

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *HESPI* ΤΟΥ *ARABIDOPSIS THALIANA*
ΣΤΗΝ ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ**

ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΡΑΒΑΛΟΣ

2012

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *HESPI* ΤΟΥ *ARABIDOPSIS THALIANA*
ΣΤΗΝ ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ**

**THE ROLE OF *HESPI* GENE IN ABIOTIC STRESS TOLERANCE
IN *ARABIDOPSIS THALIANA***

Υπεύθυνη Καθηγήτρια

ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, ΤΒΒ, Π.Θ.

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ, Λέκτορας Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, ΤΒΒ, Π.Θ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Επικ. Καθηγήτρια κ. Κ. Παπαδοπούλου για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση, συνεργασία, εμπιστοσύνη και ενθάρρυνση που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής και συγγραφικής περιόδου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα κ. Ν. Μπαλατσό για την εμπιστοσύνη και τη συνεργασία. Επίσης αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω την υπεύθυνη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας φυτών και περιβάλλοντος Δρ. Δ. Τσίκου για τη σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διεκπεραίωση του πειράματος, για το χρόνο που μου αφιέρωσε, τις διορθώσεις και παρατηρήσεις της, καθώς και για την άριστη συνεργασία μας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου για την αλληλοσυμπράσταση και το ευχάριστο και φιλικό κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1	Καταπόνηση στην αλατότητα και η αντίδραση των φυτών.....	8
1.2	Θερμική καταπόνηση των φυτών.....	11
1.3	Καταπόνηση των φυτών από ξενοβιοτικές ουσίες.....	13
1.4	Ενεργές Μορφές οξυγόνου.....	14
1.5	Χαρακτηριστικά του κερκάδιου ρυθμού στα φυτά.....	16
1.6	Αποικοδόμηση mRNA στα φυτικά κύτταρα και ο ρόλος των αποαδενυλασσών.....	18
1.7	Η αποαδενυλάση της νοκτουρνίνης.....	24
2.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	27
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
3.1	Παραγωγή σπορόφυτων <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
3.2	Μέτρηση μήκους ριζικού συστήματος.....	31
3.3	Απομόνωση ολικού RNA από φυτικού ιστούς.....	31
3.4	Απομάκρυνση DNA από τα δείγματα ολικού RNA με DNase I (με απενεργοποίηση του ενζύμου).....	32
3.5	Απομάκρυνση DNA από τα δείγματα ολικού RNA με DNase I (με καθαρισμό με χρήση φαινόλης).....	33
3.6	Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας δειγμάτων.....	33
3.7	Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	34
3.8	Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.....	35
3.9	Αντίστροφη μεταγραφή του mRNA σε cDNA.....	36
3.10	Πρωτόκολλο PCR πραγματικού χρόνου.....	37
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
4.1	Μακροσκοπικά αποτελέσματα.....	40
4.2	Αποτελέσματα βιοχημικών αναλύσεων.....	45
4.2.1	Αποτελέσματα απομόνωσης ολικού RNA.....	45
4.2.2	Αποτελέσματα αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου.....	50
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	61
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα φυτά είναι οργανισμοί, των οποίων η φυσιολογία της δομής, των λειτουργιών και της συμπεριφοράς είναι διαφορετική σε σχέση με τους άλλους ζωντανούς οργανισμούς και για να γίνει κατανοητή χρειάζεται μία διανοητική μετάθεση από την μεριά μας. Τα φυτά διαθέτουν όλες εκείνες τις βιολογικές συνιστώσες, που χαρακτηρίζουν την συμπεριφορά τους. Τα φυτά αντιλαμβάνονται τον περιβάλλοντα χώρο, ανιχνεύουν και αποκρίνονται ανάλογα στα ερεθίσματα που δέχονται, ρυθμίζουν κατάλληλα τη βιοχημεία τους και τη φυσικοχημεία του περιβάλλοντός τους, τρέφονται, αναπτύσσονται, διαφοροποιούνται, και αναπαράγονται.

Η Βιοτεχνολογία Φυτών είναι ένας νέος επιστημονικός κλάδος, ο οποίος προέκυψε στα τέλη της δεκαετίας του '80 από το συνδυασμό της Μοριακής Βιολογίας, των τεχνικών του ανασυνδυασμένου DNA και τη Βιοχημεία και Φυσιολογία Φυτών. Οι στόχοι που έθεσε η Βιοτεχνολογία Φυτών ήταν η δημιουργία νέων ποικιλιών με αυξημένη ανθεκτικότητα και απόδοση, η ενσωμάτωση κάποιων επιθυμητών χαρακτηριστικών και η ανάπτυξη καλλιεργειών, που θα ανθίστανται σε ασθένειες, ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα.

Η Μοριακή Βιολογία μας έδωσε πολύτιμες πληροφορίες για τα πρωτεϊνικά προϊόντα ορισμένων γονιδίων των φυτών, τα οποία λειτουργούν ως διακόπτες αφύπνισης ή λήθαργου άλλων γονιδίων. Τα προϊόντα κάποιων γονιδίων μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση κάποιων άλλων γονιδίων. Τα προϊόντα αυτά αποκαλούνται μεταγραφικοί παράγοντες. Το φυτό *Arabidopsis thaliana* διαθέτει περίπου 1500 γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες μεταγραφής. Η έκφραση διαφόρων γονιδίων επηρεάζεται από τα ρυθμιστικά αναπτυξιακά και περιβαλλοντικά σήματα και την εφαρμογή κωδικονίων στα που λαμβάνουν τα φυτά.

Στην εργασία αυτή δίνεται έμφαση στη μελέτη έκφρασης του γονιδίου *HESPI* του φυτού *Arabidopsis thaliana* σε αβιοτικές συνθήκες καταπόνησης. Η εργασία χωρίζεται σε πέντε κύρια κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται μία εισαγωγή όσον αφορά την έκφραση διαφόρων γονιδίων και τους μηχανισμούς παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου υπό την επίδραση αλατότητας διαφορετικής συγκέντρωσης, ακραίων θερμοκρασιών περιβάλλοντος, και ξενοβιοτικών ουσιών. Επίσης, περιγράφεται ο ρόλος της *HESPI* σε σχέση με το ομόλογο της νοκτουρνίνης, που ελέγχεται από τον κερκάδιο ρυθμό. Η *HESPI* είναι η πρώτη κερκάδια ελεγχόμενη αποαδενυλάση στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Στο δεύτερο κεφάλαιο αναπτύσσονται με αρκετή λεπτομέρεια οι βασικές μεθοδολογίες που ακολουθήθηκαν στη φάση της πειραματικής διαδικασίας. Στα επόμενο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εργασίας, τα οποία τεκμηριώνονται διασταυρούμενα με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητικών εργασιών στο κεφάλαιο της συζήτησης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ρόλος της αποαδενυλάσης της νοκτουρνίνης στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (με την κωδική ονομασία HESP1) δεν είναι ακόμη γνωστός, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι ελέγχεται από τον κιρκάδιο ρυθμό και δρα στο επίπεδο αποικοδόμησης του mRNA. Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν φυτά άγριου τύπου και γενετικώς τροποποιημένα (*hesp1*) στις ακόλουθες περιπτώσεις καταπονήσεων: σε αλατότητα διαφορετικής συγκέντρωσης, σε ακραίες θερμοκρασίες περιβάλλοντος, και σε διαφορετικές δόσεις ρυπαντή (τύπου paraquat). Οι αβιοτικές καταπονήσεις δημιουργούν συνθήκες ισχυρής επιλεκτικής πίεσης, προκαλώντας μοριακές, βιοχημικές, και φυσιολογικές αντιδράσεις. Τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά έδειξαν ανοχή στη μεταχείριση με 50 mM NaCl. Για το λόγο αυτό, ακολούθησε περαιτέρω διερεύνηση της έκφρασης του γονιδίου *HESP1*, για τη συγκέντρωση των 50 mM NaCl καθώς και για το μισό αυτής (δηλαδή, τα 25 mM NaCl). Αρχικά, από το μοριακό έλεγχο επιβεβαιώθηκε ότι το γονίδιο *HESP1* υποεκφράζεται στα φύλλα των γενετικώς τροποποιημένων φυτών (*hesp1*), και στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *OXT6-2* και *ADH2* σε φυτά αγρίου τύπου και σε γενετικώς τροποποιημένα (*hesp1*), και βρέθηκε ότι τα γονίδια αυτά υπερεκφράζονται στα φυτά (*hesp1*) παρουσία 25mM NaCl. Επομένως, η σίγαση του γονιδίου *HESP1* στα γενετικώς τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis thaliana* επάγει την έκφραση των γονιδίων *OXT6-2* και *ADH2*, που συμβάλλουν στην ανοχή των φυτών σε συνθήκες αύξησης του NaCl.

ABSTRACT

The role of deadenylase of the noctornin in the *Arabidopsis thaliana* (with code name HESP1) is not still known; however clues exist that it is controlled by the circadian clock and act in the level of the mRNA degradation. In this thesis, wild-type plants and mutants (*hesp1*) were studied in the following cases: in salinity stress conditions, high and low temperature treatments, and in different contradictions of methyl viologen (type paraquat). Abiotic stresses create treaties of powerful selective pressure, causing molecular, biochemical, and physiologic reactions. Mutants (*hesp1*) showed tolerance in the treatment with 50 mM NaCl. For this reason, it followed further investigation of expression of gene *HESP1*, for the concentration of 50 mM NaCl as well as for the 25 mM NaCl. Initially, from the molecular analysis it was confirmed that the gene *HESP1* subexpressed in leaves of mutants (*hesp1*), and then the expression of genes *OXT6-2* and *ADH2* in wild type plants and mutant was studied and it was found that genes are overexpressed in the plants *hesp1* presence of 25mM NaCl. Therefore, the silence of gene *HESP1* in the mutants of *Arabidopsis thaliana* induce the expression of genes *OXT6-2* and *ADH2* that contribute to the plants tolerance in increased treaties of NaCl.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ποικιλομορφία των συνθηκών του περιβάλλοντος, εκθέτει τα φυτά σε μία πληθώρα καταπονήσεων. Οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις δημιουργούν συνθήκες ισχυρής επιλεκτικής πίεσης, προκαλώντας μοριακές, βιοχημικές, φυσιολογικές και μορφολογικές αντιδράσεις, που συντελούν στην προσαρμογή και την επιβίωση των φυτών στις δυσμενείς συνθήκες. Οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις διακρίνονται σε αβιοτικές και βιοτικές (Ζίφα κ.ά., 2008). Οι σημαντικότερες αβιοτικές καταπονήσεις είναι η έλλειψη ή η περίσσεια νερού, η υψηλή αλατότητα, η υψηλή ακτινοβολία, τα βαρέα μέταλλα καθώς και οι πολύ υψηλές ή πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, δηλαδή προκαλούνται από ένα πλεόνασμα ή μία έλλειψη στο φυσικό και χημικό περιβάλλον. Οι βιοτικές καταπονήσεις προκαλούνται από άλλους οργανισμούς. Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί αντιδρούν σε αυτές τις αλλαγές του περιβάλλοντος. Στα φυτά, η αντίδραση στα ερεθίσματα δεν είναι τόσο εμφανής. Όμως εξαιτίας της ακινησίας τους, τα φυτά πρέπει να προσαρμόζονται συνεχώς σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών, μέσω αναπτυξιακών και φυσιολογικών μηχανισμών.

1.1 Καταπόνηση στην αλατότητα και η αντίδραση των φυτών

Η αλατότητα είναι ένα φαινόμενο που συναντούμαστε στη φύση εδώ και πολλούς αιώνες, πολύ πριν την εμφάνιση των ανθρώπων και της γεωργίας. Σύμφωνα με τον Zhu (2001) το 30% της παγκόσμιας καλλιεργήσιμης γης αντιμετωπίζει σήμερα προβλήματα υψηλής αλατότητας και στο μεγαλύτερο ποσοστό τα αίτια αλάτωσης των εδαφών είναι φυσικά (τοπικά πετρώματα, χαμηλή βροχόπτωση σε συνδυασμό με υψηλή εξάτμιση). Επίσης, ένα μεγάλο ποσοστό των καλλιεργούμενων εδαφών καθίστανται αλατούχα εξαιτίας της λανθασμένης διαχείρισής τους από τον άνθρωπο (υπερβολική λίπανση σε συνδυασμό με περιορισμένη άρδευση ή χρήση αλατούχου αρδευτικού νερού). Οι Ghassemi et al., (1995) αναφέρουν ότι η αλατότητα του εδάφους είναι ένα από τα μεγαλύτερα και κυριότερα προβλήματα που μετατρέπει τα γόνιμα και παραγωγικά εδάφη σε άγονα και συχνά οδηγεί στην απώλεια του φυσικού περιβάλλοντος και μείωση της βιοποικιλότητας. Οι αρνητικές επιδράσεις της αλατότητας των εδαφών είναι δυνατόν να αποφευχθούν με την υιοθέτηση ειδικών μέτρων όπως: η βελτίωση της ποιότητας του αρδευτικού νερού, η εξυγίανση των αλατούχων εδαφών, η χρήση των κατάλληλων καλλιεργητικών τεχνικών. Όμως τα ανωτέρω μέτρα αφενός είναι υψηλού κόστους και αφετέρου δεν δίνουν μία μόνιμη λύση στο χρόνιο πρόβλημα της αλατότητας εδαφών. Σύμφωνα με τους Dasgan et al., (2002) την ορθότερη λύση αποτελεί η επιλογή και η καλλιέργεια φυτών ανθεκτικών στην αλατότητα.

Τα φυτά ανάλογα με την ανθεκτικότητά τους στην αλατότητα (NaCl) διακρίνονται σε ευπαθή, μετρίως ανθεκτικά και ανθεκτικά. Τα ανθεκτικά και τα μετρίως ανθεκτικά στη αλατότητα αποτελούν μόλις το 2% των φυτών, ενώ το υπόλοιπο 98% των φυτών είναι ευπαθή. Η υπάρχουσα γνώση για τη φύση των βλαβών που προξενεί η αυξημένη συγκέντρωση αλάτων στα φυτά είναι περιορισμένη. Γενικά, γνωρίζουμε ότι η υψηλή συγκέντρωση αλάτων στα φυτά είναι ένας περίπλοκος περιβαλλοντικός αναστολέας που προκαλεί: α) ωσμωτική καταπόνηση λόγω της μείωσης του εξωτερικού υδατικού δυναμικού του εδάφους, β) ιοντική ανισορροπία λόγω συσσώρευσης ιόντων, τα οποία

είναι τοξικά σε υψηλές συγκεντρώσεις, γ) τροφική καταπόνηση λόγω έλλειψης των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων όπως είναι το κάλιο (K^+) και το ασβέστιο (Ca^{2+}), και δ) οξειδωτική καταπόνηση λόγω της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου.

Η συγκέντρωση αλάτων εξωτερικά των ριζών μειώνει τη διαθεσιμότητα του νερού στο φυτά, με επακόλουθο τα φυτά να υφίστανται υδατική καταπόνηση (Munns, 1993). Επιπλέον, για να μπορέσουν οι ρίζες να προσλάβουν νερό από το έδαφος πρέπει τα φύλλα να αποκτήσουν ακόμη πιο αρνητικό δυναμικό με σκοπό να διατηρήσουν την ισορροπία του υδατικού δυναμικού στο σύστημα έδαφος-ρίζα-φυτό. Επομένως, η διατάραξη της υδατικής σχέσης μεταξύ εδάφους και φυτού, αρχικά έχει σαν αποτέλεσμα τη γρήγορη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των φύλλων και των ριζών. Στη συνέχεια, μετά τη σταθεροποίηση του μειωμένου ρυθμού ανάπτυξης των φυτών, παρατηρείται μερική ανάκτηση του ρυθμού ανάπτυξης των φύλλων ή και σε ορισμένες περιπτώσεις η πλήρης ανάκτηση των ριζών (Yeo et al., 1991). Στο στάδιο αυτό, δεν είναι ακόμη κατανοητό εάν ο ρυθμός ανάπτυξης των φυτών οφείλεται στον έλεγχο που ασκούν οι ρυθμιστές ανάπτυξης ή άλλοι παράγοντες όπως είναι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός ή η υδατική κατάσταση. Σύμφωνα με τους Munns et al. (2000) ο έλεγχος του ρυθμού ανάπτυξης των φυτών οφείλεται σε ορισμένους ρυθμιστές ανάπτυξης, που εντοπίζονται στις ρίζες των φυτών.

Όταν τα άλατα απορροφούνται από το φυτό έχουν σαν αποτέλεσμα την υπερσυγκέντρωσή τους στους ιστούς των φυτών, προκαλώντας ιοντική καταπόνηση. Το Cl^- συγκεντρώνεται σε νεαρούς βλαστούς και σε φύλλα προκαλώντας νέκρωση των κυττάρων. Η ιοντική ανισορροπία μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και πρόωρη φυλλόπτωση. Η μειωμένη φωτοσύνθεση οφείλεται στο κλείσιμο των στομάτων με αποτέλεσμα τη μειωμένη αφομοίωση CO_2 (Zhu, 2001). Σύμφωνα με τους Neill et al. (2002) το αμψισσικό οξύ ενεργοποιεί την παραγωγή H_2O_2 μέσω της δράσης της NAD(P)H οξειδάσης στα καταπρακτικά κύτταρα με τα οποία ρυθμίζεται το άνοιγμα και το κλείσιμο των στομάτων.

Η συσσώρευση αλάτων προκαλεί διάφορες μεταβολικές δυσλειτουργίες παρεμποδίζοντας την απορρόφηση στοιχείων του μεταβολισμού (Hautala et al., 1992). Όσο αυξάνονται οι συγκεντρώσεις Na^+ τόσο μειώνονται οι συγκεντρώσεις K^+ και Ca^{2+} . Τα ιόντα K^+ και Ca^{2+} έχουν μεγάλη σημασία για τις διάφορες μεταβολικές διαδικασίες. Οι Gisbert et al. (2000) ανακάλυψαν ότι σε γενετικώς τροποποιημένα φυτά ντομάτας η υπερέκφραση του γονιδίου *HAL1* (το γονίδιο αυτό ρυθμίζει τη μεταφορά K^+) συνδέεται με αντοχή των φυτών στην αλατότητα. Αντιθέτως, τα αντίστοιχα φυτά άγριου τύπου, τα οποία παρουσίασαν ευαισθησία στην αλατότητα, η συγκέντρωση K^+ σε σχέση με το Na^+ δεν ήταν τόσο διαφοροποιημένη όπως στα γενετικώς τροποποιημένα. Η μεγάλη συγκέντρωση Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα δεν είναι γνωστό εάν οφείλεται στην αλατότητα ή αποτελεί ένα γενικό σήμα καταπόνησης. Σύμφωνα με τους Geisler et al. (2000) η αντοχή στην αλατότητα ρυθμίζεται από ενδοκυτταρικά σήματα Ca^{2+} μέσω ενός μονοπατιού, το οποίο έχει ομοιότητες με την καλσινευρίνη. Τμήματα μεταφοράς του σήματος του Ca^{2+} αποτελούν κανάλια και μονοπάτια Ca^{2+} που υπάρχουν στη μεμβράνη των χυμοτοπίων. Η περαιτέρω αλυσίδα αποκωδικοποίησης του σήματος Ca^{2+} δεν είναι γνωστή.

Βλάβες προκαλούνται όχι μόνο λόγω της υπερσυσσώρευσης ιόντων Cl^- και Na^+ στα φυτά αλλά και από την υπερωσμωτική καταπόνηση (Martin & Koebner, 1995). Η αυξημένη συγκέντρωση ιόντων στο εξωτερικό του κυττάρου έχει ισχυρές ωσμωτικές

επιδράσεις και στα κύτταρα. Τα ιόντα Na^+ εισέρχονται στα κύτταρα μέσα από τα κανάλια K^+ ενώ το νερό εξέρχεται από τα κανάλια νερού της κυτταρικής μεμβράνης. Σύμφωνα με τους Allkakhverdiev et al. (2000) η καταπόνηση φυτικών κυττάρων στην αλατότητα μείωσε τον όγκο του κυτταροπλάσματος κατά 25 %. Τα φυτά στην προσπάθειά τους να αντιδράσουν σε αυτού του είδους την καταπόνηση, προσπαθούν να επιτύχουν ωσμωτική και υδατική ομοιόσταση. Για το λόγο αυτό συσσωρεύουν διάφορους ωσμωλύτες στο κυτταρόπλασμα, ώστε να μειωθεί το υδατικό δυναμικό και να εμποδιστεί η πρόσληψη νερού που περιέχει υψηλά ποσοστά σε αλάτι. Πρόκειται για πολυαμίνες όπως είναι η προλίνη. Η προλίνη, εκτός όλων των άλλων λειτουργιών, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο ως ρυθμιστής της ωσμωτικής πίεσης (Lefevre et al., 2001).

Η καταπόνηση από την αυξημένη αλατότητα συνοδεύεται από οξειδωτική καταπόνηση με συνέπεια δευτερογενείς βλάβες στα κύτταρα (Panda & Upadhyay, 2004). Η οξειδωτική καταπόνηση οφείλεται στην ταχεία συγκέντρωση ενεργών μορφών οξυγόνου που προκαλούν βλάβες σε πρωτεΐνες και DNA. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι ενεργές μορφές οξυγόνου απομακρύνονται με επιτυχία από τα αντιοξειδωτικά συστήματα των φυτών. Αντιθέτως, υπό την επίδραση περιβαλλοντικών καταπονήσεων, η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου είναι πολύ μεγαλύτερη από την ικανότητα των αντιοξειδωτικών συστημάτων των φυτών. Οι Sairam et al. (2002) διαπίστωσαν ότι η αντοχή στην αλατότητα οφείλεται σε αυξημένη απόδοση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού και σε χαμηλά επίπεδα H_2O_2 . Αποτελέσματα που προέκυψαν από πειράματα των Borsani et al. (2001) έδειξαν ότι γενετικά τροποποιημένα φυτά, τα οποία δεν παρήγαγαν σαλικυλικό οξύ (δηλαδή η καταλάση διατηρούσε την δραστηριότητά της) είχαν αυξημένη ανθεκτικότητα στη συγκέντρωση αλάτων. Ο Zhu, (2001) παρατήρησε ότι η ενίσχυση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού δια της υπερέκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως είναι η καταλάση, η SOD, και η APO έχει σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση του μηχανισμού προστασίας των φυτών έναντι της αλατότητας. Επίσης, και ο Ανδρώνης, (2003) μελετώντας γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η αυξημένη ενεργότητα του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μπορεί να προσφέρει μερική προστασία του φυτού σε καθεστώς καταπόνησης από αλατότητα.

Οι βλάβες των φυτών που οφείλονται στην αυξημένη αλατότητα ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του φυτού, τη συγκέντρωσή τους στο θρεπτικό διάλυμα και τη διάρκεια παρουσίας τους σ' αυτό. Η συμπεριφορά των φυτών στην αλατότητα και ο βαθμός αντοχής τους σε αυτήν εξαρτάται από την ικανότητά τους να διαχειρίζονται τα ιόντα. Βασική προτεραιότητα των φυτών είναι η επαναφορά της ιοντικής ομοιόστασης (Miller et al., 2010). Ορισμένα είδη φυτών που είναι ανθεκτικά στην αλατότητα για να αποφύγουν τη συσσώρευση ιόντων Na^+ στα φύλλα αποβάλλουν το Na^+ από τους βλαστούς. Ο Sussman (1994) είναι από τους πρώτους που διαπίστωσαν ότι ο βασικότερος μηχανισμός απομάκρυνσης των ιόντων Na^+ ρυθμίζεται από τις H^+ -ATPάσες της κυτταρικής μεμβράνης. Οι H^+ -ATPάσες αξιοποιούν την παραγόμενη ενέργεια από την υδρόλυση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) για να αντλήσουν H^+ και να διαμορφώσουν ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό. Η μετακίνηση αυτή προκαλεί τη λειτουργία αντιμεταφορέων Na^+/H^+ , η οποία με τη σειρά της προκαλεί τη συζευγμένη έξοδο των ιόντων Na^+ . Επίσης, τη λειτουργία των αντιμεταφορέων Na^+/H^+ σε διάφορα είδη φυτών περιγράφει και ο Blumwald (2000). Σύμφωνα με τους Gollmack & Dietz (2001) οι H^+ -ATPάσες που εντοπίζονται στις εσωτερικές μεμβράνες επιτυγχάνουν κυτταροπλασματική συγκέντρωση ιόντων Na^+ σε μη τοξικά επίπεδα με την

διαμερισματοποίηση αυτών εντός των χυμοτοπίων. Ο Zhu (2001) κλωνοποίησε γονίδια υπερ-ευαισθησίας στην αλατότητα (Salt Overly Sensitive, SOS) σε φυτά *Arabidopsis* και διαπίστωσε τη λειτουργία ενός ρυθμιστικού μονοπατιού, το οποίο διασφαλίζει ιοντική ομοιόσταση. Πρόκειται για τρία γονίδια *SOS* (*SOS1*, *SOS2*, και *SOS3*). Το γονίδιο *SOS1* κωδικοποιεί έναν αντιμεταφορέα Na^+/H^+ επί της κυτταρικής μεμβράνης, το γονίδιο *SOS2* κωδικοποιεί μία πρωτεϊνική κινάση σερίνης-θυροσίνης, και το γονίδιο *SOS3* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη δέσμευσης Ca^{2+} . Ο μηχανισμός δράσης και αλληλεπίδρασης των τριών γονιδίων βρίσκεται υπό διερεύνηση. Άλλα φυτά διαθέτουν μηχανισμούς έγχυσης, που διευκολύνουν την αντικατάσταση των ιόντων Na^+ με ιόντα K^+ . Σύμφωνα με τους Dasgan et al., (2002) η ανθεκτικότητα των φυτών στην αλατότητα συνδέεται στενά με τους λόγους K^+/Na^+ και $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ στους βλαστούς.

Οι Bray et al. (2000) περιγράφουν τους μηχανισμούς αντοχής των φυτών στην αλατότητα διακρίνοντάς τους ως συνεχείς και επαγόμενους. Στους συνεχείς ανήκουν οι μηχανισμοί που στηρίζονται στη δράση ενζύμων και πρωτεϊνών, τα γονίδια των οποίων εκφράζονται διαρκώς και ανεξάρτητα από τις υφιστάμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Στους επαγόμενους ανήκουν εκείνοι οι μηχανισμοί που βασίζονται σε ένζυμα ή πρωτεΐνες, τα γονίδια των οποίων εκφράζονται μόνο όταν το φυτό υποστεί αιφνιδίως μία ακραία περιβαλλοντική κατάσταση ή επάγεται η υπερέκφρασή τους. Με τους επαγόμενους μηχανισμούς αντοχής, τα φυτά τροποποιούν το μεταβολισμό τους κατάλληλα, προκειμένου να προσαρμοστούν στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ωστόσο, γνωρίζουμε ελάχιστα για τη δυνατότητα της αλατότητας να επάγει τη σύνθεση ενεργών μορφών οξυγόνου στην αποπλαστική περιοχή και το ρόλο των αποπλαστικών αντιοξειδωτικών ουσιών (Hernandez et al., 2001).

