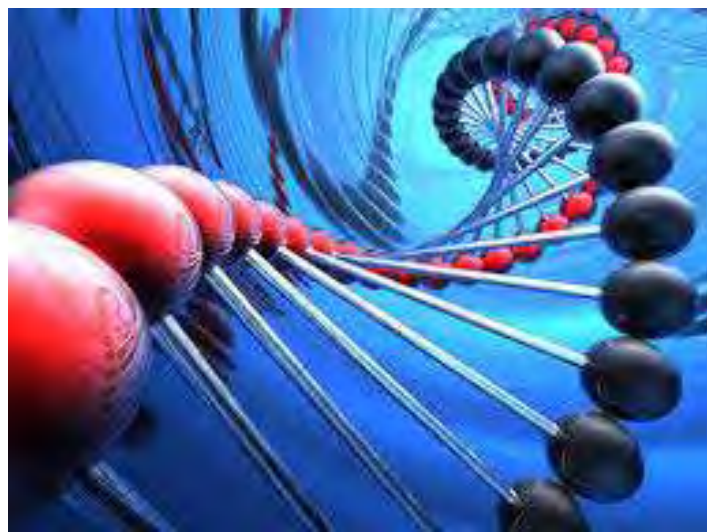




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

**Έλεγχος αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης HESP1 του *Arabidopsis thaliana*  
με τις πρωτεΐνες OXT6 και GRP7**



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΝΤΑΦΟΠΟΥΛΟΣ Δ. ΣΩΤΗΡΙΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2015**

Έλεγχος αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης HESP1 του *Arabidopsis thaliana*  
με τις πρωτεΐνες OXT6 και GRP7

Διπλωματική εργασία  
Νταφόπουλος Σωτήριος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών  
και περιβάλλοντος στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνος Καθηγητής  
Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.

Τριμελής επιτροπή  
Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.  
Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας  
και Βιοτεχνολογίας, TBB, Π.Θ.  
Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κ. Καρπούζα Δημήτριο, κ. Λεωνίδα Δημήτριο και ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μπαλατσό Νικόλαο, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Θα ήθελα να εκφράσω επίσης τις θερμές μου ευχαριστίες στην κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του TBB του Π.Θ. για την αμέριστη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ ολόθερμα τη Δρ. Τσίκου Δανιέλα για την καθοδήγηση, την κατανόηση και τη συμπαράσταση της.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ-ABSTRACT.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1. Κιρκάδιοι ρυθμοί.....	8
1.1.1 Χαρακτηριστικά του κιρκάδιου ρυθμού στα φυτά.....	8
1.1.2 Ρύθμιση του κιρκάδιου ρολογιού στο <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	11
1.2 Αποαδενυλάσες.....	14
1.2.1 Αποικοδόμηση mRNA και αποαδενυλάσες.....	14
1.2.2 Η αποαδενυλάση της νοκτουρνίνης (Nocturnin).....	18
1.2.3 Μεταγραφική ρύθμιση της νοκτουρνίνης.....	20
1.3 OXT6 και GRP7.....	23
1.4 <i>Arabidopsis thaliana</i> , το φυτό μοντέλο.....	25
1.5 Αρχή του συστήματος δύο υβριδίων.....	26
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
2.1 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης.....	29
2.2 Δεκτικά κύτταρα ζύμης.....	29
2.3 Διαλύματα και θρεπτικά μέσα.....	30
2.4 Φορείς έκφρασης.....	31
2.4.1 Πλασμιδιακός φορέας pGBKT7.....	31
2.4.2 Πλασμιδιακός φορέας pGADT7.....	33
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
3.1 Σκοπός.....	35
3.2 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης.....	35
3.3 Επιλογή μετασχηματισμένων κυττάρων (σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς λευκίνη και τρυπτοφάνη).....	37
3.4 Έλεγχος αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών.....	41
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το γονίδιο *HESP* του *Arabidopsis thaliana*. Από έρευνα που έχει γίνει στο εργαστήριο για την έκφραση του γονιδίου *HESP* σε βάσεις δεδομένων, υπήρχαν ενδείξεις ότι το γονίδιο αυτό εμπλέκεται σε αβιοτικές καταπονήσεις. Γι' αυτό το λόγο, ελέγχθηκε πιθανή συσχέτιση με τα γονίδια *OXT6* και *GRP7* που επίσης εμπλέκονται σε αβιοτικές καταπονήσεις. Η πιθανή αλληλεπίδραση των παραπάνω πρωτεϊνών μελετήθηκε με το σύστημα δύο υβριδίων. Οι πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε κύτταρα ζύμης και ο έλεγχος της πιθανής αλληλεπίδρασής τους έγινε μέσω επιλογής των μετασχηματισμένων ζυμών σε θρεπτικό υπόστρωμα από το οποίο απουσίαζε το αμινοξύ ιστιδίνη. Οι ζύμες που εκφράζανε τους συνδυασμούς των πρωτεϊνών *HESP-OXT6* και *HESP-GRP7* δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό χωρίς ιστιδίνη. Επομένως, συμπεράναμε ότι οι πρωτεΐνες αυτές δεν αλληλεπιδρούν.

## ABSTRACT

In the present study the *HESP* gene of *Arabidopsis thaliana* was investigated. As shown from a previously research in the laboratory regarding the expression of *HESP* gene against databases, there were indications that this gene is involved in abiotic stress. For this reason, a possible relation with genes *OXT6* and *GRP7*, also being involved in abiotic stress, was tested. The possible interaction of these proteins was studied by the two-hybrid system. The proteins were expressed in yeast cells and their possible interaction was checked via selection of yeast transformants in medium in the absence of amino acid histidine. Yeast expressing combinations of proteins *HESP-OXT6* and *HESP-GRP7* failed to grow on histidine-free medium. Therefore, we concluded that these proteins do not interact.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1.Κιρκάδιοι ρυθμοί

Το φαινόμενο των κιρκάδιων ρυθμών στους οργανισμούς κέντρισε από πολύ νωρίς το ενδιαφέρον των επιστημόνων. Κατά την αρχαιότητα ο Ανδροσθένης πρώτος διαπίστωσε τη διαφορά στη συμπεριφορά των φυτών κατά την εναλλαγή μέρας και νύχτας (4<sup>ος</sup> αιώνας π.Χ.). Η παρατήρηση ότι ορισμένα φυτικά είδη έχουν την ικανότητα να ανοίγουν τα φύλλα τους την ημέρα και να τα κλείνουν πριν το τέλος αυτής, αποτελεί και την πρώτη ιστορική αναφορά γύρω από τους κιρκαδικούς ρυθμούς των φυτών.

Επόμενη καταγραφή γίνεται γύρω στο 1.500 μ.Χ. όπου το φαινόμενο των ρυθμών δεν θα το αφήσει να περάσει απαρατήρητο ούτε ο πατέρας της επιστήμης της Συστηματικής Βοτανικής, Κάρολος Λινναίος. Παρατηρώντας το περιοδικό άνοιγμα και κλείσιμο στα άνθη των κρίνων με την εναλλαγή μέρας-νύχτας, διαπιστώνει ότι το φαινόμενο είναι γενικότερα συντηρημένο μεταξύ των φυτικών ειδών.

Δύο αιώνες μετά και συγκεκριμένα το 1729, ο Γάλλος αστρονόμος Jean Jacques d Ortous deMairan, πάλι με αφορμή το άνοιγμα και κλείσιμο των φύλλων του ηλιοτρόπιου κατά τη διάρκεια της μέρας και της νύχτας αντιστοίχως, διεξάγει το πρώτο πείραμα γύρω από τους ρυθμούς. Τοποθετεί φυτά ηλιοτρόπιου σε συνεχές σκοτάδι, χωρίς όμως να παρατηρήσει μεταβολή στο σχετικό ρυθμό ανοιγοκλεισίματος των φύλλων.

Η ιδιότητα των φυτών να κινούν ρυθμικά τα φύλλα τους, προσέλκυσε το ενδιαφέρον και του πατέρα της Εξέλιξης, του Κάρολου Δαρβίνου. Μετά τις έρευνες του σχετικά με την εξελικτική πορεία των ειδών και τη συγγραφή της «*Εξέλιξης των ειδών (The origin of species)*», ο Δαρβίνος αρχίζει να παρατηρεί τις κινήσεις των φύλλων των φυτών, τις οποίες προσπαθεί να συνδέσει με την εξέλιξη τους. Αποτέλεσμα των πολλαπλών πειραμάτων του, είναι η υπόθεση ότι τα φυτά τη νύχτα κλείνουν τα φύλλα τους, προσπαθώντας να ελαττώσουν στο ελάχιστο την εκτεθειμένη στις νυχτερινές θερμοκρασίες επιφάνεια, ενώ την ημέρα τα ανοίγουν για

να εκμεταλλευτούν την ηλιακή ακτινοβολία. Τα συμπεράσματα του περικλείονται στο βιβλίο του «*Η δύναμη της κίνησης στα φυτά (The power of Movement in Plants)*».

