι περισσότεροι οργανισμοί έχουν μια έμφυτη ικανότητα να αντιλαμβάνονται το χρόνο. Πράγματι, οι περισσότεροι οργανισμοί δεν ανταποκρίνονται στην ανατολή του ηλίου αλλά ρυθμίζουν την βιολογία τους σύμφωνα με την αυγή. Οι ημερήσιοι ρυθμοί των οργανισμών παραμένουν, ακόμα και όταν στερούνται εξωγενή χρονικά ερεθίσματα, δείχνοντας ότι παράγονται από ένα ενδογενές βιολογικό κιρκάδιο ρολόι. Μέχρι πρόσφατα, οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους οι οργανισμοί λειτουργούν σε αυτή την τέταρτη διάσταση, τον χρόνο, παραμένουν άγνωστοι. Παρόλα αυτά, εδώ και περισσότερα από 30 χρόνια, οι προσεγγίσεις της μοριακής γενετικής αποκάλυψαν τη μοριακή βάση του κυτταρικού κιρκάδιου ρολογιού (McClung, 2009).

Τα κιρκάδια ρολόγια έχουν βρεθεί από τα κυανοβακτήρια μέχρι τον άνθρωπο και ρυθμίζουν τη συμπεριφορά, τη φυσιολογία και τη βιοχημεία αυτών των οργανισμών. Μελέτες έδειξαν ότι ο μοριακός μηχανισμός του ρολογιού είναι συντηρημένος ακόμα και σε περιπτώσεις που συγκεκριμένα γονίδια δεν είναι. Αν και ο κεντρικός πυρήνας του μηχανισμού του ρολογιού αποτελείται από μια θηλιά αρνητικής ανατροφοδότησης, σχετικά πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι για να παραχθεί ένα κιρκάδιο ρολόι, χρησιμοποιούνται διαφορετικά επίπεδα ρύθμισης. Για παράδειγμα, το ρολόι στη *Drosophila* και στα σπονδυλωτά, βασίζεται στη μεταγραφική ενεργοποίηση και στην καταστολή κεντρικών γονιδίων του ρολογιού. Σήμερα είναι σαφές ότι τα πρωτεϊνικά προϊόντα αυτών των γονιδίων ελέγχονται όχι μόνο σε μεταγραφικό επίπεδο, αλλά και σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο, με φωσφορύλιωση, με αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, με ενδοκυτταρικό εντοπισμό και με αποικοδόμηση, γεγονότα που ρυθμίζονται και τα ίδια ρυθμικά (Baggs and Green, 2003).

## Χαρακτηριστικά Κιρκάδιου Ρυθμού

Οι κιρκάδιοι ρυθμοί αποτελούν το υποσύνολο των βιολογικών ρυθμών και έχουν περίοδο που ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί ένας κύκλος 24 ωρών. Αυτό το χαρακτηριστικό τους, ενέπνευσε τον Franz Halberg το 1959 να δημιουργήσει τον όρο "circadian" (κιρκάδιος) από τις λατινικές λέξεις "circa" (κύκλος) και "dies" (ημέρα). Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό των κιρκάδιων ρυθμών είναι ότι παράγονται ενδογενώς και ότι είναι αυτό-συντηρούμενοι με αποτέλεσμα να αντέχουν σε συνεχείς περιβαλλοντικές συνθήκες όπως σε συνεχές φως ή σκοτάδι και σε συνεχή θερμοκρασία. Κάτω από αυτές τις ελεγχόμενες συνθήκες, ο οργανισμός στερείται εξωτερικά χρονικά ερεθίσματα και παρατηρείται απώλεια συγχρονισμού με τον 24ωρο κύκλο. Ένα τρίτο χαρακτηριστικό όλων των κιρκάδιων ρυθμών είναι ότι η περίοδος παραμένει σχετικά σταθερή σε μια κλίμακα περιβαλλοντικών θερμοκρασιών (Pittendrigh, 1954). Σύμφωνα με το τελευταίο, το ρολόι δεν επηρεάζεται από τις μεταβολές στον κυτταρικό μεταβολισμό.

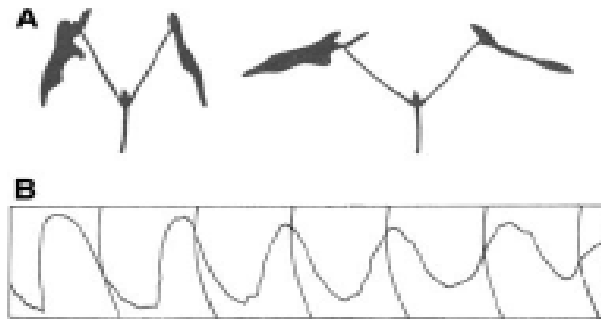
Ένας οργανισμός στερείται τα περιβαλλοντικά χρονικά ερεθίσματα, όπως οι κύκλοι φωτός/σκοτούς και οι κύκλοι θερμοκρασίας, που προκύπτουν από την εναλλαγή ημέρας σε νύχτα, μόνο σε περιπτώσεις όπως στο εργαστήριο. Αυτά τα περιβαλλοντικά χρονικά ερεθίσματα που ονομάζονται χρονοθέτες (απόδοση του γερμανικού όρου *zeitgeber*: *zeit*=χρόνος, *geber*=δότης) συγχρονίζουν το ενδογενές σύστημα χρόνου με μια περίοδο 24 ωρών, ανταποκρινόμενοι στην εξωγενή περίοδο της περιστροφής της Γης. Κατά τη διάρκεια της ημέρας παράγονται ερεθίσματα, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν την επανεκκίνηση του ρολογιού. Ένας παλμός φωτός πριν από την αυγή θα προχωρήσει τη φάση του ρολογιού, όμως ο ίδιος παλμός φωτός μετά το σούρουπο θα την καθυστερήσει. Αν ο ίδιος παλμός φωτός δοθεί το μεσημέρι τότε δεν θα έχει κανένα απολύτως αποτέλεσμα. Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι το ρολόι λειτουργεί με την δική του ευαισθησία απέναντι στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (McClung, 2009).

## Η ιστορία της μελέτης του ρολογιού στα φυτά

Τα πρώτα γραπτά που αναφέρονται σε ημερήσιους ρυθμούς προέρχονται από τον 4<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. Ο Ανδροσθένης περιέγραψε την καθημερινή κίνηση των φύλλων του δέντρου *Tamarindus indicus*, στο νησί Τήλος, στον Περσικό κόλπο, κατά τη διάρκεια της εκστρατείας του Μ. Αλεξάνδρου (Bretzi, 1903). Δεν αναφέρεται ότι η προέλευση αυτών των ρυθμών είναι ενδογενής και πέρασαν πάνω από δύο χιλιετίες ώστε αυτό να δοκιμαστεί πειραματικά. Η βιβλιογραφία για τους κιρκάδιους ρυθμούς ξεκίνησε το 1729, όταν ο Γάλλος αστρονόμος de Marain ανέφερε ότι η καθημερινή κίνηση των φύλλων του φυτού ηλιοτρόπιο (πιθανόν το *Mimosa pudica*) έμενε σταθερή στο συνεχές σκοτάδι, δηλώνοντας την ενδογενή της προέλευση (de Marain, 1729). Πέρασαν τριάντα χρόνια μέχρι να επαναληφθούν οι παρατηρήσεις του de Marain (Hill, 1757; Duhamel duMonceau, 1759; Zinn, 1759). Οι μελέτες αυτές, απέκλεισαν τη θερμοκρασία σαν ένα πιθανό χρονοθέτη *zeitgeber* που οδηγεί στη ρυθμική κίνηση των φύλλων.

Πέρασε περίπου ένας αιώνας μέχρι να μετρηθούν με ακρίβεια οι κινήσεις των φύλλων ώσπου διαπιστώθηκε ότι οι ρυθμοί αυτοί ήταν 24ωρών, δηλαδή κιρκάδιοι, προτείνοντας ότι ήταν ενδογενείς και όχι αποκρίσεις στα περιβαλλοντικά χρονικά ερεθίσματα. Ο de Candolle (1832) ισχυρίστηκε ότι η περίοδος του *M. pudica* δεν συγχρονίζεται με τον 24ωρο κύκλο της φύσης αφού διαρκούσε 22 με 23 ώρες. Επιπλέον έδειξε ότι ο ρυθμός μπορούσε να αντιστραφεί, μεταβάλλοντας την

εναλλαγή φωτός/σκότους. Κάποιοι συγγραφείς επανέλαβαν και επέκτειναν αυτές τις παρατηρήσεις κατά τον 19<sup>ο</sup> και στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, μελετώντας πάντα την κίνηση των φύλλων των φυτών, που αποτελούσε το μοναδικό γνωστό κινκάρδιο ρυθμό (Εικόνα 1). Οι κινκάρδιοι ρυθμοί στα ζώα περιγράφηκαν πολύ αργότερα, σε αρθρώποδα (Kiesel, 1894) και σε αρουραίους (Richter, 1922).



**Εικόνα 1.**

**A.** Κινήσεις των φύλλων του φυτού *Phaseolus coccineus*. Η θέση των φύλλων ενός σπορόφυτου τη νύχτα (αριστερά) και κατά τη διάρκεια της μέρας (δεξιά).

**B.** Κινκάρδιος ρυθμός της κίνησης των φύλλων του *P. coccineus* συγχρονισμένος με κύκλους φωτός/σκότους. Οι κορυφές αντιστοιχούν στην κίνηση των φύλλων κατά τη διάρκεια της νύχτας και οι κάθετες γραμμές υποδηλώνουν τα διαστήματα του 24ωρου.

(McClung, 2009)

Το γεγονός ότι οι κινκάρδιοι ρυθμοί, στην κίνηση των φύλλων, ήταν ενδογενείς αμφισβητήθηκε. Ο Pfeffer (1873) για παράδειγμα, υποψιάστηκε ότι το φως που "γλιστράει" μέσα σε σκοτεινά δωμάτια επεμβαίνει σε αυτές τις μελέτες, ματαιώνοντας τις προσπάθειες να παραχθούν συνεχείς συνθήκες και ακυρώνει τους ισχυρισμούς ότι οι ρυθμοί αυτοί έχουν ενδογενή προέλευση. Το ότι οι ρυθμοί ήταν κινκάρδιοι και όχι ακριβώς 24ωροι ήταν ένα πολύ σημαντικό σημείο, γιατί αποτελούσε την καλύτερη απόδειξη, μέχρι που έγιναν πειράματα στο μύκητα *Neurospora crassa* (Sulzman et al., 1984), ότι ήταν πράγματι ενδογενείς και δεν οδηγούνταν από κάποιο λεπτό και μη ανιχνεύσιμο γεωφυσικό ερέθισμα που συνδέεται με την περιστροφή της Γης γύρω από τον άξονά της.

Ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό του κινκάρδιου ρυθμού είναι η εξισορρόπηση της θερμοκρασίας και πέρασε αρκετός καιρός ώσπου να εκτιμηθεί αυτό το χαρακτηριστικό. Η λογική της μελέτης της εξάρτησης του μήκους της περιόδου από τη θερμοκρασία προκύπτει από την προσδοκία ότι ο μηχανισμός του ρολογιού βασίζεται στην εναλλαγή των χημικών διεργασιών. Οπότε, προβλέφθηκε ότι το ρολόι θα πρέπει να εξαρτάται από τη θερμοκρασία όπως και οι χημικές διεργασίες. Μέχρι το 1960 οι παρατηρήσεις αυτές, επεκτάθηκαν σε πολλά άλλα φυτά αλλά και σε ζώα (Sweeney and Hastings, 1960). Το ότι τα ρολόγια δεν ήταν ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία, αλλά παρουσίαζαν μία λιγότερο αναμενόμενη εξάρτηση από αυτήν, υποστήριζε σθεναρά την ιδέα ενός μηχανισμού εξισορρόπησης θερμοκρασίας που ήταν ατελής. Ένας τέτοιος μηχανισμός μπορούσε να μεταβάλλει το μήκος της περιόδου ανάλογα με τη θερμοκρασία.

Το 1880, οι Charles και Francis Darwin πρότειναν την κληρονομησιμότητα των κιρκάδιων ρυθμών (Darwin and Darwin, 1880). Αυτό μελετήθηκε αρχικά, κατά τη δεκαετία του 1930 με δύο στρατηγικές. Στην πρώτη, φυτά και ζώα μεγάλωσαν σε συνεχείς συνθήκες για πολλαπλές γενεές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι φρουτόμυγες που διατήρησαν σταθερούς ρυθμούς για 700 γενεές εκτρεφόμενες σε συνεχείς συνθήκες (reviewed in Johnson, 2005). Στη δεύτερη, σπορόφυτα ή ζώα εκτέθηκαν σε κύκλους που διέφεραν από τον 24ωρο, ώστε να μεταβληθεί το μήκος της περιόδου κατά τη διάρκεια των νέων αυτών κύκλων. Όμως μετά την απελευθέρωσή τους σε συνεχείς συνθήκες, αποκαταστάθηκε η ενδογενής κιρκάδια περίοδος (Bünning, 1973). Η κληρονόμηση του μήκους της περιόδου στους απογόνους, που προέκυψαν από διασταύρωση γονέων με διακριτά μήκη περιόδου, αναφέρθηκε πρώτα στο *Phaseolus*. Τα υβρίδια είχαν μήκος περιόδου ενδιάμεσο των γονέων (Bünning, 1932, 1935).

Η ανάλυση με τη βοήθεια της προωθητικής γενετικής για την ταυτοποίηση συστατικών του κιρκάδιου ρολογιού ξεκίνησε τη δεκαετία του 1970. Αν και σήμερα είναι δεδομένο ότι τα κιρκάδια ρολόγια συντίθενται από προϊόντα γονιδίων, το γεγονός αυτό αποτέλεσε την πηγή ιδιαίτερης διαμάχης. Το ότι οι προσπάθειες της προωθητικής γενετικής θα ήταν άκαρπες αμφισβητήθηκε, γιατί τα ρολόγια ήταν αρκετά πολύπλοκα για να επιδείξουν πολυγονιδιακή κληρονομησιμότητα (Bünning, 1935) και δεν υποκύπτουν εύκολα σε γενετικές προσεγγίσεις. Παρόλα αυτά, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν μεταλλάξεις με μεταβαλλόμενο μήκος περιόδου στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster* (Kanopka and Benzer, 1971), στο φύκος *Chlamydomonas reinhardtii* (Bruce, 1972) και στο μύκητα *Neurospora crassa* (Feldman and Hoyle, 1973). Πέρασε πάνω από μια δεκαετία μέχρι να κλωνοποιηθεί το πρώτο γονίδιο του ρολογιού, το γονίδιο period (per) στη *Drosophila* (Bargiello and Young, 1984; Zehring et al., 1984) και πέντε χρόνια μέχρι να κλωνοποιηθεί το δεύτερο, το γονίδιο frequency στο *Neurospora* (McClung et al., 1989).

Στα φυτά διαπιστώθηκε ότι ο ρυθμός της κίνησης των φύλλων ήταν μόνο ένας ανάμεσα στους πολλούς ρυθμούς, συμπεριλαμβανομένης της γονιμοποίησης, της ανάπτυξης, της ενζυμικής ενεργότητας, της κίνησης των στομάτων, της φωτοσύνθεσης, της εκπομπής αρώματος και του ανοίγματος των άνθεων (Comming and Wagner, 1968). Πραγματοποιήθηκαν δύο κρίσιμες ανακαλύψεις, πρώτος ο Kloppstech (1985), περιέγραψε στο φασόλι έναν κιρκάδιο ρυθμό τριών μεταγράφων, που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA. Αυτή η παρατήρηση αντιγράφηκε και επεκτάθηκε στο σιτάρι. Όμως τόσο το φασόλι, όσο και το σιτάρι, δεν ήταν κατάλληλα για κατευθυνόμενη κλωνοποίηση γονιδίου ενώ το *Arabidopsis Thaliana* προέκυπτε σαν ένα ισχυρό σύστημα στο οποίο μπορεί να συνδυαστεί ανάλυση με προωθητική γενετική με τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης γονιδίου (Somerville and Koornneef, 2002). Σύντομα αποδείχθηκε ότι ένας αριθμός γονιδίων του *Arabidopsis Thaliana* υπόκειται σε κιρκάδιο έλεγχο (McClung and Kay, 1994) (McClung, 2009).



**Το φυτό *Arabidopsis Thaliana* εμφανίζει πολλούς κιρκάδιους ρυθμούς**

Όπως πολλά φυτά, έτσι και το *Arabidopsis*, εμφανίζει ρυθμική κίνηση της κοτυληδόνας και του φύλλου καθώς και κιρκάδιο ρυθμό στην επιμήκυνση του υποκοτυλίου (Dowson-Day and Millar, 1999) και του ανθώδους μέρους του βλαστού (Jouve et al., 1998). Ο έλεγχος της μεταγραφής από το κιρκάδιο ρολόι είναι διαδεδομένος (Dunlap, 1999) και η λίστα των γονιδίων του φυτού που ελέγχονται από αυτό είναι μεγάλη (**Πίνακας 1**). Ανάλυση με μικροσυστοιχίες έδειξε ότι περίπου το 10% του συνόλου των γονιδίων του *Arabidopsis* ρυθμίζεται στο επίπεδο του mRNA και έχουν ανιχνευθεί πολλά μεταβολικά μονοπάτια που ρυθμίζονται κιρκάδια (Harmer et al., 2000; Schaffer et al., 2001). Τα μετάγραφα που ρυθμίζονται κιρκάδια έχουν μικρό χρόνο ημιζωής (Gutierrez et al., 2002). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι πάνω από το 35% του μεταγραφωσώματος μπορεί να ρυθμιστεί κιρκάδια (Michael and McClung, 2003).

Αν και η μελέτη του κιρκάδιου ρυθμού έχει εστιαστεί σε συνεχείς συνθήκες, είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι τα φυτά στη φύση αναπτύσσονται σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Σε φυτά που αναπτύσσονται με ημερήσιους κύκλους, γίνεται μία σημαντική αλληλεπίδραση με το μεταβολισμό των σακχάρων που επηρεάζει σημαντικά την περιοδική γονιδιακή έκφραση (Bläsing et al., 2005). Επιπρόσθετα, σχετικά πρόσφατα δεδομένα διασαφηνίζουν ότι το κιρκάδιο ρολόι διαμορφώνει την ικανότητα απόκρισης σε αβιοτικό στρες, όπως το κρύο (Fowler et al., 2005) (McClung, 2009).

**Πίνακας 1.**

Γνωστά γονίδια του κιρκάδιου ρολογιού στο *Arabidopsis thaliana*. (McClung, 2009)

Circadian Clock Phenotype				
Gene	Locus ID	Function	Loss-of-Function	Overexpression
<i>CCA1</i>	At2g46830	Single Myb domain transcription factor	Short period	Arrhythmic
<i>CKB3</i>	At3g60250	Casein kinase II regulatory subunit	Not known (gene family)	Short period
<i>CRY1</i>	At4g08920	Blue light photoreceptor	Long period in blue light	Short period in blue light
<i>CRY2</i>	At1g04400	Blue light photoreceptor	Long period in blue light	Short period in blue light
<i>DET1</i>	At4g10180	Repressor of photomorphogenesis	Short period	Not known
<i>ELF3</i>	At2g25930	Unknown	Arrhythmic in continuous light	Long period
<i>ELF4</i>	At2g40080	Unknown	Arrhythmic	Not known
<i>GI</i>	At1g22770	Unknown	Short period, low amplitude	Short period, low amplitude
<i>LHY</i>	At1g01060	Single Myb domain transcription factor	Short period	Arrhythmic
<i>LUX</i>	At3g46640	Myb transcription factor	Arrhythmic	Arrhythmic

**Πίνακας 1, συνέχεια**

<i>PHYA</i>	At1g09570	Red light photoreceptor	Long period in far-red light	Short period in far-red light
<i>PHYB</i>	At2g18790	Red light photoreceptor	Long period in red light, leading phase in white light	Short period in red light, lagging phase in white light
<i>PIF3</i>	At1g09530	Basic helix-loop-helix transcription factor	Wild type	Wild type
<i>PRR3</i>	At5g60100	Pseudo-response regulator	Short period	Wild type
<i>PRR5</i>	At5g24470	Pseudo-response regulator	Short period	Low amplitude, long period
<i>PRR7</i>	At5g02810	Pseudo-response regulator	Long period	Not known
<i>PRR9</i>	At2g46790	Pseudo-response regulator	Long period	Short period
<i>SRR1</i>	At5g59560	Unknown	Leading phase, low amplitude	Not known
<i>TIC</i>		Gene not yet identified	Short period, low amplitude	Not known
<i>TOC1</i>	At5g61380	Pseudo-response regulator	Short period	Arrhythmic
<i>ZTL</i>	At5g57360	F-box protein	Long period	Arrhythmic

### Το κερκάδιο ρολόι στο *Arabidopsis thaliana*

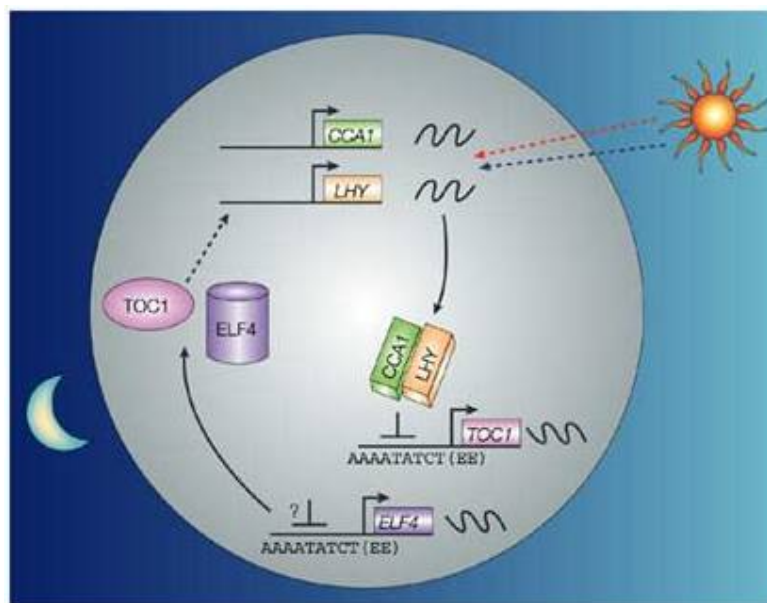
Πολλοί οργανισμοί διαθέτουν κερκάδια ρολόγια, τα οποία ρυθμίζουν τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά τους. Το ευκαρυωτικό ρολόι περιλαμβάνει θηλιές ανατροφοδότησης, για τη γονιδιακή έκφραση, με αρνητικά και θετικά στοιχεία και κυτταροπλασματικά σηματοδοτικά μόρια. Στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis*, ο μηχανισμός του ρολογιού θεωρείται ότι περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις θηλιές ανατροφοδότησης: την κεντρική θηλιά (central loop), τη θηλιά που είναι συγχρονισμένη με το πρωί (morning-phased loop) και τη θηλιά που είναι συγχρονισμένη με το βράδυ (evening-phased loop) (James et al., 2008).