1.2 Θερμική καταπόνηση των φυτών

Με εξαίρεση τα τροπικά δάση στα οποία οι κλιματικές συνθήκες παραμένουν σχετικά σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, οι θερμοκρασίες του φυσικού περιβάλλοντος ακολουθούν ευρείες διακυμάνσεις, συχνά ακραίες, είτε σε ημερήσια βάση (π.χ. έρημοι), είτε σε εποχική. Επίσης, παρατηρούνται ημερονύκτιες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας σε ορισμένα όργανα των φυτών. Είναι χαρακτηριστικό ότι κατά τη διάρκεια της νύκτας, οι ρίζες διαθέτουν την υψηλότερη θερμοκρασία, ενώ κατά τη διάρκεια της ημέρας, η περιοχή του βλαστού, η οποία βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια του εδάφους, είναι αυτή που διαθέτει αντίστοιχα την υψηλότερη θερμοκρασία. Με βάση τα όρια θερμοκρασίας εντός των οποίων αναπτύσσονται οι φυτικοί οργανισμοί διακρίνονται: α) ψυχρόφιλοι (0°C - 20°C), β) μεσόφιλοι (10°C - 30°C) και γ) θερμόφιλοι (30°C - 65°C).

Οι ακραίες θερμοκρασίες επιφέρουν δραματικές αλλαγές στην κινητική ενέργεια των μορίων. Οι χαμηλές θερμοκρασίες προκαλούν ακαμψία των μεμβρανών και αύξηση της απαιτούμενης ενέργειας ενεργοποίησης των βιοχημικών αντιδράσεων. Η μετάβαση του νερού από την υγρή στη στερεή κατάσταση σε συνθήκες παγετού, αποτελεί ένα κρίσιμο συμβάν για τη διατήρηση των ζωτικών λειτουργιών των κυττάρων. Από την άλλη πλευρά οι υψηλές θερμοκρασίες επιταχύνουν τις κινήσεις των μορίων, με αποτέλεσμα να χαλαρώνουν οι δεσμοί των μεγαλομορίων και να αυξάνεται η ρευστότητα των μεμβρανών.

Το ψύχος αποτελεί παράγοντα καταπόνησης για μεσόφιλους και θερμοφίλους φυτικούς οργανισμούς. Ο όρος ψύχος αντιπροσωπεύει το εύρος θερμοκρασιών μεταξύ 0°C και 15°C. Φυτά τα οποία έχουν προσαρμοστεί σε θερμά κλίματα, στα οποία συγκαταλέγονται πολλά καλλιεργούμενα, χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα σε χαμηλές θερμοκρασίες και τα συμπτώματα καταπόνησης εμφανίζονται εάν εκτεθούν σε θερμοκρασίες κάτω από 10°C. Τα συμπτώματα εξαρτώνται από το είδος, την ηλικία του φυτού και το είδος του ιστού του οργάνου, καθώς και τη διάρκεια έκθεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες.

Για να μπορέσουν τα φυτά να προσαρμοστούν σε χαμηλές θερμοκρασίες απαιτείται η συσσώρευση διαλυτών σακχάρων. Το κυριότερο σάκχαρο θεωρείται ότι είναι η σακχαρόζη (Guy et al., 1992). Σύμφωνα με τους Jeong & Housley (1990) και Geigenberger et al. (1995) η αυξημένη συσσώρευση σακχαρόζης στους φωτοσυνθετικούς και μη-φωτοσυνθετικούς ιστούς συνδέεται με την αυξημένη δραστηριότητα της συνθάσης της 6-φωσφοροσακχαρόζης (SPS). Η συνθάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης είναι ένα διμερές ή τετραμερές μόριο με μονομερή 138 kDa, που καταλύει μία σημαντική και ρυθμιζόμενη αντίδραση στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της σακχαρόζης (Park et al., 2008). Όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων (*At5g20280*, *At5g11110*, *At4g10120* και *At1g04920*) του *Arabidopsis thaliana*, έχει βρεθεί ότι όλα τα γονίδια της SPS παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση μετά από την έκθεση των φυτών σε συνθήκες ψύχους. Η μεγαλύτερη έκφραση εντοπίζεται στο γονίδιο *At5g11110*, του οποίου η έκφραση βρέθηκε να είναι οκτώ φορές μεγαλύτερη από ότι στο φυτό μάρτυρα.

Κατά τον εγκλιματισμό του φυτού *Arabidopsis thaliana* στο ψύχος παρατηρούνται μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων. Για την ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών θεωρείται υπεύθυνη μια οικογένεια ρυθμιστικών πρωτεϊνών, οι πρωτεΐνες CBF/DREB1. Οι ενεργοποιητές αυτοί προσδένονται σε ειδικό προαγωγέα, το ρυθμιστικό στοιχείο C-repeat (CRT) (dehydration responsive element) (DRE). Οι πρωτεΐνες CBF/DREB1 είναι δυνατό να επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων τα οποία ελέγχονται από το ρυθμιστικό στοιχείο CRT/DRE σε σύντομο χρονικό διάστημα, δίχως να μεσολαβήσει έκθεση σε ψύχος. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα γονίδια αυτά ενεργοποιούνται όχι μόνο παρουσία χαμηλών θερμοκρασιών, αλλά και οσμωτικής υδατικής καταπόνησης, δηλαδή παραγόντων καταπόνησης που έχουν κοινό αποτέλεσμα την αφυδάτωση των ιστών. Το αισθητήριο της αντίληψης του ερεθίσματος "χαμηλή θερμοκρασία" δεν είναι ακόμη γνωστό, ωστόσο θεωρείται βέβαιο ότι σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος παίζει η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και ορισμένες κινάσες πρωτεϊνών.

Επίσης, οι υψηλές θερμοκρασίες του περιβάλλοντος αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα καταπόνησης των φυτικών οργανισμών. Το ανώτατο όριο ανοχής για τα περισσότερα φυτά είναι η θερμοκρασία των 50°C-55°C. Η ζημιογόνος επίδραση των υψηλών θερμοκρασιών εστιάζεται κυρίως στις ιδιότητες των μεμβρανών. Οι υψηλές θερμοκρασίες επηρεάζουν τόσο την φωτοσύνθεση, όσο και την αναπνοή, ωστόσο η αναπνοή παρεμποδίζεται σε σαφώς υψηλότερες θερμοκρασίες εν συγκρίσει με τη φωτοσύνθεση. Η υδατική κατάσταση των ιστών επηρεάζει την αντοχή τους στις υψηλές θερμοκρασίες.

Στους περισσότερους φυτικούς οργανισμούς η έκθεση για σύντομο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασίες οι οποίες υπερβαίνουν το βέλτιστο, επιφέρει παρεμπόδιση της σύνθεσης των περισσότερων πρωτεϊνικών μορίων, επάγει ωστόσο τη σύνθεση μιας οικογένειας πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους, γνωστών ως πρωτεΐνες θερμικού

πλήγματος (Heat Shock Proteins, HPS). Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες, ανεξάρτητα από το φυτικό είδος στο οποίο συντίθενται, ενώ η λειτουργία τους συνδέεται άμεσα με την ικανότητα επιβίωσης σε υψηλές θερμοκρασίες. Το χρονικό διάστημα έκθεσης κυμαίνεται μεταξύ των 15 min και έως λίγων ωρών σε θερμοκρασίες υψηλότερες κατά 5°C έως 15°C από την κανονική θερμοκρασία ανάπτυξης. Σε ιστούς οι οποίοι δεν βρίσκονται υπό συνθήκες καταπόνησης οι πρωτεΐνες θερμικού πλήγματος δεν ανιχνεύονται ή ανιχνεύονται σε ίχνη. Η σύνθεσή τους είναι ταχεία, ενώ τα υπεύθυνα mRNAs μπορεί να κάνουν την εμφάνισή τους μέσα σε 3 min έως 5 min και οι HPSs μέσα σε 30 min από την εφαρμογή του θερμικού πλήγματος.

Με βάση το μοριακό τους βάρος, οι πρωτεΐνες αυτές διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: α) την HPS 90, β) την HPS 70 και γ) την ετερογενή ομάδα, η οποία περιλαμβάνει πρωτεΐνες με μοριακό βάρος μεταξύ των 17 και 28 kDa. Μεταξύ των πρωτεϊνών θερμικού πλήγματος περιλαμβάνεται και η ουμπικουΐνη, της οποίας ο ρόλος αφορά τη σήμανση πρωτεϊνικών μορίων τα οποία θα υποστούν πρωτεολυτική αποδόμηση. Ορισμένες πρωτεΐνες της κατηγορίας HPS 70 παίζουν τον ρόλο τσαπερονινών. Πρόκειται για μια κατηγορία πρωτεϊνών οι οποίες υπό κανονικές συνθήκες κατευθύνουν τη συναρμολόγηση ετερογενών πρωτεϊνικών συμπλόκων. Μια τέτοια πρωτεΐνη παίρνει μέρος στη συναρμολόγηση των μικρών και μεγάλων υπομονάδων της RubisCo στους χλωροπλάστες. Φαίνεται λοιπόν ότι οι σύνθεση της κατηγορίας αυτής υπό συνθήκες θερμικού πλήγματος αφορά την προστασία πρωτεϊνικών συμπλόκων από την αποσύνθεση λόγω υψηλών θερμοκρασιών.

1.3 Καταπόνηση των φυτών από ξενοβιοτικές ουσίες

Τα φυτά υφίστανται καταπονήσεις από πληθώρα ξενοβιοτικών ουσιών όπως παθογόνοι μικροοργανισμοί, άλλα φυτά, ή χημικές ενώσεις φυτοφαρμάκων, και για το λόγο αυτό ανέπτυξαν μηχανισμούς άμυνας, οι οποίοι μέσω ενζυμικών αντιδράσεων μεταβολίζουν τις ουσίες αυτές και τις καθιστούν μη τοξικές.

Σύμφωνα με τους Yuan et al. (2007) ο μεταβολισμός των φυτοφαρμάκων διακρίνεται σε τέσσερις διαδοχικές φάσεις. Στην πρώτη φάση πραγματοποιούνται βασικές αντιδράσεις μετατροπής του μορίου των χημικών ενώσεων των φυτοφαρμάκων, όπως είναι η οξειδωση, αναγωγή, υδροξυλίωση ή υδρόλυση, για να μειωθεί η τοξικότητά τους, να αυξηθεί η υδροφιλικότητά τους και να γίνει δυνατή η περαιτέρω τροποποίησή τους. Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει το σχηματισμό συμπλόκων του τροποποιημένου μορίου της χημικής ένωσης με υδρόφιλα μόρια όπως σάκχαρα, αμινοξέα ή το τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης, ώστε η χημική ένωση να καταστεί πλέον μη τοξική και να γίνει δυνατή η αναγνώρισή της από τους μεταφορείς του κυττάρου. Η τρίτη φάση περιλαμβάνει την ενεργή μεταφορά και εναπόθεση των συμπλόκων μέσω εξειδικευμένων διαμεμβρανικών μεταφορέων στα χυμοτόπια. Στην τελευταία φάση οι μεταβολίτες των φυτοφαρμάκων που βρίσκονται στο χυμοτόπιο, αποδομούνται περαιτέρω και σε ορισμένες περιπτώσεις απεκκρίνονται από το χυμοτόπιο και προσροφώνται στο κυτταρικό τοίχωμα ως αδρανή συστατικά (Wolf et al., 1996; Rea et al., 1998).

Η αλυσίδα των ενζυμικών αντιδράσεων περιλαμβάνει πολλές οικογένειες ενζύμων, όπως είναι οι CytP450 μονοοξυγονάσες, μεταφοράσες της γλουταθειόνης, γλυκοζυλτρανσφεράσες, και ATP-εξαρτώμενους διαμεμβρανικούς μεταφορείς. Οι

μεταφορές της γλουταθειόνης είναι μια πολυπληθής ετερογενής οικογένεια πολυλειτουργικών ισοενζύμων που την συναντούμε σε πολλούς οργανισμούς. Έχουν καταλυτική δράση, εξαρτώμενη από τη γλουταθειόνη της υπεροξειδάσης ανάγοντας τα υπεροξειδία των λιπαρών οξέων στις λιγότερο τοξικές αλκοόλες, συμβάλλοντας στην αντιμετώπιση της οξειδωτικής καταπόνησης. Οι μεταφορές της γλουταθειόνης με την απομόνωση μίας πλειάδας αλληλουχιών από πολλά φυτικά είδη ταξινομούνται με βάση τη δομή του γονιδίου (αριθμό ιντρονίων), την αλληλουχία των αμινοξέων, και την ύπαρξη συντηρημένων αμινοξικών καταλοίπων σε έξι διαφορετικές κλάσεις: Phi (F), Tau (U), Theta (T), Zeta (Z), Lambda (L) και DHAR (Droog, 1997; Edwards et al., 2000). Η ολοκλήρωση της αλληλούχησης του γονιδιώματος του φυτού *Arabidopsis thaliana* μας έδωσε σημαντικές πληροφορίες για την ύπαρξη των ισοενζύμων των κλάσεων των μεταφορών της γλουταθειόνης. Για παράδειγμα στο *Arabidopsis thaliana*, τα 52 γονίδια που κωδικοποιούν τις μεταφορές της γλουταθειόνης αντιστοιχούν σε 13 Phi, 28 Tau, 3 Theta, 2 Lambda και 4 DHAR ισοένζυμα. Η διασπορά των γονιδίων των μεταφορών της γλουταθειόνης δεν είναι τυχαία στο γένωμα, αλλά η μεγάλη πλειοψηφία τους βρίσκεται σε ομάδες σε μικρά χρωμοσωμικά τμήματα. Η επαγωγή στην έκφραση των μεταφορών της γλουταθειόνης παρατηρείται όταν το φυτό βρίσκεται υπό καταπόνηση οποιασδήποτε μορφής (αβιοτικής ή οξειδωτικής). Χαρακτηριστική είναι η υψηλή εξειδίκευση στην επαγωγή των ισοενζύμων των μεταφορών της γλουταθειόνης, καθώς κάποια εκφράζονται διαρκώς, κάποια άλλα σε φυσιολογικές συνθήκες δεν εκφράζονται καθόλου, ενώ ορισμένα που επάγονται από συγκεκριμένα ερεθίσματα, δεν αντιδρούν σε κάποια άλλα. Επίσης, οι μεταφορές της γλουταθειόνης εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, ανεξάρτητα από την παρουσία ξενοβιοτικών ουσιών, αυτό υποδεικνύει και άλλους βιολογικούς ρόλους, που μέχρι σήμερα δεν είναι κατανοητοί.

1.4 Ενεργές Μορφές οξυγόνου

Οι Ενεργές Μορφές Οξυγόνου (EMO) είναι χημικώς αντιδρώντα μόρια που περιέχουν ιόντα οξυγόνου, όπως το ενεργό οξυγόνο ($^1\text{O}_2$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το σουπεροξειδίο (O_2^-) και η υδροξυλική ρίζα (HO^\cdot). Κάτω από βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, οι EMO παράγονται σε χαμηλά επίπεδα σε οργανίδια όπως οι χλωροπλάστες, τα μιτοχόνδρια και peroxisomes. Εντούτοις, κατά τη διάρκεια διαφόρων περιβαλλοντικών καταπονήσεων, το ποσοστό παραγωγής τους είναι εντυπωσιακά υψηλό. Οι EMO παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλή αντίδραση λόγω της εμφάνισης ηλεκτρονίων διαφορετικού σθένους. Αυτό οδηγεί σε μια κατάσταση που είναι γνωστή ως οξειδωτική πίεση. Οι EMO είναι τοξικά μόρια ικανά να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη στις πρωτεΐνες, το DNA και τα λιπίδια (Apel & Hirt 2004).

Η συσσώρευση EMO κατά τη διάρκεια καταπόνησης εξαρτάται πολύ από την ισορροπία μεταξύ της παραγωγής και αποβολής των EMO (Mittler et al., 2004). Επίσης, εξαρτάται από τις αλλαγές στις συνθήκες περιβάλλοντος, τη δριμύτητα και τη διάρκεια της καταπόνησης, και τη δυνατότητα του ιστού να προσαρμόζεται γρήγορα στις ενεργειακές διαφορές. Στους χλωροπλάστες, ο περιορισμός στη σταθεροποίηση του CO_2 που συνδέεται με την υπερ-μείωση στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, είναι η κύρια αιτία της παραγωγής EMO. Η υπερ-μείωση στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των

μιτοχονδρίων είναι επίσης ένας σημαντικός μηχανισμός παραγωγής EMO κατά τη διάρκεια καταπόνησης (Davidson & Schiestl, 2001). Στα peroxisomes, H₂O₂ παράγεται όταν οξειδώνεται η glycolate σε glyoxylic οξύ κατά τη διάρκεια της φωτοαναπνοής (Mittler et al., 2004).

Οι EMO ως φυσικό υποπροϊόν μεταβολισμού του οξυγόνου παίζουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση του κυττάρου και στην ομοιόσταση. Η ανίχνευση σημάτων που προέρχονται από EMO σε διάφορες διαδικασίες των φυτών, έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης των γονιδίων άμυνας και αποκρίσεων προσαρμογής. Η έκθεση σε ερεθίσματα EMO προκαλεί την έκφραση γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης ενός συνόλου γονιδίων που κωδικοποιούν μια χαρακτηριστική σειρά αποτοξίνωσης των ενζύμων (Desikan et al., 2001; Vranova et al., 2002). Αυτή η αυξανόμενη έκφραση γονιδίων περιλαμβάνει πιθανώς ένα ή περισσότερα μονοπάτια σηματοδότησης, η διαμόρφωση των οποίων οδηγεί σε αλλαγές στη μεταγραφική δραστηριότητα ποικίλων γονιδίων που κωδικοποιούν την αποτοξίνωση των ενζύμων (Rennenberg & Polle, 1994; Mittler, 2002; Gadjev et al., 2006). Δομικά στοιχεία διάφορων συστημάτων ρύθμισης εμπλέκονται με τις αποκρίσεις των EMO. Ένα από αυτά είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs). Οι EMO ή οι χειρισμοί που αυξάνουν τις EMO ενεργοποιούν διάφορες MAPKs των φυτών, και επομένως οι EMO μπορούν να ενεργήσουν δια της ενεργοποίησης μιας ανώτερης κινάσης, της OXII (Rentel et al., 2004), που έχει προταθεί πρόσφατα, για να επιτρέψει επίσης στα παραγόμενα σήματα από λιπίδια να ενσωματωθούν μέσω μιας οξειδωτικής μονάδας σηματοδότησης, PDK1-OXII (Anthony et al., 2006). Επιπλέον, ο παράγοντας μεταγραφής (transcription factor) ZAT12, και μια πρωτεΐνη τύπου C2H2, εμπλέκονται στα πρόωρα βήματα απόκρισης των EMO του *Arabidopsis thaliana* σε αβιοτικές καταπονήσεις (Rizhsky et al., 2004; Davletova et al., 2005). Οι Davletova et al. (2005) διερεύνησαν περαιτέρω τη σχέση μεταξύ EMO και αλατότητας ή έλλειψης νερού, συγκρίνοντας την οσμωτική απόκριση και την απόκριση αλατότητας για είκοσι επτά αντίγραφα EMO απόκρισης που κωδικοποιούν τους παράγοντες μεταγραφής και άλλων σχετικών πρωτεϊνών σηματοδότησης, που ρυθμίζονται υψηλότερα στην *arx1* των φυτών κατά τη διάρκεια φωτο-οξειδωτικής καταπόνησης, καθώς επίσης και στα φυτά άγριου τύπου μετά από την επεξεργασία με H₂O₂, χρησιμοποιώντας το εργαλείο μετανάλυσης *Genevestigator* των Zimmermann et al. (2004). Και τα είκοσι επτά αντίγραφα παρουσίασαν σημαντική επαγωγή (≥ 2) τουλάχιστον σε ένα χρονικό σημείο της οσμωτικής καταπόνησης ή της καταπόνησης στην αλατότητα. Εντούτοις, οι διαφορές στο πρότυπο απόκρισης μεταξύ των δύο επεξεργασιών ήταν εντυπωσιακές. Η υψηλότερη ρύθμιση κάτω από οσμωτικές συνθήκες ήταν σχεδόν αποκλειστικά στους βλαστούς, ενώ κατά την καταπόνηση στην αλατότητα ήταν σχεδόν αποκλειστικά στις ρίζες. Τα διάφορα αντίγραφα έδειξαν μια αποκλειστική ή κυρίαρχα ιδιόμορφη καταπόνηση, για παράδειγμα, *CERK1* και *WRKY70* για καταπόνηση στην αλατότητα, *CML38* (ασβέστιο-δεσμευτική πρωτεΐνη) και *ANAC053* (περιοχή NAC του *Arabidopsis*, που περιέχει την πρωτεΐνη 53) για την οσμωτική καταπόνηση. Λίγα είναι γνωστά για τη λειτουργία αυτών των ρυθμιστών της EMO-απόκρισης κατά τη διάρκεια της έλλειψης νερού δηλαδή της οσμωτικής καταπόνησης ή της καταπόνησης στην αλατότητα, αλλά μπορούν να διαδραματίσουν έναν σημαντικό ρόλο στον εγκλιματισμό των φυτών για κάθε τύπο καταπόνησης, σύμφωνα με το χαρακτηριστικό της οξειδωτικής ομοιόστασης κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Παραδείγματος χάριν, *CML38* είναι μια πρωτεΐνη η calmodulin που αυξάνεται

ειδικά κατά τη διάρκεια της οσμωτικής καταπόνησης και στους βλαστούς και στις ρίζες και παροδικά ρυθμίζεται χαμηλότερα στους βλαστούς σε απόκριση στην αλατότητα (Vanderbeld & Snedden, 2007). Τα φυτά ανέπτυξαν ένα πολύπλοκο αντιοξειδωτικό σύστημα για προστασία τους από τις αρνητικές επιδράσεις των ενεργών μορφών οξυγόνου. Το αντιοξειδωτικό σύστημα των φυτών αποτελείται από χαμηλού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως: ασκορβικό οξύ, α- τοκοφερόλη, γλουταθειόνη και καροτενοειδή, αλλά και από ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), οι υπεροξειδάσες (APX), (POX), η καταλάση (CAT), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), και η πολυφαινολική οξειδάση (PPO) (Foyer et al., 1991).

Η προσαρμογή (εγκλιματισμός) των φυτών στις αλλαγές του περιβάλλοντος απαιτεί μια νέα κατάσταση κυτταρικής ομοιόστασης (cellular homeostasis), που πραγματοποιείται από μια λεπτή ισορροπία μεταξύ πολλαπλών μονοπατιών (pathways), που υπάρχουν στα διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα (Mittler et al., 2006). Αυτός ο συντονισμός μπορεί, εντούτοις, να αναστατωθεί κατά τη διάρκεια καταπονήσεων όπως είναι η έλλειψη νερού και η υψηλή αλατότητα, ειδικά όταν εκτίθεται το κύτταρο ή ολόκληρο το φυτό σε μια γρήγορη μείωση του υδατικού δυναμικού, ή όταν περιλαμβάνονται πρόσθετες περιβαλλοντικές παράμετροι.

1.5 Χαρακτηριστικά του κηκιάδιου ρυθμού στα φυτά

Ο μεταβολισμός, η φυσιολογία και η συμπεριφορά των περισσότερων οργανισμών ταλαντώνονται κατά τη διάρκεια της ημέρας. Ορισμένες από αυτές τις μεταβολές είναι αποκρίσεις στις αλλαγές των επιπέδων του φωτός, της θερμοκρασίας και της σχετικής υγρασίας που συνοδεύουν τον 24ωρο κύκλο ημέρας-νύχτας. Οι οργανισμοί έχουν την ικανότητα να αντιλαμβάνονται τις μεταβολές αυτές και να προβαίνουν σε ρύθμιση της βιολογίας τους. Για παράδειγμα ορισμένα φυτά χαμηλώνουν τα φύλλα τους κατά τη διάρκεια της νύχτας (περιορίζοντας τις θερμικές απώλειες) και τα ανυψώνουν και πάλι κατά τη διάρκεια της ημέρας (για αποτελεσματικότερη δέσμευση της ηλιακής ακτινοβολίας). Αυτές οι βιολογικές ρυθμίσεις αποκαλούνται ημερήσιοι ρυθμοί. Οι ημερήσιοι ρυθμοί των οργανισμών υφίστανται ακόμη και στην περίπτωση που παύουν να υπάρχουν εξωτερικά χρονικά ερεθίσματα. Γεγονός, που τεκμηριώνει ότι οφείλονται σε ένα ενδογενές βιολογικό ρολόι (κηκιάδιο ρολόι). Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι οργανισμοί λειτουργούν σε αυτή την τέταρτη διάσταση, το χρόνο, παραμένουν ακόμη άγνωστοι. Τα τελευταία χρόνια, γίνονται προσπάθειες για την ανακάλυψη της μοριακής βάσης του κυτταρικού κηκιάδιου ρολογιού (Dunlap, 1999).

Ο κηκιάδιος ρυθμός είναι υποσύνολο του βιολογικού ρυθμού και έχει περίοδο που ορίζεται από το χρόνο που απαιτείται για την ολοκλήρωση ενός κύκλου 24 ωρών. Ο όρος *circadian* (κηκιάδιος) προέρχεται από τις λατινικές λέξεις *circa* (κύκλος) και *diem* (ημέρα). Ο κηκιάδιος ρυθμός ενός οργανισμού παράγεται ενδογενώς και είναι αυτοσυντηρούμενος. Ο κηκιάδιος ρυθμός κάτω από σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες, δηλαδή στερούμενος εξωτερικά χρονικά ερεθίσματα, παρουσιάζει απώλεια συγχρονισμού με τον 24ωρο κύκλο. Εάν ένα φυτό διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ειδικό θάλαμο κάτω από τεχνητά σταθερές συνθήκες φωτός, θερμοκρασίας και υγρασίας, μπορεί να παρεκκλίνει από την 24ωρη περίοδο (ενός κηκιάδιου κύκλου). Ο κηκιάδιος ρυθμός συνεχίζει να εκφράζεται τουλάχιστον για μία χρονική περίοδο ως

ελευθέρως-τρέχουσα, η οποία μπορεί να ποικίλει από 21-27 ώρες ανάλογα με την απόκριση. Επομένως, το φυτό αποκομμένο από τις περιβαλλοντικές συνθήκες αποσυγχρονίζεται. Η απόκλιση από την περίοδο των 24 ωρών δεν σημαίνει ότι το βιολογικό ρολόι μετακινήθηκε εσφαλμένα. Τα ρολόγια ελεύθερου ρυθμού κρατούν ακριβή ώρα αλλά δεν είναι συγχρονισμένα με τον εξωτερικό κόσμο. Το φυτό επανασυγχρονίζεται αν επανέλθει στις φυσιολογικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Από τα κυανοβακτήρια μέχρι τον άνθρωπο έχουν βρεθεί κινκάρδια ρολόγια, τα οποία ρυθμίζουν τη συμπεριφορά, τη φυσιολογία και τη βιοχημεία των οργανισμών αυτών. Το κινκάρδιο ρολόι στη *Drosophila* αλλά και σε διάφορα σπονδυλωτά έχει βρεθεί ότι βασίζεται στη μεταγραφική ενεργοποίηση και στην καταστολή κεντρικών γονιδίων του ρολογιού. Σύμφωνα με τους Baggs & Green (2003) τα πρωτεϊνικά προϊόντα αυτών των γονιδίων ελέγχονται όχι μόνο σε μεταγραφικό επίπεδο, αλλά και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, με φωσφορυλίωση, με αλληλεπίδραση πρωτεΐνης- πρωτεΐνης, με ενδοκυτταρικό εντοπισμό και με αποικοδόμηση.