Το 1880, οι Charles και Francis Darwin πρότειναν την κληρονομησιμότητα των κιρκάδιων ρυθμών. Αυτό μελετήθηκε αρχικά, κατά τη δεκαετία του 1930 με δύο στρατηγικές. Στην πρώτη, φυτά και ζώα μεγάλωσαν σε συνεχείς συνθήκες για πολλαπλές γενεές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι φρουτόμυγες που διατήρησαν σταθερούς ρυθμούς για 700 γενεές εκτρεφόμενες σε συνεχείς συνθήκες (Johnson, 2005). Στη δεύτερη, σπορόφυτα ή ζώα εκτέθηκαν σε κύκλους που διέφεραν από τον 24ωρο, ώστε να μεταβληθεί το μήκος της περιόδου κατά τη διάρκεια των νέων αυτών κύκλων. Η κληρονόμηση του μήκους της περιόδου στους απογόνους, που προέκυψαν από διασταύρωση γονέων με διακριτά μήκη περιόδου, αναφέρθηκε πρώτα σε γένη του *Phaseolus*. Τα υβρίδια είχαν μήκος περιόδου ενδιάμεσο των γονέων (Bünning, 1936).

Στην αυγή του προηγούμενου αιώνα, οι Karl Von Frisch και Ingeborg Beling διεξάγουν πειράματα με μέλισσες μετά από την παρατήρηση ότι το έντομο αυτό επισκέπτεται τα άνθη συγκεκριμένες μόνο ώρες της ημέρας. Ακόμα και στις περιπτώσεις που το νέκταρ αφαιρούνταν με τεχνητό τρόπο από τα άνθη, οι μέλισσες συνέχιζαν να τα επισκέπτονται δρώντας κάτω από τον έλεγχο ενός εσωτερικού ρολογιού, συντονισμένου εξελικτικά με την περιοδική έκκριση του νέκταρος. Ωστόσο, μόλις στα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα γίνεται η πρώτη αναφορά για την ύπαρξη του βιολογικού ρολογιού στους οργανισμούς, από τους Gustav Krammer και Klaus Hoffmann. Ο τελευταίος ήταν και αυτός που κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι βιολογικοί ρυθμοί είναι ενδογενείς και ότι το βιολογικό ρολόι συγχρονίζεται από το περιβάλλον. Την ίδια χρονική περίοδο ένας άλλος επιστήμονας ο Colin Pittendrigh (1960) μελετά την επίδραση της θερμοκρασίας στους ρυθμούς του είδους *Drosophila pseudoobscura*, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η θερμοκρασία παίζει δευτερεύοντα ρόλο στην εξισορρόπηση των ρυθμών καθώς η μεταβολή της, επηρεάζει ελάχιστα την περίοδο του παρατηρούμενου ρυθμού.

Οι παραπάνω επιστήμονες υπήρξαν οι θεμελιωτές της έρευνας πάνω στα βιολογικά ρολόγια των οργανισμών. Μιας έρευνας που θα συνεχιστεί μέχρι το τέλος του περασμένου αιώνα και τις αρχές του νέου. Μόλις την τελευταία δεκαετία όμως, θα αρχίσει να αποκαλύπτεται η μοριακή φύση της κιρκαδικότητας. Ωθηση σε αυτό θα δώσουν έρευνες που έχουν προηγηθεί την δεκαετία του 1980 κυρίως και αφορούν τη

σηματοδότηση (signalling) σε μοριακό επίπεδο πολλών λειτουργιών του φυτικού κυττάρου από το φώς.

Η ανάλυση με τη βοήθεια της προωθητικής γενετικής για την ταυτοποίηση συστατικών του κιρκάδιου ρολογιού ξεκίνησε τη δεκαετία του 1970. Αν και σήμερα είναι δεδομένο ότι τα κιρκάδια ρολόγια συντίθενται από προϊόντα γονιδίων, το γεγονός αυτό αποτέλεσε την πηγή ιδιαίτερης διαμάχης. Το ότι οι προσπάθειες της προωθητικής γενετικής θα ήταν άκαρπες αμφισβητήθηκε, γιατί τα ρολόγια είναι αρκετά πολύπλοκα για να επιδείξουν πολυγονιδιακή κληρονομησιμότητα (Bünning, 1936) και δεν υπόκεινται εύκολα σε γενετικές προσεγγίσεις. Παρόλα αυτά, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν μεταλλάξεις με μεταβαλλόμενο μήκος περιόδου στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster* (Konopka & Benzer, 1971), στο φύκος *Chlamydomonas reinhardtii* (Bruce, 1972) και στο μύκητα *Neurospora crassa* (Feldman & Hoyle, 1973). Πέρασε πάνω από μια δεκαετία μέχρι να κλωνοποιηθεί το πρώτο γονίδιο του ρολογιού, το γονίδιο *period* (*per*) στη *Drosophila* (Bargiello & Young, 1984· Zehring et al., 1984) και πέντε χρόνια μέχρι να κλωνοποιηθεί το δεύτερο, το γονίδιο *frequency* στο *Neurospora* (McClung et al., 1989).

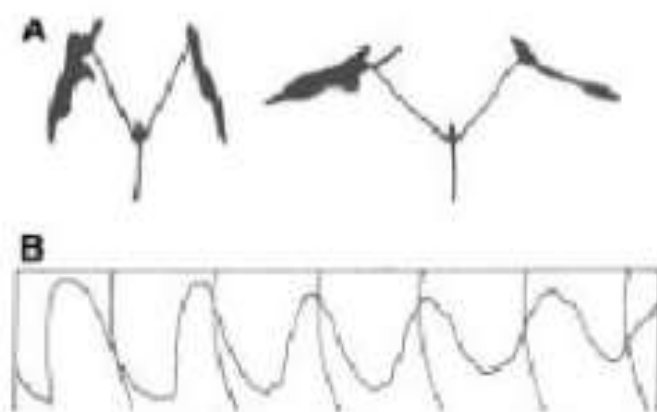
### 1.1.1 Χαρακτηριστικά του κιρκάδιου ρυθμού στα φυτά

Ένας ρυθμός αποτελεί την περιγραφή μίας ταλάντωσης σε σχέση με το χρόνο. Η ταλάντωση χαρακτηρίζεται από μέγιστα και ελάχιστα σημεία που εναλλάσσονται καθώς το φαινόμενο εξελίσσεται χρονικά. Από όλους τους ρυθμούς που παρατηρούνται στη φύση, οι κιρκαδικοί είναι οι μόνοι που η περίοδος τους, αντιστοιχεί σε μια πλήρη περιστροφή της γης γύρω από τον άξονα της. Χαρακτηριστικό λοιπόν των κιρκαδικών ρυθμών, όπως φανερώνει και το όνομα τους, είναι ότι η περίοδος τους είναι παραπλήσια των 24 ωρών.

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 (κirkάδιο 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 κirkάδιου ρολογιού (Dunlap, 1999).



**Εικόνα 1**

- A. Κινήσεις των φύλλων του φυτού *Phaseolus coccineus*. Η θέση των φύλλων ενός σπορόφυτου τη νύχτα (αριστερά) και κατά τη διάρκεια της μέρας (δεξιά).
- B. Κirkάδιος ρυθμός της κίνησης των φύλλων του *P. coccineus* συγχρονισμένος με κύκλους φωτός/σκότους. Οι κορυφές αντιστοιχούν στην κίνηση των φύλλων κατά τη διάρκεια της νύχτας και οι κάθετες γραμμές υποδηλώνουν τα διαστήματα του 24ωρου. (McClung, 2008)

Ο κirkάδιος 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* (kirkάδιος) προέρχεται από τις λατινικές λέξεις *circa* (κύκλος) και *diem* (ημέρα). Ο κirkάδιος ρυθμός ενός οργανισμού παράγεται ενδογενώς και είναι

αυτοσυντηρούμενος. 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 κιρκάδιου κύκλου). Ο κιρκάδιος ρυθμός συνεχίζει να εκφράζεται τουλάχιστον για μία χρονική περίοδο, 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 αυτά κρατούν ακριβή ώρα, αλλά δεν είναι συγχρονισμένα με τον εξωτερικό κόσμο. Το φυτό επανασυγχρονίζεται αν επανέλθει στις φυσιολογικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

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

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 κιρκάδιο ρυθμό τριών μεταγραφών 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 γονιδίωμά 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).