Πρόσφατα προτάθηκε ότι η θηλιά ανατροφοδότησης, η οποία είναι κρίσιμη για την κερκάδια ρυθμικότητα στο *Arabidopsis* (η κεντρική θηλιά), βασίζεται στην αλληλεπίδραση του *TOC1* (TIMING OF CAB EXPRESSION 1), του *LHY* (LATE ELONGATED HYPOCOTYL) και του *CCA1* (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1) (Εικόνα 2). Οι *CCA1* και *LHY* είναι δύο μεταγραφικοί παράγοντες, σχετικοί με την *MYB* οικογένεια, των οποίων τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης εμφανίζουν μέγιστο την αυγή. Η υπερέκφραση του *CCA1* ή του *LHY* από έναν ιδιοσύστατο υποκινητή έχει ως αποτέλεσμα ο ένας παράγοντας να ρυθμίζει καθοδικά τον άλλο, πράγμα που οδηγεί σε αρρυθμία. Το παραπάνω φανερώνει πως οι παράγοντες αυτοί αποτελούν συστατικά μιας θηλιάς αρνητικής ανατροφοδότησης, που είναι απαραίτητη για την παραγωγή και τη διατήρηση των κερκάδιων ρυθμών.

Το *TOC1* κωδικοποιεί για έναν ρυθμιστή (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR), του οποίου η έκφραση έχει μέγιστο το σούρουπο. Μεταλλάξεις στο *TOC1* μικραίνουν την περίοδο όλων των κερκάδιων ρυθμών που έχουν ελεγχθεί μέχρι τώρα.

Επιπρόσθετα, αύξηση στη δόση του TOC1 μεγαλώνει την περίοδο των κερκάδιων ταλαντωτών ενώ η υπερέκφρασή του από έναν ιδιοσύστατο υποκινητή προκαλεί αρρυθμία. Ο TOC1 έχει αρκετά μοτίβα που δείχνουν ότι συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση και, πράγματι, τα επίπεδα του mRNA των παραγόντων CCA1 και LHY μειώνονται στο μετάλλαγμα *toc1-2* (που είναι πιθανόν αλληλόμορφο με μηδενική μετάλλαξη). Η έκφραση του *CCA1* μειώνεται αξιοσημείωτα στο μετάλλαγμα *elf4*, το οποίο δεν εμφανίζει ρυθμικότητα τόσο στο συνεχές φως όσο και στο συνεχές σκοτάδι. Το ELF4 (early flowering 4) δεν εμφανίζει ομολογία με πρωτεΐνες γνωστής λειτουργίας αλλά η έκφρασή του είναι κυκλική με φάση που είναι παρόμοια με αυτή του TOC1, πράγμα που δείχνει ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορεί να λειτουργούν μαζί για να προωθήσουν την έκφραση του CCA1 και του LHY. Το CCA1 και το LHY ρυθμίζουν καθοδικά την ίδια τους την έκφραση, καταστέλλοντας την έκφραση του *TOC1*. Αυτό συμβαίνει μέσω της πρόσδεσής τους σε ένα στοιχείο 9 νουκλεοτιδίων που βρίσκεται στον υποκινητή του *TOC1* (AAATATCT), το οποίο είναι κρίσιμο για την κερκάδια ρύθμιση.

Το στοιχείο που αναγνωρίζουν οι παράγοντες CCA1 και LHY στον υποκινητή του *TOC1* υπάρχει σε μια ομάδα γονιδίων συγχρονισμένων με το βράδυ (evening-phased) και είναι γνωστό ως evening-element (EE). Επιπλέον, τα EE είναι πανομοιότυπα με την αλληλουχία που αναγνωρίζει ο CCA1 στον υποκινητή του γονιδίου *LIGHT HARVESTING CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1* (AAAAATCT), ένα γονίδιο που ρυθμίζεται από το ρολόι και η έκφραση του οποίου παρουσιάζει μέγιστο το πρωί. Πέραν του ότι ο CCA1 και ο LHY είναι μέλη μιας θηλιάς ανατροφοδότησης για την κερκάδια ρυθμικότητα, πιθανόν λειτουργούν για να καταστείλουν την έκφραση αρκετών γονιδίων που είναι συγχρονισμένα με το βράδυ και για να προωθήσουν την έκφραση γονιδίων που είναι συγχρονισμένα με το πρωί, παρέχοντας ένα μηχανισμό που συνδέει τον κερκάδιο ταλαντωτή με πολλές βιοχημικές και φυσιολογικές διεργασίες. Τα κερκάδια ρολόγια, από τα φυτά μέχρι τα θηλαστικά, ρυθμίζουν τις μεταβολικές και αναπτυξιακές δραστηριότητες, ελέγχοντας την έκφραση ρυθμιστικών γονιδίων-κλειδιών (Yanovsky and Kay, 2003).



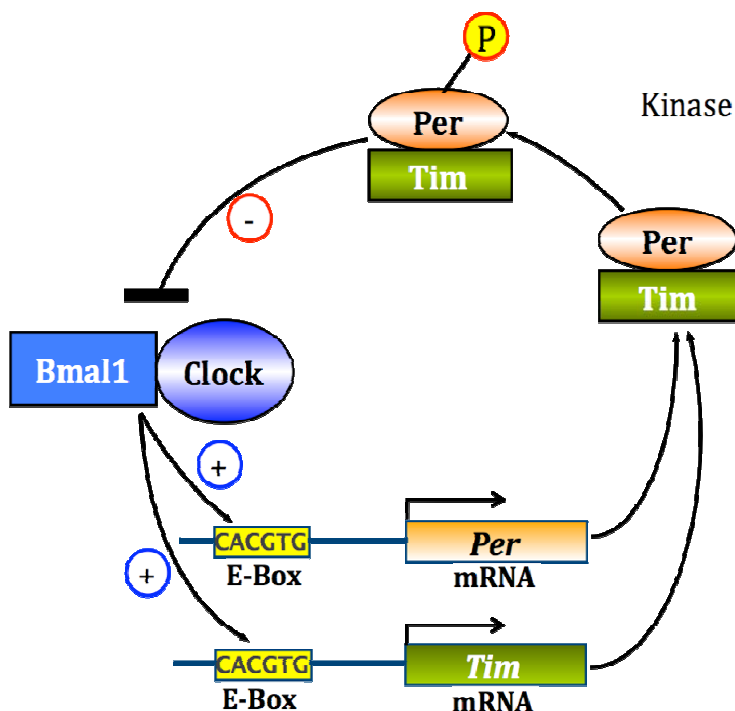
**Εικόνα 2.**

Μοριακές αλληλεπιδράσεις που διαμορφώνουν το κερκάδιο ταλαντωτή του φυτού. (Yanovsky and Kay, 2003)

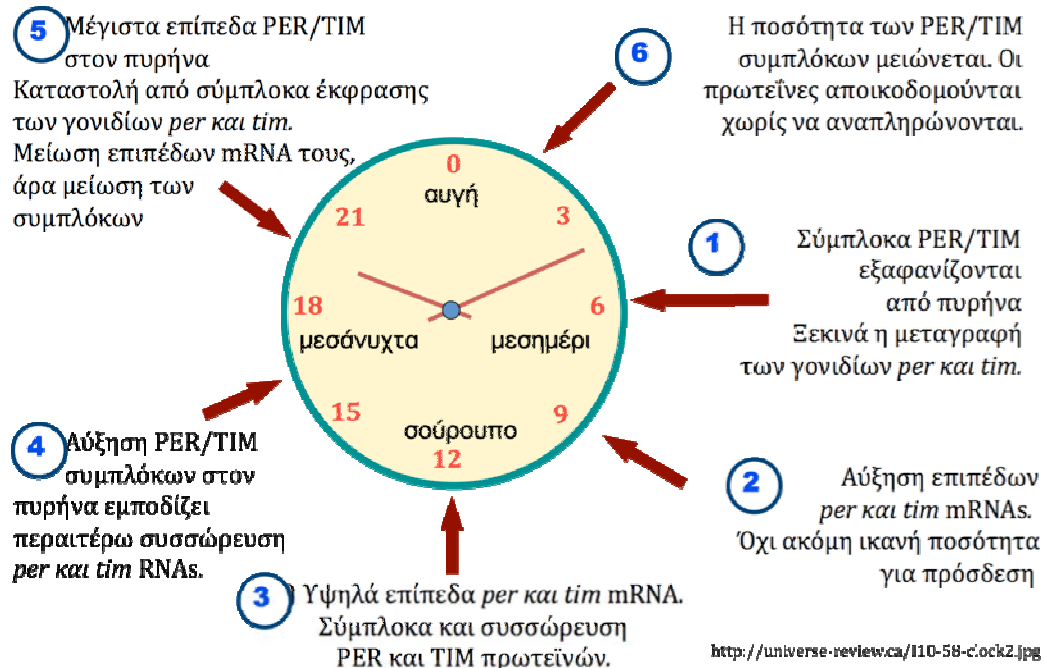
Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη *Drosophila* αποκάλυψαν έναν ανάλογο μηχανισμό με αυτόν στο *Arabidopsis*. Τα γονίδια της *Drosophila* που φαίνεται να είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του κερκάδιου ρολογιού είναι το *PERIOD* (*PER*), το *TIMELESS* (*TIM*), το *BMAL1* (*CYCLE*), το *CLOCK*, το *CRYPTOCHROME* (*CRY*) και το *DOUBLETIME* (*DBT*). Τα γονίδια *CLOCK* και *BMAL1* κωδικοποιούν για δύο βασικούς έλικας-θηλιάς-έλικας (bHLH)-PAS μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι σχηματίζουν το ετεροδιμερές CLOCK-BMAL1 μέσα στον πυρήνα και προσδένονται σε στοιχεία E-box στους υποκινητές των γονιδίων του ρολογιού ενεργοποιώντας την έκφρασή τους. Τέτοια γονίδια είναι το *PER* και το *TIM*. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών σχηματίζουν το διμερές PER-TIM στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια εισέρχονται στον πυρήνα όπου και καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση (Εικόνα 3). Επιπλέον, στη μύγα, το *CRY* λειτουργεί κυρίως σαν φωτουπόδοχέας, προσδένει το ετεροδιμερές PER-TIM, με τρόπο εξαρτώμενο από το φως, διαμεσολαβώντας στην εξαρτώμενη από το φως αποικοδόμηση του TIM.

Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν μελέτες στη *Drosophila* που αφορούν τη μετά-μεταγραφική και μετά-μεταφραστική ρύθμιση των στοιχείων του κερκάδιου ρολογιού. Προτάθηκαν μοντέλα που προβλέπουν ότι η αποικοδόμηση των mRNAs και των πρωτεϊνών του ρολογιού είναι κρίσιμη στον έλεγχο της περιοδικότητας. Για παράδειγμα, ο βαθμός στον οποίο καταστέλλεται η γονιδιακή έκφραση από το ετεροδιμερές PER-TIM μπορεί να ρυθμιστεί μέσω της σταθερότητας του PER και του TIM. Το γονίδιο *DBT* κωδικοποιεί για μία κινάση που μειώνει τη σταθερότητα του μονομερούς PER φωσφορυλιώνοντάς το. Μύγες με απενεργοποιημένο το γονίδιο *DBT* συσσωρεύουν υποφωσφορυλιωμένο PER (Εικόνα 4) (Cermakian and Sassone-Corsi, 2000).

Από τα παραπάνω φαίνεται πως η ρύθμιση της έκφρασης των mRNAs των TIM και PER, καθορίζεται από το χρόνο της ζωής τους, και κατ'έκταση από τη ρύθμιση της αποικοδόμησης των mRNAs αυτών (βλ. παρακάτω, Αποικοδόμηση mRNA).



Εικόνα 3. Μοριακός μηχανισμός του κερκάδιου ρολογιού στη *Drosophila*.



**Εικόνα 4.**

Μεταβολή της έκφρασης των *PER* και *TIM* κατά τη διάρκεια της ημέρας.

### Αποικοδόμηση mRNA

Η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης mRNA και στην αντιϊκή προστασία (Dykxhoorn et al., 2003; Maquat et al., 2000; Hoofvan et al., 1999). Αποτελεί το καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση των μορίων mRNA και την μεταφραστική αποσιώπηση, γεγονός που την καθιστά ιδανικό σημείο ελέγχου και των δύο διεργασιών.

Στον πυρήνα, με την διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι νεοπροστιθέμενες πολυ(A) ουρές, στο κατάλληλο μήκος. Οι πολυ(A) ουρές όταν είναι σε προκαθορισμένο σωστό μήκος είναι απαραίτητες για την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα και όταν αυτό φτάσει στο κυτταρόπλασμα του προσδίδουν σταθερότητα και έναυσμα για μετάφραση. Στο κυτταρόπλασμα, η εκτεταμένη αποαδενυλίωση του mRNA, πέρα από ένα συγκεκριμένο μήκος, σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του.

Η αποικοδόμηση του mRNA ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του (αποαδενυλίωση) από διάφορα ένζυμα, γνωστά ως αποαδενυλάσες (βλ. παρακάτω: § Αποαδενυλάσες-Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος δραστηριότητάς τους) (Tucker et al., 2000; Mitchell et al., 2001). Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) αφαιρεί το κάλυμμα, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xpn1p, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, μετά την αποαδενυλίωση, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών (Μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από την αποαδενυλίωση) (Garneau et al., 2004; Anderson et al., 1998; Chen et al., 2001; Wang and Kiledjian, 2001; Mukherjee et al., 2002). Στην περίπτωση αυτή το

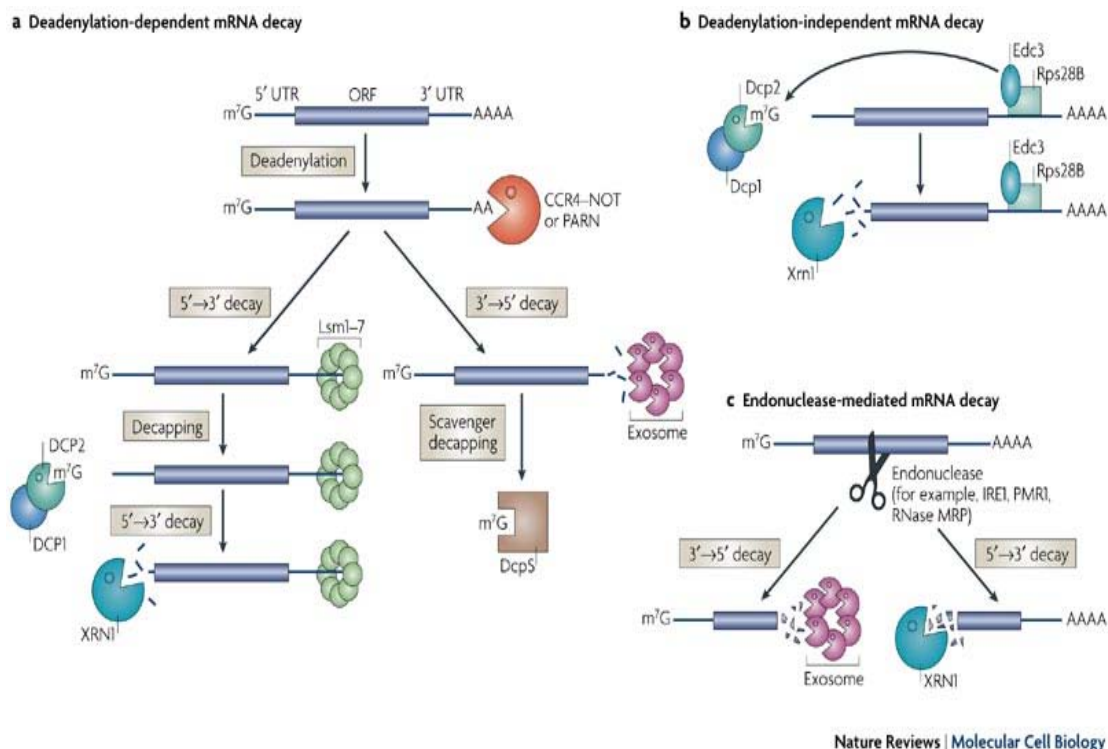
κάλυμμα υδρολύεται από το DcpS (Liu et al., 2002) (**Εικόνα 5a**). Τα 2 κυριότερα μονοπάτια αποικοδόμησης του ευκαρυωτικού mRNA και οι πρωτεϊνικοί παράγοντες που εμπλέκονται σ' αυτά συνοψίζονται στον **Πίνακα 2** (Meyer et al., 2004).

### Πίνακας 2.

Τα δύο κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης των ευκαρυωτικών mRNAs και οι κυριότεροι παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτά (ενισχυτές και αναστολείς). (Meyer et al., 2004).

Reaction	Enzymes		Effectors
	Yeast	Mammals	
<b>I</b> deadenylation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pan2p/Pan3p</li> <li>• CCR4-NOT complex</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pan2/Pan3</li> <li>• CCR4-NOT complex</li> <li>• PARN</li> </ul>	PABPC PABPC cap
<b>IIa</b> decapping	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dcp1p/Dcp2p</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dcp1/Dep2</li> </ul>	Edc1p; Edc2p; Edc3p; Pat1p; Lsm1-7; Dhh1p; PABPC
<b>IIb</b> cap hydrolysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dcs1p</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DepS</li> </ul>	
<b>III</b> 5'-3' exonucleolytic decay	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Xrn1p</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Xrn1</li> </ul>	
<b>IV</b> 3'-5' exonucleolytic decay	<ul style="list-style-type: none"> <li>• exosome</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• exosome</li> </ul>	Ski2p; Ski3p; Ski7p; Ski8p

Υπάρχει βέβαια και το μονοπάτι αποικοδόμησης το οποίο είναι ανεξάρτητο της αποδενυλίωσης στον *S. cerevisiae*, όπου είναι απαραίτητη η στρατολόγηση της πρωτεϊνικής μηχανής απομάκρυνσης του καλύμματος (**Εικόνα 5b**). Ωστόσο η αποικοδόμηση ορισμένων μορίων mRNA μπορεί να ξεκινήσει με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες είτε από το μηχανισμό του RNAi (Μονοπάτι αποικοδόμησης διαμεσολαβούμενο από ενδονουκλεάσες) (Dodson et al., 2002). Στο μονοπάτι αυτό μετά τη δράση των ενδονουκλεασών παράγονται δύο θραύσματα με απροστάτευτα άκρα, τα οποία και αποικοδομούνται στη συνέχεια με τη δράση του εξωσώματος και της Xrn1p (**Εικόνα 5c**). Επίσης, τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν ταχύτατα ανώμαλα mRNAs χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν φυσιολογικά mRNAs.



**Εικόνα 5.**

Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA. (Goldstrohm and Wickens, 2008)

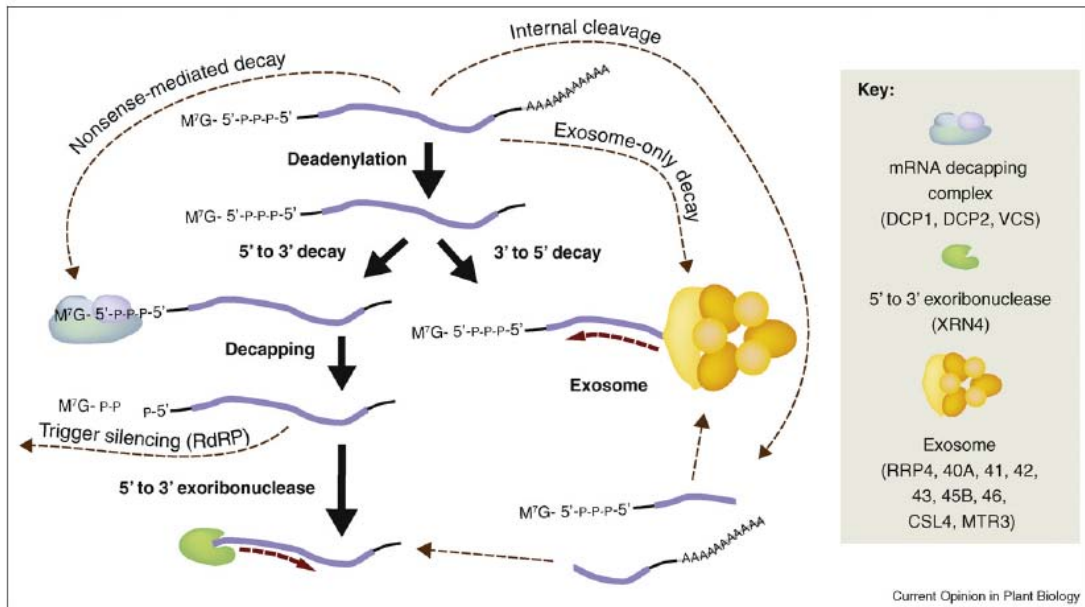
### Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA στο φυτικό κύτταρο

Όπως αναφέρθηκε, η αποικοδόμηση του mRNA στο κυτταρόπλασμα, ξεκινά με την αποαδενυλίωση, τη βράχυνση ή την πλήρη αφαίρεση της πολυ(A)-ουράς (**Εικόνα 6**). Αρκετά βιοχημικά σύμπλοκα που πραγματοποιούν αποαδενυλίωση (βλ. επόμενη §) στα ζώα και στα φύκη, είναι συντηρημένα και στα φυτά: η πολυ(A) ριβονουκλεάση PARN (βλ. παρακάτω), το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4/CAF1 και η πολυ(A) νουκλεάση PAN (**Πίνακας 3**). Για να πραγματοποιηθεί η αποαδενυλίωση απαιτούνται τόσο η δράση της PARN όσο και η δράση του συμπλόκου CCR4/CAF1. Κάθε σύμπλοκο στοχεύει εξειδικευμένα υποστρώματα mRNAs, όμως παραμένει άγνωστος ο βαθμός εξειδίκευσης των αποαδενυλασών καθώς και το πώς επιτυγχάνεται αυτή η εξειδίκευση.