Στους φυτικούς οργανισμούς διαπιστώθηκε ότι ο ρυθμός κίνησης των φύλλων είναι ένας από τους πολλούς ρυθμούς, συμπεριλαμβανομένων της γονιμοποίησης, της ανάπτυξης, της ενζυμικής ενεργότητας, της κίνησης των στομάτων, της φωτοσύνθεσης, της εκπομπής αρώματος και του ανοίγματος των ανθέων. Ο Kloppstech (1985) περιέγραψε έναν κινκάρδιο ρυθμό τριών μεταγράφων στα φασόλια, οι οποίοι κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA. Η ίδια παρατήρηση έγινε και στο σιτάρι. Όμως, τόσο το σιτάρι όσο και τα φασόλια δεν ήταν κατάλληλα για μία κατευθυνόμενη κλωνοποίηση γονιδίων. Αντιθέτως, το *Arabidopsis Thaliana* απεδείχθη ένα πολύ χρήσιμο φυτό μοντέλο για τη μελέτη των αποκρίσεων των φυτών σε εξωτερικά ερεθίσματα. Στην κατεύθυνση αυτή έχει συμβάλει ο μικρός βιολογικός του κύκλος, το μικρό μέγεθός του και η παραγωγή μεγάλου αριθμού σπερμάτων που διευκολύνουν την εργαστηριακή του χρήση. Το γονιδιώμα του παρουσιάζει υψηλό ποσοστό μη επαναλαμβανόμενου DNA της τάξης του 50% επί του συνολικού DNA. Το *Arabidopsis Thaliana* αποτελεί ένα ισχυρό σύστημα, στο οποίο μπορεί να συνδυαστεί ανάλυση με προωθητική γενετική με τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης γονιδίων (Nakamichi, 2003). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι ένας αριθμός γονιδίων του *Arabidopsis Thaliana* υπόκεινται σε κινκάρδιο έλεγχο (McClung, 2008). Στον Πίνακα 1-1 παρουσιάζονται τα γονίδια του *Arabidopsis Thaliana* που ελέγχουν το κινκάρδιο ρολόι. Σύμφωνα με τους Harmer et al. (2001) περίπου το 10% του συνόλου των γονιδίων του *Arabidopsis Thaliana* ρυθμίζεται στο επίπεδο του mRNA, ενώ έχουν ανιχνευθεί πολλά μεταβολικά μονοπάτια που ρυθμίζονται κινκάρδια (Schaffer et al., 2001). Οι Gutierrez et al. (2002) διαπίστωσαν ότι τα μετάγραφα που ρυθμίζονται κινκάρδια έχουν μικρό χρόνο ζωής. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι πάνω από το 35% του μεταγραφώματος μπορεί να ρυθμιστεί κινκάρδια (Michael & McClung, 2003).

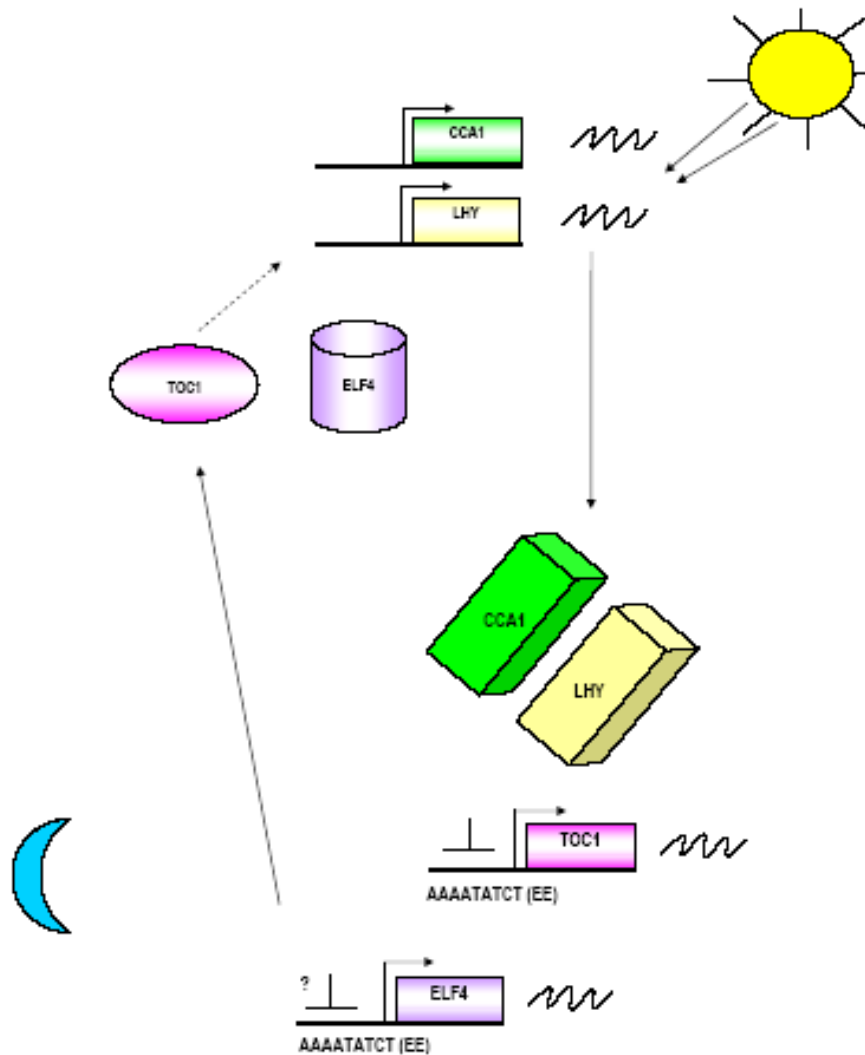
Ο μηχανισμός ρολογιού στο *Arabidopsis Thaliana* περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις βρόχους ανατροφοδότησης: α) τον κεντρικό βρόχο (central loop), β) το βρόχο που συγχρονίζεται με το πρωί (morning-phased loop), και γ) το βρόχο που συγχρονίζεται με το βράδυ (evening-phased loop).

Σύμφωνα με τους Yanovsky & Kay (2003) ο κεντρικός βρόγχος βασίζεται στην αλληλεπίδραση των γονιδίων *TOC1* (*Timing Of Cab expression 1*), *LHY* (*Late elongated Hypocotyl*) και *CCA1* (*Circadian Clock Associated 1*). Στην Εικόνα 1-1 παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων που διαμορφώνουν τον κινκάρδιο ταλαντωτή. Τα *CCA1* και *LHY* αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι συνδέονται με την

οικογένεια *MYB* και των οποίων τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης παρουσιάζουν μέγιστη τιμή την αυγή. Η υπερ-έκφραση του *CCA1* ή του *LHY* από έναν υποκινητή έχει σαν αποτέλεσμα ο ένας παράγοντας να ρυθμίζει τον άλλο γεγονός που τελικά οδηγεί σε αρρυθμία. Το *TOC1* κωδικοποιεί για λογαριασμό ενός ψευδο-ρυθμιστή απόκρισης, ο οποίος παρουσιάζει μέγιστη έκφραση το σούρουπο. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι αυξημένη τιμή του *TOC1* προκαλεί επιμήκυνση της περιόδου των κικκιδίων ταλαντωτών. Αντιθέτως, μεταλλάξεις του *TOC1* προκαλούν ελάττωση της περιόδου των κικκιδίων ταλαντωτών. Το *TOC1* έχει αρκετά μοτίβα που δείχνουν ότι συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση. Τα επίπεδα του mRNA των ανωτέρω παραγόντων *CCA1* και *LHY* μειώνονται στο μετάλλαγμα *toc1-2*. Η έκφραση του *CCA1* μειώνεται ακόμη περισσότερο στο μετάλλαγμα *elf4*. Το *ELF4* (*Early FLowering 4*) δεν παρουσιάζει ομολογία με άλλες γνωστές πρωτεΐνες, αλλά παρόμοια κυκλική έκφραση με αυτή του *TOC1*. Γεγονός, που δείχνει ότι οι δύο πρωτεΐνες συλλειτουργούν προωθώντας την έκφραση των *CCA1* και *LHY*. Επίσης έχει βρεθεί ότι τα *CCA1* και *LHY* ρυθμίζουν την ίδια τους την έκφραση και καταστέλλουν την έκφραση του *TOC1*. Αυτό οφείλεται στην πρόσδεσή τους σε ένα στοιχείο εννέα (9) νουκλεοτιδίων (AAAATATCT) που υπάρχει στον υποκινητή του *TOC1*. Οι παράγοντες *CCA1* και *LHY* αναγνωρίζουν ένα στοιχείο στον υποκινητή του *TOC1*, το οποίο υπάρχει σε μία ομάδα γονιδίων συγχρονισμένων με το βράδυ (*Evening phased*), που είναι ευρύτερα γνωστή ως *EE* (*Evening Element*). Το *EE* είναι πανομοιότυπο με την αλληλουχία (AAAATATCT), την οποία αναγνωρίζει ο *CCA1* στον υποκινητή του γονιδίου *Light Harvesting Chlorophyll A/B Blinding Protein 1*. Πρόκειται για ένα γονίδιο που ρυθμίζεται από το κικκίδιο ρολόι και η έκφρασή του λαμβάνει τη μέγιστη τιμή το πρωί. Οι παράγοντες *CCA1* και *LHY* λειτουργούν ταυτόχρονα και σαν καταστολείς της έκφρασης αρκετών γονιδίων που είναι συγχρονισμένα με το βράδυ για να συνδράμουν στην έκφραση άλλων γονιδίων που είναι συγχρονισμένα με το πρωί. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένας μηχανισμός που συνδέει τον κικκίδιο ταλαντωτή με πολλές φυσιολογικές και βιοχημικές διεργασίες. Επομένως, τα κικκίδια ρολόγια ρυθμίζουν μεταβολικές και αναπτυξιακές δραστηριότητες των φυτών, ενώ παράλληλα ελέγχουν την έκφραση σημαντικών ρυθμιστικών γονιδίων.

1.6 Αποικοδόμηση mRNA στα φυτικά κύτταρα και ο ρόλος των αποαδενυλασών

Η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA παίζει σημαντικό ρόλο: α) στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, β) στον έλεγχο της βιοσύνθεσης του mRNA, και γ) στην αντιϊκή προστασία (Moraes et al., 2006). Τα μόρια mRNA των περισσότερων ευκαρυωτικών οργανισμών φέρουν μία ουρά πολυ(A). Οι πολυ(A) ουρές με προκαθορισμένο μήκος συντελούν στην έξοδο του mRNA από τον πυρήνα, του προσδίδουν σταθερότητα και έναυσμα για μετάφραση όταν αυτό φτάνει στο κυτταρόπλασμα. Στον πυρήνα με τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης (deadenylation) περιορίζονται οι πολυ(A) ουρές στο κατάλληλο μήκος. Στο κυτταρόπλασμα με τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης σηματοδοτείται η αποικοδόμησή του.

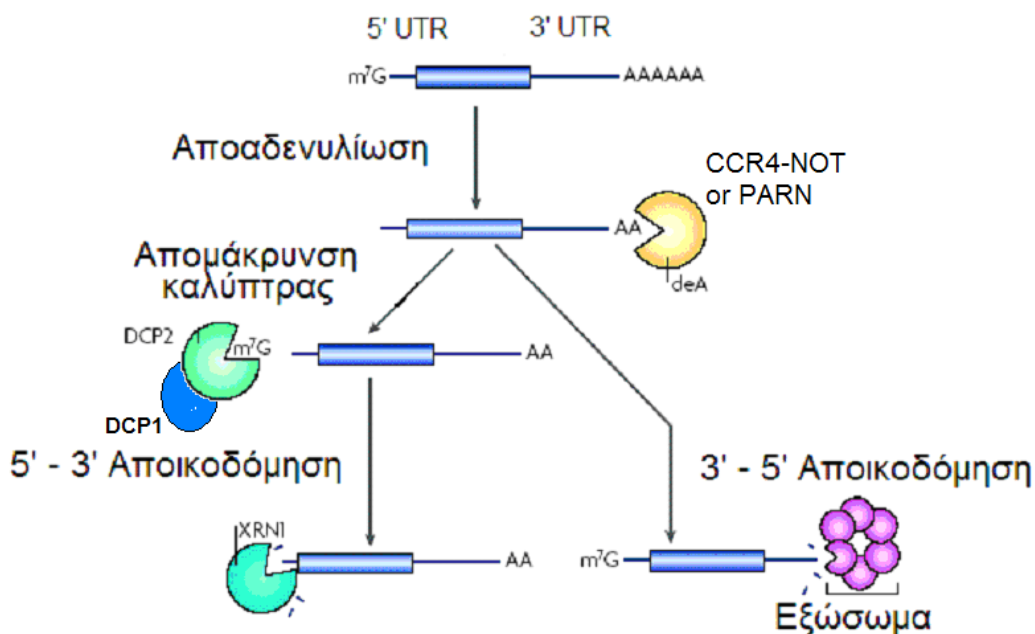


Εικόνα 1-1. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων που διαμορφώνουν τον κερκάδιο ταλαντωτή

Η αποικοδόμηση του mRNA αρχίζει με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του από διάφορα ένζυμα που χαρακτηρίζονται ως αποαδενυλάσες (και η διαδικασία ονομάζεται αποαδενυλίωση) (Tucker et al., 2001). Σύμφωνα με τους Balatsos et al. (2006), μετά την αποαδενυλίωση ένα ένζυμο αποτελούμενο από δύο υπομονάδες την Dcp1p και Dcp2p αφαιρεί την καλύπτρα και με τον τρόπο αυτό εκθέτει το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από μία 5'-3' εξωνουκλεάση, την Xrn1p. Εναλλακτικά, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'-5' από ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών, το κυτταροπλασματικό εξώσωμα. Τέλος, η καλύπτρα υδρολύεται από το DcpS. Στην Εικόνα 1-2 απεικονίζονται το μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA εξαρτώμενα από την αποαδενυλίωση (Goldstrohm & Wickens, 2008). Επίσης, στον Πίνακα 1-2 παρουσιάζονται τα μονοπάτια αποικοδόμησης του ευκαρυωτικού mRNA, καθώς και οι πρωτεϊνικοί παράγοντες (Meyers et al., 2004).

Πίνακας 1-1: Γονίδια του κικκάδιου ρολογιού του *Arabidopsis Thaliana* (McClung, 2008)

ΓΟΝΙΑΙΟ	LOCUS ID	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	ΑΠΩΛΕΙΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ	ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ
<i>CCA1</i>	<i>At2g46830</i>	Παράγοντας μεταγραφής απλού πεδίου Myb	Σύντομης περιόδου	Αρρυθμία
<i>CKB3</i>	<i>At3g60250</i>	Ρυθμιστές καζεΐνης κινάσης II	Άγνωστη (οικογένεια γονιδίων)	Σύντομης περιόδου
<i>CRY1</i>	<i>At4g08920</i>	Φωτο-υποδοχέας μπλε φωτός	Σύντομης περιόδου στον μπλε φωτισμό	Σύντομης περιόδου στον μπλε φωτισμό
<i>CRY2</i>	<i>At1g04400</i>	Φωτο-υποδοχέας μπλε φωτός	Σύντομης περιόδου στον μπλε φωτισμό	Σύντομης περιόδου στον μπλε φωτισμό
<i>DET1</i>	<i>At4g10180</i>	Υποδοχέας φωτο-μορφογένεσης	Σύντομης περιόδου	Άγνωστη
<i>ELF3</i>	<i>At2g25930</i>	Άγνωστη	Αρρυθμία στο συνεχή φωτισμό	Μακράς περιόδου
<i>ELF4</i>	<i>At2g40080</i>	Άγνωστη	Αρρυθμία	Άγνωστη
<i>GI</i>	<i>At1g22770</i>	Άγνωστη	Σύντομης περιόδου, μικρού εύρους	Σύντομης περιόδου, μικρού εύρους
<i>LHY</i>	<i>At1g01060</i>	Παράγοντας μεταγραφής απλού πεδίου Myb	Σύντομης περιόδου	Αρρυθμία
<i>LUX</i>	<i>At3g46640</i>	Παράγοντας μεταγραφής Myb	Αρρυθμία	Αρρυθμία
<i>PHYA</i>	<i>At1g09570</i>	Φωτο-υποδοχέας ερυθρού φωτός	Σύντομης περιόδου στο μακρινό IR	Σύντομης περιόδου στο μακρινό IR
<i>PHYB</i>	<i>At2g18790</i>	Φωτο-υποδοχέας ερυθρού φωτός	Σύντομης περιόδου στον ερυθρό φωτισμό, αργοπορία στον λευκό φωτισμό	Σύντομης περιόδου στον ερυθρό φωτισμό, αργοπορία στον λευκό φωτισμό
<i>PIF3</i>	<i>At1g09530</i>	Βασικός παράγοντας μεταγραφής έλικα – βρόχου – έλικα	Άγριου τύπου	Άγριου τύπου
<i>PRR3</i>	<i>At5g60100</i>	Ρυθμιστής ψευτο-απόκρισης	Σύντομης περιόδου	Άγριου τύπου
<i>PRR5</i>	<i>At2g24470</i>	Ρυθμιστής ψευτο-απόκρισης	Σύντομης περιόδου	Μικρού εύρους, μακράς περιόδου
<i>PRR7</i>	<i>At5g02810</i>	Ρυθμιστής ψευτο-απόκρισης	Μακράς περιόδου	Άγνωστη
<i>PRR9</i>	<i>At2g46790</i>	Ρυθμιστής ψευτο-απόκρισης	Μακράς περιόδου	Σύντομης περιόδου
<i>SRR1</i>	<i>At5g59560</i>	Άγνωστη	Προπορεία φάσεως, μικρού εύρους	Άγνωστη
<i>TIC</i>	-	Το γονίδιο δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί	Σύντομης περιόδου, μικρού εύρους	Άγνωστη
<i>TOC1</i>	<i>At5g61380</i>	Ρυθμιστής ψευτο-απόκρισης	Σύντομης περιόδου	Αρρυθμία
<i>ZTL</i>	<i>At5g57360</i>	Πρωτεΐνη F-Box	Μακράς περιόδου	Αρρυθμία



Εικόνα 1-2. Τα μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA εξαρτώμενα από την αποδενυλίωση.

Πίνακας 1-2: Τα μονοπάτια αποικοδόμησης του ευκαρυωτικού mRNA (Meyer et al., 2004)

	ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	ΕΝΖΥΜΑ		ΕΝΙΣΧΥΤΕΣ
I	Αποαδενυλίωση	<ul style="list-style-type: none"> • Pan2p/Pan3p • CCR4-NOT σύμπλοκο 	<ul style="list-style-type: none"> • Pan2/Pan3 • CCR4-NOT σύμπλοκο • PARN 	PABPC PABPC cap
IIa	Απομάκρυνση καλύπτρας	Dcp1p/Dcp2p	Dcp1/Dcp2	Edc1p, Edc2p, Edc3p, Pat1p, Lsm1-7, Dhh1p, PABPC
IIb	Υδρόλυση καλύπτρας	Des1p	DcpS	-
III	5' - 3' Εξωνουκλεοτιδική αποικοδόμηση	Xrn1p	Xrn1	-
IV	3' - 5' Εξωνουκλεοτιδική αποικοδόμηση	Εξώσωμα	Εξώσωμα	Ski2p, Ski3p, Ski7p, Ski82p

Είναι φανερό ότι η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA στο κυτταρόπλασμα αρχίζει με την αποαδενυλίωση, τη βράχυνση ή την πλήρη αφαίρεση της πολυ(A) ουράς. Σύμφωνα με τους Goldstrohm & Wickens (2008) βιοχημικά σύμπλοκα που πραγματοποιούν αποαδενυλίωση συναντώνται τόσο στα φυτικά όσο και στα ζωικά κύτταρα, για παράδειγμα: η πολυ(A) ριβονουκλεάση PARN, το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4/CAF1, και η πολυ(A) νουκλεάση PAN. Η αποαδενυλίωση βασίζεται στη δράση της PARN πολυ(A) ριβονουκλεάσης και του CCR4/CAF1 συμπλόκου αποαδενυλίωσης. Το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης δρα σε εξειδικευμένα υποστρώματα mRNAs. Ο βαθμός εξειδίκευσης των αποαδενυλασών και ο τρόπος που επιτυγχάνεται αυτή η εξειδίκευση δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί. Στη συνέχεια, μετά την αποαδενυλίωση, απομακρύνεται η καλύπτρα στο άκρο 5' του mRNA. Η απομάκρυνση της καλύπτρας (decapping) πραγματοποιείται με τη βοήθεια του συμπλόκου απομάκρυνσης, κύρια στοιχεία του οποίου είναι οι παράγοντες *DCP1* και *DCP2*. Ένα τρίτο στοιχείο του συμπλόκου απομάκρυνσης είναι ο παράγοντας *VARICOSE* (*VCS*)/*HEDLS*, ο οποίος πρωτο-ανιχνεύτηκε στα φυτικά κύτταρα. Μετά την απομάκρυνση της καλύπτρας, το αποαδενυλιωμένο mRNA υφίσταται αποικοδόμηση κατά την κατεύθυνση 5'-3'. Ειδικότερα, το 5' μονοφωσφορυλιωμένο άκρο του RNA είναι ευάλωτο στην *XRN1* εξωριβονουκλεάση (Reverdatto et al., 2004). Η αποαδενυλίωση λαμβάνει χώρα πριν την αποικοδόμηση του mRNA από το εξώσωμα. Το εξώσωμα αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή εξωνουκλεοτιδικής δραστηριότητας με κατεύθυνση 3' - 5'. Πρόκειται για έναν μακρομοριακό μηχανισμό, ο οποίος δύναται: α) να επεξεργαστεί μερικώς το RNA, β) να αποικοδομήσει πλήρως το RNA, και γ) να πραγματοποιήσει ποιοτικό έλεγχο του RNA (δηλαδή πραγματοποιεί επιλεκτική αποικοδόμηση μόνο των ελαττωματικών μορίων RNA).

Σύμφωνα με τους Goldstrohm & Wickens (2008) οι αποαδενυλάσες είναι Mg^{2+} -εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες (ένζυμα) που αποικοδομούν την πολυ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3' - 5' ελευθερώνοντας το 5' - AMP. Οι αποαδενυλάσες εκδηλώνουν μία σαφή προτίμηση για το 3' - πολυ(A) σαν υπόστρωμα, παρά το γεγονός ότι αποικοδομούν αλλά λιγότερο αποτελεσματικά και αδενοσινικά ομοπολυμερή. Με την εξέλιξη της επιστήμης της βιοχημείας, ο αριθμός των αποαδενυλασών που ταυτοποιούνται αυξάνει γοργά (Πίνακας 1-3). Οι αποαδενυλάσες ταξινομούνται σε δύο υπερ-οικογένειες (superfamilies): α) την οικογένεια *DEDD*, και την οικογένεια *EEP* (Exonuclease Endonuclease Phosphatase). Η οικογένεια *DEDD* πήρε το όνομά της από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu, τα οποία είναι διάσπαρτα μεταξύ των μοτίβων εξωνουκλεάσης και παράλληλα συντονίζουν τα ιόντα Mg^{2+} . Στην υπερ-οικογένεια αυτή ανήκουν: η αποαδενυλάση *POP2* (ευρύτερα γνωστή ως *CAF1*), η *CAF1Z*, η πολυ(A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (*PARN*), και η *PAN2*. Στην υπερ-οικογένεια των Εξωνουκλεασών Ενδονουκλεασών Φωσφατασών (*EEP*) ανήκουν αποαδενυλάσες που φέρουν τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και His. Ειδικότερα, μεταξύ των *EEP* ανήκουν: η *CCR4*, η *Nocturnin*, η *ANGEL*, και η *PAN2*.

Από τη βάση δεδομένων UniProtKB προκύπτει η μεγάλη ποικιλότητα και ποικιλομορφία των αποαδενυλασών. Πολλά μέλη των οικογενειών *POP2*, *CCR4*, *PAN2* και *ANGEL* απαντώνται σχεδόν σε όλους του ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Δηλαδή διαφορετικές αποαδενυλάσες μπορούν να δράσουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες. Αντιθέτως, άλλες αποαδενυλάσες επιτελούν εξειδικευμένες ρυθμιστικές λειτουργίες και δεν απαντώνται σε όλους του οργανισμούς

(για παράδειγμα η *Drosophila Melanogaster* στερείται των αποαδενυλασών PARN και CAF1Z. Αυτό υποδηλώνει ότι οι εξειδικευμένες αποαδενυλάσες ελέγχουν στοχευόμενα mRNAs. Ορισμένες αποαδενυλάσες είναι απαραίτητες για την επιβίωση των ευκαρυωτικών οργανισμών, ενώ τα μεταλλάγματα άλλων προκαλούν ποικιλία φαινοτύπων. Επίσης, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες είναι απαραίτητες για κάποιες βιολογικές διεργασίες, δηλαδή ο έλεγχος συγκεκριμένων mRNAs είναι μεγάλης σημασίας για την ομαλή εκτέλεση αυτών των διεργασιών. Για παράδειγμα οι PARN και CCF-1 είναι σημαντικές κατά την πρόωμη ανάπτυξη, η CNOT7 είναι σημαντική για τη γονιμότητα και τη μεταβολική ομοιόσταση των οργανισμών.

Η αναξέλεγκτη αποαδενυλίωση οδηγεί στην καταστροφή και το θάνατο του ευκαρυωτικού κυττάρου. Επομένως, απαιτείται ρύθμιση της δραστηριότητας των αποαδενυλασών. Τα σταθερά και ενεργά μεταγραφικά mRNAs πρέπει να προστατεύονται από την αποαδενυλίωση, ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά mRNAs θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να αποικοδομούνται.

Ο ρυθμός αποαδενυλίωσης ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών mRNAs. Η διαδικασία ελέγχεται από ρυθμιστικούς παράγοντες, που προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες των mRNAs. Ρυθμιστικοί παράγοντες που βρίσκονται στις περιοχές 3'-UTR των mRNAs ενισχύουν την αποαδενυλίωση. Παραδείγματα τέτοιων παραγόντων που δεσμεύονται στις περιοχές 3'-UTR των mRNAs θεωρούνται: CUG-BP, miRNAs, PUF, και CPEB. Εναλλακτικά η αποαδενυλίωση μπορεί να γίνει δια της αλληλεπίδρασης της PABR και ορισμένων αποαδενυλασών όπως η PAN2 και PAN3. Η περιοχή 5'-UTR του mRNA είναι δυνατόν να επηρεάσει θετικά την διαδικασία αποαδενυλίωσης διεγείροντας την δραστηριότητα ορισμένων αποαδενυλασών, για παράδειγμα την PARN. Επομένως, η έκφραση συγκεκριμένων αποαδενυλασών και των ρυθμιστών τους καθορίζει το χρόνο και την τοποθεσία που μπορεί να λάβει χώρα η αποαδενυλίωση.