### 1.1.2 Ρύθμιση του κινκάρδιου ρολογιού στο *Arabidopsis thaliana*

Όπως πολλά φυτά, έτσι και το *Arabidopsis*, εμφανίζει ρυθμική κίνηση της κοτυληδόνας και του φύλλου καθώς και κινκάρδιο ρυθμό στην επιμήκυνση του υποκοτυλίου (Dowson & Millar, 1999) και του ανθώδους μέρους της βλαστούτης ταξιανθίας (Jouve et al., 2000). Ο έλεγχος της μεταγραφής από το κινκάρδιο ρολόι είναι διαδεδομένος απαντάται συχνά (Dunlap, 1999) και η λίστα των γονιδίων του φυτού που ελέγχονται από αυτό είναι μεγάλη.

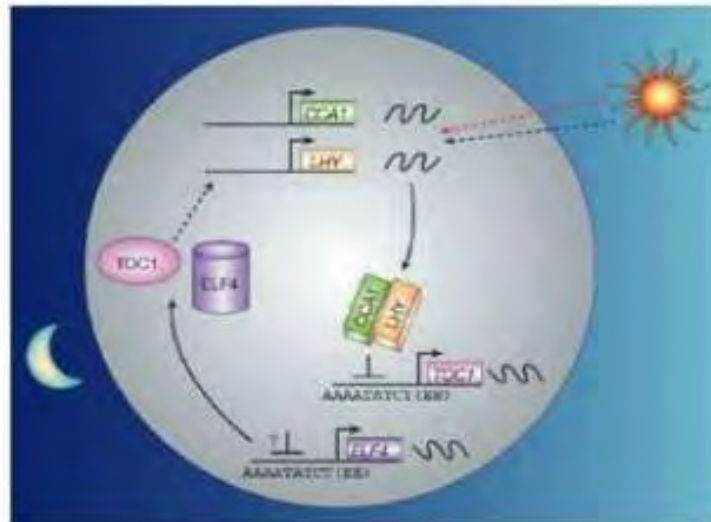
Αν και η μελέτη του κινκάρδιου ρυθμού έχει εστιαστεί σε συνεχείς συνθήκες, είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι τα φυτά στη φύση αναπτύσσονται σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Σε φυτά που αναπτύσσονται με ημερήσιους κύκλους, γίνεται μία σημαντική αλληλεπίδραση με το μεταβολισμό των σακχάρων που επηρεάζει σημαντικά την περιοδική γονιδιακή έκφραση (Bläsing et al., 2005). Επιπρόσθετα, σχετικά πρόσφατα δεδομένα διασαφηνίζουν ότι το κινκάρδιο ρολόι διαμορφώνει την ικανότητα απόκρισης σε αβιοτικό στρες, όπως το κρύο (McClung, 2008).

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 μεταγραφωσώματος 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) τον βρόχο που συγχρονίζεται με το πρωί (morning-phased loop), και γ) τον 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*). 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 ψευδορυθμιστή απόκρισης, ο οποίος παρουσιάζει μέγιστη έκφραση το σούρουπο. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι αυξημένη τιμή του *TOC1* προκαλεί επιμήκυνση της περιόδου των κικκάδιων ταλαντωτών. Αντιθέτως, μεταλλάξεις του *TOC1* προκαλούν ελάττωση της περιόδου των κικκάδιων 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 κικκάδιο 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 κirkάδιο ταλαντωτή με πολλές φυσιολογικές και βιοχημικές διεργασίες. Επομένως, τα κirkάδια ρολόγια ρυθμίζουν μεταβολικές και αναπτυξιακές δραστηριότητες των φυτών, ενώ παράλληλα ελέγχουν την έκφραση σημαντικών ρυθμιστικών γονιδίων.



**Εικόνα 2**

*Μοριακές αλληλεπιδράσεις που διαμορφώνουν το κirkάδιο ταλαντωτή του φυτού.  
(Yanovsky & Kay, 2003)*

## 1.2 Αποαδενυλάσεις

### 1.2.1 Αποικοδόμηση mRNA και αποαδενυλάσεις

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.

Η αποικοδόμηση του mRNA αρχίζει με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του από διάφορα ένζυμα που χαρακτηρίζονται ως αποαδενυλάσες· 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.

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, όπως 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).

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

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

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. 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. Εδικότερα, μεταξύ των EEP ανήκουν: η CCR4, η Nocturnin, η ANGEL, και η PAN2.

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 ανεξέλεγκτη αποαδενυλίωση οδηγεί στην καταστροφή και τον 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 πυρηνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών, και β) τον εντοπισμό τους σε ενδοκυτταρικά κοκκία. Στην περίπτωση εσφαλμένου διαχωρισμού των αποαδενυλασών μεταξύ πυρήνα και κυτοσολίου 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 κατασταλμένα mRNAs υπάρχει ο κίνδυνος να ενεργοποιηθούν. Δηλαδή, η συνένεση 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.

Σχετικά με το *Arabidopsis*, έχει μελετηθεί το ομόλογο της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN). Η PARN είναι μία αποαδενυλάση που πρωτοχαρακτηρίστηκε σε θηλαστικά ενώ απουσιάζει από τη ζύμη και τη *Drosophila*. Η PARN του *Arabidopsis* (AtPARN) που εκφράστηκε σε κύτταρα *E.coli* διαθέτει αποικοδομητική ενεργότητα *in vitro*, γεγονός που συνδέεται με την ύπαρξη συντηρημένων περιοχών και κατάλοιπων αμινοξέων που είναι σημαντικά για την καταλυτική ενεργότητα (Reverdatto et al., 2004). Η N-τελική περιοχή της παρουσιάζει ομοιότητα με την N-τελική περιοχή της HuPARN, όπου βρίσκονται οι καταλυτικές περιοχές. Η συντηρημένη N-τελική περιοχή της PARN είναι πιο

σημαντική για την ενεργότητά της από την C-τελική περιοχή. Επιπλέον, διαθέτει τρεις κρίσιμες Exo-περιοχές χαρακτηριστικές της οικογένειας των ενζύμων RNaseD (Chiba et al., 2003). Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η PARN εξαρτάται από δισθενή μεταλλικά ιόντα ενώ εμφανίζει μέγιστη δραστικότητα παρουσία ιόντων  $Mg^{+2}$ , τα οποία πιθανόν βρίσκονται στο μοτίβο DEDD του ενεργού κέντρου, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης. Η PARN περιέχει επίσης μια σπάνια διατηρημένη RH3 περιοχή που φαίνεται να έχει δομή όμοια με αυτήν της IF3 καρβοξυτελικής περιοχής (Wu et al., 2005). Η RH3 περιοχή προσδένεται σε μονόκλωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν επιστρατεύει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA. Τα πειράματα πρωτεϊνικού εντοπισμού σε φυτικά κύτταρα δείχνουν ότι η AtPARN βρίσκεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Ακόμη, πειράματα με μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της AtPARN δείχνουν ότι το γονίδιο της είναι σημαντικό κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης. Αν και μέχρι τώρα δεν έχουν απενεργοποιηθεί ομόλογα γονίδια της AtPARN σε άλλους οργανισμούς, όλες οι παρατηρήσεις φανερώνουν τη σημαντικότητα του ενζύμου και τη χρησιμότητά του σε πολλούς άλλους πολυκύτταρους οργανισμούς (Chiba et al., 2003).

### 1.2.2 Η αποαδενυλάση της νοκτουρνίνης (Nocturnin)

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

Το ομόλογο της νοκτουρνίνης στον ποντικό (mNoc) έχει ταυτοποιηθεί ότι είναι ιδιαίτερα συντηρημένο στο επίπεδο των αμινοξέων. Παρόλα αυτά, σε αντίθεση

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

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

Η νοκτουρνίνη είναι μια 3'-εξωριβονουκλεάση, με εξειδίκευση στο πολυ(A). Έχει δράση αποαδενυλάσης, δηλαδή έχει την ικανότητα να αφαιρεί την πολυ(A)-

ουρά από τα mRNAs. Η αποαδενυλίωση αποτελεί το πρώτο βήμα στην αποικοδόμηση του mRNA και συμμετέχει στη μεταφραστική αποσιώπηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις η απώλεια της πολυ(A)-ουράς οδηγεί σε ταχεία αποικοδόμηση του mRNA, με φορά 3'→5', ενώ σε άλλες περιπτώσεις η απώλεια της ουράς εμποδίζει τη μετάφραση μέσω της εξασθένισης σχηματισμού των κυκλικών πολυσωμάτων. Ο ρόλος της νοκτουρνίνης στην αποαδενυλίωση δεν είναι ακόμα γνωστός, αλλά υπάρχουν αποδείξεις ότι ελέγχεται από τον κirkάδιο ρυθμό δρώντας στο επίπεδο της αποικοδόμησης του mRNA και της μετάφρασης (Douris & Green, 2009).