Το εξώσωμα αποτελεί την μεγαλύτερη πηγή της εξωνουκλεολυτικής δραστηριότητας, με φορά 3'→5', στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Είναι ένας πολύπλευρος μακρομοριακός μηχανισμός που μπορεί πρώτον, να επεξεργαστεί μερικώς το RNA ή δεύτερον, να αποικοδομήσει πλήρως το RNA ή τρίτον, να πραγματοποιήσει ποιοτικό έλεγχο του RNA. Το τελευταίο σημαίνει ότι αποικοδομεί επιλεκτικά μόνο τα ελαττωματικά μόρια RNA, για παράδειγμα tRNA που δεν έχει αναδιπλωθεί σωστά. Η αποαδενυλίωση συμβαίνει πριν από την αποικοδόμηση του mRNA από το εξώσωμα.

Το αποαδενυλιωμένο mRNA μπορεί να υποστεί και αποικοδόμηση κατά τη φορά 5'→3' όμως πρώτα απαιτείται η απομάκρυνση της καλύπτρας στο 5' άκρο του mRNA. Η απομάκρυνση της καλύπτρας πραγματοποιείται από το σύμπλοκο απομάκρυνσης της καλύπτρας (decapping). Τα κύρια συστατικά του συμπλόκου, οι

παράγοντες DCP1 και DCP2, είναι συντηρημένοι στα φυτά. Ένα τρίτο συστατικό του συμπλόκου απομάκρυνσης της καλύπτρας είναι ο παράγοντας VARICOSE (VCS)/HEDLS, ο οποίος πρωτοχαρακτήριστηκε στα φυτά. Το ομόλογο στα θηλαστικά, που ονομάζεται HEDLS, εμπλέκεται στην απομάκρυνση της καλύπτρας του mRNA και λειτουργεί ως μοριακή σκαλωσιά για τα μόρια DCP1 και DCP2. Έτσι, τα σύμπλοκα απομάκρυνσης της καλύπτρας στα φυτά και στα ζώα, φαίνεται να είναι όμοια μεταξύ τους, (στο *Arabidopsis* τα VCS, DCP2 και DCP1 αλληλεπιδρούν και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα) ενώ και τα δύο διαφέρουν από αυτό της ζύμης, το οποίο στερείται το ομόλογο VCS/HEDLS. Η απώλεια απομάκρυνσης της καλύπτρας επηρεάζει το ρυθμό αποικοδόμησης μόνο σε συγκεκριμένα υποστρώματα, υποδηλώνοντας ότι για κάποια mRNAs είναι προκαθορισμένο να απομακρυνθεί η καλύπτρα τους ενώ για κάποια άλλα όχι. Στα mRNAs των θηλαστικών το DCP2 αναγνωρίζει αλληλουχίες που έχουν χαρτογραφηθεί στην 5'-αμετάφραστη περιοχή. Μετά τη απομάκρυνση της καλύπτρας, το 5' μονοφωσφορυλιωμένο άκρο του RNA γίνεται ευάλωτο στην XRN4 εξωριβονουκλεάση (Belostotsky and Sieburth, 2009).



**Εικόνα 6.**

Μονοπάτια της αποικοδόμησης του mRNA στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου. (Belostotsky and Sieburth, 2009)



### Πίνακας 3.

Κυτταροπλασματικοί παράγοντες του *Arabidopsis Thaliana* που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του RNA. (Belostotsky and Sieburth, 2009)

Cytoplasmic RNA decay machinery – ( <i>Arabidopsis</i> ).	
Subunit name	Function
Poly(A) ribonuclease (PARN)	Deadenylation
CCR4/CAF1	Deadenylation
PAN-like	Deadenylation
RRP4	Exosome, S1 + KH domain
RRP40A	Exosome, S1 + KH domain
RRP40B	Exosome, S1 + KH domain
CSL4	Exosome, S1 + KH domain
RRP41	Exosome, RNase PH domain
RRP42	Exosome, RNase PH domain
RRP43	Exosome, RNase PH domain
RRP45A	Exosome, RNase PH domain
RRP45B	Exosome, RNase PH domain
RRP46	Exosome, RNase PH domain
MTR3	Exosome, RNase PH domain
RRP44A	Exosome, RNase II
RRP44B	Exosome, RNase II
RRP6A	RNase D
RRP6B	RNase D
RRP6C	RNase D
DCP2/TDT	Decapping enzyme
DCP1	Decapping subunit
VARICOSE	Scaffold for decapping complex assembly, P-body core
XRN4	5'-3' exoribonuclease
UPF1	Nonsense-mediated decay
UPF2	Nonsense-mediated decay
UPF3	Nonsense-mediated decay
SMG-7	Nonsense-mediated decay
UBP1	TIA1-like, stress granules
UBP47	TIA1-like, stress granules

### Αποαδενυλάσες-Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος δραστηριότητάς τους

Ως αποαδενυλάσες ορίζουμε τις εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολύ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας 5'-AMP. Καθημερινά ο αριθμός των ταυτοποιημένων αποαδενυλασών αυξάνει ως αποτέλεσμα βιοχημικών και γενετικών ερευνών. Οι αποαδενυλάσες εκδηλώνουν μια σαφή προτίμηση για 3'- πολυ(A) ως υπόστρωμα, παρά το γεγονός πως σε ορισμένες περιπτώσεις έχει δείχτεί ότι αποικοδομούν λιγότερο αποτελεσματικά και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες είναι Mg<sup>2+</sup>-εξαρτώμενα ένζυμα που μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο. Η DEDD υπερ-οικογένεια έχει λάβει το όνομά της από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης, τα οποία συντονίζουν τα ιόντα Mg<sup>2+</sup>. Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν η αποαδενυλάση POP2 (γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), καθώς και οι οικογένειες των PAN2 αποαδενυλασών. Από την άλλη μεριά η υπερ-οικογένεια των εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών (exonuclease-endonuclease-phosphatase, EEP), περιλαμβάνει αποαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Παραδείγματα EEP ενζύμων αποτελούν οι αποαδενυλάσες Nocturnin, CCR4 και Angel.

Κάθε είδος οργανισμού διαθέτει και διαφορετική γκάμα και αριθμό αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και Angel είναι παρόντα σε όλους τους ευκαρυώτες, ενώ άλλες αποαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες (π.χ. η *Drosophila melanogaster* στερείται τόσο της PARN όσο και της CAF1Z (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Η τεράστια ποικιλότητα και η ποικιλομορφία των αποαδενυλασών υποδηλώνει πως πιθανότατα συγκεκριμένες αποαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs επιτάσσοντας τον έλεγχο τους στη δραστηριότητα ενός μόνο ενζύμου. Από την άλλη, διαφορετικές αποαδενυλάσες μπορούν να δράσουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες.

Οι αποαδενυλάσες όπως αναφέρθηκε, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενική διαδικασία ανακύκλισης του mRNA. Επιτελούν όμως και αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς ρόλους. Κάποιες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάγματα άλλων επιφέρουν μια ποικιλία ενδιαφερόντων φαινοτύπων. Επιπλέον, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες είναι απαραίτητες για συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες, γεγονός που αποδεικνύει πως ο έλεγχος ορισμένων mRNAs είναι καθοριστικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία αυτών των διεργασιών (Goldstrohm and Wickens, 2008; Parke and Song, 2004). Για παράδειγμα, αρκετές αποαδενυλάσες, συμπεριλαμβανομένων της PARN του *Xenopus laevis* και της CCF-1 του *C. elegans*, είναι σημαντικές κατά την πρόωμη ανάπτυξη, ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα (όπως η CNOT7 στα ποντίκια) και τη μεταβολική ομοιόσταση (ποντίκια που στερούνται Nocturnin, λαμβάνουν λιγότερο σωματικό βάρος και λίπος σε σύγκριση με τα ποντίκια που τη διαθέτουν, κάτω από ίδιες συνθήκες διατροφής και συμπεριφοράς).

Η ρύθμιση της δραστηριότητας των αποαδενυλασών κρίνεται απαραίτητη, καθώς συνθήκες ανεξέλεγκτης αποαδενυλίωσης θα οδηγούσαν σε καταστροφή και θάνατο του κυττάρου. Σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNAs πρέπει να προστατευθούν από την αποαδενυλίωση ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να οδηγούνται στην αποικοδόμηση.

Ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNAs. Αυτή η διαδικασία ελέγχεται από παράγοντες-ρυθμιστές οι οποίοι προσδένονται ειδικά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες των mRNAs. Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3' αμετάφραστες περιοχές συγκεκριμένων mRNAs (3'-UTR) ενισχύουν την αποαδενυλίωση τους. Αυτά τα στοιχεία δεσμεύονται από παράγοντες οι οποίοι στρατολογούν συγκεκριμένες αποαδενυλάσες προωθώντας έτσι την αποαδενυλίωση. Τέτοια παραδείγματα παραγόντων που δεσμεύονται στις 3'-UTR περιοχές μορίων mRNA αποτελούν οι CUG-BP, miRNAs, PUF και CPEB (Goldstrohm and Wickens, 2008; Kadyrova et al., 2007; Hook et al., 2007). Εναλλακτικά, προώθηση της αποαδενυλίωσης μπορεί να επιτευχθεί και μέσω αλληλεπίδρασης της PABP και συγκεκριμένων αποαδενυλασών (π.χ η PABP στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3). Επίσης, το 5' κάλυμμα του mRNA μπορεί να επηρεάσει θετικά την αποαδενυλίωση διεγείροντας την δραστηριότητα και την επεξεργαστικότητα κάποιων αποαδενυλασών (χαρακτηριστικότερο και μοναδικό γνωστό έως σήμερα παράδειγμα αποτελεί η PARN). Η έκφραση των αποαδενυλασών και των αντίστοιχων ρυθμιστών τους υποδεικνύει το χρόνο και τον τόπο, στον οποίο μπορεί να συμβεί ρύθμιση της αποαδενυλίωσης. Για παράδειγμα, η έκφραση της νοκτουρνίνης είναι ρυθμική και ελέγχεται από τον κερκάδιο ρυθμό, ενώ οι αποαδενυλάσες της οικογένειας των POP2 είναι ιδιοσυστατικές. Επιπροσθέτως, όταν το κύτταρο υποβάλλεται σε διάφορες μορφές stress (UV, οξειδωση, οσμωτική πίεση ή έλλειψη γλυκόζης) τότε η αποαδενυλίωση σταματά αμέσως. Ο μοριακός μηχανισμός της αναστολής παραμένει

άγνωστος. Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται επίσης από δύο μορφές χωρικού ελέγχου: τον πυρηνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών και την εντόπισή τους σε κοκκία. Στην πρώτη περίπτωση, προβλήματα σωστού διαχωρισμού των αποαδενυλασών μεταξύ πυρήνα και κυτοσολίου μπορούν να αποβούν μοιραία για την τύχη mRNAs που δεν θα έπρεπε να αποικοδομηθούν. Από τη άλλη μεριά, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία, τα οποία περιέχουν κατασταλαμμένα mRNAs, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ενεργοποιηθούν. Η συν-εντόπιση αυτών των αποαδενυλασών με τα υποστρώματα τους πιθανότατα διευκολύνει την κινητική της αποαδενυλίωσης (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Οι αποαδενυλάσες συνήθως αποτελούν τμήμα συμπλόκων με πολλές υπομονάδες. Οι άλλες πρωτεΐνες σε αυτά τα σύμπλοκα επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, η PAN2 δεσμεύεται στην PAN3 που με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την PABP. Η τελευταία στρατολογεί όπως αναφέρθηκε το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στην πολυ(A) ουρά των mRNA-στόχων (Hammet et al., 2002). Άλλες αποαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή. Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των αποαδενυλασών, καθώς διαφορετικά ετεροδιμερή έχουν και διαφορετικές ενζυμικές και ρυθμιστικές ιδιότητες. Η δυνατότητα για έλεγχο της αποαδενυλίωσης καθίσταται τεράστια και ιδιαίτερα πολύπλοκη αν σε όλα αυτά συνυπολογίσουμε την αλληλεπίδραση των πολυάριθμων πιθανών συμπλόκων αποαδενυλασών με την τεράστια ποικιλία των ρυθμιστών τους και την αλληλεπίδραση των τελευταίων με μία εξίσου μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ρυθμιστικών στοιχείων επί των 3'-UTR περιοχών των mRNA-στόχων (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Τα σύμπλοκα αποαδενυλασών που στρατολογούνται από ειδικούς ρυθμιστές είναι πολυλειτουργικά καθώς περιέχουν, εκτός των ενζύμων αποαδενυλίωσης, συστατικά που καταστέλλουν τη μετάφραση και συστατικά που ενισχύουν την αποικοδόμηση του mRNA. Η πολυλειτουργικότητα αυτή παρέχει ευκαιρίες για πολυάριθμα σημεία ρύθμισης της αποαδενυλίωσης, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης των mRNAs, είτε ξεχωριστά είτε συντονισμένα (Goldstrohm and Wickens, 2008). Στον **Πίνακα 4** παρουσιάζεται συνοπτικά η κατάταξη των αποαδενυλασών στις δύο υπερ-οικογένειες καθώς και ενδεικτικά παραδείγματα ενζύμων που εντοπίζονται σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών, καθώς και στοιχεία για την κυτταρική εντόπιση και τον φυσιολογικό τους ρόλο.

**Πίνακας 4.**

Ποικιλομορφία των αποαδενυλασών (Goldstrohm and Wickens, 2008).

		SC	CE	DM	XL	MM	HS
<b>DEDD nucleases</b>	<b>CNOT7/POP2</b>	+	+	+	+	+	+
	<b>CNOT8</b>	-	-	-	+	+	+
	<b>CAF1Z</b>	-	+	-	+	+	+
	<b>PARN</b>	-	+	-	+	+	+
	<b>PAN2</b>	+	+	+	+	+	+
<b>EEP nucleases</b>	<b>CNOT6/CCR4</b>	+	+	+	+	+	+
	<b>CNOT6L</b>	-	-	-	-	+	+
	<b>NOC</b>	-	-	+	+	+	+
	<b>2'PDE</b>	-	+	+	+	+	+

SC: *S.cerevisiae*, CE: *C. elegans*, DM: *D.melanogaster*, XL: *X.laevis*, MM: *M. musculus*, HS: *H.sapiens*

Σχετικά με το *Arabidopsis*, έχει μελετηθεί το ομόλογο της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN). Η PARN είναι μία αποαδενυλάση που πρωτοχαρακτηρίστηκε σε θηλαστικά ενώ απουσιάζει από τη ζύμη και τη *Drosophila* (Πίνακας 4). Η PARN του *Arabidopsis* (AtPARN) που εκφράστηκε σε κύτταρα *E.coli* διαθέτει αποικοδομητική ενεργότητα *in vitro*, γεγονός που συνδέεται με την ύπαρξη συντηρημένων περιοχών και κατάλοιπων αμινοξέων που είναι σημαντικά για την καταλυτική ενεργότητα (Reverdatto et al., 2004). Η N-τελική περιοχή της παρουσιάζει ομοιότητα με την N-τελική περιοχή της HuPARN, όπου βρίσκονται οι καταλυτικές περιοχές. Η συντηρημένη N-τελική περιοχή της PARN είναι πιο σημαντική για την ενεργότητά της από την C-τελική περιοχή. Επιπλέον, διαθέτει τρεις κρίσιμες Exo-περιοχές χαρακτηριστικές της οικογένειας των ενζύμων RNaseD (Chiba et al., 2003). Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η PARN εξαρτάται από δυσθενή μεταλλικά ιόντα ενώ εμφανίζει μέγιστη δραστηριότητα παρουσία ιόντων  $Mg^{+2}$ , τα οποία πιθανόν βρίσκονται στο μοτίβο DEDD του ενεργού κέντρου, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης. Η PARN περιέχει επίσης μια σπάνια διατηρημένη RH3 περιοχή που φαίνεται να έχει δομή όμοια με αυτήν της IF3 καρβοξυτελικής περιοχής (Wu et al., 2005). Η RH3 περιοχή προσδένεται σε μονόκλιωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν επιστρατεύει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA. Τα πειράματα πρωτεϊνικού εντοπισμού σε φυτικά κύτταρα δείχνουν ότι η AtPARN βρίσκεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Ακόμη, πειράματα με μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της AtPARN δείχνουν ότι το γονίδιο της είναι σημαντικό κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης. Αν και, μέχρι τώρα, δεν έχουν απενεργοποιηθεί ομόλογα γονίδια της AtPARN σε άλλους οργανισμούς, όλες οι παρατηρήσεις φανερώνουν τη σημαντικότητα του ενζύμου και τη χρησιμότητά του σε πολλούς άλλους πολυκύτταρους οργανισμούς (Chiba et al., 2003).

## **Νοκτουρνίνη (Nocturnin), μια αποαδενυλάση που ελέγχεται από το κικκάδιο ρολόι**

Πέραν του μεταγραφικού και μετά-μεταφραστικού ελέγχου, το κικκάδιο ρολόι υπόκειται σε ρύθμιση και από ένα μετά-μεταγραφικό μηχανισμό. Δεδομένα από το *Arabidopsis*, από τη *Drosophila* και από θηλαστικά δείχνουν ότι οι μετά-μεταγραφικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί είναι σημαντικοί στον έλεγχο της διατήρησης των επιπέδων των mRNAs που σχετίζονται με το κικκάδιο ρολόι. Αν και τίποτα δεν είναι γνωστό για τη μοριακή φύση του μετά-μεταγραφικού ελέγχου, δεδομένα από τη *Drosophila* προτείνουν ότι το ρυθμιστικό αυτό βήμα διαθέτει από μόνο του ρυθμικότητα.

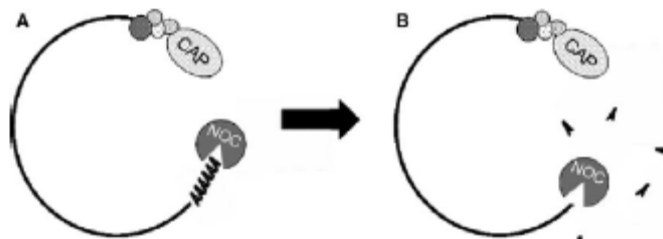
Στο *Xenopus* ταυτοποιήθηκε ένα γονίδιο με ρυθμική έκφραση, η νοκτουρνίνη (nocturnin), που ονομάστηκε έτσι επειδή το mRNA της μεταγράφεται σε υψηλά επίπεδα νωρίς τη νύχτα. Στον αμφιβληστροειδή του *Xenopus* υπάρχει ένα ενδογενές κικκάδιο ρολόι που ρυθμίζει έναν αριθμό φυσιολογικών και βιοχημικών διεργασιών. Το γονίδιο της νοκτουρνίνης παρουσιάζει υψηλό ρυθμό έκφρασης mRNA σε έναν κύκλο φωτός και σε συνεχείς συνθήκες. Στον αμφιβληστροειδή του *Xenopus*, το mRNA της νοκτουρνίνης εντοπίζεται αποκλειστικά στα ραβδία και στα κωνία των φωτοϋποδοχέων της κυτταρικής στιβάδας. Στα κύτταρα αυτά εντοπίζεται το κικκάδιο ρολόι, που οδηγεί στη ρυθμική απελευθέρωση της μελατονίνης και στην έκφραση των ομόλογων γονιδίων του ρολογιού του *Xenopus*.

Το ομόλογο της νοκτουρνίνης στον ποντικό (mNoc) έχει ταυτοποιηθεί ότι είναι ιδιαίτερα συντηρημένο στο επίπεδο των αμινοξέων. Παρόλα αυτά, σε αντίθεση με το *Xenopus*, το mRNA της mNoc εκφράζεται ευρέως σε ιστούς του ποντικού συμπεριλαμβανομένου του συκωτιού, του νεφρού, του εγκεφάλου (περιλαμβάνεται το υπερχιασματικό δίκτυο (SCN) και την υπόφυση), του πνεύμονα, της καρδιάς και του αμφιβληστροειδούς. Η υψηλή κικκάδια έκφραση του mRNA της νοκτουρνίνης, έχει παρατηρηθεί σε αρκετούς από αυτούς τους ιστούς, εμφανίζοντας μέγιστο έκφρασης νωρίς τη νύχτα (Baggs and Green, 2003). Η νοκτουρνίνη είναι συντηρημένη στους ευκαρυώτες και εκφράζεται στον κύριο βηματοδότη των θηλαστικών, τον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου, χωρίς όμως να έχει ρυθμική έκφραση. Μέσα στο κύτταρο, η πρωτεΐνη της νοκτουρνίνης βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Douris and Green, 2009). Ομόλογα της νοκτουρνίνης έχουν κλωνοποιηθεί από τον άνθρωπο, την αγελάδα, το κοτόπουλο και τη *Drosophila*, ενώ είναι πιθανό, να υπάρχει ομόλογο και στο *Arabidopsis*.

Η ανάλυση της βάσης δεδομένων έδειξε ότι η νοκτουρνίνη είναι μια νέα πρωτεΐνη με ακολουθία όμοια, μόνο στο C-τελικό άκρο, με την πρωτεΐνη Ccr4p του *Sacharomyces cerevisiae* που ταυτοποιήθηκε ως ένας μεταγραφικός συνενεργοποιητής (Baggs and Green, 2003). Ο Ccr4p δεν προσδένει άμεσα το DNA, αλλά αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες μέσω μιας περιοχής πλούσιας σε λευκίνες. Η νοκτουρνίνη, στο N-τελικό της άκρο, διαθέτει μια περιοχή που μοιάζει με φερμουάρ λευκίνης (Green, 2003). Η νοκτουρνίνη και ο Ccr4p ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια νουκλεασών εξαρτώμενων από το μαγνήσιο ( $Mg^{+2}$ ). Τα μέλη της οικογένειας αυτής όπως η DNase I, η APE I (DNA-repair apurinic/apirimidinic endonuclease) και η οικογένεια IP5P (inositol polyphosphate 5-phosphatases) διαθέτουν "τσέπες" με παρόμοια κατάλοιπα αμινοξέων. Τα συντηρημένα κατάλοιπα είναι σημαντικά για την κατάλυση. Σε αυτά συμπεριλαμβάνεται και η περιοχή πρόσδεσης του  $Mg^{+2}$ . Επιπλέον, ύστερα από ανάλυση της αναδίπλωσης με ειδικό λογισμικό φαίνεται ότι η νοκτουρνίνη έχει δομικές ομοιότητες με την APE I (Baggs and Green, 2003). Αν και η ομοιότητα μεταξύ των δύο πρωτεϊνών είναι μικρή, οι

περιοχές ομοιότητας αντιστοιχούν σε ακολουθίες που είναι κρίσιμες για τη δομή και τη λειτουργία της οικογένειας νουκλεασών (Green, 2003). Η C-τελική περιοχή του Ccr4p, που εμφανίζει ομοιότητα με τη νοκτουρνίνη και με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας των  $Mg^{+2}$ -εξαρτώμενων νουκλεασών, φαίνεται να έχει δράση αποαδενυλάσης (Baggs and Green, 2003).