Όταν το ευκαρυωτικό κύτταρο υφίσταται καταπονήσεις από διάφορους αβιοτικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα υψηλή αλατότητα, υψηλή ακτινοβολία, χαμηλές θερμοκρασίες, κ.ά., τότε αναστέλλεται η διαδικασία της αποαδενυλίωσης. Ο μοριακός μηχανισμός αναστολής της αποαδενυλίωσης παραμένει άγνωστος. Επίσης, η διαδικασία της αποαδενυλίωσης επηρεάζεται από δύο μορφές χωρικού ελέγχου: α) τον πυρηνοκυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών, και β) τον εντοπισμό τους σε ενδοκυτταρικά κοκκία. Στην περίπτωση εσφαλμένου διαχωρισμού των αποαδενυλασών μεταξύ πυρήνα και κυττοσολίου μπορεί να αποβεί μοιραίος για την τύχη των mRNAs που δεν θα έπρεπε να αποικοδομηθούν. Αντιθέτως, όταν αποαδενυλάσες εντοπιστούν σε ενδοκυτταρικά κοκκία, τα οποία περιέχουν κατασταλαμένα mRNAs υπάρχει ο κίνδυνος να ενεργοποιηθούν. Δηλαδή, η συνεύρεση αυτών των αποαδενυλασών με τα υποστρώματά τους διευκολύνει την κινητική της αποαδενυλίωσης. Οι αποαδενυλάσες αποτελούν τμήμα ή τμήματα διαφόρων συμπλόκων και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Για παράδειγμα, η PAN2 δεσμεύεται από την PAN3, η οποία με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την PABR. Η PABR προσλαμβάνει το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στην περιοχή της πολυ(A) ουράς του mRNA. Τα σύμπλοκα των αποαδενυλασών που δεσμεύονται από ειδικούς ρυθμιστές είναι πολυλειτουργικά. Η πολυλειτουργικότητα διασφαλίζει πολυάριθμα σημεία ρύθμισης της αποαδενυλίωσης, της μετάφρασης, και της αποικοδόμησης του mRNA. Άλλες αποαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή. Τα ετεροδιμερή παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό συμπλόκων, και

διαφορετικές ρυθμιστικές ενζυμικές ιδιότητες. Συνεπώς, ο έλεγχος της διαδικασίας αποαδενυλίωσης είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος.

Στα φυτικά κύτταρα του *Arabidopsis Thaliana* έχει βρεθεί το ομόλογο της πολυ(A) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης PARN. Πρόκειται για μία αποαδενυλάση που πρωτοανιχνεύτηκε στα κύτταρα των θηλαστικών. Η αποαδενυλάση PARN του *Arabidopsis Thaliana* (AtPARN) διαθέτει αποικοδομητική ενεργότητα, γεγονός, που σύμφωνα με τους Reverdatto et al. (2004) ερμηνεύεται ως καταλυτική ενεργότητα συνδεδεμένη με την ύπαρξη συντηρημένων περιοχών και κατάλοιπων αμινοξέων. Η N-τελική περιοχή της AtPARN παρουσιάζει ομοιότητες με την N-τελική περιοχή της HuPARN, όπου περιέχονται οι καταλυτικές περιοχές. Η συντηρημένη N-τελική περιοχή της PARN είναι η πιο σημαντική από άποψη ενεργότητας και διαθέτει τρεις εξω-περιοχές χαρακτηριστικές της οικογένειας των ενζύμων RNaseD. Η AtPARN εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα αλλά και στον πυρήνα. Μελέτες με μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της AtPARN έδειξαν ότι το γονιδίωμά της παίζει σημαντικό ρόλο στη φάση της ανάπτυξης των φυτικών οργανισμών (Chiba et al., 2003).

1.7 Η αποαδενυλάση της νοκτουρνίνης

Η νοκτουρνίνη (nocturnin) ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στο *Xenopus*. Ονομάστηκε έτσι επειδή το mRNA μεταγράφεται σε υψηλά ποσοστά τις πρώτες νυκτερινές ώρες. Στον ποντικό το ομόλογο της νοκτουρνίνης έχει βρεθεί ότι είναι ιδιαίτερα συντηρημένο στο επίπεδο των αμινοξέων. Εκφράζεται ευρέως σε όλους τους ιστούς του ποντικού, όπως στα νεφρά, στον εγκέφαλο, στο συκώτι. Η υψηλή κερκάδια έκφραση του mRNA της νοκτουρνίνης έχει παρατηρηθεί σε αρκετούς από αυτούς τους ιστούς, παρουσιάζοντας μέγιστες τιμές τις πρώτες νυκτερινές ώρες.

Η νοκτουρνίνη είναι μία νέα πρωτεΐνη με ακολουθία όμοια, μόνο στο C-τελικό άκρο, με την πρωτεΐνη Ccr4p του μύκητα *Sacharomyces cerevisiae*. Η Ccr4p δεν προσδένεται άμεσα στο DNA, αλλά αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες μέσω μίας περιοχής πλούσιας σε λευκίνες. Στο N-τελικό της άκρο, διαθέτει μία περιοχή που μοιάζει με φερμουάρ λευκίνης. Η νοκτουρνίνη και η Ccr4p ανήκουν σε μία μεγάλη οικογένεια νουκλεασών εξαρτώμενων από το μαγνήσιο (Mg^{+2}). Τα μέλη της οικογένειας αυτής όπως η DNase I, η APE I (DNA-repair apurinic/apirimidibic endonuclease), και η οικογένεια IP5P (inositol polyphosphate 5-phosphatases) διαθέτουν "τσέπες" με παρόμοια κατάλοιπα αμινοξέων. Τα κατάλοιπα είναι σημαντικά για την κατάλυση. Επίσης, η νοκτουρνίνη έχει δομικές ομοιότητες με την APE I. Η ομοιότητα μεταξύ των δύο πρωτεϊνών αν και είναι μικρή, αντιστοιχεί σε ακολουθίες που είναι κρίσιμες για τη δομή και τη λειτουργία της οικογένειας των νουκλεασών. Το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης Ccr4p που παρουσιάζει ομοιότητα με τη νοκτουρνίνη και άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας των Mg^{+2} , φαίνεται να έχει δράση αποαδενυλάσης (Baggs & Green, 2005).

Η νοκτουρνίνη είναι μία 3'-εξωριβονουκλεάση, με δράση αποαδενυλάσης, δηλαδή έχει την ικανότητα να αφαιρεί την πολυ(A)-ουρά από τα mRNAs. Η αποαδενυλίωση αποτελεί το πρώτο βήμα στην αποικοδόμηση του mRNA και συμμετέχει στην μεταφραστική αποσιώπησή του. Ο ρόλος της νοκτουρνίνης στην αποαδενυλίωση δεν είναι ακόμη γνωστός.

Πίνακας 1-3: Ποικιλομορφία των αποαδενυλασών (Goldstrohm & Wickens, 2008)

Οικογ.	Sc	Ce	Dm	Xl	Mm	Hs	Ενεργός	Παρατηρ.	Πεδία πρωτεϊνών	Εντοπισμός	Βιολογικές λειτουργίες
DEDD νουκλεάσες											
POP2	Pop2	CCF-1	POP2	CNOT7	CNOT7	CNOT7	Sc, Dm, Mm, Hs	Inhibited by PABP	DEDD	C, PB, Sh	<ul style="list-style-type: none"> DNA damage, cell cycle (Sc) Development, fertility (Ce) Cell size, miRNA control (Dm) Spermato-genesis, bone mass (Mm)
				CNOT8	CNOT8	CNOT8	Hs		DEDD		ND
CAF1Z		CAF-1z		CAF1Z	CAF1Z	CAF1Z	Hs		DEDD, C3H ZnF, NLS	N, CB, Sh	ND
PARN		PARN		PARN	PARN	PARN	Xl, Hs	Binds and stimulated by cap; inhibited by PABP and CBP80	DEDD, R3H, NBD, NLS	N, C, Sh	<ul style="list-style-type: none"> Oocyte maturation (Xl) NMD (Hs)
					PARNL	PARNL	ND		DEDD		
PAN2	Pan2	PAN-2	PAN2	PAN2	PAN2	PAN2	Sc, Mm, Hs	Stimulated by PABP	DEDD, WD40, UCH	N, C, Sh	Nuclear poly(A) shortening, replication stress (Sc)

Πίνακας 1-3: (Συνέχεια)

Οικογ.	Sc	Ce	Dm	Xl	Mm	Hs	Ενεργός	Παρατηρ	Πεδία πρωτεϊνών	Εντοπισμός	Βιολογικές λειτουργίες
EEP νουκλεάσες											
CCR4	Ccr4	CCR-4	CCR4	CNOT6	CCR4	CNOT6	Sc, Dm, Mm, Hs	Inhibited by PABP	EEP, LRR	C, PB, Sh	<ul style="list-style-type: none"> DNA damage, cell cycle, replication stress (Sc) Oogenesis (DM) NMD (Mm)
				CNOT6L	CCR4L	CNOT6L	Mm, Hs		EEP, LRR	C, Sh	<ul style="list-style-type: none"> Cell proliferation (Mm)
Nocturnin			NOC	Noc	NOC	NOC	Xl, Mm, Hs		EEP	C	<ul style="list-style-type: none"> Circadian (Xl, Mm) Homeostasis (Mm)
ANGEL	Ng11	Angel	Angel	Angel1	ANGEL1	ANGEL1	ND		EEP	C, MA (Sc)	
	Ng12			Angel2	ANGEL2	ANGEL2	Sc		EEP	C (Sc); N, CB, Sh (Hs)	5.8S rRNA processing, carbon source (Sc)
	Ng13						ND		EEP	ND	
2'PDE		2'PDE	2'PDE	2'PDE	2'PDE	2'PDE	Hs	Degrades 2'–5'A and 3'–5'A	EEP	ND	Interferon response (Hs)

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

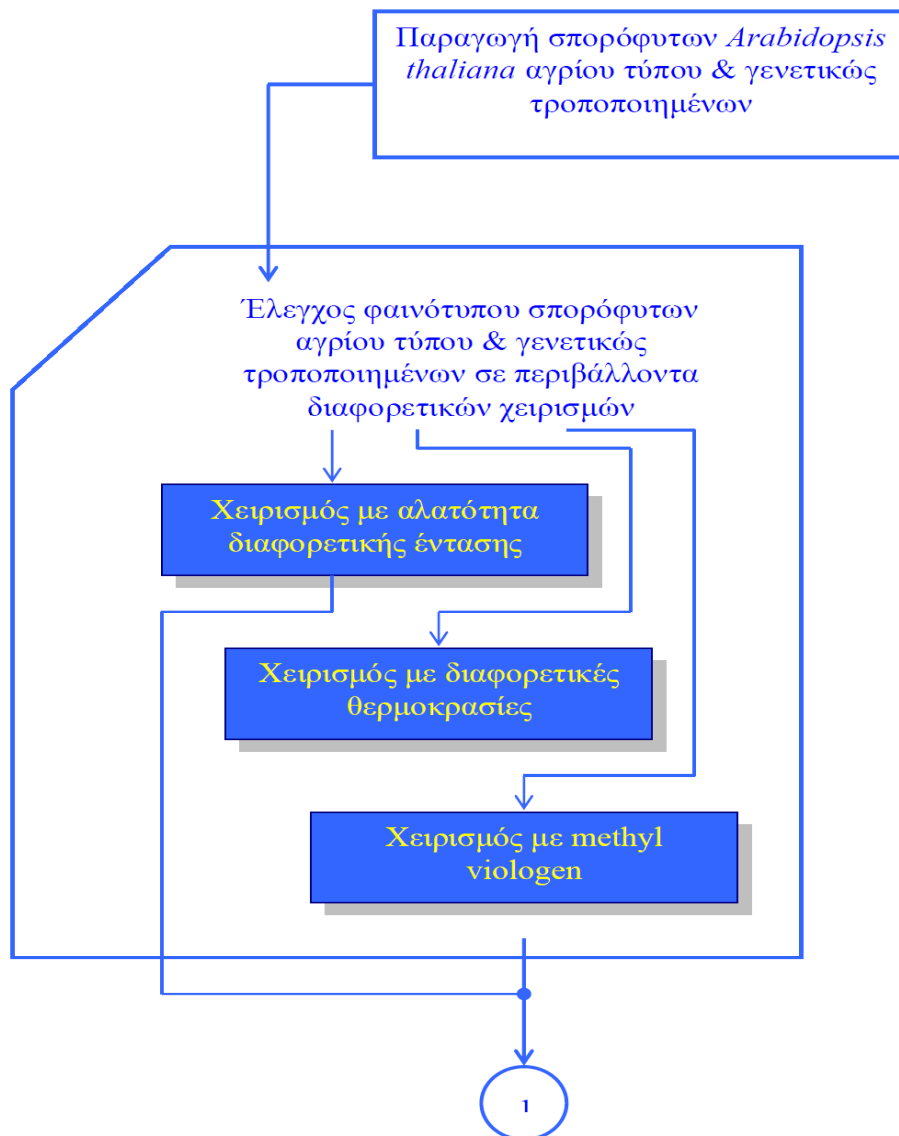
Η νοκτουρνίνη (*nocturnin*) είναι μία αποαδενυλάση, η οποία ρυθμίζεται από τον κερκάδιο ρυθμό και εκφράζεται με υψηλά επίπεδα τιμών τις πρώτες νυχτερινές ώρες. Εξειδικεύεται στην αφαίρεση της πολυ(A) ουράς των mRNAs. Η μείωση του μήκους της πολυ(A) ουράς μπορεί να οδηγήσει σε εναλλακτική μετάφραση και/ή σε πλήρη αποικοδόμηση του μεταγράφου. Έχει ταυτοποιηθεί σε θηλαστικά (ποντικούς), στο *Xenopus laevis Retina*, ενώ είναι πιθανόν να υπάρχει ομόλογό της και στα φυτά. Ο ρόλος αυτής της αποαδενυλάσης στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (με την κωδική ονομασία HESP1) δεν είναι ακόμη γνωστός, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι ελέγχεται από τον κερκάδιο ρυθμό και δρα στο επίπεδο αποικοδόμησης του mRNA.

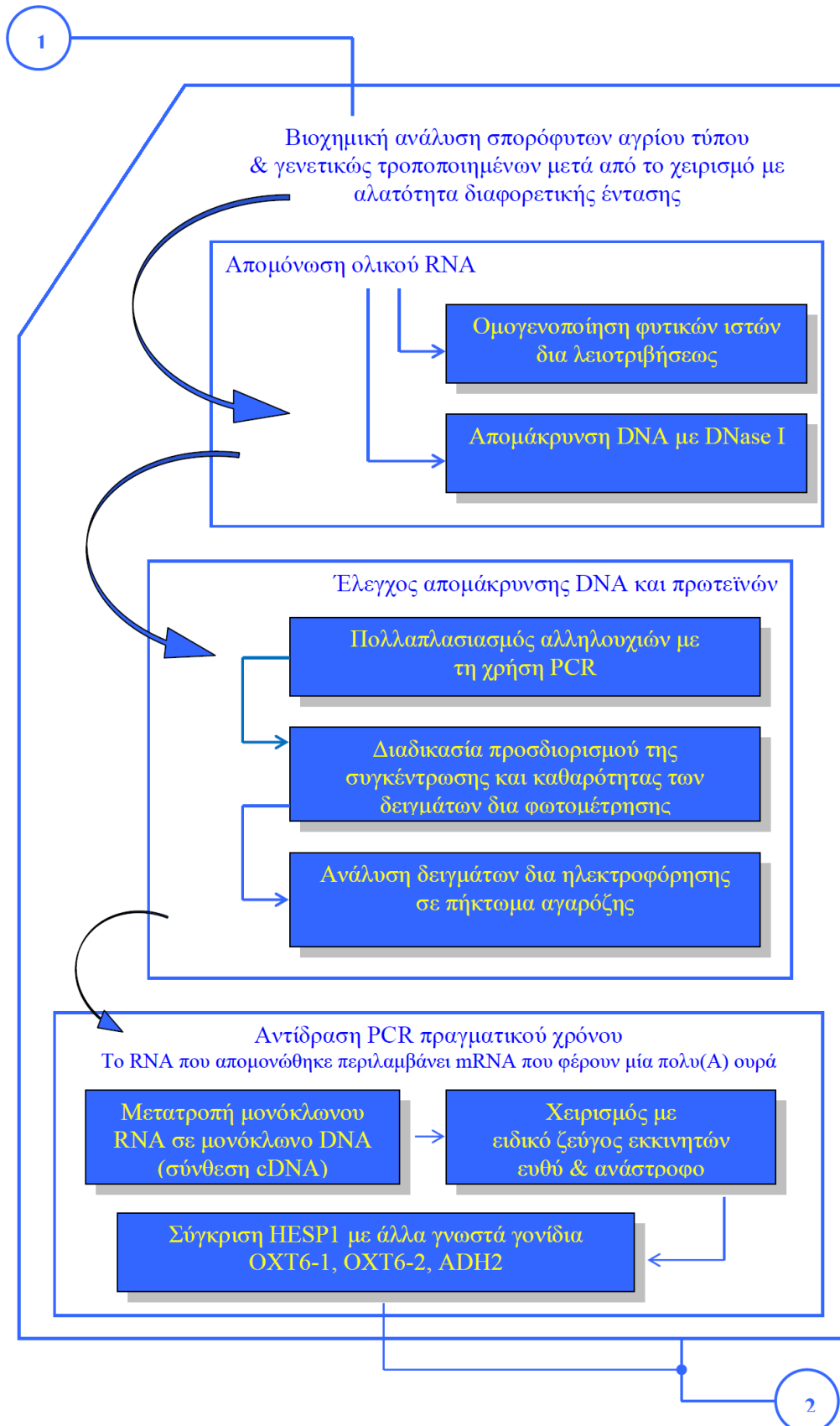
Σκοπός της εργασίας είναι να μελετηθεί η έκφραση της *HESP1* στο φυτό *Arabidopsis thaliana* σε συνθήκες καταπόνησης από διαφορετικούς αβιοτικούς παράγοντες. Ειδικότερα, να μελετηθεί σε φυτά αγρίου τύπου και γενετικώς τροποποιημένα στις ακόλουθες περιπτώσεις καταπονήσεων: Α) σε αλατότητα διαφορετικής συγκέντρωσης, Β) σε ακραίες θερμοκρασίες περιβάλλοντος, και C) σε διαφορετικές δόσεις ρυπαντή (τύπου paraquat). Στη πρώτη φάση της πειραματικής διαδικασίας, εξετάζεται φαινοτυπικά η απόκριση των φυτών στις διαφορετικές συνθήκες καταπονήσεων, ενώ στη δεύτερη φάση πραγματοποιείται λεπτομερής μοριακός έλεγχος και σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου της *HESP1* με άλλα γνωστά γονίδια.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας φυτών & Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Φεβρουάριο έως και τον Ιούλιο του 2011.

Διάγραμμα ροής της μελέτης έκφρασης του γονιδίου *HESPI* του *Arabidopsis thaliana* σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης







3.1 Παραγωγή σπορόφυτων *Arabidopsis thaliana*

Στην εργασία χρησιμοποιήθηκαν, ως φυτικό υλικό, σπορόφυτα *Arabidopsis thaliana* *Columbia* άγριου τύπου και γενετικά τροποποιημένα. Οι σπόροι προήλθαν από φυτά που καλλιεργήθηκαν από άλλους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου. Για την παραγωγή των σπορόφυτων μεσολάβησαν τα ακόλουθα στάδια: α) απολύμανση σπόρων, β) προετοιμασία κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος, γ) σπορά και ανάπτυξη των φυτών κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες.

Οι σπόροι υποβλήθηκαν σε επιφανειακή απολύμανση, αρχικά δια εμβάπτισης σε διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) 70% (v/v), όπου παρέμειναν για 2 min, στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (4ml NaClO + 6ml dH_2O + 2μl Tween 20) για 15 min, και τέλος πλύθηκαν με απιονισμένο νερό έξι φορές επί 4 min κάθε φορά.

Τα θρεπτικά υποστρώματα, που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των σπορόφυτων, περιελάμβαναν το θρεπτικό μέσο *Murashige & Skoog (MS)* της *Duchefa Biochemie*, το οποίο αναμίχθηκε με απιονισμένο νερό (σε αναλογία 4.410,64 mg *MS* σε 1l απιονισμένου νερού, ήτοι 4,41 g/l) και συμπληρώθηκε με 1% άγαρ σε μορφή σκόνης. Επιπλέον, στις περιπτώσεις καταπονήσεων, προστέθηκαν αντιστοίχως στα διαλύματα των θρεπτικών υποστρωμάτων: για την περίπτωση (A) χλωριούχο νάτριο (NaCl) κατά 10 mM, 25 mM, 50 mM και 100 mM, και για την περίπτωση (C) 0,15 μM / 0,30 μM του ρυπαντή methyl viologen (paraquat). Κάθε θρεπτικό διάλυμα αποστειρώθηκε με τη χρήση αυτόκαυστου (δηλαδή με θέρμανση πάνω από το σημείο βρασμού του νερού και

τη χρήση ατμού υπό πίεση - 1,1 kg/cm² που ισοδυναμεί με θερμοκρασία 121°C), συνολικά για 30 min. Στη συνέχεια, τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής βιολογικής ασφαλείας με ενσωματωμένη πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), όπου έγινε η επίστρωσή τους σε τρυβλία, με όλους τους προβλεπόμενους κανόνες ελέγχου έναντι αναστολής της μικροβιακής αύξησης. Μετά το πέρας περίπου 30 min, το θρεπτικό διάλυμα στερεοποιήθηκε εντός των τρυβλίων.

Τέλος, στο αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα του κάθε τρυβλίου σπάρθηκαν συνολικά δέκα σπόροι *Arabidopsis thaliana*, οι οποίοι τοποθετήθηκαν κατακόρυφα για να μεγαλώσει η ρίζα στην επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν ερμητικά με τη βοήθεια ελαστικής μεμβράνης και αφού σκεπάστηκαν με λεπτά φύλλα αλουμινίου, τοποθετήθηκαν αρχικά για 24 ώρες σε χαμηλή θερμοκρασία 4°C (συνθήκες ψυγείου). Στη συνέχεια παρέμειναν μέχρι να βλαστήσουν σε συνθήκες θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Τα τρυβλία με τους φυτρωμένους σπόρους μεταφέρθηκαν σε ειδικό θάλαμο ανάπτυξης φυτών με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας 23°C και φωτοπερίοδου 12/12 με ένταση φωτός 50 μmol/ m²s. Στις περιπτώσεις (A) και (C), τα φυτά παρέμειναν στο θάλαμο ανάπτυξης επί 21 ημέρες. Στην περίπτωση (B), παρέμειναν στο θάλαμο ανάπτυξης επί 7 ημέρες, και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε διαφορετικούς θαλάμους με διαφορετικές θερμοκρασίες 22°C / 16°C / 10°C επί 14 ημέρες. Τα φυτά αυτά χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα διερεύνησης έκφρασης του γονιδίου της HESPI σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης.

3.2 Μέτρηση μήκους ριζικού συστήματος

Τα φυτά συγκομίστηκαν μετά το πέρας τριών εβδομάδων από την εκβλάστηση των σπόρων. Ακολούθησε η μέτρηση μήκους του ριζικού συστήματος για κάθε φυτό. Τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του t-test και επίπεδο σημαντικότητας 5%. Για τη στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *Sigma Stat 3.5* και τα διαγράμματα έγιναν με το πρόγραμμα *Sigma Plot 10.0*.

3.3 Απομόνωση ολικού RNA από φυτικού ιστούς

Προκειμένου στη δεύτερη φάση να γίνει απομόνωση του ολικού RNA από τους φυτικούς ιστούς των φύλλων *Arabidopsis thaliana*, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Περίπου 0,2 gr φυτικού ιστού, που είχαν απομακρυνθεί από τα φυτά και είχαν διατηρηθεί στους -80 °C, ομογενοποιήθηκαν δια λειοτριβήσεως με γουδί σε σωλήνες eppendorf παρουσία υγρού αζώτου.
- Στους σωλήνες eppendorf προστέθηκαν 300 μl μείγματος φαινόλης – χλωροφόρμιου – ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25:24:1 (διάλυμα PIC) pH: 8,3.
- Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύτηκαν για 30 δευτερόλεπτα με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/ λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδάτινη φάση κάθε δείγματος μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα eppendorf και επαναλήφθηκε η εκχύλιση με 300μl μείγματος PIC.

- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/ λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και η υδάτινη φάση κάθε δείγματος μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα erpendorf.
- Τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίστηκαν με την προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και ενός όγκου ισοπροπανόλης.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές/ λεπτό και στους 4 °C.
- Το ίζημα των νουκλεϊνικών οξέων επαναδιαλύθηκε σε 1.125 μl διαλύματος 10T/10E και το RNA κατακρημνίστηκε εκλεκτικά με την προσθήκη 375 μl διαλύματος 8 M LiCl και επώαση στους 4 °C για τουλάχιστον 12 ώρες.
- Το ολικό RNA συλλέχτηκε με φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 στροφές/ λεπτό στους 4 °C.
- Το ίζημα ξηπλήθηκε με 70% v/v αιθανόλη, αφέθηκε να στεγνώσει και επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE.
- Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του κάθε δείγματος προσδιορίστηκαν φωτομετρικά ενώ η ακεραιότητα διαπιστώθηκε με ανάλυση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η αναλυτική σύσταση των διαλυμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του ολικού RNA των φυτικών ιστών, παρουσιάζεται στον ακόλουθο Πίνακα 3-1.

Πίνακας 3-1: Αναλυτική σύσταση διαλυμάτων απομόνωσης ολικού RNA

Διάλυμα εκχύλισης RNA

50 mM Tris-HCl (pH:8,3), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Lauryl sarcosine.

PIC pH 8,3

Φαινόλη, χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη αναμιγνύονται σε αναλογία 24:24:1. Το μείγμα εξισορροπείται με 100 mM Tris-HCl (pH:8,3)/10 mM EDTA.

3M Οξικό νάτριο (pH:5,2)

Σε τελικό όγκο 1 lt H₂O διαλύονται 246,09 gr άνυδρο οξικό νάτριο. Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 5,2 με την προσθήκη πυκνού οξικού οξέος. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

10T/10E

10 mM Tris-HCl (pH:8,3), 10 mM EDTA.

8 M LiCl

Σε τελικό όγκο 100ml dH₂O διαλύονται 33,9gr LiCl.

TE

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

3.4 Απομάκρυνση DNA από τα δείγματα ολικού RNA με DNase I (με απενεργοποίηση του ενζύμου)

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA από τους φυτικούς ιστούς απομονώθηκε και μέρος του γονιδιωματικού DNA, το οποίο έπρεπε στη συνέχεια να απομακρυνθεί. Αρχικά, η διαδικασία απομάκρυνσης που ακολουθήθηκε βασίστηκε στα ένζυμα της εταιρείας Invitrogen που κόβουν - καταστρέφουν το DNA, ενώ ταυτόχρονα αφήνουν ανέπαφο το RNA. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 15 λεπτά σε

θερμοκρασία δωματίου, ενώ η απενεργοποίηση του ενζύμου έγινε στους 65°C για 10 λεπτά.

3.5 Απομάκρυνση DNA από τα δείγματα ολικού RNA με DNase I (με καθαρισμό με χρήση φαινόλης)

Η μέθοδος της DNase I χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτική της προηγούμενης μεθόδου, λόγω των δυσκολιών που παρουσιάστηκαν στην απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα ολικού RNA. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Ελήφθησαν δείγματα ολικού RNA και μεταφέρθηκαν σε σωλήνες eppendorf, στους οποίους προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα DNase I.
- Το ολικό RNA επώαστηκε με DNase I (της εταιρίας TAKARA) για 1 ώρα στους 37°C.
- Ακολούθησε καθαρισμός του δείγματος με φαινόλη.
- Προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης - χλωροφόρμιου - ισοαμυλικής αλκοόλης 25:24:1, το μείγμα αναδεύτηκε καλά και ακολούθησε φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/ λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα eppendorf.
- Προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος χλωροφόρμιου - ισοαμυλικής αλκοόλης 24:1, το μείγμα αναδεύτηκε καλά και ακολούθησε φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/ λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα eppendorf.
- Τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίστηκαν με την προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και 2,5x του όγκου αιθανόλης. Το δείγμα αφέθηκε στους -80 °C για 20 λεπτά.
- Ακολούθησε φυγοκέντριση 30 λεπτών στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- Το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% v/v αιθανόλη, αφέθηκε να στεγνώσει και επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο ddH₂O.