### 1.2.3 Μεταγραφική ρύθμιση της νοκτουρνίνης

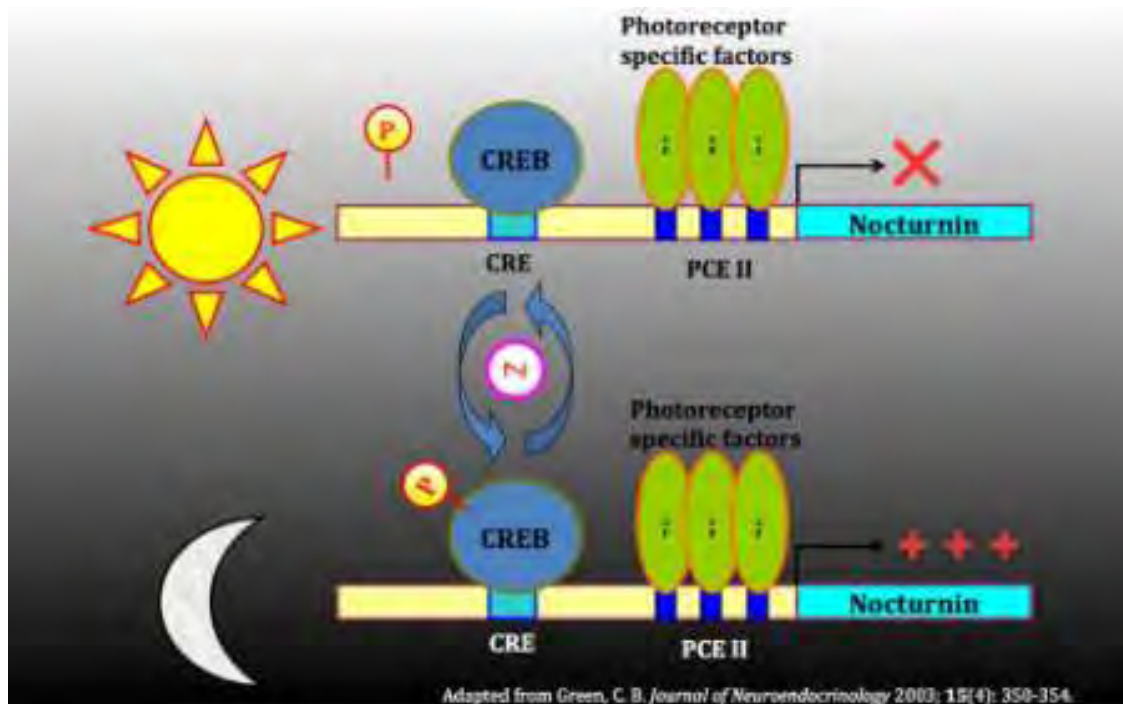
Ο υποκινητής της νοκτουρνίνης αναλύθηκε ώστε να καθοριστούν τα στοιχεία που συμβάλλουν στην περιορισμένη μεταγραφή του στο χώρο και στο χρόνο. Στην κεντρική 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου, ακριβώς ανοδικά από το σημείο έναρξης μεταγραφής, ταυτοποιήθηκε μια σειρά τριών επαναλήψεων ενός νέου στοιχείου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

Έπειτα από έρευνα για στοιχεία που συμβάλλουν στην έκφραση της νοκτουρνίνης, εξετάστηκε ένα μοτίβο που βρίσκεται ακριβώς ανοδικά από τα τρία PCEII στοιχεία, το οποίο προσομοιάζει με ένα E-box. Τα στοιχεία E-box προσδένουν μεταγραφικούς παράγοντες bHLH (basic-helix-loop-helix) και αυτή η συγκεκριμένη ομάδα των E-boxes (group C; NACGTG) συχνά προσδένεται από πρωτεΐνες bHLH-PAS, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών CLOCK και BMAL1 του κirkάδιου ρολογιού. Το ετεροδιμερές CLOCK/BMAL1 αποτελεί ένα ακέραιο κομμάτι του κεντρικού κirkάδιου μηχανισμού και ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων *PER* (*PERIOD*) και *CRY* (*CRYPTOCHROME*) στα σπονδυλωτά μέσω αλληλεπιδράσεων

με στοιχεία E-boxes στους υποκινητές αυτών των γονιδίων. Και άλλα γονίδια με ρυθμική έκφραση όπως το *AVP* (*ARGININE VASOPRESSIN*), το *DBP* (*D-ELEMENT-BINDING PROTEIN*) και το *AA-NAT* (*ARYLALKYLAMINE N-ACETYLTRANSFERASE*) ρυθμίζονται από την πρόσδεση του ετεροδιμερούς CLOCK/BMAL1 στα στοιχεία E-boxes. Παρόλα αυτά, τα E-boxes που έχουν χαρακτηριστεί στους υποκινητές αυτών των γονιδίων, έχουν αλληλουχία CACGTG ενώ ο υποκινητής της νοκτουρνίνης περιέχει την αλληλουχία GACGTG. Επιπλέον, η μεταγραφή της νοκτουρνίνης στον αμφιβληστροειδή του *Xenopus* είναι διαφορετική από τη μεταγραφή γονιδίων που πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ετεροδιμερούς CLOCK/BMAL1. Πράγματι, πειράματα έδειξαν ότι το ετεροδιμερές CLOCK/BMAL1 δεν προσδένεται in vivo στο στοιχείο E-box του υποκινητή του γονιδίου της νοκτουρνίνης.

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

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



**Εικόνα 3**

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

### 1.3 OXT6 και GPR7

Τα φυτά αντιμετωπίζουν ένα ευρύ φάσμα προκλήσεων στο φυσικό τους περιβάλλον. Αντίξοες συνθήκες που περιλαμβάνουν έντονες διακυμάνσεις φωτός ή θερμοκρασίας, ξηρασία, αλατότητα, ατμοσφαιρικούς ρύπους όπως το όζον, ή εδαφικούς ρύπους, όπως βαρέα μέταλλα, μπορούν να απειλήσουν την υγεία τους. Κρίσιμη για την επιβίωση τους είναι η γρήγορη ικανότητα των φυτών να αντιλαμβάνονται και να ανταποκρίνονται στις πιέσεις που προκαλούνται από τέτοιες συνεχώς μεταβαλλόμενες συνθήκες. Χαρακτηριστικές αντιδράσεις στις περισσότερες από αυτές τις συνθήκες είναι οι μεταβολές στο κυτταρικό επίπεδο ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS). Η οξειδωτική καταπόνηση που παράγεται στα φυτά μετά από αυξήσεις των ROS μπορεί να είναι επιβλαβής για αυτά, καθώς στην κατηγορία των ενώσεων αυτών ανήκουν η ρίζα υπεροξειδίου, το υπεροξειδίο υδρογόνου και η ρίζα του υδροξυλίου, ενώσεις που είναι σε θέση να βλάψουν άμεσα πλέον κυτταρικά μακρομόρια, και τελικά να οδηγήσουν στο θάνατο του κυττάρου. Από την άλλη πλευρά, τα ROS παράγονται συνεχώς σε βασικά επίπεδα ως συνέπεια ενός ευρέως φάσματος κοινών μεταβολικών διεργασιών. Αυτό, σε συνδυασμό με τις παροδικές αυξήσεις στις συγκεντρώσεις των ROS, όταν τα φυτά υπόκεινται σε αντίξοες συνθήκες, φαίνεται ότι κάνει τα μόρια αυτά ρυθμιστές των φυτών, ώστε να ανταπεξέρχονται κάτω από συνθήκες στρες, καθώς και μόρια σηματοδότησης για διάφορες διεργασίες στα φυτά, όπως το κλείσιμο των στομάτων, την κυτταροδιαίρεση, τον γεωτροπισμό των ριζών, και της ανάπτυξης των φυτών.

Μελετήθηκαν φυτά του είδους *Arabidopsis thaliana* τα οποία είχαν μετάλλαξη στο γονίδιο *OXT6* και στην οποία μετάλλαξη το γονίδιο δεν παρήγαγε την πρωτεΐνη αυτή, δηλαδή το γονίδιο ήταν ανενεργό. Το γονίδιο αυτό παράγει 2 μόρια mRNA. Ένα μεγάλο και ένα μικρό. Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσίασε το μικρό mRNA, το CPSF30, το οποίο κωδικοποιεί έναν παράγοντα πολυαδενυλίωσης, ο οποίος συμμετέχει στην επεξεργασία του mRNA πριν γίνει η πολύ-αδενυλίωση. Τα αποτελέσματα της έρευνας εμπλέκουν την πρωτεΐνη CPSF30 του *Arabidopsis* στον μετά-μεταγραφικό έλεγχο στις αντιδράσεις των φυτών στο stress και συγκεκριμένα στην έκφραση ενός συνόλου γονιδίων που φαίνεται ότι προσδίδουν ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό stress.