Η νοκτουρνίνη είναι μια 3'-εξωριβονουκλεάση, με εξειδίκευση στο πολυ(A). Έχει δράση αποαδενυλάσης, δηλαδή έχει την ικανότητα να αφαιρεί την πολυ(A)-ουρά από τα mRNAs (Εικόνα 7). Η αποαδενυλίωση αποτελεί το πρώτο βήμα στην αποικοδόμηση του mRNA και συμμετέχει στη μεταφραστική αποσιώπηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις η απώλεια της πολυ(A)-ουράς οδηγεί σε ταχεία αποικοδόμηση του mRNA, με φορά 3'→5', ενώ σε άλλες περιπτώσεις η απώλεια της ουράς εμποδίζει τη μετάφραση μέσω της εξασθένησης σχηματισμού των κυκλικών πολυσωμάτων. Ο ρόλος της νοκτουρνίνης στην αποαδενυλίωση δεν είναι ακόμα γνωστός, αλλά υπάρχουν αποδείξεις ότι ελέγχεται από τον κεντρικό ρυθμό δρώντας στο επίπεδο της αποικοδόμησης του mRNA και της μετάφρασης (Douris and Green, 2009).



**Εικόνα 7.**

*Μετά-μεταγραφική αποαδενυλίωση mRNA από την εξωριβονουκλεάση νοκτουρνίνη.*

*A. Η νοκτουρνίνη προσδένεται στην πολυ(A)-ουρά και ξεκινά την αποικοδόμηση.*

*B. Η μείωση του μήκους πολυαδενυλίωσης μπορεί να οδηγήσει σε εναλλακτική μετάφραση και/ή σε πλήρη αποικοδόμηση του μεταγράφου.*

*(Douris and Green, 2009)*

## Μεταγραφική ρύθμιση της νοκτουρνίνης

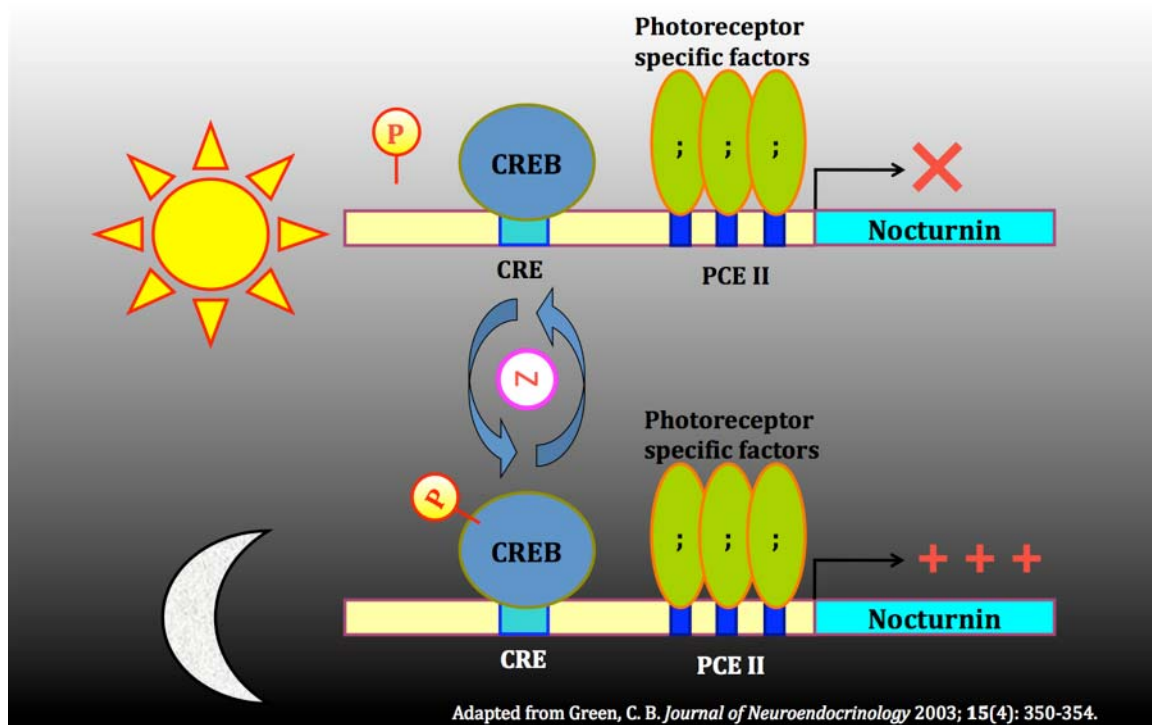
Ο υποκινητής της νοκτουρνίνης αναλύθηκε ώστε να καθοριστούν τα στοιχεία που συμβάλλουν στην περιορισμένη μεταγραφή του, στο χώρο και στο χρόνο. Στην κεντρική 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου, ακριβώς ανοδικά από το σημείο έναρξης μεταγραφής, ταυτοποιήθηκε μια σειρά τριών επαναλήψεων ενός νέου στοιχείου πρόσδεσης πρωτεΐνης που ονομάστηκε PCEII (photoreceptor conserved element II). Το στοιχείο PCEII του DNA προσδένει με υψηλή συγγένεια πυρηνικές πρωτεΐνες, που απομονώθηκαν από τον αμφιβληστροειδή του *Xenopus*, αλλά δεν έδειξε ιδιαίτερη συγγένεια με πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από άλλους ιστούς. Το στοιχείο PCEII είναι απαραίτητο και επαρκές για την έκφραση της νοκτουρνίνης, όμως οι παράγοντες που προσδένονται σε αυτό δεν είναι ακόμα γνωστοί. Η αλληλουχία του στοιχείου αυτού, είναι διαφορετική από αυτές που ταυτοποιήθηκαν σε άλλα γνωστά γονίδια φωτοϋποδοχέων.

Έπειτα από έρευνα για στοιχεία που συμβάλλουν στην έκφραση της νοκτουρνίνης, εξετάστηκε ένα μοτίβο που βρίσκεται ακριβώς ανοδικά από τα τρία PCEII στοιχεία, το οποίο προσομοιάζει με ένα E-box. Τα στοιχεία E-box προσδένουν μεταγραφικούς παράγοντες bHLH (basic-helix-loop-helix) και αυτή η συγκεκριμένη

ομάδα των E-boxes (group C; NACGTG) συχνά προσδένεται από πρωτεΐνες bHLH-PAS, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών CLOCK και BMAL1 του κερκάδιου ρολογιού. Το ετεροδιμερές CLOCK/BMAL1 αποτελεί ένα ακέραιο κομμάτι του κεντρικού κερκάδιου μηχανισμού και ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων *PER* (*PERIOD*) και *CRY* (*CRYPTOCHROME*) στα σπονδυλωτά μέσω αλληλεπιδράσεων με στοιχεία E-boxes στους υποκινητές αυτών των γονιδίων. Και άλλα γονίδια με ρυθμική έκφραση όπως το *AVP* (*ARGININE VASOPRESSIN*), το *DBP* (*D-ELEMENT-BINDING PROTEIN*) και το *AA-NAT* (*ARYLALKYLAMINE N-ACETYLTRANSFERASE*) ρυθμίζονται από την πρόσδεση του ετεροδιμερούς CLOCK/BMAL1 στα στοιχεία E-boxes. Παρόλα αυτά, τα E-boxes που έχουν χαρακτηριστεί στους υποκινητές αυτών των γονιδίων, έχουν αλληλουχία CACGTG ενώ ο υποκινητής της νοκτουρνίνης περιέχει την αλληλουχία GACGTG. Επιπλέον, η μεταγραφή της νοκτουρνίνης στον αμφιβληστροειδή του *Xenopus* είναι διαφορετική από τη μεταγραφή γονιδίων που πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ετεροδιμερούς CLOCK/BMAL1. Πράγματι, πειράματα έδειξαν ότι το ετεροδιμερές CLOCK/BMAL1 δεν προσδένεται *in vivo* στο στοιχείο E-box του υποκινητή του γονιδίου της νοκτουρνίνης.

Η αλληλουχία που είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του πρωτεϊνικού συμπλόκου είναι 5'-GTGACGTG-3' (είναι υπογραμμισμένο το κομμάτι της αλληλουχίας που μοιάζει με την αλληλουχία του E-box) και εμφανίζει σημαντική ομοιότητα με το στοιχείο CRE (cyclic AMP response element). Η πρωτεΐνη που προσδένεται στο στοιχείο CRE ονομάζεται CREB (CRE binding protein) και ρυθμίζεται με φωσφορύλιωση.

Ο CREB εμπλέκεται στη ρύθμιση αρκετών διαδικασιών που σχετίζονται με τον κερκάδιο ρυθμό και σε άλλα είδη εκτός από το *Xenopus* και η ομοιότητα στην ακολουθία του CRE και του E-box έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι τα δύο στοιχεία σχετίζονται εξελικτικά. Στα κύτταρα των φωτοϋποδοχέων του αμφιβληστροειδούς του *Xenopus* παρατηρήθηκαν ρυθμοί φωσφορύλιωσης του CRE, με μέγιστο από νωρίς τη νύχτα μέχρι τα μεσάνυχτα, παρόμοιο με το ρυθμό μεταγραφής της νοκτουρνίνης. Όλα αυτά τα δεδομένα προτείνουν ότι ο CREB οδηγεί τη ρυθμική μεταγραφή της νοκτουρνίνης (και πιθανόν και άλλων γονιδίων που είναι συγχρονισμένα με τη νύχτα), μέσω του τροποποιημένου CRE (**Εικόνα 8**) (Green, 2003).



**Εικόνα 8.**

Προτεινόμενος μηχανισμός της κηκράδιας ρύθμισης της μεταγραφής της νοκτουρνίνης. (Green, 2003)



## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι καταρχήν, η αναζήτηση αποαδενυλασών στο φυτό *Arabidopsis thaliana* που ρυθμίζονται από τον κερκάδιο ρυθμό, εξετάζοντας για ύπαρξη ομολόγων της νοκτουρνίνης. Στη συνέχεια, βασιζόμενοι στην αρχική αναζήτηση, θα κλωνοποιηθούν ο(οι) υποψήφιο(οι) παράγοντα(ες), και να ακολουθήσει η υπερέκφραση και απομόνωσή του (τους) σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης. Τέλος, για τον(τους) παράγοντα(ες) θα ελεγχθεί η παρουσία ή μη δράσης αποαδενυλάσης και θα ακολουθήσει ο βιοχημικός χαρακτηρισμός.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### ΥΛΙΚΑ

#### Χημικά

Agar	CHEMBIOTIN
Ammonium Persulfate (APS)	SIGMA
Bactotryptone	idg
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Coomasie Brilliant Blue	Fluka
Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	MERCK
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Research Organics
Dithiothreitol (DTT)	SERVA
EDTA	Panreac
HCl	Merck
HEPES	SERVA
Isopropyl ThioGalactosyl (IPTG)	Fermentas
KCl	Merck
LB Agar	Scharlau
LB Broth	Scharlau
Methylene blue	SIGMA
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	Panreac
MOPS	Alfa Aesar
NaCl	Panreac
NaHCO <sub>3</sub>	Merck
NaOH	Merck
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	SERVA
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	SIGMA
Sucrose	Merck
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	Research Organics
Tris base	Merck
Triton X	Merck
Yeast Extract	idg
Αγαρόζη (Agarose)	SeaKem
Αιθανόλη	Panreac
Ακρυλαμίδη (Acrylamide)	SIGMA
Β-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel de Haen
Βρωμιούχο αιθίδιο	Merck
Γλυκερόλη (glucerosl)	Panreac
Δις-ακρυλαμίδιο (Bis-acrylamide)	SIGMA
Ισοπροπανόλη (Isopropanole)	Scharlau
Λυσοζύμη	FLUKA
Οξικό οξύ	Merck
Χλωραμφαινικόλη	SIGMA

#### • Βακτηριακά στελέχη

BL21 (DE3) pUBS E.coli B, F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub>+m<sub>B</sub>+) gal λ(DE3)

- **Θρεπτικά υλικά**

LB Agar Scharlau  
LB Broth Scharlau

- **Πρωτεΐνες και ένζυμα**

His6-AtNOC Από E.coli BL21  
Rnasin Biolabs  
KapaTaq polymerase KAPABIOSYSTEMS  
DNase TAKARA  
RNase inhibitor Invitrogen  
Λιγάση T4 Promega  
EcoRI New England Biolabs  
HindIII New England Biolabs  
NdeI New England Biolabs  
XhoI New England Biolabs

- **Νουκλεοτίδια και συνθετικά νουκλεοσίδια**

Πολυαδενυλικό οξύ SIGMA  
Πολυγουανυλικό οξύ SIGMA  
Πολυκυτιδιλικό οξύ SIGMA  
Πολουρακυλικό οξύ SIGMA

- **Πλασμίδια**

pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector  
pET15b AtNOC

- **Υλικά χρωματογραφίας**

Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose QIAGEN

- **Υλικά διαπίδυσης**

Μεμβράνη διαπίδυσης SIGMA

### Διαλύματα

- **Θρεπτικά υλικά**

Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Agar)

Για την παρασκευή ενός λίτρου διαλύματος προστίθενται : 10ng Bactotryptone, 10gr yeast extract, 5gr NaCl. Για την παρασκευή θρεπτικού μέσου τρυβλίων προστίθενται στα παραπάνω 15gr άγαρ

- **Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης**

-TAE (1X TAE: 40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)

-Βρωμιούχο αιθίδιο (παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε απιονισμένο νερό και διατηρείται στους 4°C. Η συγκέντρωσή του στην πηκτή της αγαρόζης είναι 0,5 μg/ml)

- DLB 6X (0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη)

- **Διαλύματα για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο βρασμού**
  - Θρεπτικό υλικό LB (10gr NaCl, 10gr Bactotryptone, 5gr Yeast Extract)
  - Διάλυμα STET (8% sucrose, 5% Triton X100, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA)
  - Διάλυμα TE (10 Mm Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA)
  - Λυσοζύμη (50 mg λυσοζύμης διαλύονται σε 1 ml dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C)
- **Διαλύματα για την απομόνωση πρωτεΐνης**
  - Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 0,1% Triton X-100, 10% γλυκερόλη, 2mM μερκαπτοαιθανόλη, 2,5mM ιμιδαζόλιο, PMSF 0,1mM, λυσοζύμη)
  - Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 10% γλυκερόλη, 5mM ιμιδαζόλιο)
  - Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 10% γλυκερόλη, 250mM ιμιδαζόλιο)
- **Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου**
  - Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (10x): Tris base 1,5%, Γλυκίνη 7,2% v/w, SDS 0,5%, pH 8,3
  - Διαλύματα stock για πήκτωμα ακρυλαμιδίου:
    - Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 1,5M, pH 8,8
    - Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 0,5M, pH 6,8
    - SDS 10% v/w
    - Ακρυλαμίδιο 30% v/w (ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο : 29/1) σε ddH<sub>2</sub>O
- **Διαλύματα για το πήκτωμα ακρυλαμιδίου**

Ανάλογα με την συσκευή και την περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου που θα χρειαστούμε θα αναζητήσουμε τους πίνακες για την αναλογία των διαλυμάτων stock που θα πρέπει να αναμειξουμε και προσθέτουμε στο τέλος τους καταλύτες APS 10% και TEMED.
- **Διαλύματα για τη χρώση του πηκτώματος ακρυλαμιδίου**
  - Διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% w/v, ισοπροπανόλη 33%, οξικό οξύ 2%
  - Διάλυμα αποχρωματισμού, Ισοπροπανόλη 9%, Οξικό οξύ 1%
- **Διαλύματα για τη μέτρηση της ενεργότητας της AtNOC**
  - Νερό ελεύθερο νουκλεασών (0,05% DEPC, O/N και αποστείρωση, αποθήκευση στο σκοτάδι)
  - Διάλυμα αντίδρασης (2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM HEPES-KOH, 0,5mM DTT, 10% γλυκερόλη)
  - Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου (0,0012% κυανό του μεθυλενίου, 0,1M MOPS-KOH)
  - Διάλυμα πολυ(A) 100μg/ml. Διάλυμα αποθήκευσης πολυ(A) (10mg/ml) αραιώνεται κατάλληλα σε διάλυμα αντίδρασης

## ΜΕΘΟΔΟΙ

### Αποστείρωση σπερμάτων *A.thaliana*

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αποστείρωση των σπερμάτων, εμβαπτίζονται σε διάλυμα αιθανόλης (EtOH) 70% για 2 λεπτά και σε διάλυμα υποχλωρίου του νατρίου (NaOCl) 5% για 15 λεπτά. Ακολούθως, τα σπέρματα ξεπλένονται 6 φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Τέλος, τα σπέρματα απλώνονται σε τρυβλία, τα οποία έχουμε επιστρώσει με θρεπτικό υπόστρωμα MS. Τα τρυβλία αφήνονται σε φωτοπερίοδο 16/8 (16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι) για 7 ημέρες.

### Δειγματοληψία έκφυτων *A.thaliana*

Μετά από 7 ημέρες πραγματοποιούμε τη δειγματοληψία των έκφυτων. Η δειγματοληψία πραγματοποιείται σε διαφορετικές ώρες του 24ώρου, στο σκοτάδι. Λαμβάνονται δείγματα στις 18:30, 10:30, 3:00 και 6:30. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80°C.

### Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN)

- Χρησιμοποιούνται 100mg φυτικού ιστού τα οποία ομογενοποιούνται με ελαιοτρίβιση σε σωλήνα erppendorf 2ml μαζί με υγρό άζωτο.
- Προσθήκη 500μl buffer RLT [σε 1ml buffer RLT έχει προστεθεί 10μl β-μερκαπτεθανόλη (β-ME)].
- Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα και επώαση στους 56°C για ένα έως τρία λεπτά.
- Μεταφορά του δείγματος σε στήλη φυγοκέντρησης QIAshredder, η οποία τοποθετείται σε σωλήνα erppendorf 2ml και φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 2 λεπτά.
- Προσεκτικά μεταφέρεται με πιπέτα το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα σε νέο σωλήνα erppendorf 1,5ml.
- Προσθήκη 250μl αιθανόλη (96-100%), το 1/2 του αρχικού όγκου του διαλύματος και ανάμιξη με την πιπέτα.
- Μεταφορά του διαλύματος (750μl) σε στήλη φυγοκέντρησης RNeasy η οποία τοποθετείται σε σωλήνα erppendorf 2ml. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 2 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 500μl buffer RPE και φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 2 λεπτά. Απόρριψη του υπερκείμενου και νέα φυγοκέντρηση στις ίδιες στροφές και λεπτά. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωλήνα erppendorf 1,5ml.
- Προσθήκη 50μl “RNase-free” νερού στο κέντρο της στήλης και φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 1 λεπτό για έκπλυση του RNA.

## Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων, χρησιμοποιούμε την ποσοτική φωτομετρική ανάλυση. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο νόμο των Lambert και Beer. Με το νόμο αυτό η απορρόφηση του φωτός από ένα διάλυμα συσχετίζεται με τη συγκέντρωση της ουσίας και το μήκος της διαδρομής του φωτός μέσα από το διάλυμα.

Σε ειδική κυβέττα χαλαζία, που περιέχει 600μl dH<sub>2</sub>O, τοποθετούμε 3 μl δείγματος και προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση του διαλύματος σε μήκος κύματος 260nm. Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων, χωρίς την παρουσία άλλων προσμίξεων, όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, δίνεται από τον τύπο :  $C = O.D._{260} * D$  \* **συντελεστής αραιώσης**, όπου O.D. είναι η απορρόφηση του δείγματος στα 260nm και D είναι η σταθερά που εξαρτάται από το είδος του νουκλεϊνικού οξέος. Σε καθαρά διαλύματα DNA η σταθερά D ισούται με 50 mg/ml, σε διαλύματα RNA ισούται με 40 mg/ml, ενώ στην περίπτωση ολιγονουκλεοτιδίων ισούται με 30 mg/ml. Προκειμένου να υπολογιστεί η καθαρότητα ενός δείγματος νουκλεϊνικών οξέων, υπολογίζονται οι λόγοι O.D.<sub>260</sub>/O.D.<sub>280</sub> και O.D.<sub>240</sub>/O.D.<sub>260</sub>. Όταν η τιμή του πρώτου λόγου κυμαίνεται μεταξύ 1,8 – 2,0 και του δεύτερου στο 0,5, τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

## Χειρισμός του ολικού RNA με DNάση

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

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

## Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός αλληλουχιών DNA με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μια θερμοκρασία στην άλλη. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την PCR – εκτός του στόχου DNA – είναι οι εκκινητές, τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια, η DNA πολυμεράση, τα ιόντα μαγνησίου και το ισοτονικό διάλυμα της αντίδρασης. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει :

- Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93–95°C) ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (Denaturation step).
- Θερμοκρασία υβριδισμού (Annealing step), προκειμένου οι εκκινητές να υβριδίσουν με το DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητά του σε G και C. Ένας τρόπος υπολογισμού της θερμοκρασίας του εκκινητή είναι μέσω του τύπου  $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$ . Η θερμοκρασία του υβριδισμού είναι τελικά 5°C κάτω από τον μέσο όρο των τιμών  $T_m$  των δύο εκκινητών της αντίδρασης.
- Θερμοκρασία επιμήκυνσης ή πολυμερισμού (Extention step). Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος λαμβάνει χώρα η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, με τη δράση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω επαναλαμβάνεται για 25–30 κύκλους συνήθως. Κατά τη διάρκεια των κύκλων η παραγωγή των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό, εφόσον βέβαια δεν παρουσιαστούν περιοριστικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα έλλειψη νουκλεοτιδίων. Η PCR βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς και, τελευταία, έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της παραπάνω βασικής αντίδρασης. Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη παραλλαγή είναι η RT-PCR, κατά την οποία χρησιμοποιείται - ως μήτρα για ενίσχυση - RNA, το οποίο πρώτα μεταγράφεται σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή (Reverse transcriptase).