3.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας δειγμάτων

Κατά τη διαδικασία προσδιορισμού της συγκέντρωσης και καθαρότητας των δειγμάτων (δηλαδή, όσον αφορά τη συγκέντρωση και καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής φωτομετρικής ανάλυσης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη αρχή των *Lambert & Beer*. Σύμφωνα με αυτή την αρχή, η απορρόφηση του φωτός από ένα διάλυμα συνδέεται άμεσα με τη συγκέντρωση μίας συγκεκριμένης χημικής ένωσης και το μήκος του φωτός που διέρχεται του διαλύματος.

Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$C_{\text{RNA}} = A_{260} \times D \times \text{συντελεστής Αραιώσης} \quad (1)$$

όπου C_{RNA} είναι η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων, A_{260} είναι η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm, και D είναι μία σταθερά που εξαρτάται από τον τύπο του νουκλεϊνικού οξέος. Η σταθερά D λαμβάνει τις ακόλουθες τιμές: σε καθαρά διαλύματα DNA ισούται με 50 mg/ml, σε διαλύματα RNA ισούται με 40 mg/ml, και σε ολιγονουκλεοτίδια ισούται με 30 mg/ml.

Για να προσδιοριστεί η καθαρότητα των δειγμάτων νουκλεϊνικών οξέων, υπολογίστηκαν οι λόγοι: A_{260}/A_{280} και A_{260}/A_{230} . Όταν οι τιμές των δύο αυτών λόγων κυμαίνονται μεταξύ 1,8-2,0 και 0,5 αντιστοίχως, τότε τα δείγματα θεωρούνται ικανοποιητικής καθαρότητας.

Για να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση και την καθαρότητα των δειγμάτων, τοποθετήσαμε 2 μl από κάθε δείγμα σε σωλήνες erpendorf, που περιείχαν 48 μl dH_2O και στη συνέχεια αφού τα μεταφέραμε σε κυψελίδες, τα τοποθετήσαμε διαδοχικά στη φωτομετρική συσκευή.

3.7 Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Ο έλεγχος απομάκρυνσης του DNA από τα δείγματα έγινε αρχικά με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), τα προϊόντα της οποίας στη συνέχεια αναλύθηκαν δια ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε τελικούς όγκους των 20μl. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων δίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3-2. Το πρόγραμμα εργασίας στο θερμοκυκλοποιητή σχεδιάστηκε σύμφωνα με τα επιδιωκόμενα αποτελέσματα και παρουσιάζεται στον Πίνακα 3-3. Οι ειδικοί εκκινητές για την αντίδραση PCR σχεδιάστηκαν από τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος. Οι ειδικοί εκκινητές ενισχύουν το γονίδιο της ουβικιτίνης, που χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς γιατί η έκφρασή του είναι σταθερή στο φυτό *Arabidopsis thaliana*.

Πίνακας 3-2: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)		
	20 μl (rxn)	Τελική συγκέντρωση
Καθαρό νερό	μέχρι 20 μl	-
10 x ρυθμιστικό διάλυμα με Mg^{2+}	2 μl	1x
dNTPs (10 Mm)	0,4 μl	200 μM
Ευθύς εκκινητής(10 μM)	0,8 μl	0,4 μM
Ανάστροφος εκκινητής (10 μM)	0,8 μl	0,4 μM
Μήτρα DNA	όσο απαιτείται	-
KapaTaq (5U/μl)	0,08 μl	1U ανά 50 μl

Πίνακας 3-3: Στάδια εκτελούμενου προγράμματος συσκευής PCR			
	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αρ. κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min	1
Αποδιάταξη αλυσίδων DNA	95°C	30 sec	30
Υβριδισμός εκκινητών	56°C	30 sec	30
Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA	72°C	30 sec	30
Τελική επιμήκυνση	72°C	2 min	1

3.8 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να αναλυθούν δια της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση είναι μία διαδικασία κατά την οποία το αρνητικά φορτισμένο μόριο του DNA κινείται μέσα σε ένα πορώδες πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό φορτίο τους, το μέγεθος και το σχήμα κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο και μπορούν να διαχωριστούν υπό κατάλληλες συνθήκες, διατηρώντας παράλληλα τις βιολογικές τους ιδιότητες. Τα μικρά τμήματα DNA γενικά κινούνται γρηγορότερα από τα μεγάλα. Τα τμήματα με μέγεθος από 100 ζεύγη βάσεων έως αρκετές χιλιάδες ζεύγη βάσεων είναι δυνατόν να διαχωριστούν αποτελεσματικά σε ένα πήκτωμα με συγκέντρωση αγαρόζης 1%, εφόσον το μέγεθος των τμημάτων αυτών διαφέρει κατά λίγες εκατοντάδες ζεύγη βάσεων. Τα τμήματα DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο μπορεί να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός.

Η διαδικασία προετοιμασίας του πηκτώματος αγαρόζης που ακολουθήθηκε περιγράφεται στη συνέχεια αναλυτικά:

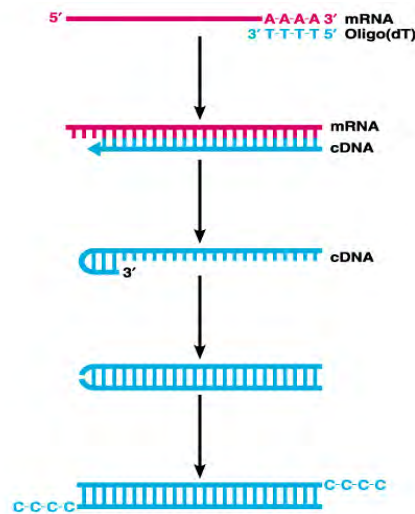
- Ικανοποιητική ποσότητα αγαρόζης (συνήθως 1,2 - 1,5%) προστέθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE IX και θερμάνθηκε εντός φούρνου μικροκυμάτων έως ότου ρευστοποιηθεί πλήρως.
- Στην ρευστοποιημένη αγαρόζη προστέθηκε 0,001% v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αφέθηκε για λίγο ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία.
- Το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πριν την τελική στερεοποίηση του πηκτώματος, ένα ειδικό "χτένι" βυθίστηκε με σκοπό να δημιουργηθούν οι κατάλληλες υποδοχές (πηγαδάκια) για τα δείγματα.
- Στα δείγματα του DNA που επρόκειτο να αναλυθούν, προστέθηκε η χρωστική ουσία DLB 6X (συνήθως μπλε χρώματος), 1/10 του όγκου του διαλύματος, με τη βοήθεια πιπέτας.
- Μόλις το πήκτωμα στερεοποιήθηκε, το "χτένι" απομακρύνθηκε με προσοχή, και το εκμαγείο τοποθετήθηκε στο δοχείο της συσκευής της ηλεκτροφόρησης, το οποίο συμπληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα TAE IX.
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις ειδικές υποδοχές του πηκτώματος με τη βοήθεια δοσομετρικής πιπέτας.

- Με τη βοήθεια του τροφοδοτικού δημιουργήθηκε ένα ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο ρυθμίστηκε ώστε να μην υπερβαίνει τα 100V.
- Κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, τα μόρια του DNA μετακινήθηκαν σχηματίζοντας χαρακτηριστικές ζώνες σε διαφορετικές περιοχές του πηκτώματος.
- Τέλος, στο πήκτωμα, που είχε προστεθεί το βρομιούχο αιθίδιο, έγιναν ορατές οι χαρακτηριστικές ζώνες με τη βοήθεια συσκευής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

3.9 Αντίστροφη μεταγραφή του mRNA σε cDNA

Κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής προβλέπεται, ως αρχικό δείγμα, να χρησιμοποιηθεί ολικό RNA, το οποίο μετατρέπεται σε cDNA παρουσία ενός ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Επίσης, για τη μεταγραφή χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή ή εννεαμερή Oligo dTs και το cDNA, που πρόκειται να παραχθεί, χρησιμοποιείται στη συνέχεια ως εκμαγείο για τη DNA πολυμεράση με τη συνήθη τεχνική της PCR (Εικόνα 3-1). Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Super Script™ II RT της εταιρείας invitrogen, το οποίο περιγράφεται ακολούθως:

- Σε σωλήνα erpendorf προστέθηκε 1μg ολικού RNA, 1μl Oligo dT (500 μg/ml), 1μl μίγμα dNTPs (10mM) και ddH₂O έως τελικού όγκου 12μl.
- Τα δείγματα αποδιατάχθηκαν με θέρμανση στους 65⁰C για 5 λεπτά. Το δείγμα μεταφέρθηκε αμέσως σε πάγο για να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση.
- Ακολούθησε σύντομη φυγοκέντρηση και προστέθηκαν 4μl 5x first-strand buffer, 1μl (40units) RNaseOUT παρεμποδιστή ριβονουκλεάσης και 2μl 0,1M DTT.
- Η αντίδραση προθερμάνθηκε στους 42 °C για 2 λεπτά πριν την προσθήκη 1μl (200 units) SuperScript II αντίστροφης μεταγραφάσης.
- Το μείγμα της αντίδρασης επώαστηκε στους 42 °C για 50 λεπτά και ακολούθησε απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση στους 70 °C για 15 λεπτά.



Εικόνα 3-1. Σύνθεση cDNA

3.10 Πρωτόκολλο PCR πραγματικού χρόνου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) ή ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) είναι μία μέθοδος, η οποία βασίζεται στην κλασική PCR και χρησιμοποιείται για να ενισχύσει τμήματα DNA, ενώ παράλληλα επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Η PCR πραγματικού χρόνου επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλαπλών τμημάτων DNA σε απόλυτο αριθμό με τη βοήθεια πρότυπων διαφόρων συγκεντρώσεων DNA. Η μέτρηση της ποσότητας πραγματοποιείται σε ολόκληρη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στην προκειμένη περίπτωση ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR πραγματικού χρόνου, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μία καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που διευκολύνει την παρακολούθηση της αντίδρασης στο σύνολό της. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του παραγόμενου προϊόντος και σχετίζεται με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Για όλες τις περιπτώσεις, η αντίδραση προετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας της συσκευής PCR πραγματικού χρόνου. Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκαν βάση συγκεκριμένου θερμοκρασιακού προγράμματος επί της συσκευής MX3005P της εταιρείας Stratagene. Στο τέλος κάθε αντίδρασης ακολουθούσε η καμπύλη αποδιάταξης, η οποία επιβεβαίωνε την ύπαρξη ενός και μόνου προϊόντος στην κάθε αντίδραση. Με το τέλος των αντιδράσεων εξήχθησαν τα δεδομένα με τη μορφή πινάκων και ακολούθησε η επεξεργασία τους με τη βοήθεια του λογισμικού LinRegPCR προκειμένου να προσδιοριστεί η αποδοτικότητα των εκκινητών της κάθε αντίδρασης, ενώ με τη βοήθεια του προγράμματος MxPro προσδιορίστηκε ο αριθμός των κύκλων ορίου (Ct), που αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης επί των οποίων είναι δυνατή η ανίχνευση φθορισμού.

- Τα cDNA-στόχοι ενισχύθηκαν με εξειδικευμένους εκκινητές, που σχεδιάστηκαν στη μεταγραφόμενη περιοχή του κάθε γονιδίου με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν κοντά στην περιοχή του 3' άκρου των γονιδίων και το μέγεθός τους κυμαίνονταν από 70 έως 150 ζεύγη βάσεων.
- Η αντίδραση PCR περιλάμβανε το μίγμα της SYBR Green (Kapa), τους εξειδικευμένους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0,2 μM ο καθένας και 1μl της μήτρας cDNA (Πίνακας 3-4 και Εικόνα 3-2).
- Οι αντιδράσεις του ποσοτικού RT-PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα MX3005P της εταιρείας Stratagene.
- Το πρόγραμμα του PCR περιλάμβανε 3 λεπτά επώαση στους 95°C και ακολούθησαν 40 κύκλοι με 95°C για 15 δευτερόλεπτα, 58°C για 20 δευτερόλεπτα και 72°C για 11 δευτερόλεπτα (Πίνακας 3-5).
- Η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός διμερών των εκκινητών ελέγχθηκε για κάθε ζεύγος χωριστά από την ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης στο τέλος της αντίδρασης.

- Τα επίπεδα έκφρασης ενός γονιδίου του *Arabidopsis thaliana* που κωδικοποιεί για ουβικιτίνη χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικός έλεγχος για να γίνει κανονικοποίηση στις μικρές διαφορές που παρουσιάζονται στις ποσότητες του cDNA.
- Τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου (X) υπολογίστηκαν σε αναλογία προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της ουβικιτίνης (U). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης υπολογίστηκαν από τον τύπο $E^{Ct}(U) / E^{Ct}(X)$, όπου E είναι η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR.
- Η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR (E) για κάθε γονίδιο υπολογίστηκε από τη γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της απορρόφησης ανά κύκλο αντίδρασης, χρησιμοποιώντας το λογισμικό LinRegPCR.

Πίνακας 3-4: Αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου

	20 μl	Τελική συγκέντρωση
cDNA	1 μl	-
Ευθύς εκκινητής	0,8 μl	200 nM
Ανάστροφος εκκινητής	0,8 μl	200 nM
ROx	0,4 μl	-
SYBR (Καπα)	10 μl	1x
H ₂ O	7 μl	-

Πίνακας 3-5: Στάδια εκτελούμενου προγράμματος συσκευής PCR πραγματικού χρόνου

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αρ. κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη αλυσίδων DNA	95°C	15 sec	40
Υβριδισμός εκκινητών	58°C	20 sec	40
Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA	72°C	11 sec	40

WT-0	WT-0	WT-0	HESP1-0	HESP1-0	HESP1-0	WT-25	WT-25	WT-25	HESP1-25	HESP1-25	HESP1-25
WT-0 OXT6-1	WT-0 OXT6-1	WT-0 OXT6-1	HESP1-0 OXT6-1	HESP1-0 OXT6-1	HESP1-0 OXT6-1	WT-25 OXT6-1	WT-25 OXT6-1	WT-25 OXT6-1	HESP1-25 OXT6-1	HESP1-25 OXT6-1	HESP1-25 OXT6-1
WT-0 OXT6-2	WT-0 OXT6-2	WT-0 OXT6-2	HESP1-0 OXT6-2	HESP1-0 OXT6-2	HESP1-0 OXT6-2	WT-25 OXT6-2	WT-25 OXT6-2	WT-25 OXT6-2	HESP1-25 OXT6-2	HESP1-25 OXT6-2	HESP1-25 OXT6-2
WT-0 ADH2	WT-0 ADH2	WT-0 ADH2	HESP1-0 ADH2	HESP1-0 ADH2	HESP1-0 ADH2	WT-25 ADH2	WT-25 ADH2	WT-25 ADH2	HESP1-25 ADH2	HESP1-25 ADH2	HESP1-25 ADH2
WT-0 UBQ	WT-0 UBQ	WT-0 UBQ	HESP1-0 UBQ	HESP1-0 UBQ	HESP1-0 UBQ	WT-25 UBQ	WT-25 UBQ	WT-25 UBQ	HESP1-25 UBQ	HESP1-25 UBQ	HESP1-25 UBQ
WT-50	WT-50	WT-50	HESP1-50	HESP1-50	HESP1-50	WT-50 OXT6-1	WT-50 OXT6-1	WT-50 OXT6-1	HESP1-50 OXT6-1	HESP1-50 OXT6-1	HESP1-50 OXT6-1
WT-50 OXT6-2	WT-50 OXT6-2	WT-50 OXT6-2	HESP1-50 OXT6-2	HESP1-50 OXT6-2	HESP1-50 OXT6-2	WT-50 ADH2	WT-50 ADH2	WT-50 ADH2	HESP1-50 ADH2	HESP1-50 ADH2	HESP1-50 ADH2
WT-50 UBQ	WT-50 UBQ	WT-50 UBQ	HESP1-50 UBQ	HESP1-50 UBQ	HESP1-50 UBQ						

Εικόνα 3-2. Διάταξη δειγμάτων κατά την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *HESPI* στην αντοχή των φυτών *Arabidopsis thaliana* σε συνθήκες καταπόνησης από διαφορετικούς οξειδωτικούς και αβιοτικούς παράγοντες ολοκληρώθηκε με τη μελέτη έκφρασης του γονιδίου *HESPI* σε συνδυασμό με γνωστά γονίδια *OXT6-1*, *OXT6-2* και *ADH2*. Για τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν τρεις έως τέσσερις επαναλήψεις συνήθως με 10 φυτά ανά επανάληψη (σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν περισσότερα των δέκα φυτών). Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τελευταίων επαναλήψεων.

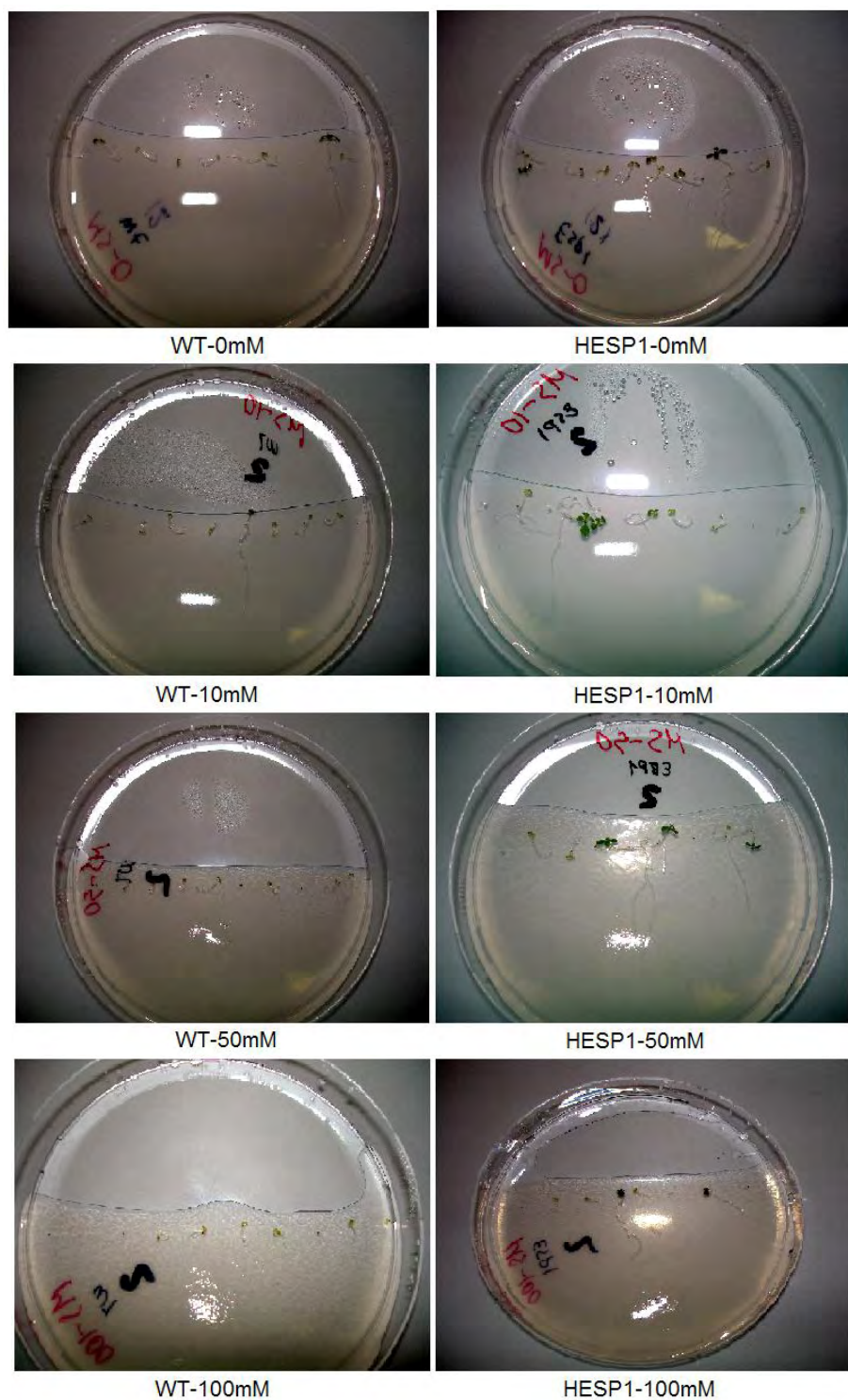
4.1 Μακροσκοπικά αποτελέσματα

Στην προσπάθεια να μελετηθεί η έκφραση του γονιδίου *HESPI*, σε συνθήκες καταπόνησης αλατότητας διαφορετικής συγκέντρωσης, ακραίων θερμοκρασιών περιβάλλοντος και διαφορετικών συγκεντρώσεων ρυπαντή methyl viologen (paraquat), χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα αγρίου τύπου και γενετικώς τροποποιημένα (*hesp1*) του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Η ανάπτυξη των φυτών έγινε σε στερεό υπόστρωμα MS (Murashige & Skoog), σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Σύμφωνα με τις μακροσκοπικές παρατηρήσεις, τα γενετικώς τροποποιημένα (*hesp1*) φυτά *Arabidopsis thaliana*, σε συνθήκες αλατότητας διαφορετικής συγκέντρωσης, αναπτύχθηκαν καλύτερα από τα φυτά αγρίου τύπου. Γεγονός, που τεκμηριώνει ότι οι συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (NaCl), που χρησιμοποιήθηκαν, δεν ήταν επαρκείς για να επηρεάσουν την ανάπτυξη των φυτών, στα οποία ήταν μειωμένη η έκφραση του γονιδίου *HESPI*. Στην Εικόνα 4-1 παρουσιάζεται η ανάπτυξη των σπορόφυτων *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου (WT) και γενετικώς τροποποιημένων (*hesp1*), την 14^η ημέρα, σε θρεπτικό υπόστρωμα απουσία (0 mM) NaCl και παρουσία (10 mM, 50 mM, και 100 mM) NaCl.

Αναλυτικότερα, τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά σε σχέση με εκείνα του αγρίου τύπου παρουσίασαν ζωηρότερη ανάπτυξη ακόμη και στη πρώτη μεταχείριση, κατά την οποία τα φυτά δεν υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας. Στη δεύτερη μεταχείριση, δηλαδή παρουσία 10 mM NaCl, τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά συμπεριφέρθηκαν επίσης καλά χωρίς να φαίνεται ότι επηρεάζονται έστω και στο ελάχιστο, αντιθέτως τα φυτά αγρίου τύπου βλάστησαν με σχετική δυσκολία. Μάλιστα, στη μεταχείριση των 10 mM NaCl, μετρήθηκε το μήκος του ριζικού συστήματος ενός φυτού στα 34 mm. Στην τρίτη και τέταρτη μεταχείριση, παρουσία 50 mM, και 100 mM NaCl αντιστοίχως, τα τοξικά συμπτώματα της αλατότητας ήταν εμφανή στα φυτά αγρίου τύπου, μη επιτρέποντας τη ανάπτυξή τους.

Τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά δείχνουν να μην επηρεάζονται στην παρουσία 50 mM NaCl, ενώ στα 100 mM NaCl, η ανάπτυξή τους φαίνεται να επηρεάζεται αρκετά. Σε ορισμένες περιπτώσεις βλάστησης των γενετικώς τροποποιημένων φυτών *Arabidopsis thaliana*, ακόμη και στη τέταρτη μεταχείριση των 100 mM NaCl, διαπιστώθηκε αύξηση της ανάπτυξης τόσο των φύλλων όσο και του ριζικού συστήματος.

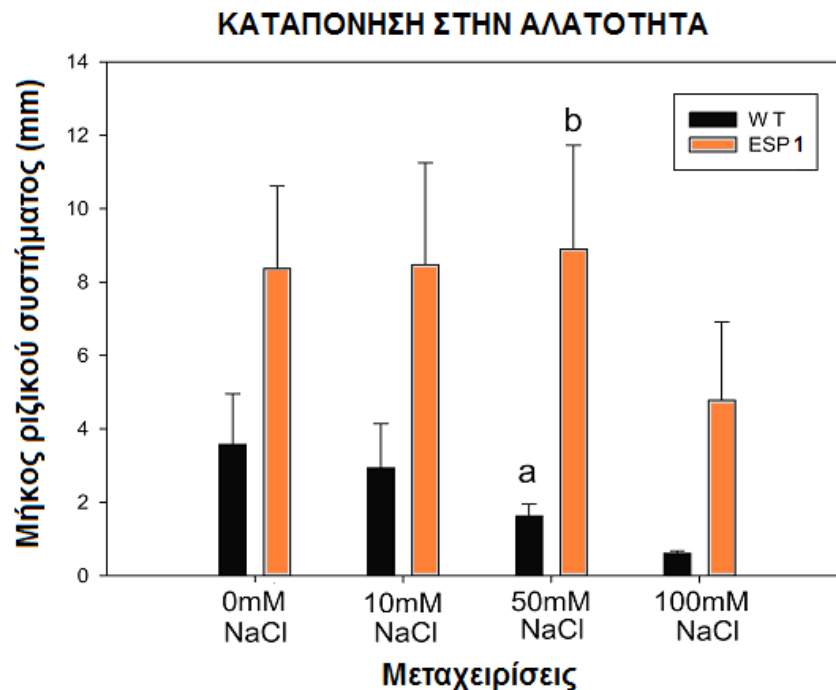


Εικόνα 4-1. Η ανάπτυξη των σπορόφυτων *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου (WT) και γενετικώς τροποποιημένων (*hesp1*), την 14^η ημέρα, σε θρεπτικό υπόστρωμα απουσία NaCl και παρουσία 10 mM, 50 mM, και 100 mM NaCl.

Στον Πίνακα 4-1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης μετά τη μακροσκοπική παρατήρηση του μήκους του ριζικού συστήματος των φυτών αγρίου τύπου (WT) και γενετικώς τροποποιημένων (*hesp1*) του *Arabidopsis thaliana*, κάτω από διαφορετικές μεταχειρίσεις στην αλατότητα (0mM, 10mM, 50mM, και 100mM NaCl). Η επίδραση των διαφόρων μεταχειρίσεων απουσία και παρουσία NaCl αποδίδεται καλύτερα στην Εικόνα 4-2.

Πίνακας 4-1: Στατιστική ανάλυση μακροσκοπικής παρατήρησης του μήκους ριζικού συστήματος σπορόφυτων σε συνθήκες καταπόνησης στην αλατότητα

Μεταχειρίσεις	Σπορόφυτα	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Σφάλμα
0mM NaCl	WT	3,573333	5,350096	1,381389
	<i>hesp1</i>	8,366667	9,521616	2,244266
10mM NaCl	WT	2,935294	4,964366	1,204036
	<i>hesp1</i>	8,473333	10,74559	2,774501
50mM NaCl	WT	1,626667	1,234890	0,318847
	<i>hesp1</i>	8,900000	10,94336	2,825564
100mM NaCl	WT	0,606667	0,265832	0,068638
	<i>hesp1</i>	4,778571	7,991070	2,135703



Εικόνα 4-2. Η επίδραση των μεταχειρίσεων απουσία NaCl και παρουσία 10 mM, 50 mM, και 100 mM NaCl στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος των σπορόφυτων αγρίου τύπου (WT) και γενετικώς τροποποιημένων (*hesp1*) του *Arabidopsis thaliana*.