Το γονίδιο *GRP7* ανήκει σε μια οικογένεια γονιδίων που εμπλέκονται στην ανταπόκριση των φυτών σε διάφορες καταστάσεις περιβαλλοντικών stress των φυτών.

Συγκεκριμένα το γονίδιο *GRP7* παρατηρήθηκε ότι συμμετέχει στη βλάστηση των σπόρων, στην ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες αλατότητας και ξηρασίας καθώς και σε αντοχή στο ψύχος. Σε έρευνες στο παρελθόν, όταν έγινε υπερέκφραση του γονιδίου *GRP7* σε φυτά *Arabidopsis thaliana*, παρατηρήθηκε ότι σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας και ξηρασίας τα φυτά εμφάνισαν καθυστερημένη βλαστικότητα σπόρων καθώς και μειωμένη ανάπτυξη νεαρών φυτών. Παρατηρήθηκε επίσης ότι τα φυτά του *Arabidopsis thaliana* με υπερέκφραση του γονιδίου *GRP7* είχαν αυξημένη ανθεκτικότητα στο ψύχος.

Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα των κυττάρων όσο και στο κυτταρόπλασμα και η λειτουργία της είναι να προσκολλάται σε μόρια RNA και να τα εξάγει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Επίσης λόγω της ιδιότητας να εκφράζεται στα καταφρακτικά κύτταρα, φαίνεται ότι παίζει ρόλο στη διαδικασία ανοίγματος-κλεισίματος των στοματίων και στην αβιοτική καταπόνηση.



#### 1.4 *Arabidopsis thaliana*, το φυτό μοντέλο

Τα τελευταία χρόνια το φυτό *Arabidopsis thaliana* της οικογένειας Brassicaceae έχει καθιερωθεί ως αντικείμενο πειραμάτων σε μελέτες μοριακής βιολογίας, γενετικής και ανάπτυξης εξαιτίας του πλήθους των πλεονεκτημάτων του. Ο βιολογικός του κύκλος είναι πολύ σύντομος και σε άριστες συνθήκες καλλιέργειας μπορεί να ολοκληρώνεται σε δύο μόνο μήνες. Ο χρόνος ανθοφορίας του είναι μεγάλος και έχει υψηλή απόδοση σε σπέρματα, τα οποία μπορεί να φτάσουν τα 10.000/φυτό.

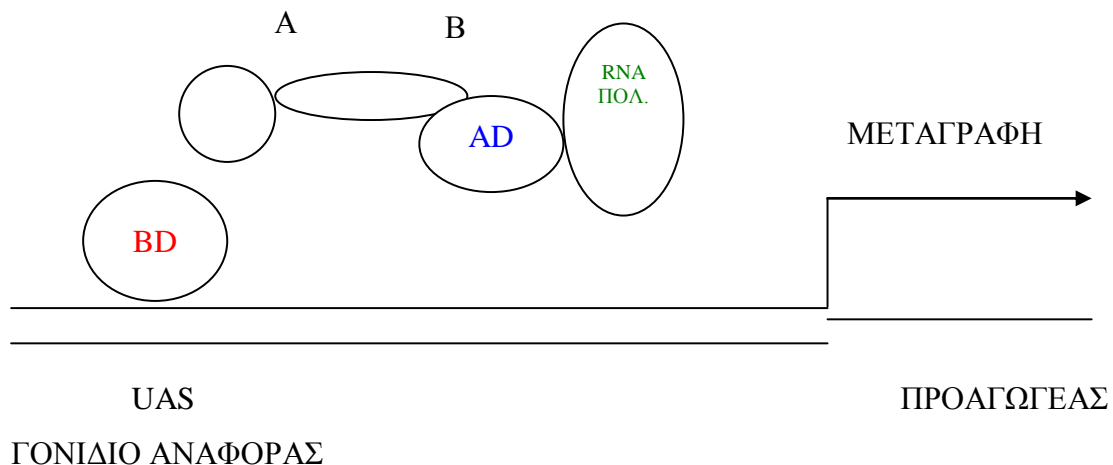
Το μικρό μέγεθος του φυτού επιτρέπει αποτελεσματικό έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού φυτών για εύρεση φαινοτυπικών μεταλλάξεων. Επιπλέον, το μικρό επίσης μέγεθος των ώριμων φυτών επιτρέπει την ταυτόχρονη καλλιέργεια μεγάλου αριθμού φυτών σε σχετικά μικρό χώρο (Pruitt & Meyerowitz, 1986). Το *Arabidopsis* παρουσιάζει το πλεονέκτημα του μικρού γονιδιώματος συγκριτικά με τα υπόλοιπα ανώτερα φυτά. Είναι 7 φορές μεγαλύτερο από το γονιδίωμα των ζυμών και 30 φορές μεγαλύτερο από το γονιδίωμα του *E. coli*. Επιπλέον, το γονιδίωμά του είναι πλέον γνωστό, καθώς ολοκληρώθηκε το πρόγραμμα προσδιορισμού της ακολουθίας των βάσεων του DNA. Το *Arabidopsis* διαθέτει ένα υψηλό ποσοστό μοναδικού, μη-επαναλαμβανόμενου DNA που φτάνει το 50-55% του συνολικού.

Ο μετασχηματισμός του είναι μια σχετικά εύκολη διαδικασία και επίσης, χωρίς ιδιαίτερη δυσκολία, είναι δυνατή η δημιουργία μεταλλάξεων είτε με χημικά μεταλλαξογόνα και ακτινοβολία, είτε με μεταθετά στοιχεία και ένθεση T-DNA (Koncz et al., 1992). Η ρίζα του *Arabidopsis* παρουσιάζει απλή ιστολογική οργάνωση και σταθερό πρότυπο οργάνωσης. Τα στοιχεία αυτά σε συνδυασμό με το μικρό της μέγεθος διευκολύνουν τον εντοπισμό μεταλλάξεων που παρουσιάζουν φαινοτυπικές διαφορές από τα αγρίου τύπου φυτά στο πρότυπο ανάπτυξης της ρίζας.

## 1.5 Αρχή του συστήματος δύο υβριδίων

Το σύστημα δύο υβριδίων χρησιμοποιείται για να ελέγξει αν δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, καθώς επίσης και για την απομόνωση κλώνων cDNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.

Το σύστημα δύο υβριδίων των ζυμών βασίζεται στο γεγονός ότι πολλοί ευκαρυωτικοί παράγοντες μεταγραφής αποτελούνται από δύο φυσικά ξεχωριστούς και λειτουργικά ανεξάρτητους τομείς. Τέτοιοι μεταγραφικοί παράγοντες συνήθως αποτελούνται από ένα τομέα πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain ή DNA-BD) ο οποίος προσδένεται σε μια θέση της αλληλουχίας του DNA που προηγείται του γονιδίου αναφοράς, η οποία στη ζύμη αναφέρεται ως UAS (upstream activation site). Ο άλλος τομέας των μεταγραφικών παραγόντων (activation domain ή AD) οδηγεί το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης να μεταγράψει το γονίδιο που ακολουθεί αμέσως μετά τη θέση UAS (Keegan et al., 1986; Hope & Struhl, 1986).