## PCR για τον έλεγχο ύπαρξης γενωμικού DNA

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

- Σε σωλήνα eppendorf προστίθενται τα παρακάτω σε τελικό όγκο 20μl.
  - 15,42μl ddH<sub>2</sub>O
  - 2μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα Kara Taq
  - 0,4μl μίγμα dNTPs
  - 0,5μl ολικό RNA
  - 0,8μl εκκινητής έμπροσθεν
  - 0,8μl εκκινητής ανάστροφος
  - 0,08μl DNA πολυμεράση kara Taq (1Unit/μl)
- Το μίγμα αναμιγνύεται με γρήγορη φυγοκέντρηση και τοποθετείται στη συσκευή PCR, προκειμένου να εκτελεστεί το παρακάτω πρόγραμμα (Πίνακας 5):

**Πίνακας 5.**

	<b>Θερμοκρασία</b>	<b>Χρόνος</b>	<b>Αρ. κύκλων</b>
<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	95 °C	2 λεπτά	1
<b>Αποδιάταξη αλυσίδων DNA</b>	95 °C	30 δευτερόλεπτα	35
<b>Υβριδισμός εκκινητών</b>		30 δευτερόλεπτα	35
<b>Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA</b>	72 °C	30 δευτερόλεπτα	35
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72 °C	10 λεπτά	1

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

**UBQ**

R: 5'-CCG ACA CCA TTG ACA ACG-3'

F: 5'-TCC AGC GAA GAT GAG ACG-3'

Μετά το τέλος της διαδικασίας το προϊόν της PCR αναλύεται σε πηκτή αγαρόζης.

### **RT-PCR**

Στην PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το ολικό RNA το οποίο μετατρέπεται σε cDNA παρουσία του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Για τη μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή ή εννιαμερή όλιγοdTs και το cDNA που θα παραχθεί θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για την DNA πολυμεράση στη συνήθη τεχνική της PCR. Εξελίξεις στην RT-PCR περιλαμβάνουν την ανάπτυξη απλών πρωτοκόλλων στα οποία η σύνθεση cDNA και η αντίδραση PCR εκτελούνται σε ένα στάδιο (one step RT-PCR). Τα πρωτόκολλα αυτά βασίζονται στην αξιοποίηση της διπλής ιδιότητας ορισμένων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών όπως η T. Thermophilus (Tth) DNA πολυμεράση να μεταγράψουν αντίστροφα RNA παρουσία  $Mn^{2+}$ , ενώ ταυτόχρονα δρουν και ως DNA πολυμεράσες.

Η σύνθεση του cDNA έγινε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο ImProm-II™ Reverse Transcription System της εταιρίας Promega και πραγματοποιείται σε ένα στάδιο.

- Αρχικά σε σωλήνα erpendorf τοποθετούνται τα παρακάτω συστατικά:
  - 1ng–5mg ολικού RNA
  - 1μl oligo(dT)<sub>15</sub> primer (0,5mg / αντίδραση)
  - δισ απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) μέχρι τελικό όγκο 5μl.
- Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται γρήγορα και θερμαίνεται στους 70 °C για πέντε λεπτά.
- Τοποθετείται αμέσως στον πάγο για 5 λεπτά, φυγοκεντρείται γρήγορα και διατηρείται στον πάγο μέχρι να ετοιμαστεί το επόμενο μίγμα.
- Σε δεύτερο σωλήνα erpendorf δημιουργείται το μίγμα της αντίδρασης με την αντίστροφη μεταγραφάση το οποίο περιέχει τα παρακάτω συστατικά:
  - ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 15μl
  - 4μl ImProm-II™ 5X Reaction Buffer
  - 0,5μl MgCl<sub>2</sub> (final concentration 1.5–8.0mM)
  - 1μl dNTPs Mix (final concentration 0.5mM each dNTP)



## Διπλωματική Εργασία Τοματσίδου Αναστασία

- 1μl αναστολέας RNάσης (20 units)
- 1μl ImProm-II™ αντίστροφη μεταγραφή
- Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται γρήγορα και προστίθεται στο πρώτο σωλήνα errendorf ο οποίος περιέχει το αρχικό δείγμα. Έτσι προκύπτει τελικός όγκος 20 μl.
- Το τελικό διάλυμα τοποθετείται στην συσκευή PCR όπου πραγματοποιούνται τα παρακάτω στάδια (**Πίνακας 6**):

**Πίνακας 6.**

Θερμοκρασία	Χρόνος
25 °C	5 λεπτά
42 °C	60 λεπτά
70 °C	15 λεπτά

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η αντίδραση PCR.

- Σε σωλήνα φυγοκέντρωσης προστίθενται τα παρακάτω, σε τελικό όγκο 20μl:
  - 14,92μl ddH<sub>2</sub>O
  - 0,4μl 10mM μίγμα dNTPs
  - 2μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα με Mg<sup>+2</sup>
  - 0,8μl 5μM εκκινητής έμπροσθεν (forward)
  - 0,8μl 5μM εκκινητής ανάστροφος (reverse)
  - 0,08μl KaraTaq πολυμεράση (5U/μl)
  - 1μl δείγμα
- Το μίγμα αναμιγνύεται πολύ καλά και τοποθετείται στη συσκευή PCR, προκειμένου να εκτελεστεί το παρακάτω πρόγραμμα στον **Πίνακα 7** :

**Πίνακας 7.**

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αρ. κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	2 λεπτά	1
Αποδιάταξη αλυσίδων DNA	95 °C	30 δευτερόλεπτα	25-35
Υβριδισμός εκκινητών	84-92 °C	1 λεπτό	25-35
Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA	72 °C	1 λεπτό	25-35
Τελική επιμήκυνση	72 °C	2 λεπτά	1

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

**A1NOC**

F: 5'-TCG CAT ATG GCG TCG TCG TCT C-3'

R: 5'-CTC GAG ATT ATT GGC TAT ATG TTT CGG TTG ATC-3'

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

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) ή αλλιώς και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην PCR και χρησιμοποιείται για να ενισχύσει τμήματα DNA και η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλαπλών τμημάτων DNA σε απόλυτο αριθμό με τη χρήση προτύπων διαφόρων συγκεντρώσεων DNA. Η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Πολλές φορές η real-time PCR συνδυάζεται με την πρότερη μετατροπή μιας ποσότητας RNA σε DNA, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής, με σκοπό κυρίως την μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων. Στη βασική έρευνα χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση και παρακολούθηση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων-στόχων μετά από μεταχειρίσεις ή για την αναπτυξιακή μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων-στόχων.

### **Αντίδραση της real time PCR**

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα σε συσκευή Mx3005P (Stratagene) και καταγράφηκαν για 45 κύκλους. Στο τέλος κάθε αντίδρασης ακολουθεί η παρακολούθηση της καμπύλης αποδιάταξης βάση της οποίας επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ενός μόνο προϊόντος στην κάθε αντίδραση. Σε όλες τις περιπτώσεις το μίγμα της αντίδρασης προετοιμάζεται σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (Stratagene), ενώ στην τελική αντίδραση χρησιμοποιείται η χρωστική αναφοράς ROX. Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα δεδομένα εξάχθηκαν με τη μορφή πινάκων και επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος LinRegPCR προκειμένου να προσδιοριστούν η αποτελεσματικότητα των εκκινήτων (efficiency) της κάθε αντίδρασης αλλά και ο αριθμός των κύκλων ορίου (Ct), ο οποίος αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης πάνω από τους οποίους είναι δυνατή η ανίχνευση φθορισμού. Για κάθε μία από τις βιολογικές επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η PCR πραγματικού χρόνου για το γονίδιο της ουμπικουΐτινης ώστε να γίνει κανονικοποίηση – ποσοτικοποίηση στα αρχικά δείγματα cDNA. Για το σκοπό αυτό σε optical tubes προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια μέχρι τελικό όγκο 20  $\mu$ l:

- 10 $\mu$ l 2X buffer
- 0,8 $\mu$ l εκκινήτης έμπροσθεν
- 0,8 $\mu$ l εκκινήτης ανάστροφος
- 1 $\mu$ l cDNA (αραιωμένο 1:10)
- 0,4 $\mu$ l χρωστική αναφοράς ROX
- 7 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

Παρακολουθώντας την έκφραση του γονιδίου της ουμπικουϊτίνης σε κάθε δείγμα βλέπουμε την πυκνότητα του cDNA που πήραμε από κάθε ιστό και κάνοντας τις κατάλληλες αραιώσεις ισοσκελίζουμε τις συγκεντρώσεις cDNA από κάθε δείγμα.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

**AιNOC**

F: 5'-TCG CAT ATG GCG TCG TCG TCT C-3'

R: 5'-ATC GTC TTC TTC CTT GCT GTT GG-3'

### **Ηλεκτροφόρηση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης**

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται, με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Αν πρέπει να διαχωριστούν γραμμικά δίκλιωνα μόρια, η σχέση που συνδέει την κινητικότητα των μορίων με το μέγεθός τους είναι ημιλογαριθμική. Η κινητικότητα μη γραμμικών μορίων εντός του ηλεκτρικού πεδίου της πηκτής δεν είναι άμεση συνάρτηση του μεγέθους τους, αλλά εξαρτάται και από τη διαμόρφωσή τους στο χώρο. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη, για παράδειγμα σε 0,8% συγκέντρωση αγαρόζης μπορούν να διαχωριστούν, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, τμήματα του DNA που κυμαίνονται από 1 έως 12 kb. Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής :

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (συνήθως 1,2-1,5%) προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1X και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει.
- Στην λιωμένη αγαρόζη προστίθεται 0,001% v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αφήνεται να κρυώσει.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως στην πηκτή βυθίζεται ειδική "χτένα" που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων. Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής DLB 6X.
- Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή απομακρύνεται η "χτένα" και τοποθετείται στο δοχείο ηλεκτροφόρησης, το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1X.
- Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5V/cm.

### **Επανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης**

- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης απομονώνεται από την πηκτή με ξυραφάκι η ταινία του DNA που μας ενδιαφέρει.
- Ζυγίζεται το κομμάτι της πηκτής σε eppendorf και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα QG σε αναλογία 3:1.
- Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 10 λεπτά ώστε να λιώσει πλήρως η πηκτή. Γι' αυτό συνίσταται ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα (vortex) κάθε 2-3 λεπτά της επώασης. Στο τέλος της επώασης το χρώμα του μίγματος γίνεται κίτρινο.
- Προστίθεται ίσος όγκος με την πηκτή, ισοπροπανόλη και αναδεύεται καλά.

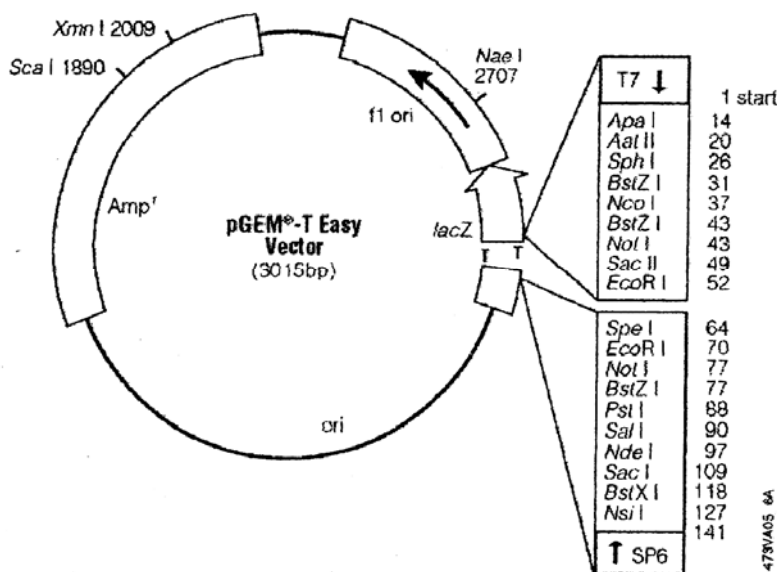
- Προσαρμόζεται η στήλη, που διατίθεται στο kit, στο erpendorf ώστε να συλλεχθεί το DNA και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
- Απομακρύνεται το διάλυμα που συλλέχθηκε στο erpendorf και αυτό ξαναπροσαρμόζεται στη στήλη.
- Προστίθενται 500μl ρυθμιστικού διαλύματος QG και επαναλαμβάνεται η διαδικασία.
- Για να ξεπλυθεί το DNA προστίθενται 0,75ml ρυθμιστικού διαλύματος PE και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό.
- Απομακρύνεται το διάλυμα που συλλέχθηκε στο erpendorf και φυγοκεντρείται πάλι για 1 λεπτό, 13.000rpm.
- Η στήλη προσαρμόζεται σε νέο erpendorf, προστίθενται 50μl ρυθμιστικού διαλύματος EB και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό, 15.000rpm, προκειμένου να συλλεχθεί το DNA.

### Υποκλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα

Ο ένας από τους δύο φορείς κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν το πλασμίδιο pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector. Τα χαρακτηριστικά αυτού του φορέα, που τον κάνουν επιθυμητό προς χρήση είναι τα εξής :

- Ο υψηλός αριθμός αντιγράφων ανά κύτταρο.
- Το γονίδιο amp<sup>r</sup> που του προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικιλίνη.
- Οι προαγωγείς που αναγνωρίζονται από τις SP6 και T7 RNA πολυμεράσες βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής υποκλωνοποίησης.
- Φέρει τμήμα του γονιδίου lacZ' που κωδικοποιεί για τα πρώτα 146 αμινοξέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης, το οποίο χρησιμοποιείται για την επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων μέσω του μηχανισμού της α-συμπληρωματικότητας.
- Φέρει στα άκρα πολύT, ώστε να διευκολύνεται η σύνδεση με κατάλληλα διαμορφωμένα προϊόντα της αντίδρασης της PCR.

Το προϊόν της αντίδρασης RT-PCR του γονιδίου που κωδικοποιεί για την AtNOC υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα φαίνεται στην **Εικόνα 9**.



Εικόνα 9.

### Ενοποίηση των άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης

Η αντίδραση της DNA λιγάσης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10μl και περιέχει τα παρακάτω συστατικά :

- 5μl ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης 2X
- 1μl T4 DNA λιγάση (2unit/μl)
- 0,5μl pGEM T-Easy φορέα
- 3μl DNA 102,36mgr/ml
- 0,5μl ddH<sub>2</sub>O

Το δείγμα επωάζεται O/N στους 4°C.

### Μετασηματισμός των βακτηριακών κυττάρων *E.coli*

- Σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 80μl δεκτικά κύτταρα του στελέχους μεταφέρονται 2μl πλασμιδίου.
- Το δείγμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά.
- Υποβάλλουμε τα κύτταρα σε θερμική καταπόνηση (42°C) για 1 λεπτό και τα αφήνουμε στον πάγο για 2 λεπτά, προκειμένου να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου.
- Προστίθενται 200μl υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37°C για 45 λεπτά.
- Προσθέτουμε στα κύτταρα 10μl 0,1M IPTG και 50μl 2% X-Gal
- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων. Στην περίπτωση μας, αμπικιλίνη.
- Μετά, γίνεται επώαση των τρυβλίων για όλο το βράδυ στους 37°C.
- Η φύλαξη των τρυβλίων γίνεται στο ψυγείο στους 4°C.
- .Οι αποικίες που φέρουν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται μπλε, λόγω της δράσης της β-γαλακτοσιδάσης. Αντίθετα, οι αποικίες που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται λευκές.

### Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

- Πρωτόκολλο Miniprep (Qiagen)
  - Μετά από φυγοκέντρηση 1,5ml υγρής καλλιέργειας, τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 250μl ρυθμιστικό διάλυμα P1 που περιέχει Rnάση A.
  - Προστίθενται 250μl ρυθμιστικό διάλυμα P2 και γίνεται ελαφρά ανακίνηση του φυγοκεντρικού σωλήνα (erpendorf).
  - Προστίθενται επιπλέον 350μl ρυθμιστικό διάλυμα N3 και αμέσως αναποδογυρίζεται το erpendorf 4-6 φορές. Το εναιώρημα θολώνει.
  - Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένα λευκό ίζημα.
  - Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται με πιπέτα σε μια στήλη Qiaprep.
  - Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60sec και απορρίπτεται το υγρό που έχει διέλθει από το φίλτρο.
  - Η στήλη ξεπλένεται με 0,75ml ρυθμιστικό διάλυμα PE και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60sec.
  - Το διερχόμενο από το φίλτρο υγρό απορρίπτεται και επαναφυγοκεντρείται για 1 λεπτό μέχρι να απαλειφθεί το υπολειπόμενο διάλυμα ξεπλύματος. Εάν

παραμένει αιθανόλη από το διάλυμα PE ίσως παρεμποδιστούν περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.

Η στήλη Qiaprep τοποθετείται σε καθαρό φυγοκεντρικό σωλήνα 1,5ml. Προκειμένου να ληφθεί το DNA, προστίθεται διάλυμα 50μl EB (10mM Tris-HCl, pH=8,5) ή νερό. Το διάλυμα έκλουσης αφήνεται για 1 λεπτό και, τέλος, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό, οπότε και λαμβάνεται το καθαρό πλασμιδιακό DNA.

### **Μέθοδος του βρασμού (Boiling method, Holmes and Quigley 1981)**

3ml υγρής καλλιέργειας LB, που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό εμβολιάζονται με μια μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C με συνεχή ανακίνηση για 12-16 ώρες.

- Από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται 1,5ml σε σωλήνα eppendorf και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, 13.000 rpm.
- Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται όσο το δυνατόν περισσότερο, γιατί το ίζημα πρέπει να παραμείνει όσο το δυνατόν πιο στεγνό.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 150μl STET και προστίθεται 1μl λυσοζύμη (50 mg/ml).
- Στη συνέχεια, γίνεται επώαση στους 100°C για 45sec και φυγοκέντρηση στις για 20 λεπτά, 13.000 rpm.
- Το ίζημα απομακρύνεται με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα, καθώς αποτελείται από βακτηριακά υπολείμματα.
- Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθενται 180μl ισοπροπανόλης, ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 7 λεπτά, 13.000 rpm.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 300μl αιθανόλη 70% v/v.
- Ακολουθεί καλή ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, 13.000 rpm.
- Αφαιρείται η αιθανόλη και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει.
- Αφού στεγνώσει το ίζημα, επαναδιαλύεται σε 20μl dH<sub>2</sub>O.

### **Πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα με ενδονουκλεάσες περιορισμού**

Πραγματοποιήσαμε πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy που περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την AtNOC, με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI. Το συγκεκριμένο ένζυμο κόβει το πλασμίδιο δεξιά και αριστερά της περιοχής ένθεσης.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μl και περιέχει τα παρακάτω συστατικά:

-2μl ρυθμιστικό διάλυμα 10X

-0,5μl EcoRI (20units/ml)

-2μl pGEM T-Easy φορέα

-15,5μl ddH<sub>2</sub>O

Το δείγμα επωάζεται για 15 λεπτά στους 37°C.

### Πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Στη συνέχεια πραγματοποιούμε πέψη του γονιδίου που κωδικοποιεί την AtNOC, το οποίο το βγάλαμε από τον πλασμιδιακό φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μl και περιλαμβάνει τα παρακάτω συστατικά:

- 2μl ρυθμιστικό διάλυμα 4 10X
- 0,2μl BSA
- 0,5μl NdeI (20units/ml)
- 0,5μl XhoI (20units/ml)
- 3μl DNA 102,36mgr/ml
- 13,8 ddH<sub>2</sub>O

Το δείγμα επωάζεται για 1,5 ώρα στους 37°C.

### Υποκλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα

Ο δεύτερος πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν ο pET15b. Τα χαρακτηριστικά αυτού του φορέα, που τον κάνουν επιθυμητό προς χρήση είναι τα εξής :

- Ο υψηλός αριθμός αντιγράφων ανά κύτταρο.
- Το γονίδιο amp<sup>r</sup> που του προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.
- Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον καταστολέα του οπερονίου της λακτόζης.
- Φέρει αλληλουχία 6 ιστιδινών (His tag) στο N-τελικό άκρο.
- Φέρει 3 περιοχές κλωνοποίησης.

Πραγματοποιούμε πέψη του πλασμιδιακού φορέα pET15b με δύο ενδονουκλεάσες περιορισμού. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μl και περιλαμβάνει τα παρακάτω συστατικά:

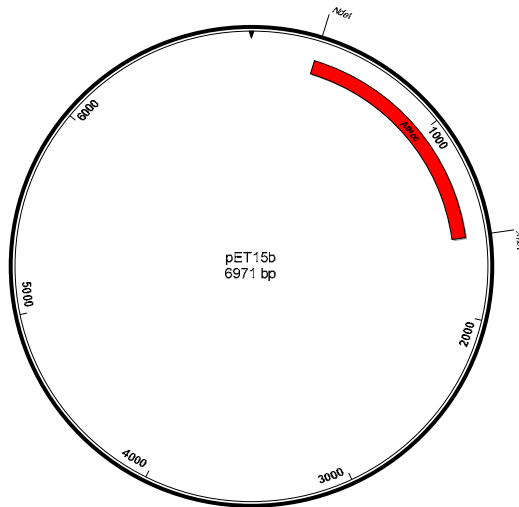
- 2μl ρυθμιστικό διάλυμα 4 10X
- 0,2μl BSA
- 0,5μl NdeI (20units/ml)
- 0,5μl XhoI (20units/ml)
- 4μl pET15b
- 12,3 ddH<sub>2</sub>O

Το δείγμα επωάζεται για 1,5 ώρα στους 37°C.

Το γονίδιο της AtNOC υποκλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pET15b (**Εικόνα 10**). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10μl και περιλαμβάνει τα παρακάτω συστατικά:

- 5μl ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης 2X
- 1μl T4 DNA λιγάση (2unit/μl)
- 0,5μl pET15b φορέα
- 3,5μl DNA 102,36mgr/ml

Το δείγμα επωάζεται O/N στους 4°C.



### Εικόνα 10.

Ανασυνδυασμένος πλασμιδιακός φορέας pET15b.

### Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένης AtNOC

- Μετασχηματισμός BL21 με pET15b AtNOC

Σε 200μl επιδεικτικών κυττάρων BL21, γίνεται προσθήκη 5μl του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA Pet15b AtNOC το οποίο εκφράζει την AtNOC η οποία φέρει 6 ιστιδίνες στο αμινοτελικό της άκρο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 30 λεπτά και ακολούθως στους 42°C για 1,5 λεπτό. Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 2 λεπτά και εν συνεχεία προστίθεται σε κάθε καλλιέργεια 800μl υλικό SOC. Ακολουθεί επώαση για 1,5 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση (160rpm). Τέλος, επιστρώνονται 300μl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό, ανάλογα με τα γονίδια ανθεκτικότητας που διαθέτει το εκάστοτε πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό (αμπικιλίνη) και χλωραμφαινικόλη στην οποία ήδη έχουν ανθεκτικότητα τα BL21 από μόνα τους. Ακολουθεί επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 12-14 ώρες (O/N).

Σε 5ml LB Broth με χλωραμφαινικόλη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 25mg/ml και αμπικιλίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml, ενοφθαλμίζονται μετασχηματισμένα κύτταρα BL21 και επωάζονται για 12-14 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm). Ακολουθεί μεταφορά των 5ml της O/N καλλιέργειας σε 400ml φρέσκου θρεπτικού μέσου LB Broth με χλωραμφαινικόλη και αμπικιλίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm (OD<sub>600</sub>) και επώαση των καλλιεργειών στους 37°C υπό ανάδευση μέχρι το OD<sub>600</sub> να φτάσει περίπου το 0,6 που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Προσθέτουμε IPTG (Isopropyl Thio Galactosyl, 1M) σε τελική συγκέντρωση 1mM,



το οποίο επάγει την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Οι καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση για 4 ώρες στους 37°C. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4.000rpm για 20min στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C.

- Απομόνωση της AtNOC

#### Ομογενοποίηση των κυττάρων

Τα κατεψυγμένα ιζήματα των κυττάρων διαλύονται στον πάγο σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης ~10ml (2-3 ml/gr κυττάρου). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία του σπασίματος των κυττάρων με υπέρηχους (sonicator) μέσα στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 12.000rpm, για 60min στους 4°C. Το υπερκείμενο διαχωρίζεται από το ίζημα και ακολουθεί η απομόνωση της πρωτεΐνης, η οποία βρίσκεται στο υπερκείμενο.

#### Χρωματογραφία συγγένειας

Το υπερκείμενο αναμιγνύεται με ρητίνη νικελίου αγαρόζης (NTA-Ni agarose), η οποία έχει εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης, και το μείγμα αναδεύεται ήπια για 30min στους 4°C. Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στην ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που έχει στο αμινοτελικό άκρο, με τα άτομα νικελίου. Το διάλυμα εκχυλίζεται προσεκτικά μέσα από στήλη που κατακρατά την ρητίνη. Η στήλη ξεπλένεται με 4,5ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (wash buffer) ώστε να γίνει απομάκρυνση των μη-ειδικών ουσιών που κατακρατήθηκαν στη στήλη. Η έκλουση της πρωτεΐνης γίνεται με 6ml ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (elution buffer) το οποίο περιέχει ιμιδαζόλιο σε συγκέντρωση 250mM. Ο ρόλος του ιμιδαζολίου είναι να δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου και να ανταγωνίζεται τη δέσμευση των πρωτεϊνών συνδεδεμένων με ιστιδίνη (His-tagged). Συλλέγουμε οκτώ κλάσματα από τη στήλη (FT, W1-W3 και E1-E4) για μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης σε καθένα από αυτά και για ηλεκτροφόρηση.

### **Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford**

Σε σωλήνες erpendorf προστίθενται τα παρακάτω:

#### **Πίνακας 8.**

	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Δείγμα</b>	<b>Χρωστική</b>
<b>FT</b>	18μl	2μl	1ml
<b>W1</b>	-	20μl	1ml
<b>W2</b>	-	20μl	1ml
<b>W3</b>	-	20μl	1ml
<b>E1</b>	-	20μl	1ml
<b>E2</b>	-	20μl	1ml
<b>E3</b>	-	20μl	1ml
<b>E4</b>	-	20μl	1ml

Επωάζουμε για 15 λεπτά και φωτομετρούμε σε οπτική απορρόφηση 595nm (OD<sub>595</sub>). Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης με βάση την πρότυπη καμπύλη.

## Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου

- Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση  
Υπολογίζουμε την ποσότητα του κάθε δείγματος που πρέπει να φορτώσουμε στην πηκτή ώστε να έχουμε 20μg πρωτεΐνης. Σε 20μl δείγματος προσθέτουμε 10μl loading buffer SDS page. Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 95°C.
- Προετοιμασία πηκτής SDS- πολυακρυλαμιδίου  
Στήνουμε τη συσκευή. Φτιάχνουμε πηκτή SDS- πολυακρυλαμιδίου 10%. Πρώτα, φτιάχνουμε το Running Gel προσθέτοντας 50μl APS και 5μl TEMED στα 7ml Running Gel buffer. Αναδεύουμε και εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια μέχρι τα ~3/5 του ύψους. Για να οριζοντιοποιηθεί η πηκτή και να σπάσουν οι φουσκάλες εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια ισοπροπανόλη.  
Καθώς περιμένουμε να πήξει φτιάχνουμε το Stacking Gel προσθέτοντας 25μl APS και 5μl TEMED στα 3,5ml Stacking Gel buffer. Αφαιρούμε την ισοπροπανόλη και εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια. Τέλος, τοποθετούμε το χτενάκι για να σχηματιστούν τα πηγαδάκια.
- Φόρτωση και ηλεκτροφόρηση δειγμάτων στην πηκτή SDS- πολυακρυλαμιδίου  
Αφού πήξει η πηκτή, φορτώνουμε τα δείγματα στα πηγαδάκια. Ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό στα 110V και αφήνουμε τα δείγματα να "τρέξουν" μέχρι να φτάσουν στο Running Gel buffer. Στη συνέχεια ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό στα 200V μέχρι τα δείγματα να φτάσουν στο τέλος της πηκτής.
- Χρώση της πηκτής SDS- πολυακρυλαμιδίου  
Μετά το πέρας της ημεκτροφόρησης, τοποθετούμε την πηκτή σε ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε οξικό οξύ 10%. Βράζουμε στο φούρνο μικροκυμάτων και τοποθετούμε την πηκτή σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει Staining buffer. Βράζουμε και πάλι στο φούρνο μικροκυμάτων και αφήνουμε για ανάδευση για πέντε λεπτά. Ξεπλένουμε την πηκτή με λίγο απιονισμένο νερό και την τοποθετούμε στο ποτήρι ζέσεως με το οξικό οξύ. Βράζουμε στο φούρνο μικροκυμάτων. Τέλος, τοποθετούμε την πηκτή σε ένα πλαστικό δοχείο με οξικό οξύ και την αφήνουμε για ανάδευση ώσπου να ξεβάψει καλά.
- Διαπίδυση  
Αφού κόψουμε ένα κομμάτι (~10cm) μεμβράνης διαπίδυσης, τη βράζουμε σε υψηλή θερμοκρασία σε 2% w/v NaHCO<sub>3</sub> για 25 λεπτά και ξεπλένουμε με απιονισμένο νερό. Σφραγίζουμε τη μεμβράνη από τη μία πλευρά με ένα πιαστράκι και με πιπέτα μεταφέρουμε το κλάσμα ή τα κλάσματα, στα οποία είδαμε από την πηκτή ότι υπάρχει το υπό μελέτη ένζυμο. Σφραγίζουμε τη μεμβράνη και από την άλλη πλευρά κατά τον ίδιο τρόπο. Τοποθετούμε τη μεμβράνη σε ποτήρι ζέσεως το οποίο περιέχει 900ml διαλύματος διαπίδυσης με pH=7.0. Τοποθετούμε το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο έχουμε προσθέσει και ένα μαγνήτη, σε συσκευή μαγνητικής ανάδευσης έτσι ώστε να αναδεύεται το διάλυμα απαλά στους 4°C για όλο το βράδυ. Την επόμενη ημέρα αφαιρούμε προσεκτικά το περιεχόμενο της μεμβράνης και, αφού πραγματοποιήσουμε μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, το μοιράζουμε σε μικροσωλήνες φυγοκέντρωσης (ependorf tubes 1.5 ml).

## Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου

Η μέθοδος στηρίζεται στη αύξηση της απορρόφησης του πολυ(A) στα 662nm όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του (Cheng et al., 2006, Greiner-Stoeffele et al., 1996). Στην αρχή αυτή και με βάση την πρότυπη καμπύλη γίνεται η μέτρηση της συγκέντρωσης σε μία αντίδραση των 100μl με προσθήκη 900μl διαλύματος κυανού του μεθυλενίου. Το τελευταίο περιέχει κυανό του μεθυλενίου το οποίο προσδένεται στο πολυμερές πολυ(A). Παρουσία ενός ενζύμου που υδρολύει το πολυ(A), το μήκος του τελευταίου μικραίνει, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται μόρια κυανού του μεθυλενίου και να αυξάνει ο ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης (ΔΑ). Επίσης, έχουμε εξετάσει ένα εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος, ώστε να ελεγχθεί και να καθοριστεί η περιοχή της γραμμικής απόκρισης της μεταβολής της ΔΑ. Κατ' αυτόν τον τρόπο μετράμε την ενεργότητα της AtNOC.

- Κατασκευή πρότυπης καμπύλης πολυ(A)

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης προετοιμάζονται σύμφωνα με τον Πίνακα 9. Μετά την προσθήκη του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επωάστηκαν για 15min στους 30<sup>0</sup>C και η φωτομέτρηση έγινε στα 662nm. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυ(A) (10μg/ml τελική συγκέντρωση). Υπολογίστηκε η διαφορά απορρόφησης (Δ.Α) θέτοντας το τυφλό ως 0. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η εξίσωση από την οποία μπορούμε να υπολογίζουμε την ποσότητα του πολυ(A) που αποικοδομείται-υδρολύεται κατά την ενζυμική αντίδραση.

**Πίνακας 9.**

<b>Τελική συγκέντρωση πολυ(A) (μg/ml)</b>	0	2	4	6	8	10 (T)
<b>Πολυ(A)100μg/ml (μl)</b>	0	20	40	60	80	100
<b>Διάλυμα αντίδρασης (μl)</b>	100	80	60	40	20	0
<b>Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου(μl)</b>	900	900	900	900	900	900

- Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε τρία pH (6.5, 7.0, 7.5) και σε τρεις θερμοκρασίες (25, 30, 37<sup>0</sup>C) ώστε να δούμε σε ποιες συνθήκες λειτουργεί καλύτερα το ένζυμο AtNOC. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σύμφωνα με τον Πίνακα 10:

**Πίνακας 10.**

	<b>P1</b>	<b>P2</b>
<b>Διάλυμα αντίδρασης</b>	27μl	67μl
<b>RNasin</b>	1μl	1μl
<b>Υπόστρωμα (S)</b>	70μl	30μl
<b>Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου</b>	900μl	900μl
<b>Ένζυμο (E)</b>	2μl	2μl

Το υπόστρωμα, δηλαδή το πολυ(A), έχει συγκέντρωση στο δείγμα P1= 7μgr/ml και στο δείγμα P2= 3μgr/ml και ένζυμο 0,25mgr/ml. Μετά το πέρας του χρόνου αντίδρασης, δηλαδή των 15 λεπτών, προσθέτουμε το ένζυμο και φωτομετρούμε τα

δείγματα στα 662nm και λαμβάνονται τιμές σε χρόνο 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30 λεπτών. Ως τυφλό χρησιμοποιούμε το δείγμα P1, πριν από την προσθήκη ενζύμου, γιατί έχει την υψηλότερη συγκέντρωση πολυ(A).

Αφού βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες, κατασκευάζουμε τη χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης χρησιμοποιώντας τις τιμές που πήραμε.

- Κινητική με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πολυ(A)

Κατασκευάζουμε την καμπύλη Michaelis-Menten πραγματοποιώντας αντιδράσεις σε pH= 6,5 και σε pH=7,0, σε δύο θερμοκρασίες, 25 και 30°C, υπολογίζοντας τη διαφορά απορρόφησης (ΔA). Τα δείγματα προετοιμάζονται σύμφωνα με τον **Πίνακα 11**:

**Πίνακας 11.**

	<b>T1</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>
<b>Διάλυμα αντίδρασης</b>	29μl	27μl	37μl	57μl	67μl	77μl
<b>RNasin</b>	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl
<b>Υπόστρωμα (S)</b>	70μl	70μl	60μl	40μl	30μl	20μl
<b>Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου</b>	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl
<b>Ένζυμο (E)</b>	-	2μl	2μl	2μl	2μl	2μl

Τα δείγματα P1-P5 αντιστοιχούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυ(A):

P1= 7μgr/ml

P2= 6μgr/ml

P3= 4μgr/ml

P4= 3μgr/ml

P5= 2μgr/ml

Το T1 είναι το τυφλό με το οποίο μηδενίζουμε το φωτόμετρο καθώς έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυ(A).

Μετά το πέρας του χρόνου αντίδρασης, δηλαδή των 15 λεπτών, προσθέτουμε το ένζυμο και φωτομετρούμε τα δείγματα στα 662nm και λαμβάνονται τιμές σε χρόνο 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30 λεπτών.

- Μελέτη της ενεργότητας απουσία  $Mg^{+2}$

Πραγματοποιούμε αντίδραση παρουσία και απουσία  $Mg^{+2}$ , σε pH=6,5 και σε pH=7,0 και σε θερμοκρασία 25°C. Τα δείγματα προετοιμάζονται σύμφωνα με τον ακόλουθο Πίνακα.

**Πίνακας 12.**

	<b>T</b>	<b>P</b>		<b>T</b>	<b>P</b>
<b>Διάλυμα αντίδρασης</b>	89μl	87μl	<b>Διάλυμα αντίδρασης χωρίς Mg<sup>+2</sup></b>	89μl	87μl
<b>RNasin</b>	1μl	1μl	<b>RNasin</b>	1μl	1μl
<b>Υπόστρωμα (S)</b>	10μl	10μl	<b>Υπόστρωμα (S)</b>	10μl	10μl
<b>Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου</b>	900μl	900μl	<b>Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου</b>	900μl	900μl
<b>Ένζυμο (E)</b>	-	2μl	<b>Ένζυμο (E)</b>	-	2μl

Το υπόστρωμα, δηλαδή το πολυ(A), έχει συγκέντρωση 0,7mgr/ml και το ένζυμο 0,25mgr/ml. Μετά το πέρας του χρόνου αντίδρασης, δηλαδή των 15 λεπτών, προσθέτουμε το ένζυμο, φωτομετρούμε τα δείγματα στα 662nm και λαμβάνουμε τιμές σε χρόνο 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30 λεπτών.

- Μελέτη της ενεργότητας παρουσία διαφορετικών υποστρωμάτων  
Πραγματοποιήσαμε αντίδραση σε τρία pH (6.5, 7.0, 7.5) και σε τρεις θερμοκρασίες (25, 30, 37°C) με διαφορετικά υποστρώματα όπως το πολύ(U), το πολύ(C) και το πολύ(G) ώστε να μελετήσουμε την ενεργότητα του ενζύμου. Τα δείγματα προετοιμάζονται σύμφωνα με τον **Πίνακα 13** :

**Πίνακας 13.**

	<b>P</b>	<b>T (τυφλό)</b>
<b>Διάλυμα αντίδρασης</b>	87μl	89μl
<b>RNasin</b>	1μl	1μl
<b>Υπόστρωμα (S)</b>	10μl	10μl
<b>Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου</b>	900μl	900μl
<b>Ένζυμο (E)</b>	2μl	-

Το υπόστρωμα (S) αντιστοιχεί στο πολύ(U), στο πολύ(C) και στο πολύ(G) και έχει συγκέντρωση 0,7mgr/ml. Το ένζυμο έχει συγκέντρωση 0,25mgr/ml. Μετά το πέρας του χρόνου αντίδρασης, δηλαδή των 15 λεπτών, προσθέτουμε το ένζυμο, φωτομετρούμε τα δείγματα σε διαφορετικό μήκος κύματος για το κάθε υπόστρωμα και λαμβάνουμε τιμές σε χρόνο 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30 λεπτών.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά από ανάλυση των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν για παράγοντες με ομολογία με την nocturnin, εντοπίστηκαν τρεις υποψήφιες αλληλουχίες με τα χαρακτηριστικά αυτά. Ακολούθως, σχεδιάζουμε τους εκκινητές που χρησιμοποιούμε στους διάφορους τύπους PCR για την κλωνοποίηση, όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα, και ακολουθήσε επιβεβαίωση της ορθότητας της διαδικασίας με αλληλούχιση.

### Πίνακας 14.

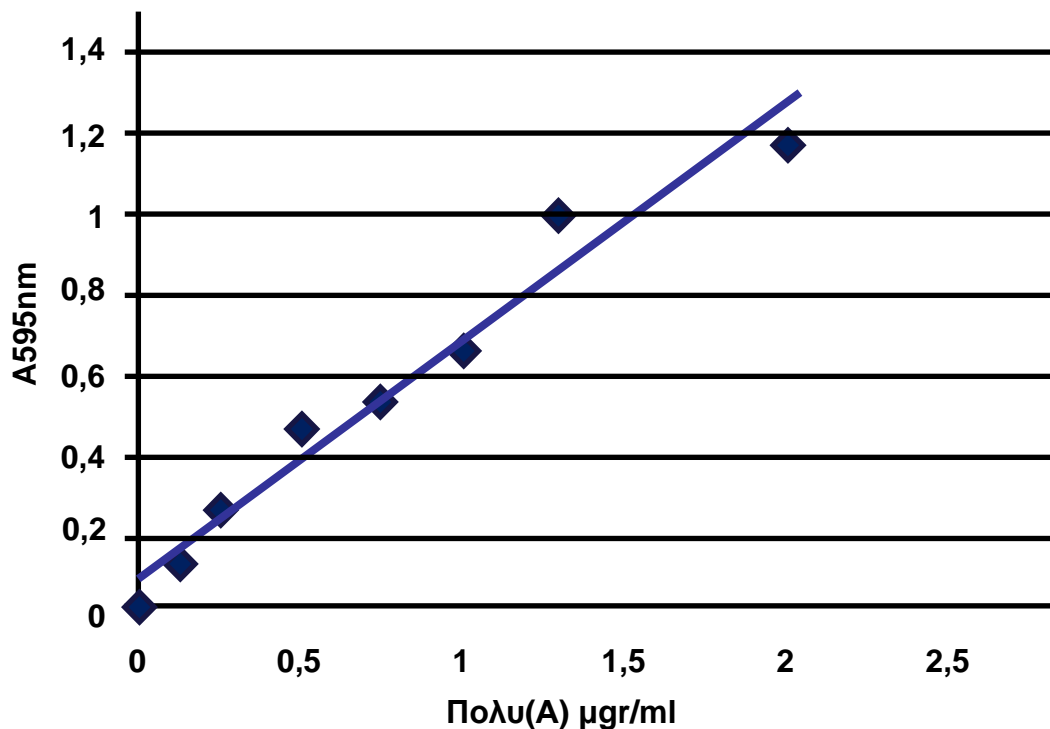
Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιούμε στους διάφορους τύπους PCR.

UBQ R	5'-CCG ACA CCA TTG ACA ACG-3'
UBQ F	5'-TCC AGC GAA GAT GAG ACG-3'
AtNOC R	5'-CTC GAG ATT ATT GGC TAT ATG TTT CGG TTG ATC-3'
AtNOC F	5'-TCG CAT ATG GCG TCG TCG TCT C-3'
AtNOC R	5'-ATC GTC TTC TTC CTT GCT GTT GG-3'
AtNOC F	5'-TGG CGT CGT CGT CTC-3'

### Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης

Η πρότυπη καμπύλη έγινε μετρώντας διάφορες αραιώσεις διαλύματος BSA με τη μέθοδο Bradford. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η γραμμική σχέση με εξίσωση:

$$A = 0,594x + 0,082$$



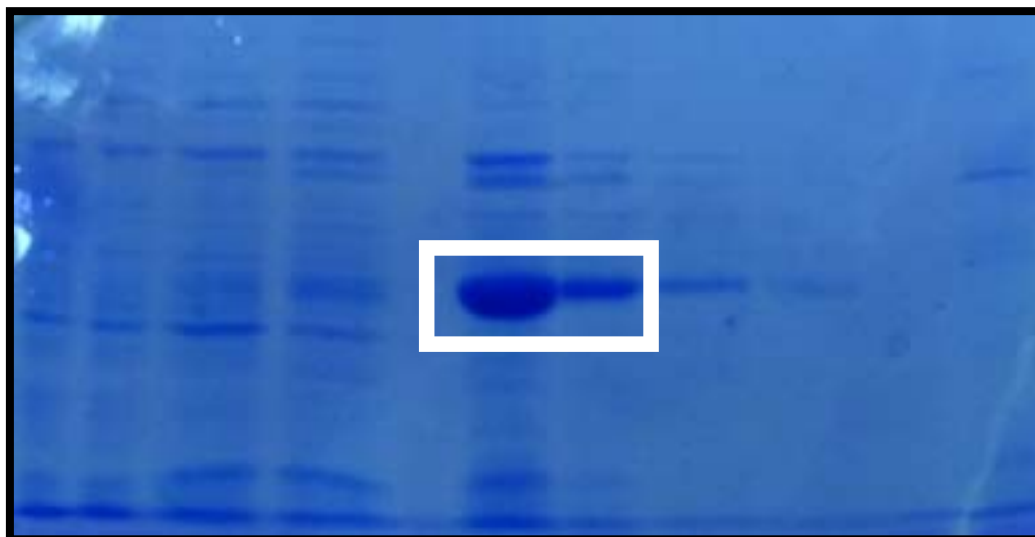
### Εικόνα 11.

Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.

### Έκφραση και απομόνωση AtNOC

Η διαδικασία της έκφρασης και απομόνωσης της AtNOC περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Στην **Εικόνα 12** παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της πρωτεΐνης AtNOC, με τη βοήθεια ρητίνης νικελίου αραρόζης, σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου 10%. Όπως φαίνεται και στην εικόνα η πρωτεΐνη βρίσκεται στα κλάσματα E1 και E2 τα οποία στη συνέχεια ετοιμάζουμε για διαπίδυση. Η πρωτεΐνη AtNOC φαίνεται να έχει μέγεθος 30kDa. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford υπολογίστηκε κάθε φορά από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης της BSA που παρατίθεται παραπάνω και είναι ίση με 0,25mgr/ml.