Οι χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες του περιβάλλοντος είναι γνωστό ότι αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα καταπόνησης των φυτικών οργανισμών, ενώ ο εγκλιματισμός των φυτών σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της ανθεκτικότητάς τους. Σύμφωνα με τις μακροσκοπικές παρατηρήσεις, τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis thaliana*, σε αντιπροσωπευτικές θερμοκρασίες (10°C, 16°C και 22°C) αναπτύχθηκαν καλύτερα έναντι των φυτών αγρίου τύπου. Τα αναλυτικά αποτελέσματα από τη μακροσκοπική παρατήρηση ανάπτυξης του μήκους του ριζικού συστήματος των σπορόφυτων αγρίου τύπου (WT) και γενετικώς τροποποιημένων (*hesp1*) του *Arabidopsis thaliana*, κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες 10°C, 16°C και 22°C καθώς και η στατιστική ανάλυση αυτών παρουσιάζονται στους Πίνακες 4-2 και 4-3 αντιστοίχως.

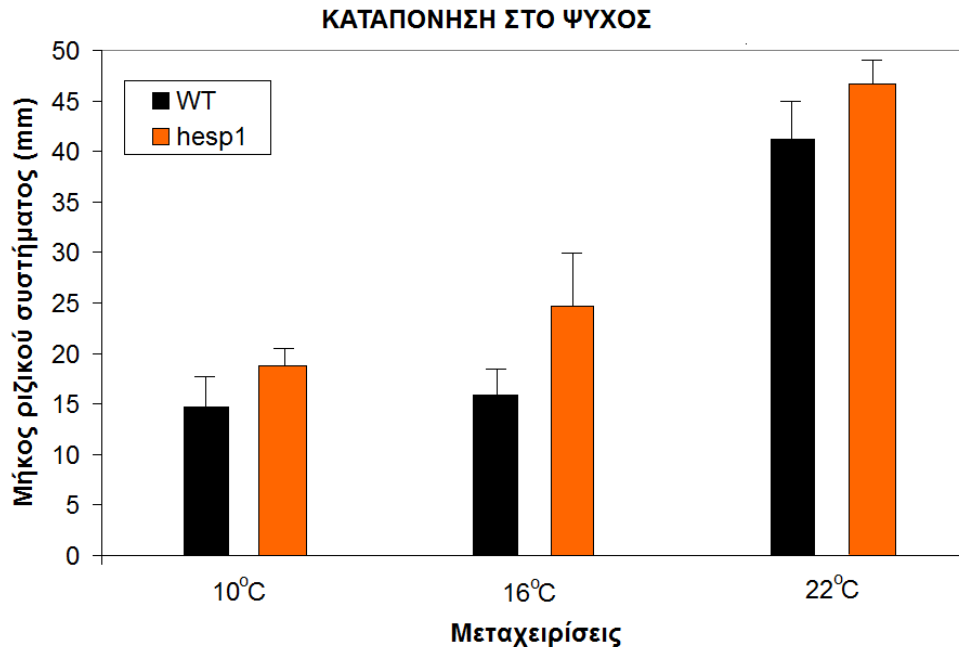
Πίνακας 4-2: Αποτελέσματα μακροσκοπικής παρατήρησης της ανάπτυξης του μήκους του ριζικού συστήματος σπορόφυτων σε θερμοκρασίες των 10°C, 16°C και 22°C (mm)

Σπορόφυτα	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
10°C	WT	8	19	9	10	10	22	26	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>hesp1</i>	21	17	22	20	8	12	15	20	28	12	20	21	16	23	25
16°C	WT	18	6	4	23	13	15	16	15	22	12	29	-	-	-	-
	<i>hesp1</i>	17	19	46	22	22	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22°C	WT	41	31	45	42	37	31	70	42	24	40	44	28	61	-	-
	<i>hesp1</i>	53	51	63	37	38	67	43	48	47	22	45	46	-	-	-

Πίνακας 4-3: Στατιστική ανάλυση μακροσκοπικής παρατήρησης ανάπτυξης μήκους ριζικού συστήματος σπορόφυτων σε διαφορετικές μεταχειρίσεις θερμοκρασιών

Μεταχειρίσεις	Σπορόφυτα	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Σφάλμα
10°C	WT	14,85714	7,312742	2,763957
	<i>hesp1</i>	18,75000	5,170429	1,292607
16°C	WT	15,72727	7,267612	2,191267
	<i>hesp1</i>	24,83333	10,60974	4,331410
22°C	WT	41,23077	12,72238	3,528554
	<i>hesp1</i>	46,66667	11,81165	3,409731

Η επίδραση των τριών θερμοκρασιών στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος αποδίδεται καλύτερα στην Εικόνα 4-3. Είναι φανερό ότι έχουμε αλλαγές του φαινοτύπου σε όλα τα γενετικώς τροποποιημένα σπορόφυτα (*hesp1*) του *Arabidopsis thaliana*. Ο μέσος όρος του μήκους του ριζικού συστήματος των γενετικώς τροποποιημένων φυτών, στις αντιπροσωπευτικές θερμοκρασίες των 10°C, 16°C και 22°C, εμφανίζεται να είναι καλύτερος σε σχέση με τον αντίστοιχο μέσο όρο των φυτών αγρίου τύπου. Όμως, οι διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές.



Εικόνα 4-3. Η επίδραση της μεταχείρισης στις θερμοκρασίες των 10°C, 16°C και 22°C στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος των σπορόφυτων αγρίου τύπου (WT) και γενετικώς τροποποιημένων (*hesp1*) του *Arabidopsis thaliana*.

Η τρίτη περίπτωση μελέτης αφορούσε την έκθεση σπορόφυτων αγρίου τύπου και γενετικώς τροποποιημένων του *Arabidopsis thaliana* σε διαφορετικές δόσεις (0,15 μM και 0,30 μM) methyl viologen (paraquat). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένας από τους σπόρους, δεν μπόρεσε να βλαστήσει σε αυτό το μη-φιλικό περιβάλλον (Εικόνα 4-4).



Εικόνα 4-4. Η προβληματική ανάπτυξη των γενετικώς τροποποιημένων (*hesp1*) σπορόφυτων *Arabidopsis thaliana*, την 14^η ημέρα, σε θρεπτικό υπόστρωμα παρουσία 0,15 μM methyl viologen (paraquat).

Είναι λοιπόν φανερό από τα ευρήματα της ανωτέρω μακροσκοπικής ανάλυσης, ότι τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis thaliana* αναπτύσσονται καλύτερα σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου κάτω από συνθήκες αυξημένης αλατότητας.

4.2 Αποτελέσματα μοριακών αναλύσεων

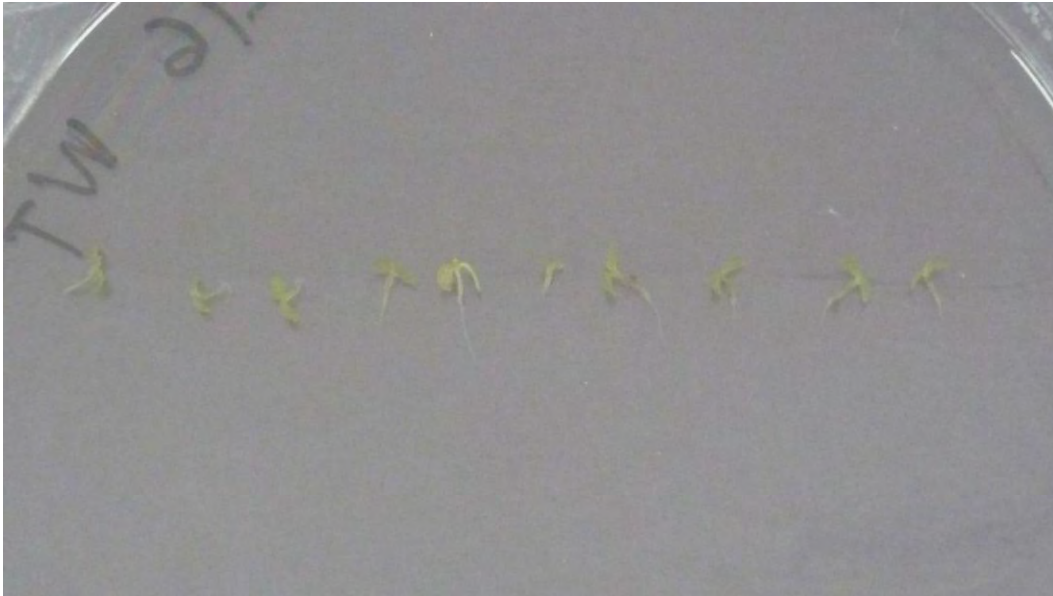
Η μέθοδος της καταπόνησης των σπορόφυτων αγρίου τύπου και γενετικώς τροποποιημένων του *Arabidopsis thaliana* σε οξειδωτικές και αβιοτικές συνθήκες παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι τα φυτά παραμένουν άθικτα χωρίς μηχανικούς τραυματισμούς και συνεπώς διευκολύνεται η ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Τα προκαταρκτικά πειράματα καταπόνησης των σπορόφυτων σε διαφορετικούς αβιοτικούς παράγοντες (βλέπε ανωτέρω), έδειξαν σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος μόνο στη μεταχείριση με 50 mM NaCl. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε, η περαιτέρω διερεύνηση της έκφρασης του γονιδίου *HESPI*, να συνεχιστεί μόνο για τη συγκέντρωση των 50 mM NaCl καθώς και για το μισό αυτής (δηλαδή, τα 25 mM NaCl). Στις Εικόνες 4-5 (A) & (B), παρουσιάζεται το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στη τελευταία φάση των πειραμάτων. Από το υλικό αυτό, που περιελάμβανε φυτά αγρίου τύπου και γενετικώς τροποποιημένα (*hesp1*), ελήφθησαν δείγματα μόνο από το υπέργειο τμήμα (φύλλα) των φυτών. Οι διαδικασίες απομάκρυνσης του DNA και απομόνωσης του mRNA και στη συνέχεια η διαδικασία διερεύνησης της έκφρασης του γονιδίου *HESPI* περιγράφονται αναλυτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

4.2.1 Αποτελέσματα απομόνωσης ολικού RNA

Αρχικά επιχειρήθηκε η απομόνωση του ολικού RNA από φυτικούς ιστούς των φύλλων. Ταυτόχρονα με την απομόνωση του RNA, απομονώθηκε και μία μικρή αλλά σημαντική ποσότητα DNA, η οποία έπρεπε να απομακρυνθεί.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας των δειγμάτων (δηλαδή, όσον αφορά τη συγκέντρωση και καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων), έγινε δια της μεθόδου της φωτομέτρησης. Στον Πίνακα 4-4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης. Στην περίπτωση που ο λόγος A260/A280 λαμβάνει τιμές μεταξύ 1,8-2 εκτιμάται ότι τα δείγματα δεν περιέχουν συγκεντρώσεις πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης κρίθηκε ότι τα συγκεκριμένα δείγματα ήταν αποδεκτής καθαρότητας.

Πίνακας 4-4: Αποτελέσματα φωτομέτρησης δειγμάτων		
Δείγματα	Συγκέντρωση RNA (ng/μl)	Λόγος A260/A280
Μάρτυρας	0	0
WT-0 mM	162,2	1,78
WT-25 mM	97,7	1,81
WT-50 mM	63,0	1,76
HESP1-0 mM	180,4	1,91
HESP1-25 mM	123,0	2,05
HESP1-50 mM	130,9	2,02



(A)



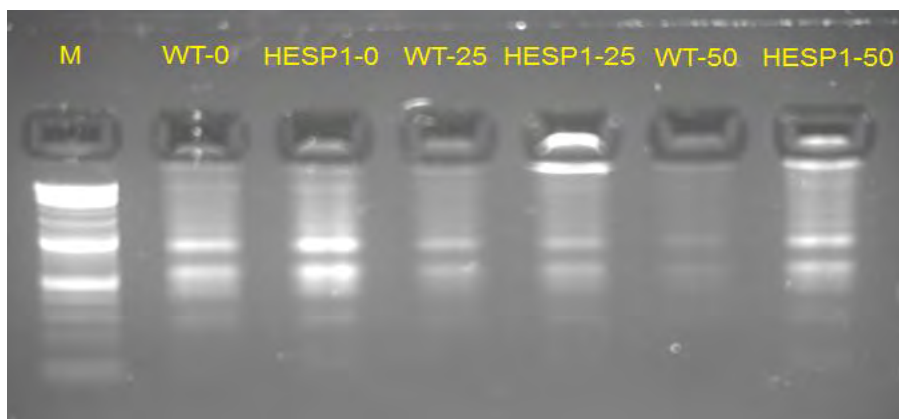
(B)

Εικόνα 4-5. (A) Σπορόφυτα αγρίου τύπου (WT) και (B) Σπορόφυτα γενετικά τροποποιημένα (*hesp1*) του *Arabidopsis thaliana* κατά τη μεταχείριση με 25 mM NaCl, για 14 ημέρες.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για την περαιτέρω ανάλυση των δειγμάτων και μετά την έκθεση του πήκτωματος της αгарόζης σε UV ακτινοβολία, RNA και DNA εμφανίστηκαν σαν μία σειρά από φωτεινές ζώνες. Στις Εικόνες 4-6 και 4-7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μετά από 7 min και 14 min αντιστοίχως. Είναι φανερό από τις δύο εικόνες ότι εκτός του mRNA έχουμε και αρκετή ποσότητα DNA σε όλα τα δείγματα. Οι φωτεινές ζώνες που βρίσκονται στις επάνω σειρές αφορούν το DNA, ενώ οι ζώνες των κάτω σειρών αφορούν το mRNA. Επίσης, παρατηρούμε ότι το δείγμα WT-50 (προτελευταίο στη σειρά) παρουσιάζει αδύναμες τις φωτεινές ζώνες του mRNA - αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η συγκέντρωση του ήταν μικρή. Συνεπώς, στα δείγματα υπάρχει ικανοποιητική συγκέντρωση mRNA, αλλά και DNA, την οποία θα πρέπει να επιχειρήσουμε να την απομακρύνουμε. Η πέψη του DNA πραγματοποιήθηκε με ειδικά ένζυμα που ονομάζονται DNAses (βλέπε κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι). Στην πρώτη προσπάθεια πέψης του DNA χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της εταιρείας Invitrogene.

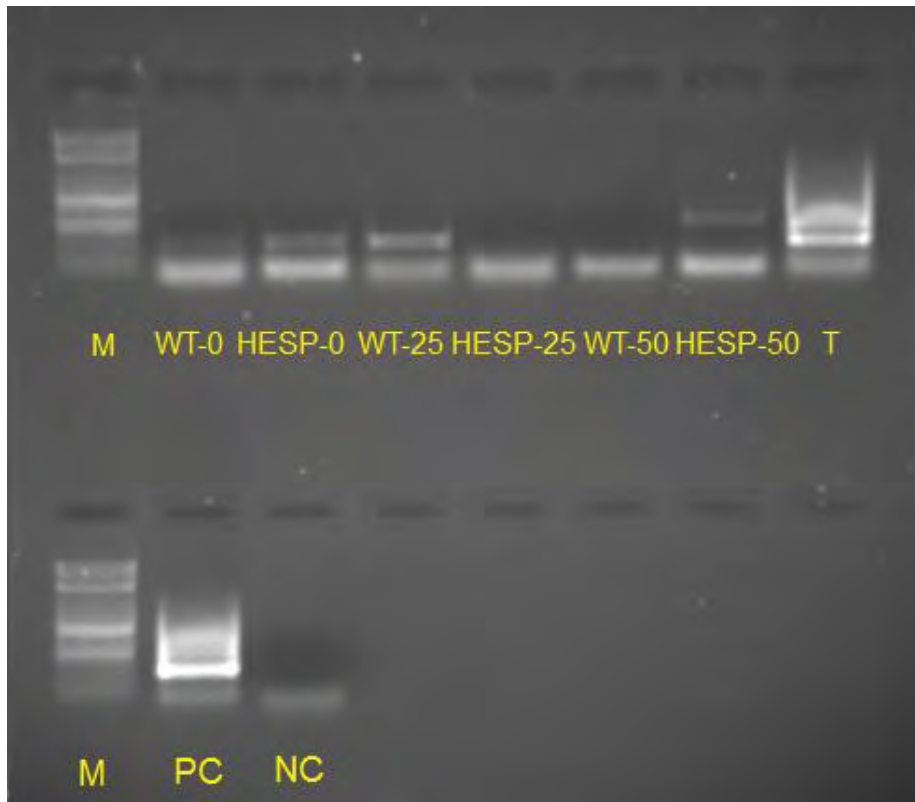


Εικόνα 4-6. Ανάλυση RNA δια ηλεκτροφόρησης δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης, για χρονικό διάστημα 7 min. Από αριστερά προς τα δεξιά εμφανίζονται ο μάρτυρας (M) μοριακών βαρών και ακολουθούν τα δείγματα WT-0, HESP1-0, WT-25, HESP1-25, WT-50 και HESP1-50.



Εικόνα 4-7. Ανάλυση RNA δια ηλεκτροφόρησης δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης, για χρονικό διάστημα 14 min. Από αριστερά προς τα δεξιά εμφανίζονται ο μάρτυρας (M) μοριακών βαρών και ακολουθούν τα δείγματα WT-0, HESP1-0, WT-25, HESP1-25, WT-50 και HESP1-50.

Μετά την προσπάθεια απομάκρυνσης του DNA, έγινε έλεγχος της απομάκρυνσης του DNA με PCR. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης για τα έξι δείγματα (WT-0, HESP1-0, WT-25, HESP1-25, WT-50, HESP1-50), το μάρτυρα (M) μοριακών βαρών, το δείγμα (T) που προέκυψε από παλαιό δείγμα cDNA, και τα δείγματα θετικού ελέγχου (positive control, PC) και αρνητικού ελέγχου (negative control, NC) παρουσιάζονται στην Εικόνα 4-8.



Εικόνα 4-8. Έλεγχος απομάκρυνσης DNA δια ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Επάνω σειρά, από αριστερά προς τα δεξιά εμφανίζονται ο μάρτυρας (M) μοριακών βαρών και ακολουθούν τα δείγματα WT-0, HESP1-0, WT-25, HESP1-25, WT-50, HESP1-50 και το δείγμα T που αντιστοιχεί σε δείγμα cDNA. Κάτω σειρά, από αριστερά προς τα δεξιά εμφανίζονται ο μάρτυρας (M) μοριακών βαρών και ακολουθούν τα δείγματα θετικού ελέγχου (positive control, PC) και αρνητικού ελέγχου (negative control, NC).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, εκτός των δειγμάτων HESP1-25 και WT-50, σε όλα τα υπόλοιπα παρατηρήθηκε η ύπαρξη DNA. Το δείγμα T, καθώς και τα δείγματα PC και NC φαίνεται ότι λειτούργησαν κανονικά.

Το επόμενο βήμα που επιλέχθηκε για την οριστική απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα, ήταν η επανάληψη της διαδικασίας μετά τον καθαρισμό των δειγμάτων με τη χρήση φαινολών. Ακολούθησε νέα αντίδραση PCR και ηλεκτροφόρηση για τα εναπομείναντα δείγματα (WT-0, HESP1-0, WT-25, HESP1-50), τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται στην Εικόνα 4-9.

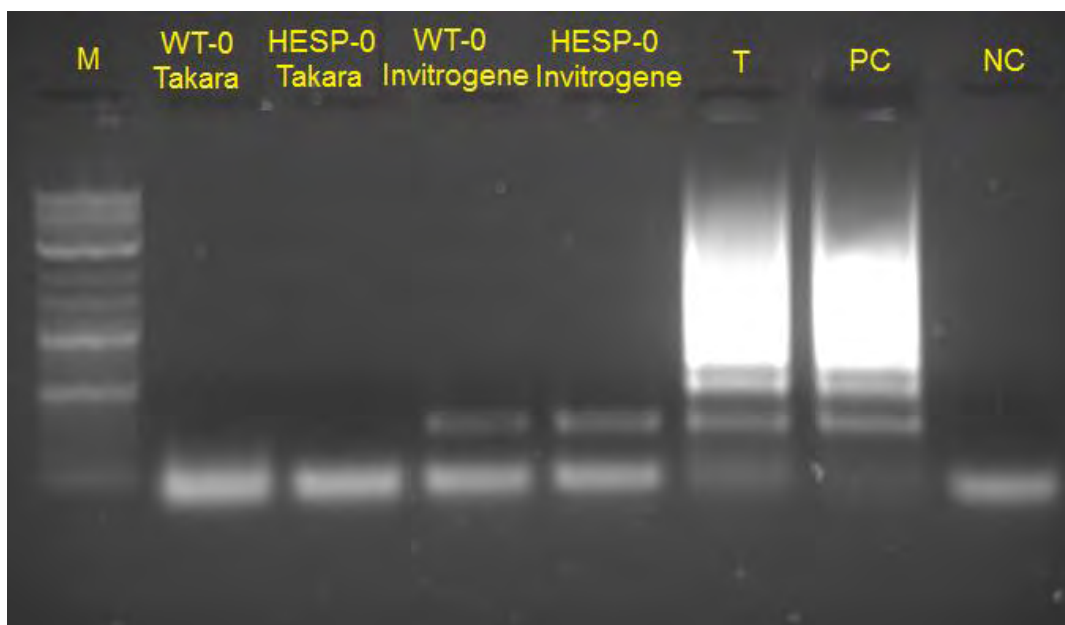


Εικόνα 4-9. Έλεγχος απομάκρυνσης DNA δια ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Από αριστερά προς τα δεξιά εμφανίζονται ο μάρτυρας (M) μοριακών βαρών και ακολουθούν τα δείγματα WT-0, HESP1-0, WT-25, HESP1-50, το δείγμα T που προέκυψε από cDNA και ακολουθούν τα δείγματα θετικού ελέγχου (positive control, PC) και αρνητικού ελέγχου (negative control, NC).

Είναι φανερό από την Εικόνα 4-9 ότι μόνο στα δείγματα WT-25 και HESP1-50 απομακρύνθηκε με επιτυχία το DNA. Τα δείγματα WT-0 και HESP1-0 παρουσίασαν έντονη φωτεινότητα της ζώνης γεγονός που σημαίνει ότι δεν καθάρισαν εντελώς και θα πρέπει εκ νέου να υποβληθούν στη διαδικασία καθαρισμού. Αυτή τη φορά αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί ένα νέο ένζυμο της εταιρείας Takara. Μετά την αντίδραση με το ένζυμο Takara χρησιμοποιήθηκε και πάλι η διαδικασία των φαινολών. Στον Πίνακα 4-5 και την Εικόνα 4-10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης και ηλεκτροφόρησης για τα δύο τελευταία δείγματα μετά τη διαδικασία καθαρισμού τους με το νέο ένζυμο αλλά και με το παλαιό [WT-0 (Takara), HESP1-0 (Takara), WT-0 (Invitrogene), και HESP1-0 (Invitrogene)].

Πίνακας 4-5: Αποτελέσματα φωτομέτρησης μετά τη διαδικασία καθαρισμού των δειγμάτων με τα ένζυμα Takara και Invitrogene

Δείγματα	Συγκέντρωση RNA (ng/μl)	Λόγος A260/A280
Μάρτυρας	0	0
WT-0 mM (Takara)	44,9	1,61
WT-0 mM (Invitrogene)	36,7	1,55
HESP1-0 mM (Takara)	92,6	1,69
HESP1-0 mM (Invitrogene)	81,2	1,62



Εικόνα 4-10. Έλεγχος απομάκρυνσης DNA δια ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Από αριστερά προς τα δεξιά εμφανίζονται ο μάρτυρας (M) μοριακών βαρών και ακολουθούν τα δείγματα WT-0 (Takara), HESP1-0 (Takara), WT-0 (Invitrogene), HESP1-0 (Invitrogene), το δείγμα T που προέκυψε από cDNA και ακολουθούν τα δείγματα θετικού ελέγχου (positive control, PC) και αρνητικού ελέγχου (negative control, NC).

Τελικά, τα δείγματα WT-0 και HESP1-0 καθάρισαν εντελώς μετά από την εφαρμογή του ένζυμου Takara. Αντιθέτως, στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Invitrogene, όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε στην Εικόνα 4-10, διατηρήθηκε στην επάνω σειρά μία φωτεινή ζώνη, η οποία ταυτίζεται με την ζώνη που εμφανίζουν τα δείγματα ελέγχου, όπως για παράδειγμα το δείγμα T και το δείγμα θετικού ελέγχου PC. Συνεπώς, το ένζυμο Takara αποδείχθηκε αποτελεσματικότερο στην πέψη του DNA.

Με την απομάκρυνση του DNA από όλα τα δείγματα, ολοκληρώθηκε με επιτυχία η πρώτη φάση προετοιμασίας των δειγμάτων.

4.2.2 Αποτελέσματα αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου

Πολλά γονίδια εκφράζονται σε περιορισμένο μόνο αριθμό κυτταρικών τύπων, κάτω από ορισμένες μόνο συνθήκες ή συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης. Για να μελετήσουμε την έκφραση του γονιδίου *HESPI* σε συνθήκες διαφορετικής συγκέντρωσης αλατότητας, έπρεπε να προχωρήσουμε στη σύνθεση cDNA.

Το πρώτο βήμα για τη σύνθεση του cDNA, που ήταν η απομόνωση του ολικού κυτταρικού RNA, πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Στη συνέχεια, έπρεπε από το ολικό κυτταρικό RNA να απομονωθεί ένα κλάσμα του, που θα περιέχει μόνο mRNA. Το mRNA χρησιμεύει ως μήτρα για τη σύνθεση του cDNA. Συνήθως, μόνο 1÷2 % του

κυτταρικού RNA είναι mRNA, ενώ το υπόλοιπο περιλαμβάνει το ριβοσωμικό RNA και τα tRNA. Όλα τα μόρια mRNA των ευκαρυωτικών οργανισμών φέρουν στο 3' άκρο τους μία αλληλουχία επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδικών καταλοίπων που περιέχουν αδερίνη, η οποία ονομάζεται ουρά πολυ(A). Η ουρά αυτή είναι σημαντική για τη λειτουργία του mRNA, όμως ταυτόχρονα αποτελεί έναν σχετικά εύκολο τρόπο απομόνωσης του mRNA από το ολικό RNA. Επομένως, οι ουρές πολυ(A) των μορίων mRNA χρησιμοποιούνται και στο δεύτερο βήμα της σύνθεσης cDNA.

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής ολιγο(dT), ο οποίος υβριδίζει στη πολυ(A) ουρά. Η εκκίνηση της αντίστροφης μεταγραφής γίνεται από το 3' άκρο. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η αντίστροφη μεταγραφάση. Το προϊόν της αντίστροφης μεταγραφής είναι ένα υβρίδιο RNA-DNA.