*Σχηματικό διάγραμμα συστήματος δύο υβριδίων. Διακρίνονται οι τομείς BD και AD του μεταγραφικού παράγοντα που έχουν σχηματίσει υβρίδια με τις πρωτεΐνες A και B, το σύμπλοκο της RNA-πολυμεράσης, η θέση σύνδεσης UAS του DNA-BD, και το γονίδιο αναφοράς με τον προαγωγέα του.*

Για τη μεταγραφή του γονιδίου απαιτείται η ύπαρξη και των δύο τομέων του μεταγραφικού παράγοντα, που συνήθως αποτελούν τμήματα της ίδιας πρωτεΐνης. Οι δύο τομείς δεν αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους οπότε δεν μπορούν από μόνοι τους να προκαλέσουν τη μεταγραφή του γονιδίου (Ma & Ptashne, 1988; Brent & Ptashne, 1985). Όμως, εάν οι δύο τομείς με κάποιο έμμεσο τρόπο έρθουν πολύ κοντά ο ένας στον άλλο, η λειτουργία έναρξης της μεταγραφής θα αποκατασταθεί. Αυτό μπορεί να συμβεί εάν δημιουργηθούν υβρίδια των δύο τομέων με πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Στο σύστημα δύο υβριδίων χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικοί πλασμιδιακοί φορείς όπου ο ένας περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί το DNA-BD και ο άλλος το γονίδιο για το DNA-AD. Στους φορείς αυτούς κλωνοποιούνται οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που κωδικοποιούν για δύο πρωτεΐνες (A και B, εικόνα 5), οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες-υβρίδια συν-εκφράζονται σε κύτταρα ζύμης και κατευθύνονται στον πυρήνα των κυττάρων (Chien et al., 1991). Το DNA-BD θα δεθεί στη θέση UAS του προαγωγέα. Μια πιθανή αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών θα φέρει τα δύο τμήματα του μεταγραφικού παράγοντα πολύ κοντά, οπότε η λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα θα αποκατασταθεί και θα αρχίσει η μεταγραφή του γονιδίου. Εάν οι δύο πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, το γονίδιο δεν θα μεταγραφεί.

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Δεκτικά κύτταρα ζύμης

Η μεθοδολογία που ακολουθεί αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου από τους Guthrie & Fink, (1991).

1. 50ml θρεπτικού μέσου YPD ή κατάλληλου μέσου SD μολύνονται με αποικίες ζύμης, διαμέτρου 2-3mm.
2. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 30°C για 16-18 ώρες, με ανάδευση στις 250 rpm, μέχρι η οπτική πυκνότητα OD<sub>600</sub> να ξεπεράσει την τιμή 1,5 (στάσιμη φάση).
3. 30ml της καλλιέργειας αυτής μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 300ml YPD. Αν είναι απαραίτητο, προσθέτουμε καλλιέργεια μέχρι το OD<sub>600</sub> να είναι 0.2-0.3.
4. Η καλλιέργεια επωάζεται για άλλες 3 ώρες στους 30°C, με ανάδευση στις 230rpm, μέχρι το OD<sub>600</sub> να φτάσει το 0.4-0.6.
5. Η καλλιέργεια μοιράζεται σε κατάλληλα δοχεία και φυγοκεντρούμε στις 2500rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-21 °C).
6. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε αποστειρωμένο TE ή αποστειρωμένο νερό. Τα αιωρήματα συγκεντρώνονται σε ένα δοχείο, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 25-50ml.
7. Το αιώρημα φυγοκεντρείται στις 2500rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-21 °C).
8. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1,5ml φρέσκου, αποστειρωμένου 1X TE/1X LiAc.

Δεν υπάρχει δυνατότητα διατήρησης των δεκτικών κυττάρων ζύμης, οπότε πρέπει ο μετασχηματισμός τους να γίνει εντός μίας ώρας από την παρασκευή τους ή εντός λίγων ωρών, με μικρότερη όμως απόδοση μετασχηματισμού.

## 2.2 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφηκε από τους Ito et al. (1983).

1. Σε 100μl δεκτικών κυττάρων ζύμης προστίθενται με την εξής σειρά:
  - 240μl PEG (50% w/v)
  - 6μl  $\text{CH}_3\text{COOLi}$  (1M)
  - 25μl carrier DNA (4mg/ml)
  - 20μl πλασμιδιακό DNA (10 μl από το καθένα πλασμίδιο) ώστε η τελική συγκέντρωση του καθενός πλασμιδίου στο μίγμα να είναι 100ng-5μg
  - 30μl αποστειρωμένο νερό.
2. Ακολουθεί θερμική καταπόνηση του μίγματος για 20 λεπτά στους 42 °C.
3. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρωση στις 5000rpm για 10 δευτερόλεπτα.
4. Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιώντας πιπέτα.

Το ίζημα των κυττάρων ζύμης επαναιωρείται σε 200μl αποστειρωμένο νερό και επιστρώνεται σε τριβλία τα οποία περιέχουν κατάλληλο θρεπτικό μέσο που θα επιτρέψει την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

## 2.3 Διαλύματα και θρεπτικά μέσα

### I. Θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη κυττάρων ζύμης

#### Θρεπτικό μέσο **YPD**

2% (w/v) πεπτόνη, 1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) γλυκόζη. Στην περίπτωση στερεού υποστρώματος, προστίθεται 2% (w/v) άγαρ.

#### Θρεπτικό μέσο **SD**

0,67% (w/v) βάση αζώτου χωρίς αμινοξέα, 10%(v/v) Drop Out διάλυμα αμινοξέων (DO supplement), 1% (v/v) από τα επιπλέον αμινοξέα, 2% (w/v) γλυκόζη. Στην περίπτωση στερεού υποστρώματος προστίθεται 2% (w/v) άγαρ.

### II. Διαλύματα για τον μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης

#### **carrier DNA**

DNA από σπέρμα σολομού διαλύεται σε ddH<sub>2</sub>O με τελική συγκέντρωση 4mg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C. Πριν από κάθε χρήση αποστειρώνεται για πέντε λεπτά για να αποδιαταχθεί και διατηρείται αποδιαταγμένο σε πάγο.

#### **10X LiAc**

1M Οξικό λίθιο (CH<sub>3</sub>COOLi). Το pH ρυθμίζεται στο 7,5 με αραιό οξικό οξύ και αποστειρώνεται.

#### **10X TE**

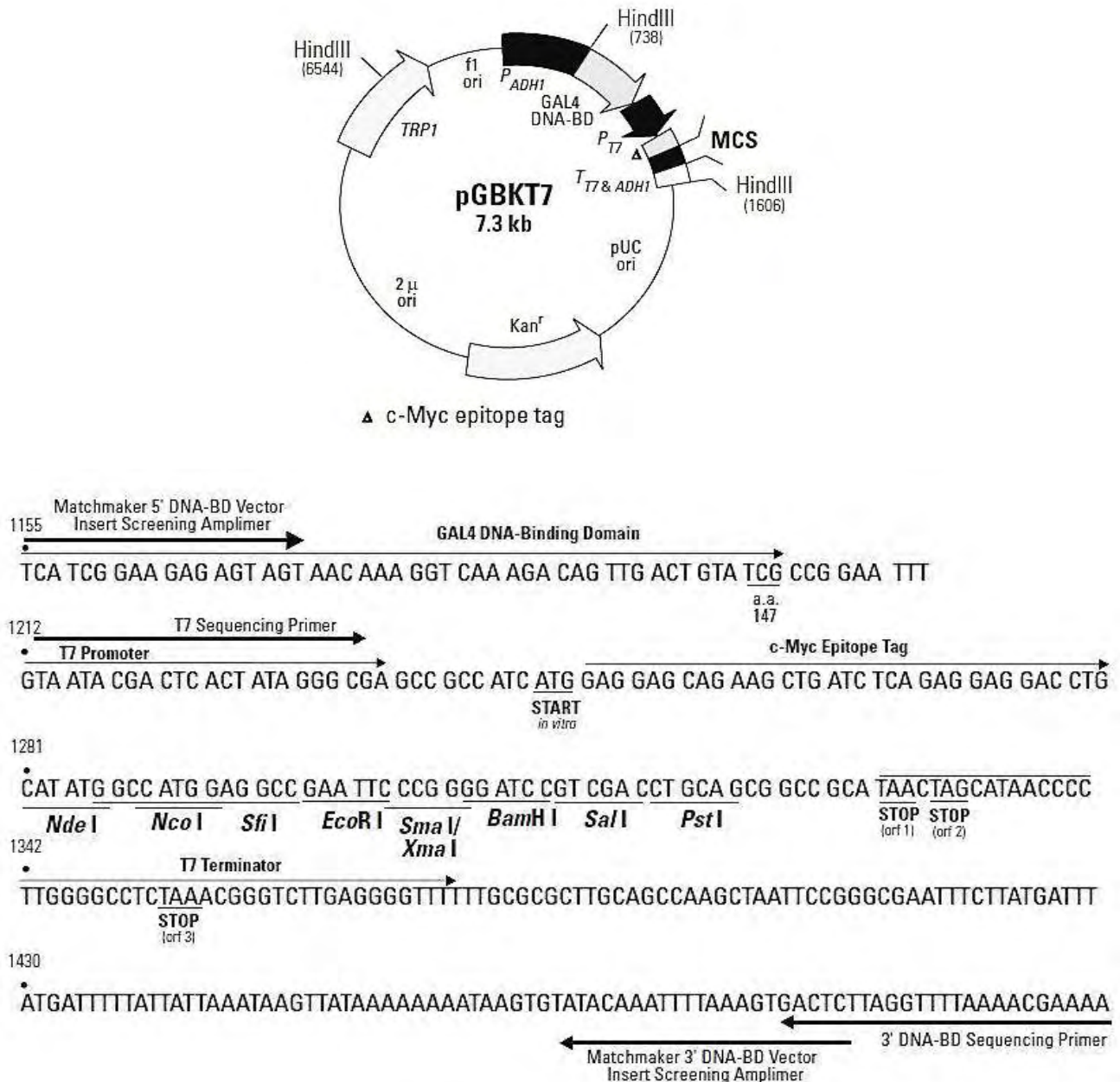
0,1M Tris-HCL, 10mM EDTA, ρύθμιση του pH στο 7,5 και αποστείρωση.