**FT W1 W2 W3 E1 E2 E3 E4**



**Εικόνα 12.**

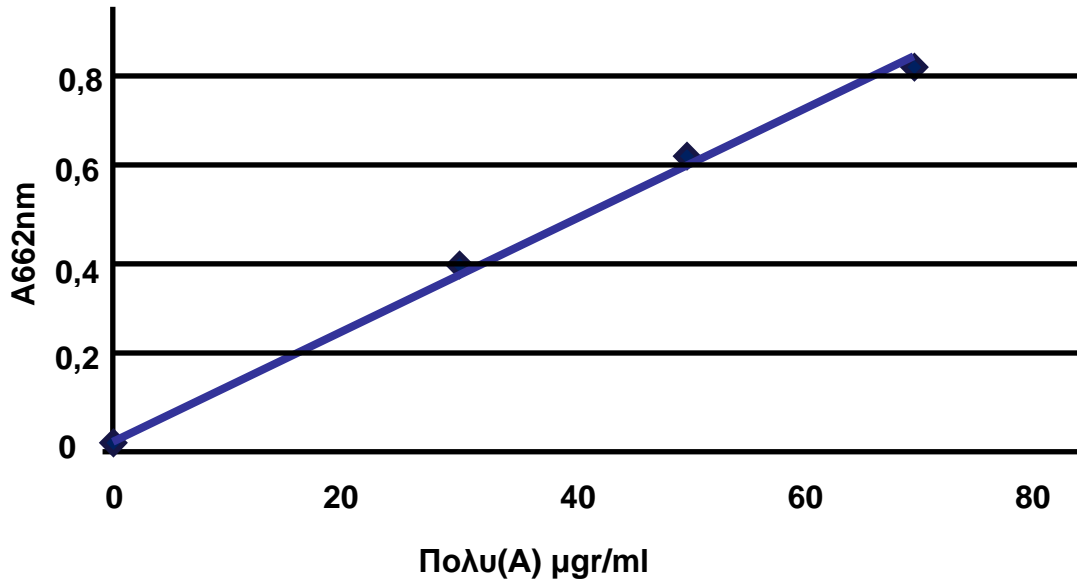
*Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της AtNOC. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. W1, W2: Δείγματα έκπλυσης, E1-E4: Δείγματα έκλουσης από την στήλη. Συγκέντρωση πρωτεΐνης που εντοπίζεται στο E1: 0,25mgr/ml.*

### Πρότυπη καμπύλη πολυ(A)

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης πολυ(A) προετοιμάζονται σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η γραμμική σχέση με εξίσωση:

$$A = 0,0117 * C (\mu\text{gr/ml}) + 0,0182$$

Με την παραπάνω εξίσωση μετατρέπουμε τις απορροφήσεις των ενζυμικών αντιδράσεων σε πολυ(A) που αποικοδομήθηκε κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων. Στην **Εικόνα 13** παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη πολυ(A).



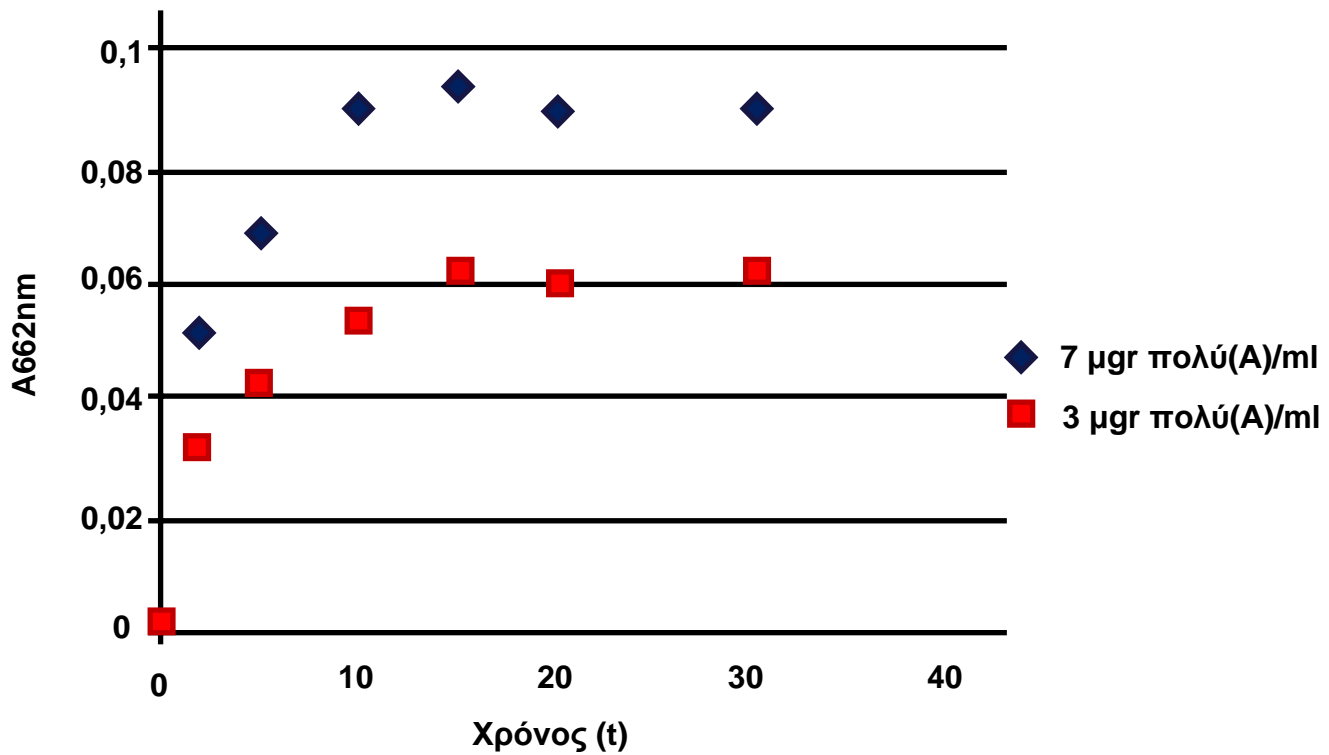
**Εικόνα 13.**

*Πρότυπη καμπύλη πολυ(A) με χρήση κυανού του μεθυλενίου.*



### Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

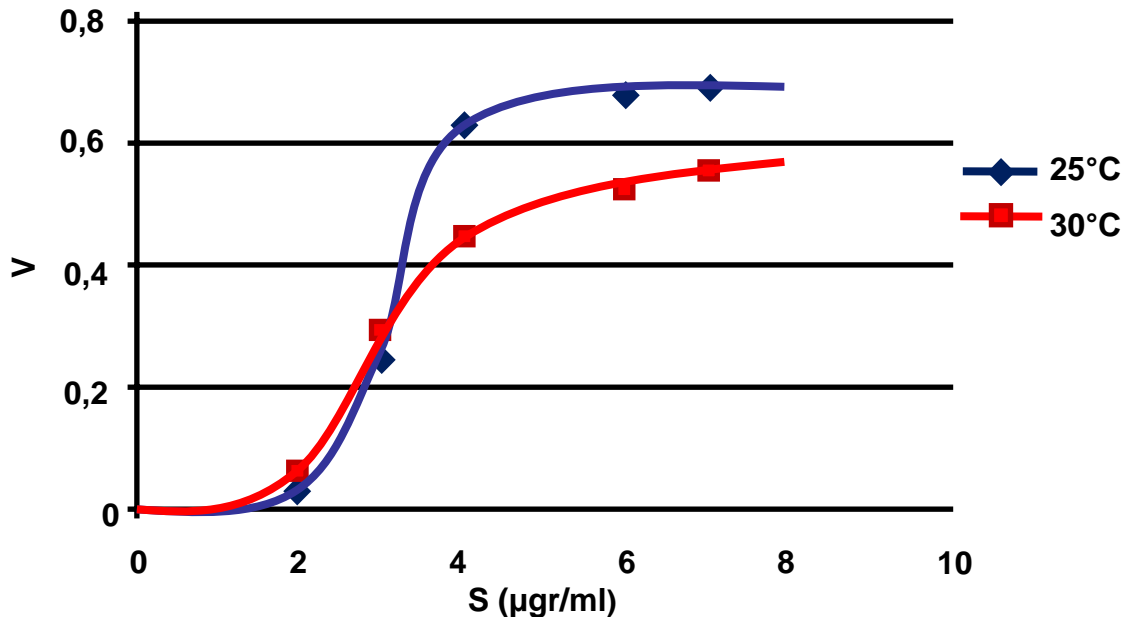
Τα δείγματα για την κατασκευή της χρονοκαμπύλης ενζυμικής δράσης της AtNOC προετοιμάζονται σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Οι τιμές απορρόφησης που παρουσιάζονται στο γράφημα της παρακάτω εικόνας προκύπτουν από αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε pH=6,5 και σε θερμοκρασία 30°C.



**Εικόνα 14.**  
*Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης AtNOC.*

**Κινητική με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πολυ(Α)**

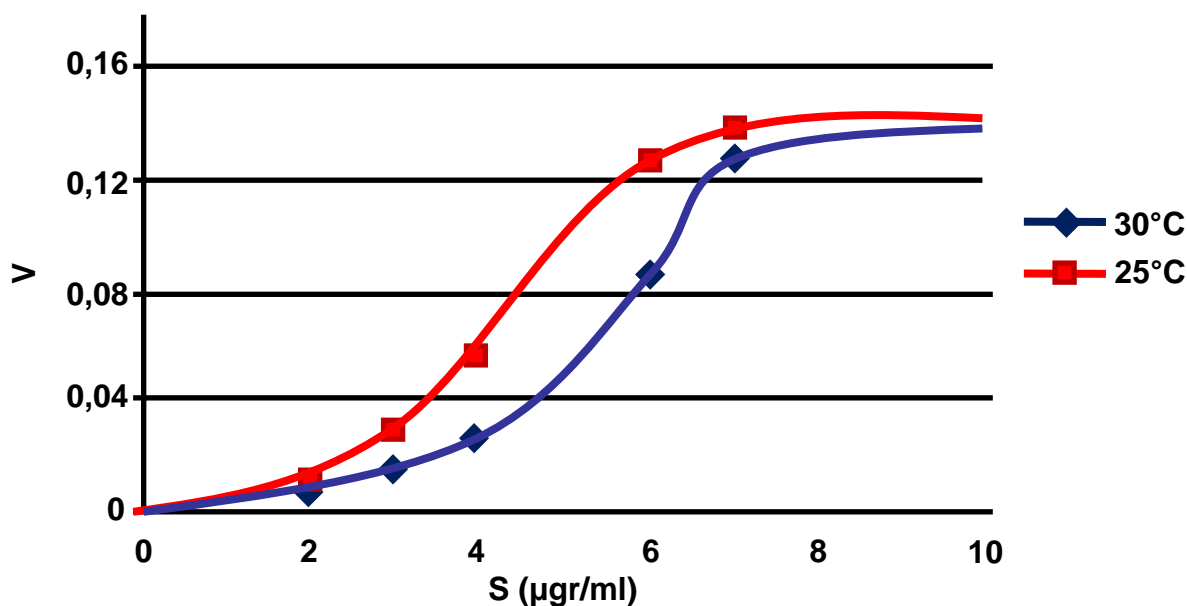
Τα δείγματα για την κατασκευή της καμπύλης Michaelis-Menten σε pH=6,5 και pH=7,0 και σε θερμοκρασία 25 και 30°C προετοιμάζονται σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Στην **Εικόνα 14** παρουσιάζεται η καμπύλη Michaelis-Menten σε pH=6,5 και σε δύο θερμοκρασίες, 25 και 30°C. Παρατηρούμε ότι σε θερμοκρασία 25°C η νοκτουρνίνη αποικοδομεί το πολυ(Α) πιο αποτελεσματικά από τους 30°C.



**Εικόνα 14.**

*Καμπύλη Michaelis-Menten σε pH=6,5. Οι συνθήκες του πειράματος περιγράφονται στα «Υλικά και Μέθοδοι».*

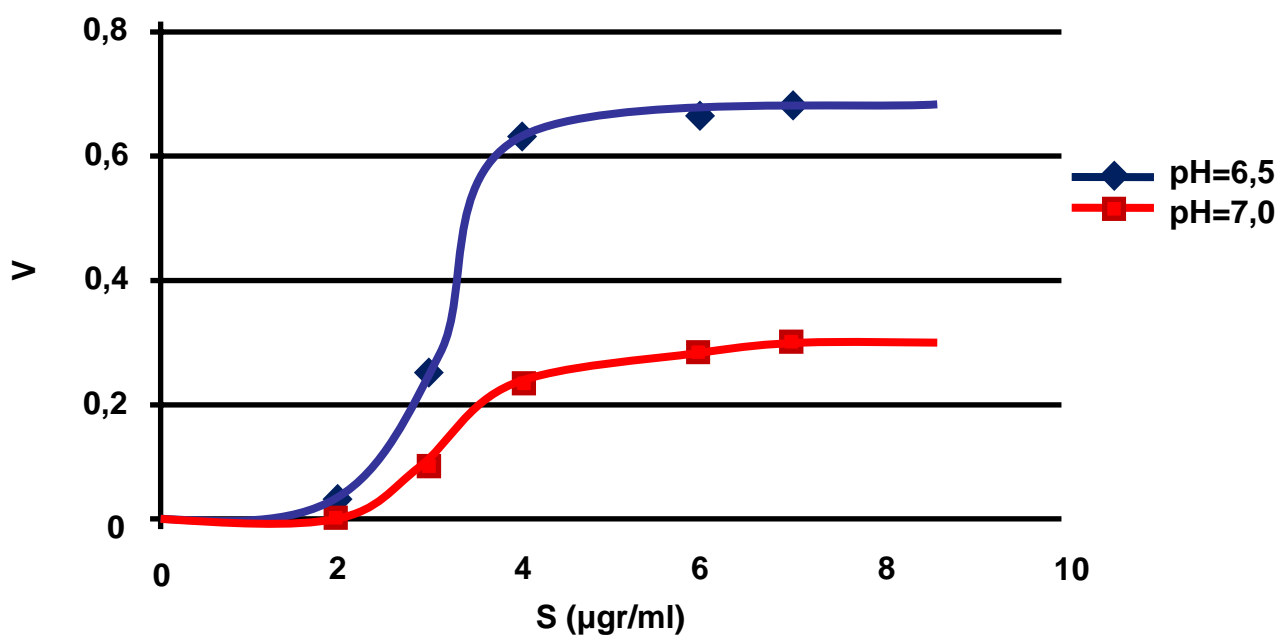
Στην **Εικόνα 15** παρουσιάζεται η καμπύλη Michaelis-Menten σε  $pH=7,0$  και σε δύο θερμοκρασίες, 25 και 30°C. Παρατηρούμε ότι σε θερμοκρασία 25°C η νοκτουρνίνη αποικοδομεί το πολυ(Α) πιο αποτελεσματικά από τους 30°C.



**Εικόνα 15.**

Καμπύλη Michaelis-Menten σε  $pH=7,0$ . Οι συνθήκες του πειράματος περιγράφονται στα «Υλικά και Μέθοδοι».

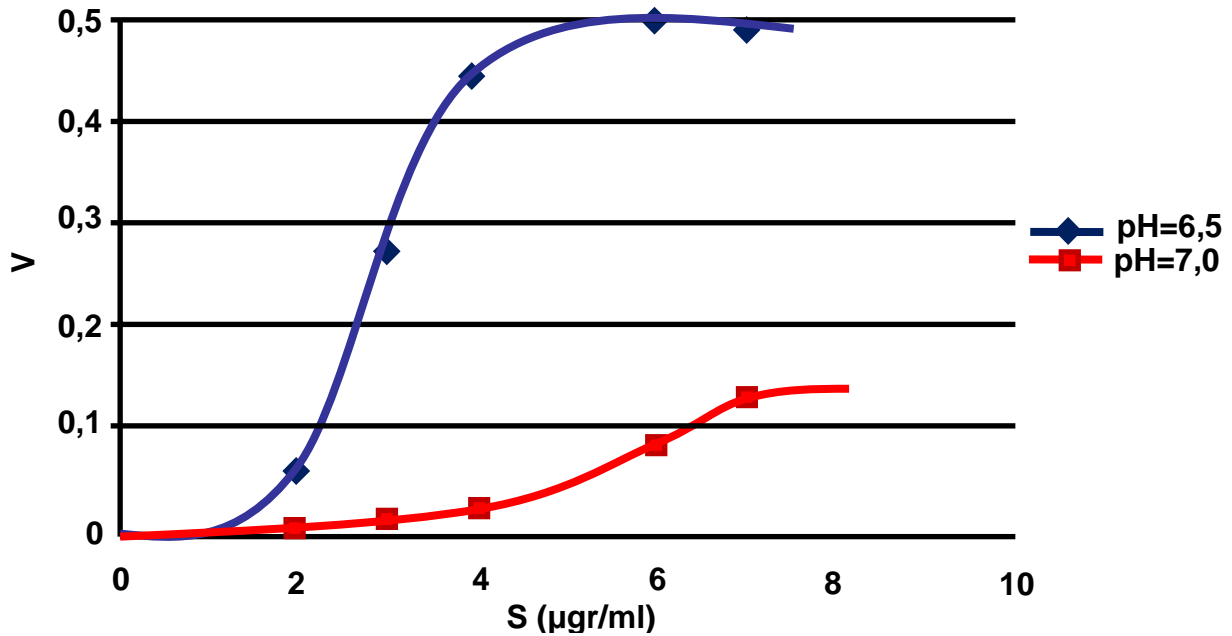
Στην **Εικόνα 16** παρουσιάζεται η καμπύλη Michaelis-Menten σε θερμοκρασία 25°C και σε  $pH=6,5$  και  $pH=7,0$ . Παρατηρούμε ότι σε  $pH=6,5$  η νοκτουρνίνη αποικοδομεί το πολυ(Α) πιο αποτελεσματικά απ' ότι σε  $pH=7,0$ .



**Εικόνα 16.**

Καμπύλη Michaelis-Menten σε  $T=25^{\circ}C$ . Οι συνθήκες του πειράματος περιγράφονται στα «Υλικά και Μέθοδοι».

Στην **Εικόνα 17** παρουσιάζεται η καμπύλη Michaelis-Menten σε θερμοκρασία 30°C και σε pH=6,5 και pH=7,0. Παρατηρούμε ότι σε pH=6,5 η νοκτουρνίνη αποικοδομεί το πολυ(Α) πιο αποτελεσματικά απ' ότι σε pH=7,0.



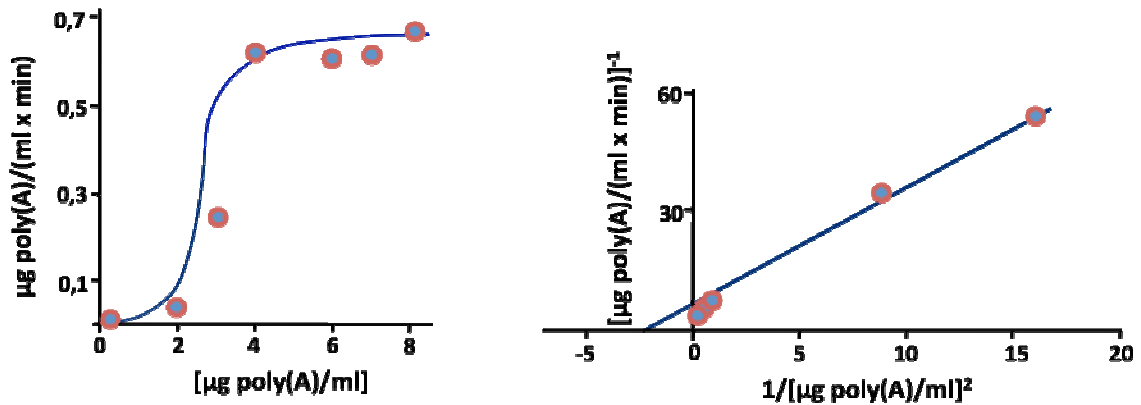
**Εικόνα 17.**

*Καμπύλη Michaelis-Menten σε  $T=30^{\circ}\text{C}$ . Οι συνθήκες του πειράματος περιγράφονται στα «Υλικά και Μέθοδοι».*

Συμπερασματικά, οι καλύτερες συνθήκες για το ένζυμο είναι pH=6,5 και  $T=25^{\circ}\text{C}$ . Επίσης, πρέπει να σημειωθεί πως σε όλα τα πειράματά μας, η καμπύλη της ταχύτητας σε διάγραμμα v-S (όπως στο διάγραμμα Michaelis-Menten) ακολουθεί σιγμοειδή μορφή, γεγονός που υπαινίσσεται πως το ένζυμο είναι αλλοστερικό. Η τελευταία παρατήρηση αξίζει και πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο και να επιβεβαιωθεί η ορθότητά της.

### Υπολογισμός κινητικών σταθερών του ενζύμου

Για να υπολογίσουμε τις κινητικές σταθερές του ενζύμου χρησιμοποιήσαμε τα διαγράμματα  $v$ - $S$  (pH 6,5 και  $T=30^{\circ}\text{C}$ ) και το αντίστοιχο διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (Lineweaver-Burk). Θεωρώντας πως η καμπύλη είναι σιγμοειδής, το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου που θα προκύψει από αυτή, για να δώσει ευθεία καμπύλη πρέπει να είναι της μορφής  $1/v - 1/[S]^2$ . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 18**. Με βάση το διάγραμμα αυτό υπολογίζουμε τις κινητικές σταθερές  $V_{\max}$  και  $K_M$  (**Πίνακας 15**).



**Εικόνα 18.**

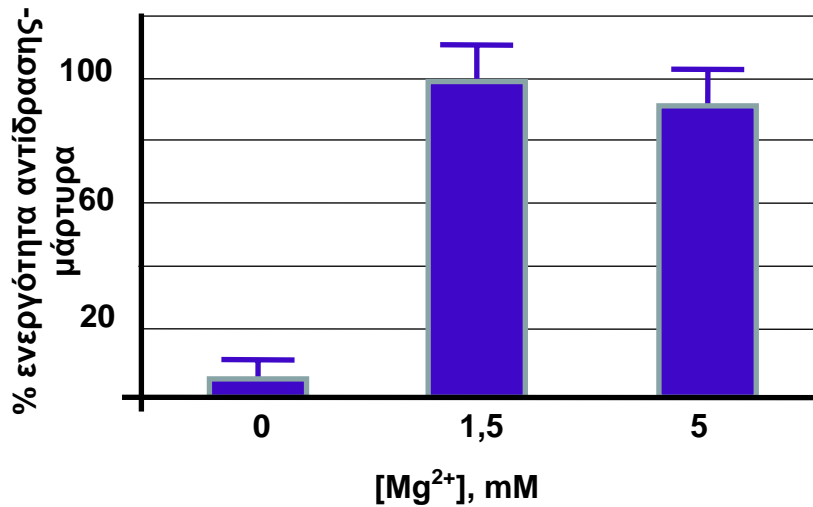
Διαγράμματα Michaelis-Menten (αριστερά) και διπλού αναστρόφου.