Τα μόρια cDNA που προέκυψαν από την ανωτέρω διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση ποσοτικού PCR πραγματικού χρόνου, όπου μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου *HESPI* καθώς και των γονιδίων *OXT6-1*, *OXT6-2*, *ADH2* και *UBQ*. Για κάθε δείγμα προβλέπονταν συνολικά τρεις επαναλήψεις. Η εξειδίκευση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου ελέγχθηκε σύμφωνα με τις καμπύλες αποδιάταξης (Εικόνα 4-11).

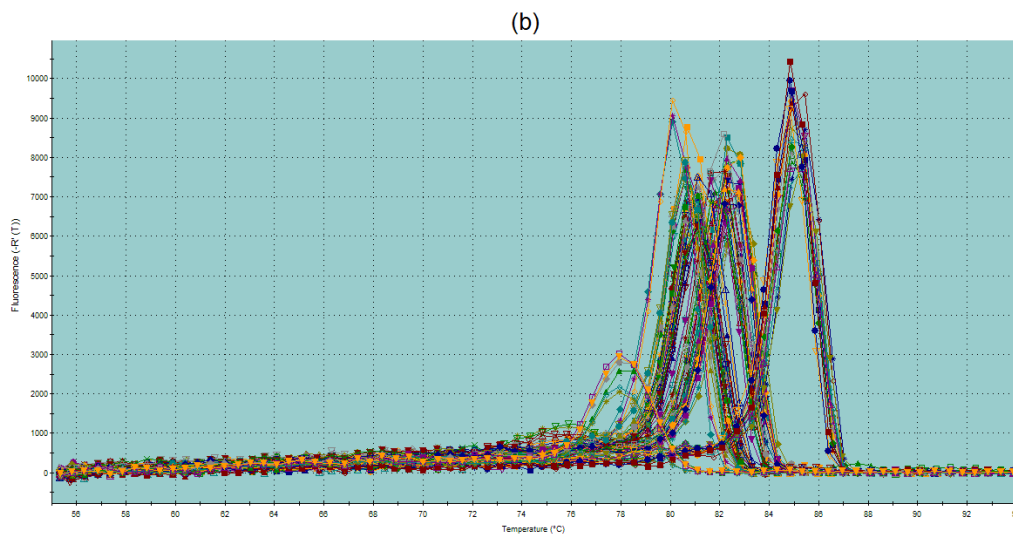
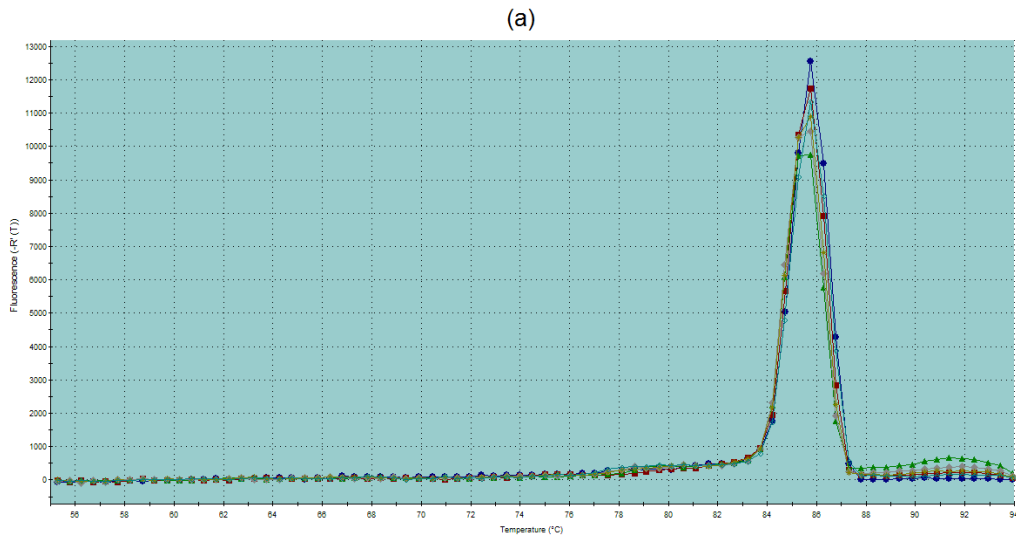
Η PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκε για την αποτελεσματική και γρήγορη ποσοτικοποίηση των μορίων-στόχων στα δείγματά μας. Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της ποσότητας του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μίας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Η ετικέτα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SYBR Green. Πρόκειται για μία χρωστική που προσδένεται στο DNA χωρίς κάποια προτίμηση για συγκεκριμένες αλληλουχίες και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν προβάλλεται η διπλή έλικα. Η ποσότητα του προϊόντος της PCR είναι τόσο χαμηλή κατά τους πρώτους κύκλους, που δεν μπορεί να προσδιοριστεί με βεβαιότητα, καθώς ο φθορισμός που παράγεται δεν υπερβαίνει αρκετά το χαμηλό ενδογενή φθορισμό των αντιδρώντων μορίων. Ύστερα από την αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR, ακολουθεί μία εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε βήμα. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια-στόχοι στην αρχή θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να αρχίσει η εκθετική φάση. Ο αυξανόμενος φθορισμός, που μετριέται καθώς προχωρά η αντίδραση και αυξάνεται η ποσότητα του μορίου-στόχου, δίνει ένα μέτρο της αύξησης του αριθμού των πολλαπλασιαζόμενων μορίων.

Στην Εικόνα 4-12 παρουσιάζονται με διαφορετικά χρώματα οι καμπύλες ενίσχυσης που αντιστοιχούν σε αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου που πραγματοποιήθηκαν με διαφορετικά μόρια-στόχους. Συγκεκριμένα με διαδοχικές αραιώσεις η αρχική ποσότητα του μορίου-στόχου κάθε φορά υποδεκαπλασιάζεται. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του μορίου-στόχου, τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται για να φτάσει η ποσότητα του προϊόντος σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. Μπορούμε ακόμη να παρατηρήσουμε ότι, όταν οι αντιδράσεις φτάσουν σε ένα ανώτατο επίπεδο, οι διαφορές στην ποσότητα των προϊόντων δεν αντιπροσωπεύουν πλέον τις αρχικές διαφορές στην ποσότητα του μορίου-στόχου. Για παράδειγμα στην Εικόνα 4-12 (α) η αντίδραση που αντιστοιχεί στην καμπύλη με το ανοιχτό λαδί χρώμα περιέχει περισσότερα μόρια-στόχους από ότι η αντίδραση με το μπλε χρώμα. Παρ' όλα αυτά, παράγει λιγότερο τελικό προϊόν. Επομένως, φαίνεται από τα ανωτέρω η επίδραση που έχουν, κατά τα αρχικά στάδια της

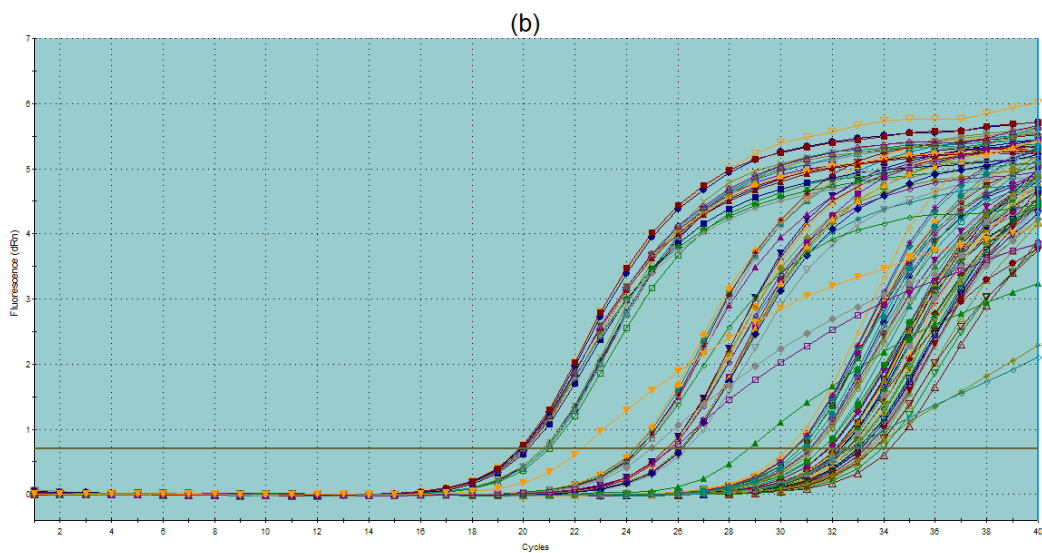
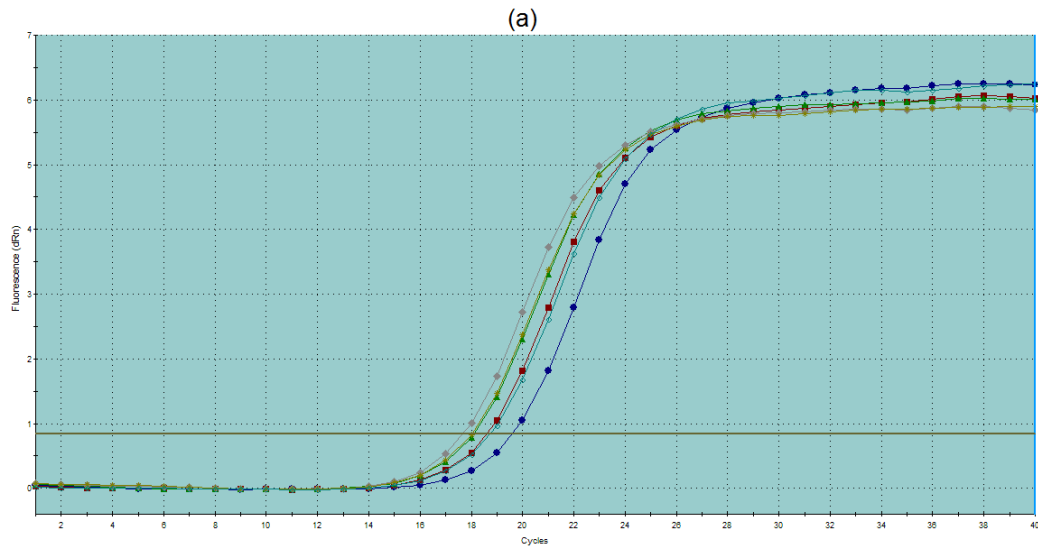
αντίδρασης, μικρές και τυχαίες πειραματικές αποκλίσεις, οι οποίες πολλαπλασιάζονται στα επόμενα στάδια, με αποτέλεσμα η τελική συμπεριφορά της αντίδρασης να μην είναι προβλέψιμη. Επίσης, γίνεται κατανοητό πόσο σημαντικό είναι να πραγματοποιηθεί η σύγκριση τη σωστή στιγμή.

Μετά τη σύνθεση του cDNA ακολούθησε η μελέτη έκφρασης του γονιδίου *HESPI* σε σύγκριση με τα άλλα γνωστά γονίδια *OXT6-1*, *OXT6-2*, *ADH2* καθώς και της *UBQ*. Η *UBQ* χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των υπόλοιπων γονιδίων. Το γονίδιο *HESPI* φαίνεται ότι εκφράζεται στους ιστούς των φύλλων του *Arabidopsis thaliana* άγριου τύπου σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου. Επίσης, η ανάλυση έδειξε ότι το γονίδιο *HESPI* εκφράζεται διαφορετικά σε μεταχειρίσεις διαφορετικής αλατότητας. Όσο αυξάνεται η αλατότητα τόσο μειώνεται η έκφραση του *HESPI* (Εικόνα 4-13). Στα μεταλλαγμένα φυτά στα οποία έχει γίνει σίγηση του γονιδίου *HESPI*, παρατηρούμε ότι η σίγηση αυτή δεν είναι πλήρης (περίπου 60%), αλλά τα επίπεδα έκφρασης του *HESPI* είναι σαφώς μειωμένα σε σχέση με τα φυτά άγριου τύπου (WT). Τα γονίδια *OXT6-1* και *OXT6-2* παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση στα φυτά αγρίου τύπου κάτω από συνθήκες αυξημένης αλατότητας. Όσο αφορά την έκφρασή τους στα φυτά *hesp1*, το γονίδιο *OXT6-1* δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην έκφρασή του στις συνθήκες αυτές. Αντιθέτως το *OXT6-2* βρέθηκε να υπερκεράζεται σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας στα μεταλλαγμένα φυτά *hesp1* με τη μεγαλύτερη έκφραση να παρατηρείται στη συγκέντρωση των 25 mM NaCl και μικρότερη στη συγκέντρωση των 50 mM NaCl (Εικόνα 4-14 και Εικόνα 4-15). Τέλος, το γονίδιο *ADH2* υπερεκφράζεται και αυτό σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας στα φυτά *hesp1* με τη μεγαλύτερη τιμή να την εμφανίζει επίσης στη συγκέντρωση των 25 mM NaCl (Εικόνα 4-16). Τα γονίδια *OXT6-2* και *ADH2* υπερεκφράζονται στην περίπτωση σίγησης του γονιδίου *HESPI* που συμβαίνει στα γενετικώς τροποποιημένα φυτά *hesp1*. Επομένως, μεταξύ της υπερέκφρασης και υποέκφρασης των ανωτέρω γονιδίων υπάρχει συσχέτιση, η οποία παρουσιάζεται αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο της Συζήτησης. Οι μέσοι όροι των τιμών έκφρασης όλων των γονιδίων στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της αλατότητας παρουσιάζονται στον Πίνακα 4-6.

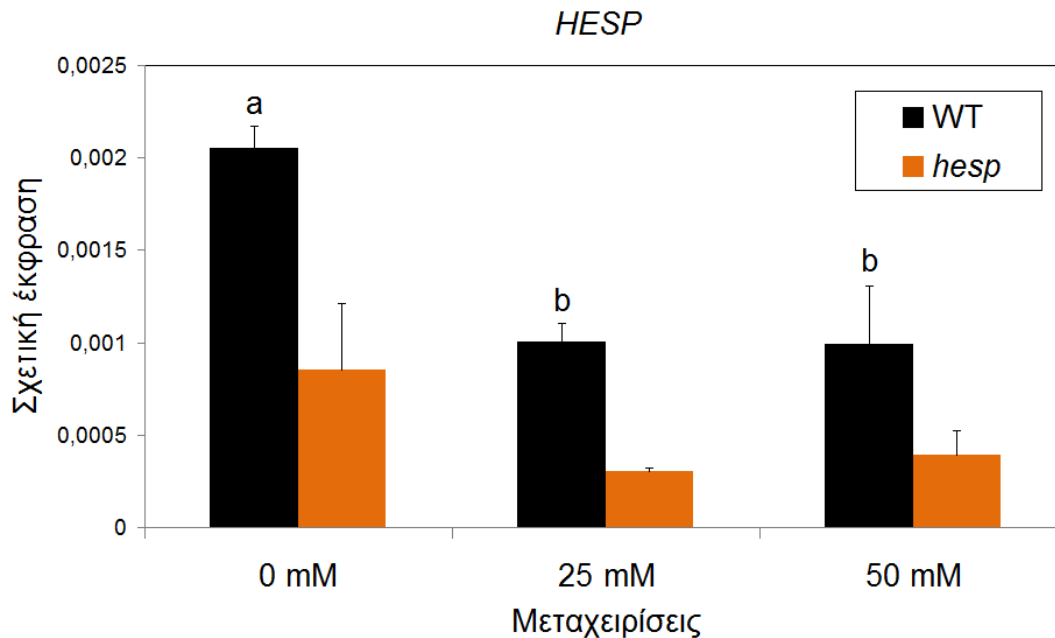
Πίνακας 4-6: Μέσοι όροι τιμών της σχετικής έκφρασης των γονιδίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl				
Μεταχειρίσεις	<i>HESPI</i>	<i>OXT6-1</i>	<i>OXT6-2</i>	<i>ADH2</i>
WT-0	0,002050	0,000773	0,001830	0,061051
HESP1-0	0,000855	0,001340	0,000555	0,035796
WT-25	0,001003	0,000371	0,000293	0,025573
HESP1-25	0,000303	0,000979	0,003010	0,143070
WT-50	0,000994	0,000337	0,000553	0,012025
HESP1-50	0,000391	0,000670	0,000747	0,091754



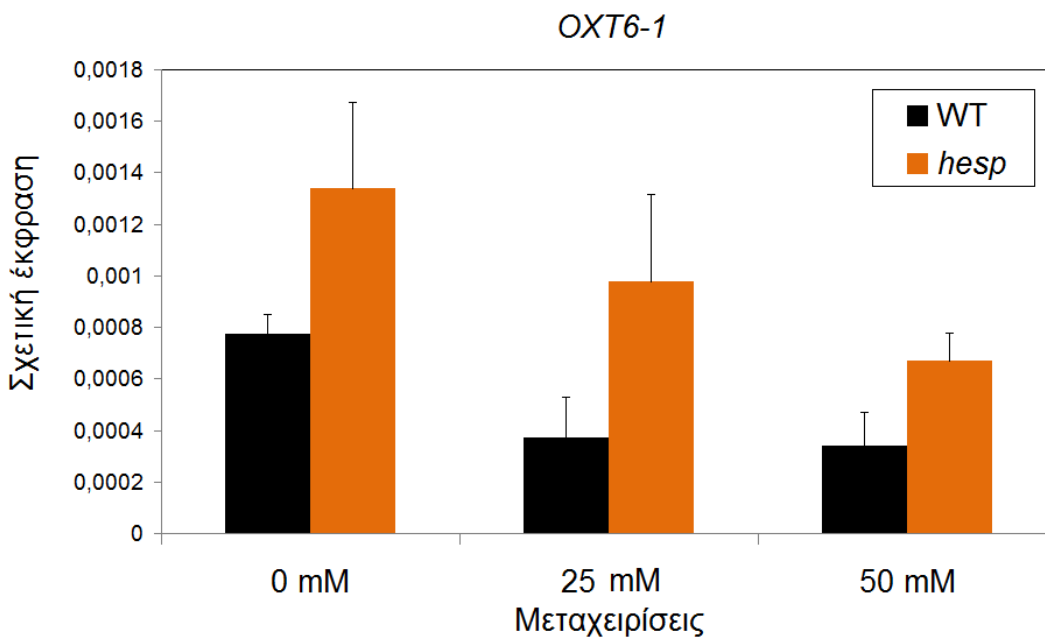
Εικόνα 4-11. Καμπύλες αποδιάταξης της PCR πραγματικού χρόνου: (a) του γονιδίου *UBQ*, (b) των γονιδίων που μελετώνται.



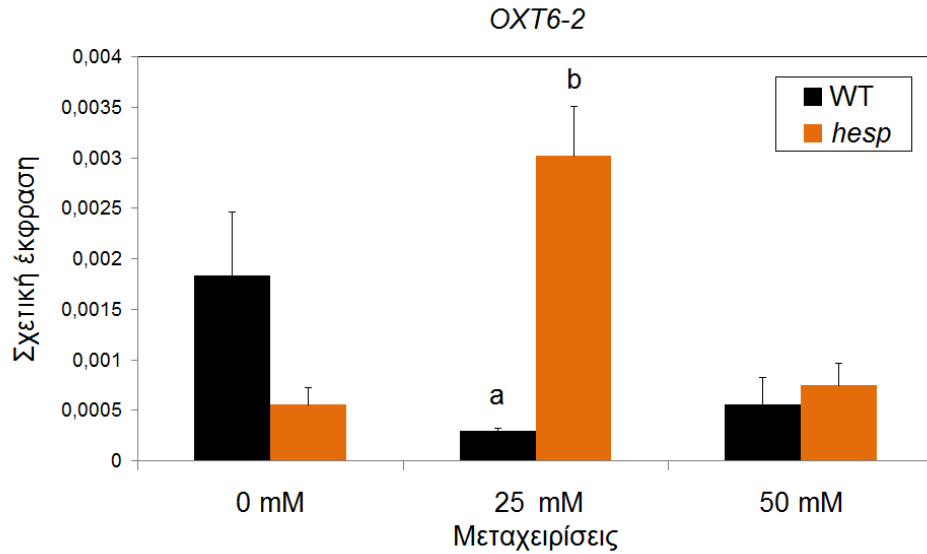
Εικόνα 4-12. Καμπύλες ενίσχυσης της PCR πραγματικού χρόνου: (a) του γονιδίου *UBQ*, (b) των γονιδίων που μελετώνται.



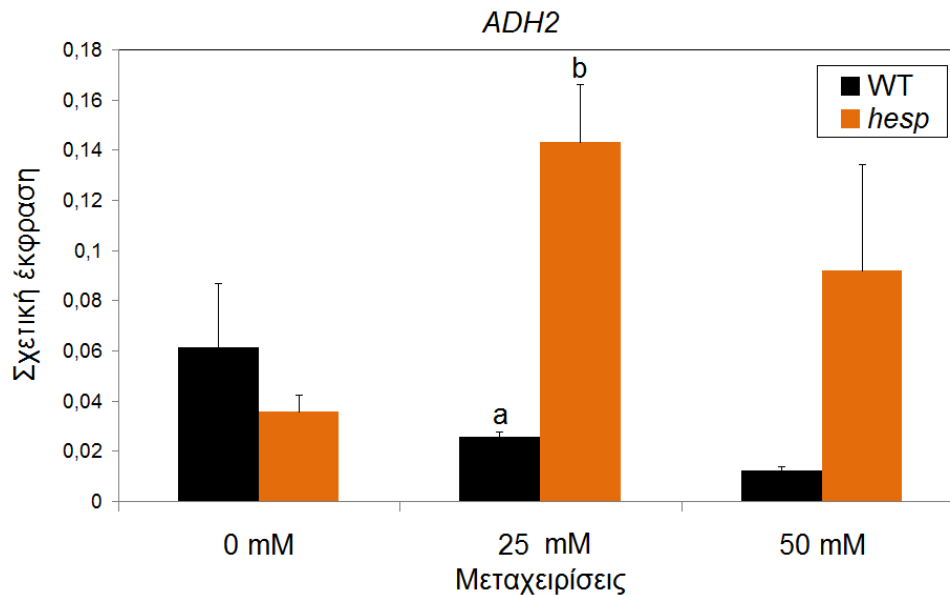
Εικόνα 4-13. Ανάλυση αποτελεσμάτων PCR πραγματικού χρόνου. Σχετική έκφραση του γονιδίου *HESP1* στα σπορόφυτα αγρίου τύπου και γενετικώς τροποποιημένα μετά από τη μεταχείρισή τους σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης στην αλατότητα. Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές διακρίνονται με διαφορετικά γράμματα της αλφαβήτου. Η σύγκριση έγινε μεταξύ των μεταχειρίσεων στα φυτά αγρίου τύπου.



Εικόνα 4-14. Ανάλυση αποτελεσμάτων PCR πραγματικού χρόνου. Σχετική έκφραση του γονιδίου *OXT6-1* στα σπορόφυτα αγρίου τύπου και γενετικώς τροποποιημένα μετά από τη μεταχείρισή τους σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης στην αλατότητα.



Εικόνα 4-15. Ανάλυση αποτελεσμάτων PCR πραγματικού χρόνου. Σχετική έκφραση του γονιδίου *OXT6-2* στα σπορόφυτα αγρίου τύπου και γενετικώς τροποποιημένα μετά από τη μεταχείρισή τους σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης στην αλατότητα. Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές διακρίνονται με διαφορετικά γράμματα της αλφαβήτου Η σύγκριση έγινε μεταξύ των φυτών αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων.



Εικόνα 4-16. Ανάλυση αποτελεσμάτων PCR πραγματικού χρόνου. Σχετική έκφραση του γονιδίου *ADH2* στα σπορόφυτα αγρίου τύπου και γενετικώς τροποποιημένα μετά από τη μεταχείρισή τους σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης στην αλατότητα. Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές διακρίνονται με διαφορετικά γράμματα της αλφαβήτου Η σύγκριση έγινε μεταξύ των φυτών αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ερευνητές του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ανακάλυψαν ότι το γονίδιο *Atlg31500* κωδικοποιεί μία λειτουργική αποαδενυλάση στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (σύμφωνα με μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Η έκφραση του γονιδίου ακολουθεί περιοδικό ρυθμό κατά την εναλλαγή ημέρας και νύχτας. Το γονίδιο βρέθηκε ότι ελέγχεται και επάγεται λίγο πριν την είσοδο στο σκοτάδι και για το λόγο αυτό έλαβε την κωδική ονομασία *HESP1*. Επειδή η ανακάλυψη αυτή έγινε πρόσφατα, δεν έχει ακόμη μελετηθεί επαρκώς ο τρόπος που ρυθμίζεται από τον κirkάδιο ρυθμό ή εκφράζεται σε διαφορετικές αβιοτικές συνθήκες ή οι επιπτώσεις στην ανάπτυξη του φυτού από την απώλεια του συγκεκριμένου γονιδίου.

Το τελευταίο διάστημα, στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, έχουν υλοποιηθεί αρκετές μελέτες που διερευνούν τον τρόπο που ελέγχεται το γονίδιο της *HESP1* από τον κirkάδιο ρυθμό. Η *HESP1* είναι η δεύτερη αποαδενυλάση που ταυτοποιείται στο φυτό *Arabidopsis thaliana* μετά την *AtPARN*. Η Τοματσίδου (2010) μελέτησε αποαδενυλάσες στο φυτό *Arabidopsis thaliana* που ρυθμίζονται από τον κirkάδιο ρυθμό. Μετά την ανάλυση των γονιδίων που κωδικοποιούν για παράγοντες με ομολογία την νοκτουρνίνη, εντόπισε τρεις υπογήφειες αλληλουχίες με αυτά τα χαρακτηριστικά, εκ των οποίων επέλεξε μόνο τη μία. Στη συνέχεια κλωνοποίησε αυτή σε δύο φορείς υπερέκφρασης και πραγματοποίησε βιοχημικό χαρακτηρισμό και μελέτη ενεργότητας. Τέλος, μελέτησε την έκφραση της *HESP1* χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες γνωστά γονίδια όπως *TOC1* και *CCA1*, που υπόκεινται σε κirkάδια έκφραση. Παρατήρησε ότι το γονίδιο της *HESP1* ακολούθησε την κατανομή έκφρασης του γονιδίου *TOC1*, παρουσιάζοντας μέγιστη έκφραση λίγο πριν σταματήσει η έκθεση του φυτού στο φως. Ο Γκέβρος (2011) μελέτησε τον τρόπο που επηρεάζεται η έκφραση του γονιδίου της *HESP1* από τον κirkάδιο ρυθμό του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Πραγματοποίησε πειράματα σε φυτά αγρίου τύπου και γενετικώς τροποποιημένα που έφεραν το τριπλό μετάλλαγμα (*CCA*, *LHY*, και *TOC*). Στα φυτά αγρίου τύπου διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο της *HESP1* υποεκφράζεται τις πρώτες πρωινές ώρες, ενώ επάγεται το μεσημέρι και το βράδυ. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου της *HESP1* στα γενετικώς τροποποιημένα φυτά, στα οποία είχε απορυθμιστεί το κirkάδιο ρολόι. Στα φυτά αυτά η έκφραση του γονιδίου της *HESP1* παρουσίασε μία μέγιστη τιμή το μεσημέρι, ενώ τις βραδινές ώρες μειώθηκε σημαντικά. Συνεπώς, παρατηρείται μία διαφοροποίηση του προτύπου έκφρασης μεταξύ γενετικώς τροποποιημένων και φυτών αγρίου τύπου. Ο Παπαποστόλου (2012) μελέτησε την έκφραση βασικών γονιδίων του κirkαδικού ρολογιού σε μεταλλαγμένες σειρές T-DNA ένθεσης που παρουσίασαν μειωμένη έκφραση του *HESP1*. Με τη βοήθεια της τεχνικής T-DNA ένθεσης είχε εισαχθεί εξωγενές γενετικό υλικό εντός του γονιδίου της *HESP1*, που διατάραξε την έκφρασή της. Συνέχισε με την καλλιέργεια αυτογονιμοποιούμενων φυτών και την ταυτοποίηση αυτών ως προς την ομοζυγωτία της ένθεσης. Τα ομόζυγα φυτά με μειωμένα επίπεδα έκφρασης του *HESP1* υποβλήθηκαν σε συνθήκες φωτοπεριοδισμού (16 ώρες φωτός / 8 ώρες σκότους) και μελετήθηκε σε αυτά η έκφραση γονιδίων. Τέλος, από μέλη του εργαστηρίου βρέθηκε, με τη βοήθεια της τεχνικής της PCR πραγματικού χρόνου, ότι στα ομόζυγα φυτά *Arabidopsis thaliana* της μεταλλαγμένης σειράς T-DNA ένθεσης *037900*, η έκφραση *HESP1* παρουσιάζεται σημαντικά μειωμένη (60%), ενώ δεν διαπιστώθηκε εμφανής μεταβολή στην ανάπτυξη ή στη φυσιολογία των φυτών.