#### **50% PEG** (Polyethylene glycol)

50gr PEG σε 100ml υδάτινου διαλύματος. (Αν είναι απαραίτητο, θερμαίνουμε στους 50°C για να υποβοηθήσουμε την διαλυτοποίηση). Όχι αποστείρωση.

## 2.4 Φορείς έκφρασης

### 2.4.1 Πλασμιδιακός φορέας pGBKT7



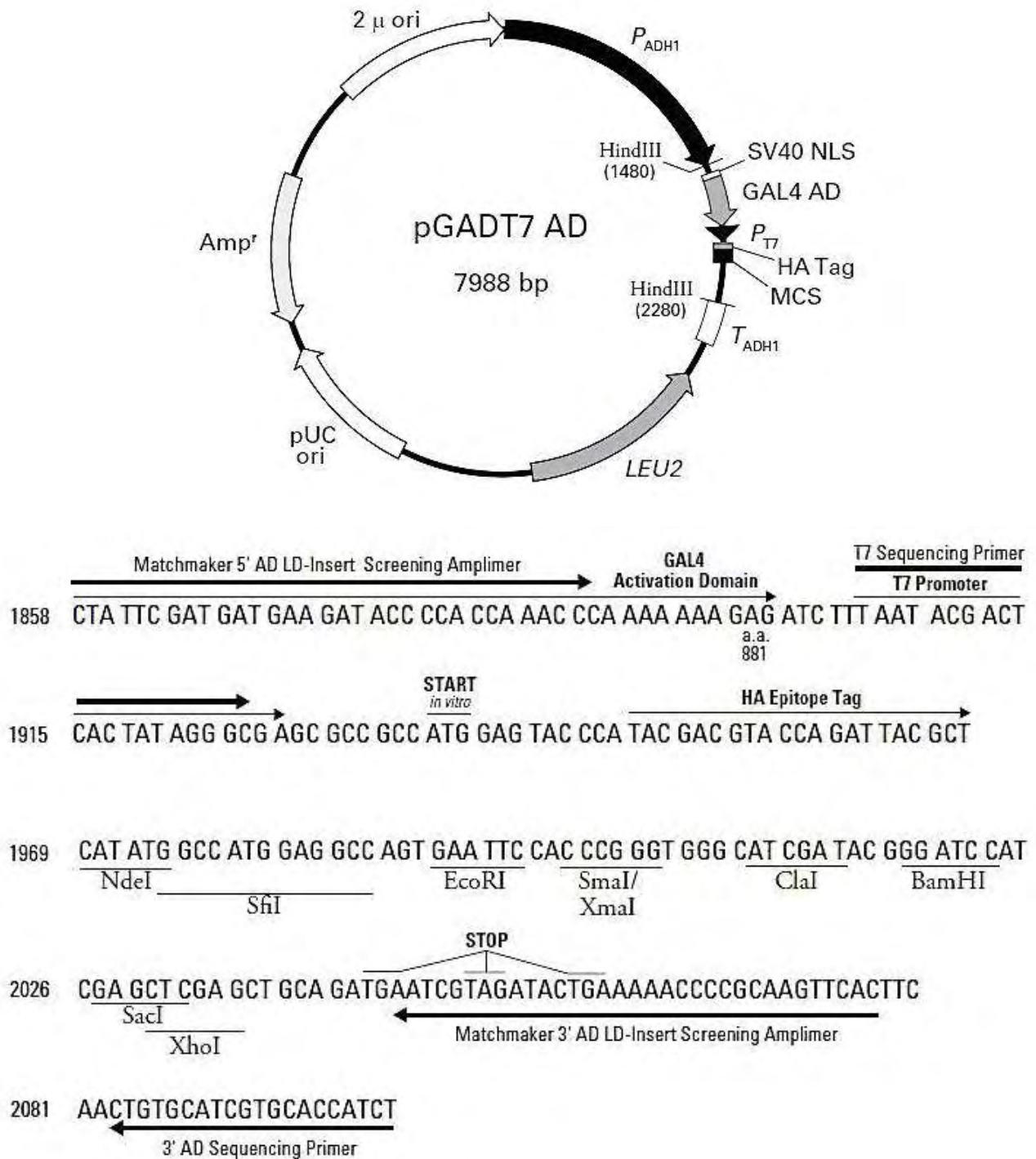
**Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pGBKT7.** Unique restriction sites are in bold.

## Περιγραφή

Ο πλασμιδιακός φορέας pGBKT7 εκφράζει πρωτεΐνες συντηγμένες με τα αμινοξέα 1-147 της GAL4 περιοχής δέσμευσης του DNA (DNA-BD). Σε ζυμομύκητες, οι πρωτεΐνες σύντηξης εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα από το ιδιοσυστατικό ADH1 υποκινητή (PADH1): η μεταγραφή τερματίζεται από τα T7 και ADH1 σήματα τερματισμού μεταγραφής (TT7 & ADH1). Ο φορέας pGBKT7 περιέχει, επίσης, τον υποκινητή T7, σήμανση με τον επίτοπο c-myc και πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης (Multiple Cloning Site, MCS). Ο φορέας pGBKT7 αντιγράφεται αυτόνομα τόσο στο *E. coli* όσο και στο *S. cerevisiae* από τις περιοχές pUC και 2  $\mu$  ori, αντίστοιχα. Ο φορέας φέρει το γονίδιο αντοχής στην καναμυκίνη Kan<sup>r</sup> για την επιλογή σε *E. coli* και το αυξότροφο γονίδιο δείκτη επιλογής TRP1 για την επιλογή σε ζυμομύκητες. Στελέχη ζυμομυκήτων που περιέχουν τον φορέα pGBKT7 εμφανίζουν υψηλότερη ικανότητα μεταμόρφωσης από στελέχη που φέρουν άλλους φορείς DNA-BD.



## 2.4.2. Πλασμιδιακός φορέας pGADT7 AD



## Περιγραφή

Ο πλασμειδιακός φορέας pGADT7 AD είναι ένας φορέας έκφρασης ζύμης που έχει σχεδιαστεί για να εκφράσει μια πρωτεΐνη ενδιαφέροντος συντηγμένη με τη GAL4 περιοχή ενεργοποίησης (AD: αμινοξέα 768-881). Η μεταγραφή της σύντηξης GAL4 AD οδηγείται από τον ιδιοσυστατικά ενεργό ADH1 υποκινητή (PADH1) και τερματίζεται στο σήμα τερματισμού της μεταγραφής (TADH1). Η σύντηξη GAL4 AD περιέχει ένα N-τερματικό SV40 σήμα εντοπισμένο στον πυρήνα (SV40 NLS; 1), που στοχεύει την πρωτεΐνη στον πυρήνα της ζύμης, και είναι σεσημασμένη με έναν επίτοπο αιμοσυγκολλητίνης (HA Tag), που βρίσκεται μεταξύ του GAL4 AD και της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, η οποία επιτρέπει στην πρωτεΐνη να ανιχνευθεί εύκολα με αντισώματα HA Tag. Ο υποκινητής T7 (PT7), ο οποίος βρίσκεται μόλις ανοδικά της αλληλουχίας της αιμοσυγκολλητίνης HA (HA-tag), επιτρέπει την *in vitro* μεταγραφή και τη μετάφραση της σεσημασμένης με HA πρωτεΐνης ενδιαφέροντος (χωρίς το GAL4 AD και το SV40 NLS). Ο φορέας pGADT7 αντιγράφεται αυτόνομα τόσο στο *E. coli* και στο *S. cerevisiae* από τις περιοχές pUC και 2  $\mu$  ori, αντίστοιχα. Ο φορέας περιέχει, επίσης, ένα γονίδιο αντοχής στην αμικικιλίνη (Amp<sup>r</sup>) για επιλογή σε *E. coli* και το διατροφικό δείκτη LEU2 για επιλογή σε ζυμομύκητες (Chien et al., 1991).