**Πίνακας 15.**

$K_M$ μg poly(A)/ml	$V_{\max}$ μg poly(A)/(ml x min)
0,34	6,2

### Μελέτη του ρόλου των ιόντων $Mg^{+2}$

Οι αποαδενυλάσες είναι ένζυμα που γενικά χρησιμοποιούν  $Mg(II)$ . Για να εξεταστεί ο ρόλος των ιόντων στη δραστικότητα της *AtNOC*, μελετήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου απουσία, και σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις  $Mg^{2+}$ . Η διαδικασία της μελέτης της ενεργότητας της *AtNOC*, απουσία  $Mg^{+2}$  περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Στην **Εικόνα 19** παρουσιάζεται η % ενεργότητα του ενζύμου παρουσία και απουσία  $Mg^{+2}$ . Παρατηρούμε ότι απουσία  $Mg^{+2}$  η ενεργότητα του ενζύμου είναι σχεδόν μηδενική, γεγονός που δείχνει πως το ένζυμο χρειάζεται τα ιόντα αυτά για να δράσει.



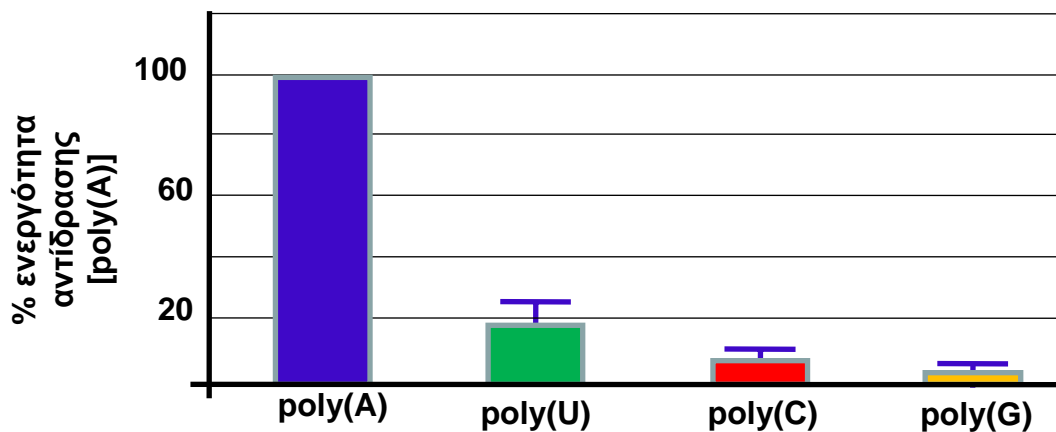
**Εικόνα 19.**

*Διαφορές στην % ενεργότητα της AtNOC απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων  $Mg^{+2}$ .*

### Η AtNOC είναι μια πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η εξειδίκευση του ενζύμου για να αποικοδομεί πολυ(A). Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η ενεργότητα της AtNOC παρουσία των υποστρωμάτων πολυ(U), πολυ(C) και πολυ(G), σε σχέση με αυτή παρουσία πολυ(A), όπως περιγράφεται στα Υλικά και μέθοδοι. Προκαταρκτικές μελέτες καθόρισαν τα μήκη κύματος όπου τα απορροφούν τα διάφορα υποστρώματα (βλ. «Υλικά και Μέθοδοι»). Στην **Εικόνα 20** παρουσιάζονται οι διαφορές στην ενεργότητα του ενζύμου. Παρατηρούμε ότι η ενεργότητα του ενζύμου AtNOC μειώνεται σημαντικά παρουσία του υποστρώματος πολυ(U), ενώ γίνεται σχεδόν μηδενική παρουσία των υποστρωμάτων πολυ(C) και πολυ(G).

Συμπερασματικά, η AtNOC είναι μια πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση.



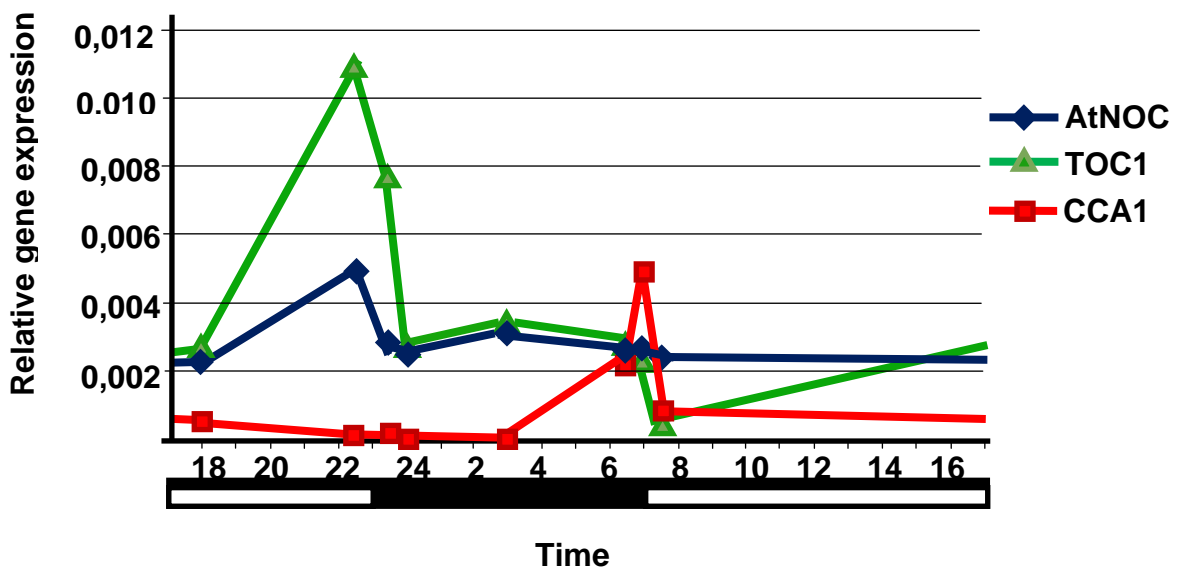
**Εικόνα 20.**

*Διαφορές στην ενεργότητα της νοκτουρνίνης παρουσία των υποστρωμάτων πολυ(A), πολυ(U), πολυ(C) και πολυ(G).*

**Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης της AtNOC από τον κηκκάδιο ρυθμό με real time RT-PCR**

Ένας από τους κύριους στόχους της εργασίας, είναι η αναγνώριση αποαδενυλασών που ρυθμίζονται από τον κηκκάδιο ρυθμό. Για να εξετάσουμε την έκφραση της AtNOC από τον κηκκάδιο ρυθμό πραγματοποιούμε πρώτα δειγματοληψίες φυτών *A. thaliana*, 7 ημερών. Η δειγματοληψία πραγματοποιείται σε διαφορετικές ώρες του 24ώρου, στο σκοτάδι. Λαμβάνονται δείγματα στις 18:00, 22:30, 23:00, 23:30, 24:00, 3:00, 6:30, 7:00, 7:30 και 8:00 από τα οποία απομακρύνονται οι ρίζες. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80°C. Ακολουθεί απομόνωση ολικού RNA και ανάλυση της έκφρασης του mRNA της AtNOC με real time RT-PCR.

Στην **Εικόνα 21** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της real time RT-PCR. Ως μάρτυρες κηκκάδιας έκφρασης χρησιμοποιούνται τα γονίδια TOC1 και CCA1, όπου είναι γνωστό πως υπόκεινται σε κηκκάδια έκφραση (James et al. 2008). Παρατηρούμε ότι το γονίδιο AtNOC ακολουθεί την κατατομή έκφρασης του γονιδίου TOC1, παρουσιάζοντας μέγιστο έκφρασης λίγο πριν σταματήσει η έκθεση στο φως. Συμπεραίνουμε ότι η έκφραση του γονιδίου AtNOC ρυθμίζεται από τον κηκκάδιο ρυθμό.



**Εικόνα 21.**

Κατατομή έκφρασης των γονιδίων AtNOC, TOC1 και CCA1. Η λευκή ράβδος δηλώνει έκθεση σε φως (ώρες 7-23), η μαύρη απουσία φωτός (ώρες 23-7).



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναζητήσαμε αποαδενυλάσες στο φυτό *Arabidopsis thaliana* που ρυθμίζονται από τον κικκάδιο ρυθμό, εξετάζοντας την ύπαρξη ομολόγων της νοκτουρνίνης. Μετά από ανάλυση των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν για παράγοντες με ομολογία με την νοκτουρνίνη, εντοπίστηκαν τρεις υποψήφια αλληλουχίες με τα χαρακτηριστικά αυτά. Ακολούθως, σχεδιάσαμε τους εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε στους διάφορους τύπους PCR για την κλωνοποίηση.

Στη συνέχεια, αφού επιλέξαμε ένα από τα τρία υποψήφια γονίδια, κλωνοποιήσαμε τον παράγοντα σε δύο φορείς υπερέκφρασης, πρώτα στον φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector και έπειτα στον φορέα pET15b. Ακολούθησε υπερέκφραση του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου pET15b σε καλλιέργειες κυττάρων *E.coli* BL21. Έπειτα, συνεχίσαμε με τον καθάρισμο του παράγοντα χρησιμοποιώντας ρητίνη νικελίου αгарόζης (NTA-Ni agarose). Η πρωτεΐνη που λάβαμε μετά το πέρας του καθαρισμού είχε συγκέντρωση 0,25mg/ml και μέγεθος 30kDa.

Το επόμενο βήμα ήταν ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης. Στις αντιδράσεις που πραγματοποιήσαμε χρησιμοποιήσαμε το πολυ(A) ως υπόστρωμα ώστε να διαπιστωθεί η δράση αποαδενυλάσης. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες, σε τρία διαφορετικά pH (6,5, 7,0, 7,5) και σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25, 30, 37), ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες για την λειτουργία του ενζύμου. Στη συνέχεια μελετήθηκε η κινητική του ενζύμου σε διαφορετικές συνθήκες και η κατασκευή της καμπύλης σε διαγράμματα v-S (ταχύτητας αντίδρασης – συγκέντρωσης υποστρώματος) ώστε να υπολογιστούν οι κινητικές σταθερές του ενζύμου. Παρατηρήσαμε πως οι καλύτερες συνθήκες για το ένζυμο είναι pH=6,5 και T=25°C. Πρέπει να σημειωθεί πως σε όλα τα πειράματά μας, η καμπύλη στο διάγραμμα v-S δεν ακολουθεί κλασική μορφή Michaelis-Menten), αλλά σιγμοειδή μορφή, γεγονός που υπαινίσσεται πως το ένζυμο είναι αλλοστερικό. Η τελευταία παρατήρηση πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο και να επιβεβαιωθεί η ορθότητά της. Για να υπολογίσουμε τις κινητικές σταθερές του ενζύμου χρησιμοποιήσαμε τα κατάλληλα διαγράμματα διπλού αναστρόφου σε συνθήκες pH 6.5, T=25°C και το αντίστοιχο διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (Lineweaver-Burk). Η AtNOC παρουσιάζει  $K_M = 0,34 \mu\text{g poly(A)}/\text{ml}$  και  $V_{\max} = 6,2 \mu\text{g poly(A)}/(\text{ml} \times \text{min})$ .

Οι αποαδενυλάσες είναι ένζυμα που γενικά χρησιμοποιούν Mg(II). Για να εξεταστεί ο ρόλος των ιόντων στη δραστηριότητα της AtNOC, μελετήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου απουσία, και σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις  $\text{Mg}^{2+}$ . Παρατηρήσαμε ότι απουσία  $\text{Mg}^{+2}$  η ενεργότητα του ενζύμου είναι σχεδόν μηδενική, γεγονός που δείχνει πως το ένζυμο χρειάζεται τα ιόντα αυτά για να δράσει.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η εξειδίκευση του ενζύμου για να αποικοδομεί πολυ(A). Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η ενεργότητα της AtNOC παρουσία των υποστρωμάτων πολυ(U), πολυ(C) και πολυ(G), σε σχέση με αυτή παρουσία πολυ(A). Παρατηρήσαμε ότι η ενεργότητα του ενζύμου AtNOC μειώνεται σημαντικά παρουσία του υποστρώματος πολυ(U), ενώ γίνεται σχεδόν μηδενική παρουσία των υποστρωμάτων πολυ(C) και πολυ(G). Συμπερασματικά, η AtNOC είναι μια πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση.

Ένας από τους κύριους στόχους της εργασίας, ήταν η αναγνώριση αποαδενυλασών που ρυθμίζονται από τον κικκάδιο ρυθμό. Για να εξετάσουμε την έκφραση της AtNOC από τον κικκάδιο ρυθμό πραγματοποιήσαμε real time PCR. Ως μάρτυρες κικκάδιας έκφρασης χρησιμοποιήσαμε τα γονίδια TOC1 και CCA1, όπου είναι γνωστό πως υπόκεινται σε κικκάδια έκφραση (James et al. 2008).

Παρατηρήσαμε ότι το γονίδιο *AtNOC* ακολουθεί την κατατομή έκφρασης του γονιδίου *TOC1*, παρουσιάζοντας μέγιστο έκφρασης λίγο πριν σταματήσει η έκθεση στο φως. Συμπερασματικά, η έκφραση του γονιδίου *AtNOC* ρυθμίζεται από τον κirkάδιο ρυθμό.

Η ανακάλυψη μιας νέας αποαδενύλασης στο φυτό *Arabidopsis thaliana* είναι ιδιαίτερα σημαντική, και μάλιστα είναι η πρώτη της οποίας η έκφραση σχετίζεται με τον κirkάδιο ρυθμό. Η *AtNOC* είναι η δεύτερη αποαδενύλαση που ταυτοποιήθηκε στο φυτό *A. thaliana*, μετά την *AtPARN*. Επιπρόσθετα το γονίδιο *AtNOC* ελέγχεται από τον κirkάδιο ρυθμό και η έκφρασή του παρουσιάζει μέγιστο λίγο πριν το σκοτάδι, γεγονός που φανερώνει πως η *AtNOC* μπορεί να στοχεύει και να αποικοδομεί επιλεγμένα μετάγραφα.

Οι φυσιολογικοί και βιοχημικοί ρυθμοί των φυτών ακολουθούν 24ωρες διακυμάνσεις, οι οποίες πραγματοποιούνται σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια του κύκλου μέρας/νύχτας (Dunlap, 1999). Παραδείγματα τέτοιων διεργασιών είναι το άνοιγμα και το κλείσιμο των στοματίων οι κινήσεις των ανθέων και των φύλλων ακόμη και ο χρόνος της άνθησης (Mas, 2005). Οι μεταβολές αυτές, οι οποίες οφείλονται στην προσαρμογή των φυτών στη σημαντική αλλαγή των συνθηκών μεταξύ μέρας και νύχτας υπονοούν σημαντικές αλλαγές που πραγματοποιούνται στο επίπεδο της έκφρασης των γονιδίων (Dunlap, 1999). Πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες έχουν χαρακτηριστεί για τη συμμετοχή τους στην ενεργοποίηση γονιδίων σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα του 24ωρου (Mas, 2005). Στην παρούσα εργασία χαρακτηρίσαμε βιοχημικά και μοριακά μια αποαδενύλαση της οποίας τα επίπεδα έκφρασης ακολουθούν 24ωρη διακύμανση. Πράγματι, τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της *AtNOC* βρέθηκαν μισή περίπου ώρα πριν την νυχτερινή περίοδο ανάπτυξης των φυτών. Είναι καλά θεμελιωμένο ότι τα κirkαδικά ρυθμιζόμενα γονίδια καθορίζονται και μεταβάλλουν την έκφρασή τους ανάλογα με εξωτερικά ερεθίσματα όπως το φως και η θερμοκρασία. Έτσι σε σταθερές συνθήκες η μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων είναι σταθερή. Επιπλέον, η μεταβολή των εξωτερικών συνθηκών έχει τη δυνατότητα να τροποποιεί τη μέγιστη έκφραση των κirkαδικά ρυθμιζόμενων γονιδίων, δίνοντας έτσι στα φυτά τη δυνατότητα της προσαρμογής και του επανακαθορισμού (resetting) των βιοχημικών διεργασιών (Devlin and Kay, 2001). Κατά συνέπεια η μέγιστη έκφραση του γονιδίου λίγο πριν την νυχτερινή περίοδο μπορεί να σημαίνει την προετοιμασία και προσδοκία του φυτού για τις επερχόμενες διεργασίες της νύχτας (anticipation). Είναι δυνατόν το φυτό να αποαδενυλιώνει και να καθιστά εύάλωτα στην αποδόμηση γονίδια τα οποία είτε δε χρειάζονται στη διάρκεια της νύχτας, όπως γονίδια που συμμετέχουν στη φωτοσύνθεση είτε γονίδια παρεμποδιστές έκφρασης άλλων γονιδίων επιτρέποντας έτσι την έκφραση τους όταν αυτά είναι απαραίτητα.

Τα φυτά κατά τη διάρκεια της νύχτας γίνονται καταναλωτές των υδατανθράκων οι οποίοι παράγονται από τη φωτοσύνθεση. Η κατανάλωση των υδατανθράκων μέσω τη αναπνοής αφενός μειώνει δραματικά τα επίπεδα οξυγόνου στο κύτταρο αφετέρου μπορεί να παράγει ενεργές μορφές οξυγόνου ως παραπροϊόντα καταπονώνοντας περαιτέρω το φυτό. Κατά συνέπεια το φυτό θα πρέπει να έχει ήδη έτοιμους μηχανισμούς αποτοξίνωσης μαζί με τους μηχανισμούς ρύθμισης των φυσιολογικών διεργασιών. Ο ρόλος της *AtNOC* και η φυσιολογική του σημασία για τα φυτά πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω και να διαπιστωθεί το εύρος των γονιδίων που ρυθμίζονται από αυτή.

Οι μελλοντικές προοπτικές του θέματος που ξεκίνησε με την συγκεκριμένη εργασία είναι πολλές και ενδιαφέρουσες. Κάποιες από αυτές περιλαμβάνουν τη μελέτη του φαινοτύπου μεταλλαγμένων φυτών *A. thaliana*, που δεν εκφράζουν την

AtNOC. Επίσης, σημαντική είναι και η μελέτη των επιπτώσεων που πιθανόν να έχει η απώλεια της AtNOC στον φυτικό οργανισμό καθώς και η μελέτη της κατατομής της έκφρασης παραγόντων που ρυθμίζονται από τον κινκάρδιο ρυθμό απουσία της AtNOC. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί η μελέτη της αλληλεπίδρασης της AtNOC με άλλα ένζυμα αποικοδόμησης ευκαρυωτικών mRNAs ή με μεταγραφικούς παράγοντες και η πιθανότητα να σχηματίζεται κάποιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson J.S.J., Parker R., *EMBO J.* 1998; 17: 1497–1506  
Åström, J., Åström A., Virtanen A., *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 18154–18159  
Baggs JE., Green CB., *Current Biology* 2003; 13: 189-198  
Belostotsky DA., Sieburth LE., *Current Opinion in Plant Biology* 2009; 12: 96-102  
Besharse JC., *PNAS* 2007; 104: 9888-9893  
Cermakian N., Sassone- Corsi P., *Nature* 2000; 1: 59-67  
Cheng Y., Liu W., Yan Y., Zhou H., *Protein and Peptide Letters* 2006; 13: 125-128  
Chen C.Y. et al., *Cell* 2001; 107, 451–464  
Chiba Y., Johnson MA., Lidder P., Vogel JT., Van Erp H., Green PJ., *Gene* 2004; 328: 95-102  
Dodson R.E., Shapiro D.J., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2002; 72: 129–164  
Douris N., Green CB., *Annals of Medicine* 2008; 40: 622-626  
Dunlap J.C., *Cell* 1999; 96: 271-290  
Dykxhoorn D.M., Novina C.D., Sharp, P.A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4: 457–467  
Garneau N., Wilusz J., Wilusz, C., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8: 113–126  
Green CB., *Journal of Neuroendocrinology* 2003; 15: 350-354  
Green CB., Douris N., Kojima S., Strayer CA., Fogerty J., Lourim D., Keller SR., Greiner-Stoeffele T., Grunow M., Hahn U., *Analytical Biochemistry* 1996; 240: 24-28  
Houseley J., Tollervey D., *Cell* 2009; 136: 763-776  
Hoof van A., Parker R., *Cell* 1999  
Hunter-Ensor M., Ousley A., Sehgal A., *Cell* 1996; 84: 677-685  
James AB., Monreal JA., Nimmo GA., Kelly CL., Herzyk P., Jenkins G., Nimmo HG., *Science* 2008; 322: 1832-1835  
Körner CG., *EMBO J.* 1998; 17: 5427–5437  
Liu X., Green CB., *Molecular and Cellular Biology* 2002; 22: 7501-7511  
Liu H., Rodgers N.D., Jiao X., Kiledjian M., *EMBO J.* 2002; 21: 4699–4708  
Maquat L.E., Carmichael, G.G., *Cell* 2000; 26: 173–176  
McClung RC, *Plant Cell* 2006; 18: 792-803  
Meyer S., Temme C., Wahle E., *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2004; 39:197–216  
Mitchell P., Tollervey D., *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001; 13: 320–325  
Mukherjee D. et al., *EMBO J.* 2002; 21: 165–174  
Més P., *Int.J. Dev. Biol.* 2005; 49: 491-500  
Reverdatto SV., Dutko JA., Chevanova JA., Hamilton DA., Belostotsky D., *RNA* 2004; 10: 1200-1214  
Tucker M., Parker R., *Annu. Rev. Biochem.* 2000; 69: 571–595  
Wang Z., Kiledjian M., *Cell* 2001; 107: 751–762  
Wu M., Reuter M., Lilie H., Liu Y., Wahle E., Song H., *EMBO Journal* 2005; 24: 4082-4093  
Yamashita A., *Nature Structural & Molecular Biology* 2005;12: 1054–1063  
Yanovsky MJ., Kay SA., *Nature* 2003; 4: 265-275