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αποτελεί συνέχεια αυτής της ερευνητικής προσπάθειας του εργαστηρίου. Στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *HESPI*, καθώς και των φυτών *Arabidopsis thaliana* της μεταλλαγμένης σειράς 037900, σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης. Ειδικότερα, μελετήθηκε η συμπεριφορά των φυτών σε συνθήκες αλατότητας διαφορετικής συγκέντρωσης, σε διαφορετικές θερμοκρασίες περιβάλλοντος, και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις methyl viologen (paraquat). Για να μελετηθεί πιθανή συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου *HESPI*, και της απόκρισης του φυτού σε συνθήκες αλατότητας διαφορετικής συγκέντρωσης, χρησιμοποιήθηκαν φυτά άγριου τύπου και γενετικώς τροποποιημένα. Τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά είχαν καλύτερη ανάπτυξη (δεν φάνηκε να επηρεάζονται από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl) σε σχέση με τα φυτά άγριου τύπου, τα οποία έδειξαν να επηρεάζονται σημαντικά και σε αρκετές περιπτώσεις δεν βλάστησαν. Επίσης, η έκθεση των φυτών σε διαφορετικές θερμοκρασίες περιβάλλοντος (10°C, 16°C και 22°C) δεν έδειξε ότι τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά αναπτύχθηκαν καλύτερα έναντι των φυτών άγριου τύπου, χωρίς όμως οι παρατηρούμενες διαφορές να είναι στατιστικώς σημαντικές. Τέλος, τα αποτελέσματα από την έκθεση των φυτών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,15 μM και 0,30 μM) methyl viologen (paraquat) έδειξαν ότι όλα τα φυτά (άγριου τύπου και γενετικώς τροποποιημένα) δεν μπόρεσαν να βλαστήσουν σε αυτές τις συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης. Συνοψίζοντας καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά παρουσίασαν μεγαλύτερη ανοχή στις συνθήκες αυξημένης αλατότητας σε σχέση με τα φυτά άγριου τύπου.

Αρχικά η διερεύνηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας και στη συνέχεια η μελέτη έκφρασης των γονιδίων, μετά από έκθεση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης από διαφορετικούς αβιοτικούς παράγοντες, είναι μία προσφιλή μέθοδος που έχει υιοθετηθεί από πολλούς ερευνητές. Οι Rizhsky et al. (2004) προκειμένου να βρουν τη συσχέτιση μεταξύ H₂O₂ και της έκφρασης των πρωτεϊνών Zat12, Zat7, του μεταγραφικού παράγοντα WRKY25 και του Apx1 άφησαν φυτά *Arabidopsis thaliana* άγριου τύπου και γενετικώς τροποποιημένα να αναπτυχθούν σε οξειδωτικές και αβιοτικές συνθήκες, όπως: θερμικό πλήγμα, έκθεση σε μέτριο επίπεδο φωτεινής ακτινοβολίας (400 μmol m⁻² sec⁻¹), paraquat και ωσμωτική καταπόνηση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα σε συνθήκες μη-καταπόνησης το μήκος του ριζικού συστήματος παρέμεινε το ίδιο για όλους τους τύπους των σπορόφυτων. Σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης σε methyl viologen τα φυτά στα οποία εκφράζονται οι πρωτεΐνες Zat12, Zat7 και ο μεταγραφικός παράγοντας WRKY25 επέδειξαν μεγαλύτερη ανοχή σε σχέση με τα σπορόφυτα αγρίου τύπου. Οι Zhang et al. (2008) με σκοπό να απομονώσουν και να χαρακτηρίσουν το γονίδιο *OXT6* εξέθεσαν σπορόφυτα αγρίου τύπου και γενετικώς τροποποιημένα του *Arabidopsis thaliana* στις ακόλουθες συνθήκες καταπόνησης: 2 μM aminotriazole + 0.4 mM buthionine sulfoximine (AT+BSO), και 50 nM - 100 nM methyl viologen (MV). Με βάση τα μακροσκοπικά αποτελέσματα, το μήκος του ριζικού συστήματος των γενετικώς τροποποιημένων φυτών (*oxi6*) ήταν μικρότερο σε σχέση με αυτό των σπορόφυτων αγρίου τύπου τις πρώτες 14 ημέρες, όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες μη-καταπόνησης. Μετά τις πρώτες 14 ημέρες, αυτή η αρχική καθυστέρηση στην ανάπτυξη των γενετικώς τροποποιημένων σπορόφυτων σιγά - σιγά αντισταθμίστηκε. Αντιθέτως, τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά παρουσίασαν ισχυρότερο ριζικό σύστημα, όταν αναπτύχθηκαν σε συνθήκες καταπόνησης με AT+BSO και MV. Οι Luhua et al. (2008) προκειμένου να κατανοήσουν τη λειτουργία ορισμένων πρωτεϊνών, οι οποίες ευρύτερα

ταξινομούνται ως πρωτεΐνες POFs (proteins with obscure features) υπέβαλλαν σε οξειδωτική (oxidative) και αβιοτική καταπόνηση (abiotic stress) με methyl viologen, t-butyl hydroperoxide, υψηλές - χαμηλές θερμοκρασίες, και NaCl φυτά *Arabidopsis thaliana*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το μήκος του ριζικού συστήματος των γενετικώς τροποποιημένων φυτών παρουσίασε μεγαλύτερη ανοχή στις αβιοτικές καταπονήσεις σε σχέση με τα φυτά άγριου τύπου.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR πραγματικού χρόνου έδειξε ότι το γονίδιο *HESPI* παρουσιάζει μειωμένα επίπεδα έκφρασης στα φύλλα των αγρίου τύπου φυτών *Arabidopsis thaliana* παρουσία NaCl. Η μείωση αυτή είναι στατιστικώς σημαντική και είναι της τάξης του 50%. Όταν μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *OXT6-2* και *ADH2* στα γενετικώς τροποποιημένα φυτά *hesp1*, βρέθηκε ότι υπερεκφράζονται (10-φορές και 5-φορές αύξηση σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, αντίστοιχα) παρουσία 25mM NaCl. Επομένως είναι δυνατόν, η σίγαση του γονιδίου *HESPI* στα γενετικώς τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis thaliana* να επάγει την έκφραση των γονιδίων *OXT6-2* και *ADH2*, σύμφωνα με τα ευρήματα της εργασίας αυτής, και επομένως είναι δυνατόν τα συγκεκριμένα γονίδια να συμβάλουν στην ανοχή των φυτών σε αυξημένες συγκεντρώσεις NaCl. Στη συνέχεια, η ανοχή των φυτών στην αλατότητα επιχειρείται να τεκμηριωθεί με νέα ευρήματα της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Σύμφωνα με τους Tesniere et al. (2006) διάφορες δεϋδρογονάσες συμπεριλαμβανομένης της δεϋδρογονάσης της αλκοόλης (Alcohol Dehydrogenase, ADH) συνδέονται γενικά με την ανοχή που επιδεικνύουν τα φυτά σε αβιοτικές συνθήκες καταπονήσεων. Η ADH έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην αύξηση της αιθανολικής ζύμωσης, η οποία ενισχύει την ανοξία των φυτών (Agarwal et al., 2007). Στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, η υπερέκφραση της ADH βελτίωσε την ανοχή των ριζιδίων σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου και συνετέλεσε στη βελτίωση της αύξησης του μήκους του ριζικού συστήματος (Shiao et al., 2002). Γενετικώς τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis thaliana* με ελαττωματική έκφραση του *ADH* παρουσίασαν μειωμένη βλαστική ικανότητα σπόρων κάτω από συνθήκες ανοξίας και ευαισθησία σε συνθήκες ψύχους και ωσμωτικής καταπόνησης (Tesniere et al., 2006; Conley et al., 1999). Επιπλέον, η αυξανόμενη δραστηριότητα των ενζύμων ADH στα φυτά επιβεβαιώνει την ανοχή τους σε συνθήκες ανοξίας (Agarwal et al., 2007). Στο ρύζι, η έκφραση των *ADH1* και *ADH2* αποδείχθηκε ότι επάγεται από περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Agarwal et al., 2007). Στην άμπελο, η υπερέκφραση του *ADH* δείχνει αυξανόμενα επίπεδα καροτενοειδών όπως *cis-violaxanthin* και λουτεΐνης, ενώ αντίθετα η σίγαση του *ADH* παρουσίασε μειωμένα επίπεδα λουτεΐνης (Agarwal et al., 2007). Η μελέτη των Senthil-Kumar et al. (2010) παρουσίασε επίσης υψηλότερη έκφραση του *ADH* στο φυτό *N. tabacum* κάτω από συνθήκες καταπόνησης. Η σίγαση του *ADH* σε φυτά *N. tabacum*, τα έκανε ευαίσθητα και παρουσίασαν υψηλότερη υποβάθμιση της συνολικής χλωροφύλλης κάτω από την καταπόνηση ελλείμματος νερού, επεξηγώντας τον ρόλο του *ADH* στην προστασία των φωτοσυνθετικών μηχανισμών κάτω από αυτήν την καταπόνηση. Περαιτέρω, η υδατική καταπόνηση φυτών με σίγαση του *ADH* έδειξε τον πιθανό ρόλο αυτού του γονιδίου στην ανοχή σε ωσμωτική καταπόνηση. Η έκθεση στην αλατότητα και η ανοχή γενετικώς τροποποιημένων φυτών *Arabidopsis thaliana* στην αφυδάτωση έδειξαν την συμβολή αυτού του γονιδίου στην ανοχή σε πολλαπλές καταπονήσεις.

Η πρωτεΐνη GSNOR (S-nitrosogluthathione reductase) κωδικοποιείται από το γονίδιο (*At5g43940*), το οποίο προγενέστερα έφερε την ονομασία δεϋδρογονάση της

αλκοόλης (ADH2) (Martínez et al., 1996). Σύμφωνα με τους Lee et al. (2008) και Chen et al. (2009), η GSNOR παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του νιτρικού οξέος (nitric oxide, NO) και των μεταβολιτών του. Επιπροσθέτως, επηρεάζει τα φυτά όχι μόνο κατά τη διάρκεια διαφόρων αβιοτικών καταπονήσεων (αλατότητα, ψύχος, υψηλή οσμωτική πίεση), αλλά επηρεάζει και την ίδια τη διαδικασία ανάπτυξης των φυτών.

Σύμφωνα με την έρευνα των Zhang et al. (2008), τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά (*ox16*) *Arabidopsis thaliana* παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης ενώ το γονίδιο *OXT6* φαίνεται να εκφράζεται σε όλους τους φυτικούς ιστούς, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της RT/PCP ανάλυσης. Το μετάλλαγμα (*ox16*) οφείλεται στη καταστροφή ενός σύνθετου γονιδίου (*At1g30460*) που κωδικοποιεί την υπομονάδα 30-kD του παράγοντα πολυαδενυλίωσης CPSF30, καθώς επίσης και μιας μεγαλύτερης πρωτεΐνης της 65-kD. Τα μεταλλαγμένα φυτά *ox16* παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης και έχει δειχτεί ότι η μικρή υπομονάδα (*AtCPSF30*) είναι ικανή από μόνη της να επαναφέρει τον ευαίσθητο σε καταπόνηση φαινότυπο των φυτών αγρίου τύπου όταν εκφραστεί στα *ox16* μεταλλαγμένα φυτά. Αυτό έρχεται σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, καθώς μόνο το μετάγραφο *OXT6-2* που αντιστοιχεί στη μικρή υπομονάδα (και όχι το *OXT6-1*) παρουσίασε επαγωγή της έκφρασης στα μεταλλαγμένα φυτά *hesp1* σε παρουσία 25mM NaCl. Σε κάθε περίπτωση, είναι πιθανόν το πολυπεπίδιο *AtCPSF30* να διαδραματίζει ρόλο στην EMO-ρυθμισμένη έκφραση των γονιδίων. Επιπροσθέτως, λόγω του *AtCPSF30*, το μήκος των πολυ(A) ουρών στα mRNAs των γενετικώς τροποποιημένων φυτών (*ox16*) μπορεί να είναι διαφορετικό από εκείνο των φυτών αγρίου τύπου. Τα αποτελέσματα νεώτερων μελετών (Delaney et al., 2006) εμπλέκουν τον παράγοντα πολυαδενυλίωσης CPSF30 στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο απόκρισης των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης, και ειδικότερα στην έκφραση ενός συνόλου γονιδίων που παρέχουν ανοχή στις οξειδωτικές καταπονήσεις.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα σημαντικότερα συμπεράσματα που μπορούμε να αποκομίσουμε από αυτή τη μεταπτυχιακή εργασία είναι τα ακόλουθα:

- Τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά (*hesp1*) του *Arabidopsis thaliana* παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή σε συνθήκες καταπόνησης λόγω αυξημένης αλατότητας, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου.
- Το γονίδιο *HESPI* φαίνεται ότι εκφράζεται στους ιστούς των φύλλων του *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου. Όμως, όσο αυξάνεται η αλατότητα, τόσο μειώνεται η έκφρασή του.
- Η σίγηση του γονιδίου *HESPI* στα γενετικώς τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis thaliana* επάγει την έκφραση των γονιδίων *OXT6-2* και *ADH2* σε αυξημένη αλατότητα.
- Σύμφωνα με μελέτες άλλων ερευνητών, η υπερέκφραση των γονιδίων *OXT6-2* και *ADH2* συμβάλει στην αύξηση του μήκους του ριζικού συστήματος των φυτών, το οποίο θα μπορούσε εν μέρη να ερμηνεύσει το φαινόμενο αυξημένου μήκους ρίζας που παρατηρήθηκε στα γενετικώς τροποποιημένα φυτά (*hesp1*).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agarwal S., Kapoor A., Lakshmi O. S., Grover A., (2007). Production and phenotypic analysis of rice transgenics with altered levels of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase proteins. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 637-646.

Allakhverdiev S. I., Sakamoto A., Nishiyama Y., Inabam M., Murata N., (2000). Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.* 123: 1047-1056.

Ανδρώνης Ε., (2003). Η αντίδραση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού στην καταπόνηση από αλατότητα σε φυτά και φυλλικά δισκία καπνού. Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Εδίκευσης, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Anthony R. G., Khan S., Costa J., Pais M. S., Bogre L., (2006). The *Arabidopsis* protein kinase PTII-2 is activated by convergent phosphatidic acid and oxidative stress signaling pathways downstream of PDK1 and OXI1. *J Biol Chem.* 281: 37536–37546.

Apel K., Hirt H., (2004). Reactive Oxygen Species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 55: 373–399.

Baggs J. E., Green C. B., (2003). Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* Retina: A mechanism for postranscriptional control of circadian-related mRNA. *Current Biology* 13: 189-198.

Balatsos N. A., Nilsson P., Mazza C., Cusack S., Virtanen A., (2006). Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *J. Biol. Chem.* 281: 4517-4522.

Blumwald E., (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion Cell Biol.* 12: 431-434.

Borsani O., Valpuesta V., Botella M. A., (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* 126: 1024-1030.

Bray E. A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E., (2000). Responses to abiotic stresses. In Gruissem, W., Buchanan, B., & Jones, R., eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA, 1158-1249.

Chen R., Sun S., Wang C., Li Y., Liang Y., An F., Li C., Dong H., Yang X., Zhang J., Zuo J., (2009). The *Arabidopsis* PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Research* 19: 1377-1387.

Chiba Y., Sakurai R., Yoshino M., Ominato K., Ishikawa M., Onouchi H., Naito S., (2003). S adenosyl-L-methionine is an effector in postranscriptional autoregulation of the cystathionine γ -synthase gene in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 10225-10230.

- Conley T. R., Peng H.-P., Shih M.-C., (1999). Mutations affecting induction of glycolytic and fermentative genes during germination and environmental stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 119: 599-608.
- Dasgan H. Y., Aktas H., Abak K., Cakmak I., (2002). Determination of screening techniques to salinity tolerance in tomatoes and investigation of genotype responses. *Plant Sci.* 163: 695-703.
- Davidson J. F., Schiestl R. H., (2001). Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 21: 8483–8489.
- Davletova S., Schlauch K., Coutu J., Mittler R., (2005). The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139: 847–856.
- Delaney K. J., Xu R., Zhang J., Li Q. Q., Yun K. Y., et al. (2006). Calmodulin interacts with and regulates the RNA-binding activity of an *Arabidopsis* polyadenylation factor subunit. *Plant Physiol* 140: 1507-1521.
- Desikan R., AH-M S., Hancock J. T., Neill S. J., (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol*, 127: 159–172.
- Droog F., (1997). Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *Journal of Plant Growth Regulation* 16: 95-107.
- Dunlap J. C., (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271-290.
- Edwards R., Dixon D. P., Walbot V., (2000). Plant glutathione S-transferases: Enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5: 193-198.
- Foyer C. H., Lelandais M., Galap C., Kunert K. J., (1991). Effect of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiology* 97: 863-872.
- Gadjev I., Vanderauwera S., Gechev T. S., Laloi C., Minkov I. N., (2006). Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signalling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141: 436–445.
- Geigenberger P., Krause K. P., Hill L. M., Reimholz R., MacRae E., Quick P., Sonnewald U., Stitt M., (1995). The regulation of sucrose synthesis in leaves and tubers of potato plants in: *Sucrose Metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology*. Rockville, MD, American Society of Plant Physiologists.
- Geisler M., Frangne N., Gomes E., Martinoia E., Palmgren M. G., (2000). The ACA4 gene of *Arabidopsis* encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast. *Plant Physiol.*, 124: 1814-1827.
- Γκέβρος Ι., (2011). Το γονίδιο HESP1 του *Arabidopsis thaliana* ελέγχεται από τον κirkάδιο ρυθμό. Διπλωματική Εργασία. Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Ghassemi F., Jakeman A. J., Nix H. A., (1995). *Salinisation of land and water resources*. CAB International, Wallingford, England.

- Gisbert C., Rus A. M., Bolarin M. C., Lopez-Coronado J.M., Arrillaga I., Montesinos C., Caro M., Serrano R., Moreno V., (2000). The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiol.* 123: 393-402.
- Goldstrohm A. C., Wickens M., (2008). Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Molecular Cell Biology* 9: 337-344.
- Golldack D., Dietz K-J., (2001). Salt-induced expression of the vacuolar H⁺-ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific. *Plant Physiol.* 125: 1643-1654.
- Gutierrez R. A., Ewing R. M., Cherry J. M., Green P. J., (2002). Identification of unstable transcripts in *Arabidopsis* by cDNA microarray analysis: Rapid decay is associated with a group of touch-and specific clock-controlled genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 11513–11518.
- Guy C. L., Huber J. L., Huber S. C., (1992). Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiol.* 100: 502-508.
- Harmer S. L., Panda S., Kay S. A., (2001). Molecular bases of circadian rhythms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 215-253.
- Hautala E. L., Wulff A., Oksanen J., (1992). Effects of deicing salt on visible symptoms, element concentrations and membrane damage in first-year needles of roadside Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Annals of Botany Fenn* 29: 179-185.
- Hernandez J. A., Ferrer M. A., Jimenez A., Barcelo A. R., Sevilla F., (2001). Antioxidant systems and O₂⁻ / H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its reaction with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* 127: 817-831.
- Jeong R., Housley T. L., (1990). Fructan metabolism in wheat in altering warm and cold temperatures. *Plant Physiol.* 93: 902-906.
- Kloppstech K., (1985). Diurnal and circadian rhythmicity in the expression of light-induced plant nuclear messenger RNAs. *Planta* 165: 502-506.
- Lee U., Wie C., Fernandez B. O., Feelisch M., Vierling E., (2008). Modulation of Nitrosative Stress by S-Nitrosoglutathione Reductase is Critical for Thermotolerance and Plant Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 786-802.
- Lefevre I, Gratia E, Lutts S (2001). Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in Rice (*Oryza stiva*). *Plant Sci.* 161: 943-952.
- Luhua S., Ciftci-Yilmaz S., Harper J., Cushman J., Mittler R. (2008). Enhanced Tolerance to Oxidative Stress in Transgenic *Arabidopsis* Plants Expressing Proteins of Unknown Function. *Plant Physiology* 148: 280–292.
- Martin P. K., Koebner R. M. D., (1995). Sodium and chloride ions contribute synergistically to salt toxicity in wheat. *Biologia Plantarum* 37: 265-271.
- Martínez M. C., Achkor H., Persson B., et al. (1996). *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase. Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide

further insights into the origins, structure and function of plant class p and liver class I alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 241: 849-857.

McClung C. R., (2008). Comes a time. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 514–520.

Meyers B. C., Vu T. H., Tej S. S., Ghazal H., Matvienko M., Agrawal V., Ning J., Haudenschild C. D., (2004). Analysis of the transcriptional complexity of *Arabidopsis thaliana* by massively parallel signature sequencing. *Nat Biotechnol* 22: 1006–1011.

Michael T. P., McClung C. R., (2003). Enhancer trapping reveals widespread circadian clock transcriptional control in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 132: 629–639.

Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R., (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment* 33: 453-467.

Mittler R, Berkowitz G (2001) Hydrogen peroxide, a messenger with too many roles? *Redox Rep* 6: 69–72.

Mittler R., (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405–410.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M., Van Breusegem F., (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490–498.

Mittler R., Kim Y., Song L., Coutu J., Coutu A., Ciftci-Yilmaz S., Lee H., Stevenson B., Zhu J. K., (2006). Gain-and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Letters* 580: 6537-6542.

Moraes K. C., Wilusz C. J., Wilusz J., (2006). CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *RNA* 12: 1084-1091.

Munns R., (1993). Physiological processes limiting plant-growth in saline soils-some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell & Environment* 16: 15-24.

Munns R., Guo J., Passioura J. B., Cramer G. R., (2000). Leaf water status controls day-time but not daily rates of leaf expansion in salt-treated barley. *Australian Journal of Plant Physiology* 27(10): 949-957.

Murashige T., Skoog F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

Nakamichi N., Matsushika A., Yamashino T., Mizuno T., (2003). Cell autonomous circadian waves of the APRR1/TOC1 quintet in an established cell line of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 44: 360–365.

Neill S., Desikan R., Hancock J., (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion Cell Biol.* 5: 388-395.

Panda S. K., Upadhyay R. K., (2004). Salt stress injury induces oxidative alterations and antioxidative defence in the roots of *Lemma minor*. *Biologia Plantarum* 48: 249-253.

Παπαποστόλου Δ., (2012). Διερεύνηση του φυσιολογικού ρόλου της AtNOC (Hesperin – Εσπερίνης), μιας αποαδενυλάσης που σχετίζεται με τον κερκάδιο ρυθμό στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Διπλωματική Εργασία. Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Park J. Y., Canam T., Kang K. Y., Ellis D. D., Mansfield, S. D., (2008). Over-expression of an *Arabidopsis* family A sucrose phosphate synthase (SPS) gene alters plant growth and fibre development. *Transgenic Res.* 17: 181-192.

Rea P. A., Li Z. S., Lu Y. P., Drozdowicz Y. M., Martinoia E., (1998). From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. In *Annual Review of Plant Biology* 49: 727-760.

Rennenberg H., Polle A., (1994). Protection from oxidative stress in transgenic plants. *Biochem Soc Transac* 22: 936-940.

Rentel M. C., Lecourieux D., Ouaked F., Usher S. L., Petersen L., (2004). OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 427: 858-861.

Reverdatto S. V., Dutko J. A., Chekanova J. A., Hamilton D. A., Belostotsky D. A., (2004). mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *RNA* 10: 1200-1214.

Rizhsky L., Davletova S., Liang H., Mittler R., (2004). The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 11736-11743.

Sairam R. K., Rao K.V., Srivastava G.C., (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci.* 163: 1037-1046.

Schaffer R., Landgraf J., Accerbi M., Simon V., Larson M., Wisman E., (2001). Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 113-123.

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, et al. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53: 1305-1319.

Shiao T.-L., Ellis M. H., Dolferus R., Dennis E. S., Doran P. M., (2002). Overexpression of alcohol dehydrogenase or pyruvate decarboxylase improves growth of hairy roots at reduced oxygen concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 77: 455-461.

Sussman M. R., (1994). Molecular analysis of protein in the plasma membrane. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 211-234.

Tesniere C., Torregrosa L., Pradal M., Souquet J.-M., Gilles C., Dos Santos K., Chatelet P., Gunata Z., (2006). Effects of genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels on the response to stress and the synthesis of secondary metabolites in grapevine leaves. *J. Exp. Bot.* 57: 91-99.

Tester M., & Davenport R., (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91(5): 503-527.

Τομασίδου Α., (2010). AtNOC, μια νέα αποαδενυλάση που ρυθμίζεται από τον κερκάδιο ρυθμό στο *Arabidopsis thaliana*. Διπλωματική Εργασία. Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

- Tucker M., Valencia-Sanchez M. A., Staples R. R., Chen J., Denis C. L., Parker R., (2001). The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104:377-386.
- Vanderbeld B., Snedden W. A., (2007). Developmental and stimulus-induced expression patterns of *Arabidopsis* calmodulin-like genes CML37, CML38 and CML39. *Plant Molecular Biology* 64: 683–697.
- Vranova E., Atichartpongkul S., Villarroel R., Van Montagu M., Inze D., (2002). Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10870–10875.
- Wolf A. E., Dietz K. J., Schroder P., (1996). Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Letters* 384: 31-34.
- Yanovsky M., Kay S. A., (2003). Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4: 265-276.
- Yuan J. S., Tranel P. J., Stewart Jr C. N., (2007). Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science* 12: 6-13.
- Yeo A. R., Lee K. S., Izard P., Boursier P. J., Flowers T.J., (1991). Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of*
- Zhang J., Addepalli B., Yun K-Y., Hunt A. G., Xu R., Rao S., Li Q. Q., Falcone D. L. (2008). A Polyadenylation Factor Subunit Implicated in Regulating Oxidative Signaling in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 3(6): e2410. doi:10.1371/journal.pone.0002410.
- Zhu J. K., (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 941-948.
- Zhu J. K., (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.
- Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Hennig L., Gruissem W., (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* 136: 2621-2632.
- Ζίφα Α., Μαμούρης Ζ., Μούτου Κ., (2008). Βιολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.