### 3 . ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Σκοπός

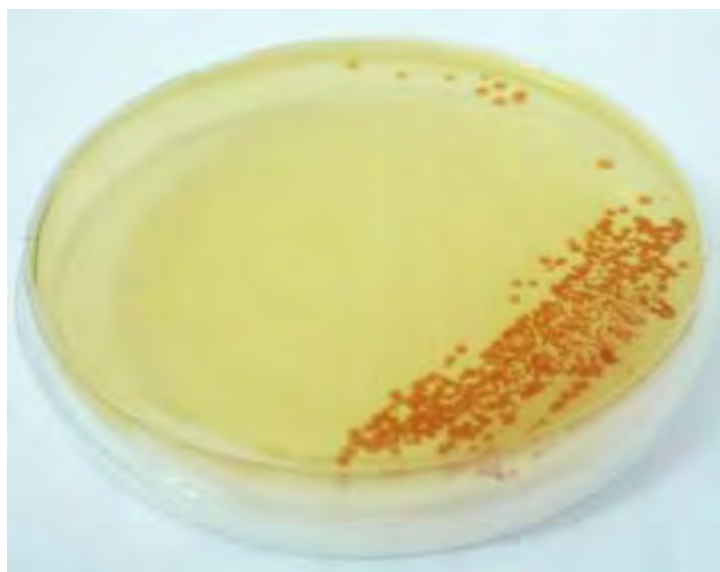
Σκοπός του πειράματος είναι να ελέγξουμε αν η πρωτεΐνη HESP αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες OXT6 και GRP7. Για να μελετήσουμε την πιθανή αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης HESP με τις πρωτεΐνες OXT6 και GRP7 πραγματοποιήθηκε εισαγωγή πλασμιδίων που έφεραν τα γονίδια αυτά σε κύτταρα ζύμης, ώστε να εκφραστούν τα γονίδια και να παράγουν πρωτεΐνες. Ο έλεγχος της πιθανής αλληλεπίδρασης HESP - OXT6 και HESP-GRP7 έγινε με τη χρήση του συστήματος δύο υβριδίων στη ζύμη.

#### 3.2 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης

Για να μπορέσουμε να μελετήσουμε την πιθανή αλληλεπίδραση των HESP με OXT6 και HESP με GRP7 κρίθηκε αναγκαία η ένθεσή τους σε ειδικούς πλασμιδιακούς φορείς που επέτρεπαν την έκφρασή τους σε σύστημα ζύμης.

Πιο συγκεκριμένα οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο pGBKT7 και ο pGADT7, οι οποίοι φέρουν την πληροφορία για τη σύνθεση των αμινοξέων τρυπτοφάνη και λευκίνη αντίστοιχα. Επιπλέον, φέρουν πολυσυνδέτες με ειδικές θέσεις αναγνώρισης για πολλά διαφορετικά ένζυμα περιορισμού. Η κλωνοποίηση του *HESP* έγινε στον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7 στις θέσεις *EcoR* I-*Sol* I και η κλωνοποίηση των *OXT6*, *GRP7* στον πλασμιδιακό φορέα pGADT7 στις θέσεις *EcoR* I-*Xho* I.

Μετά την κλωνοποίηση των *HESP* και *OXT6*, *GRP7* στους πλασμιδιακούς φορείς pGBKT7 και pGADT7 αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε η επιλογή των σωστών πλασμιδίων που περιείχαν τις ενθέσεις και ακολούθησε μετασχηματισμός κατάλληλων δεκτικών κυττάρων ζύμης. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ζύμης στελέχους AH109 (εικόνα 4). Τα κύτταρα του συγκεκριμένου στελέχους είναι αυξοτροφικά ως προς τα αμινοξέα τρυπτοφάνη και λευκίνη, οπότε δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο που λείπει κάποιο από αυτά τα αμινοξέα.



**Εικόνα 4**

*Κύτταρα ζύμης στελέχους AH 109*

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι συνδυασμοί των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στο μετασχηματισμό των δεκτικών κυττάρων.

	<b>HESP.pGBK</b>	<b>OXT6.pGAD</b>	<b>?</b>
<b>2</b>	<b>HESP.pGBK</b>	<b>GPR7.pGAD</b>	<b>?</b>
<b>3</b>	<b>HESP.pGBK</b>	<b>pGAD</b>	<b>Αρνητικός έλεγχος</b>
<b>4</b>	<b>pGBK</b>	<b>OXT6.pGAD</b>	<b>Αρνητικός έλεγχος</b>
<b>5</b>	<b>pGBK</b>	<b>GPR7.pGAD</b>	<b>Αρνητικός έλεγχος</b>
<b>6</b>	<b>pGBK</b>	<b>pGAD</b>	<b>Αρνητικός έλεγχος</b>
<b>7</b>	<b>pGBK-53</b>	<b>pGAD-T</b>	<b>Θετικός έλεγχος</b>

**Πίνακας 1**

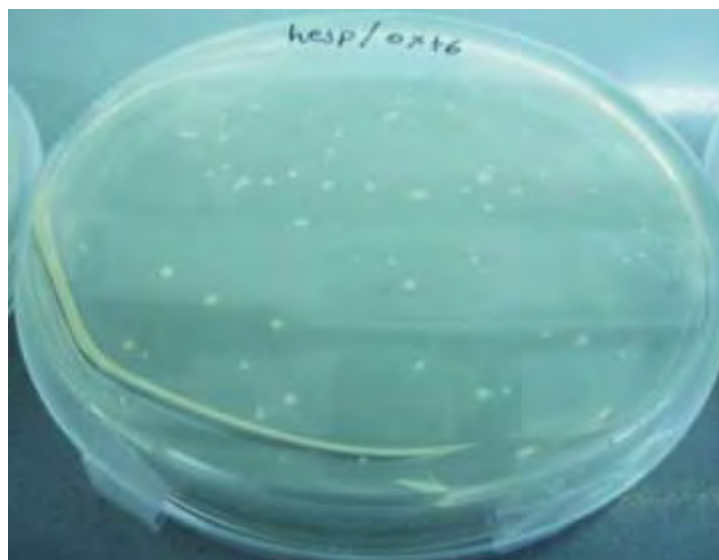
*Συνδυασμοί πλασμιδίων στο μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης*

Από τον τρίτο μέχρι τον έκτο συνδυασμό αναμένουμε αρνητικά αποτελέσματα. Ο αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε για να βεβαιώσουμε ότι καμία από τις πρωτεΐνες μας δεν αλληλεπιδρά με τους “άδειους φορείς”. Στον έβδομο συνδυασμό αναμένουμε θετικό αποτέλεσμα, διότι οι πρωτεΐνες αυτές είναι ήδη γνωστό ότι αλληλεπιδρούν.

### 3.3 Έλεγχος μετασχηματισμένων κυττάρων (σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς λευκίνη και τρυπτοφάνη)

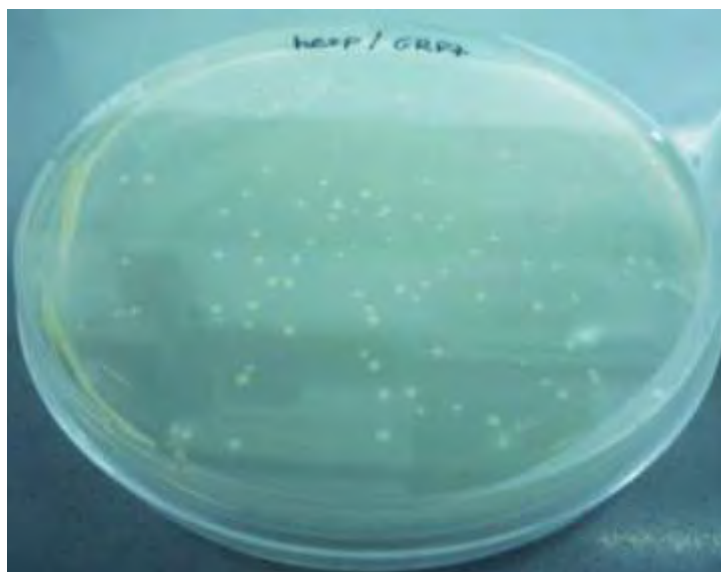
Η επιλογή των κυττάρων ζύμης που μετασχηματίστηκαν και με τα δύο πλασμίδια έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα SD που δεν είχε τρυπτοφάνη και λευκίνη.

Στις παρακάτω εικόνες (5-11) παρατηρούμε την ανάπτυξη των κυττάρων ζύμης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα SD -Leu/-Trp. Περιμετρικά στα τριβλία των εικόνων αναγράφονται οι συνδυασμοί των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στο μετασχηματισμό των δεκτικών κυττάρων.



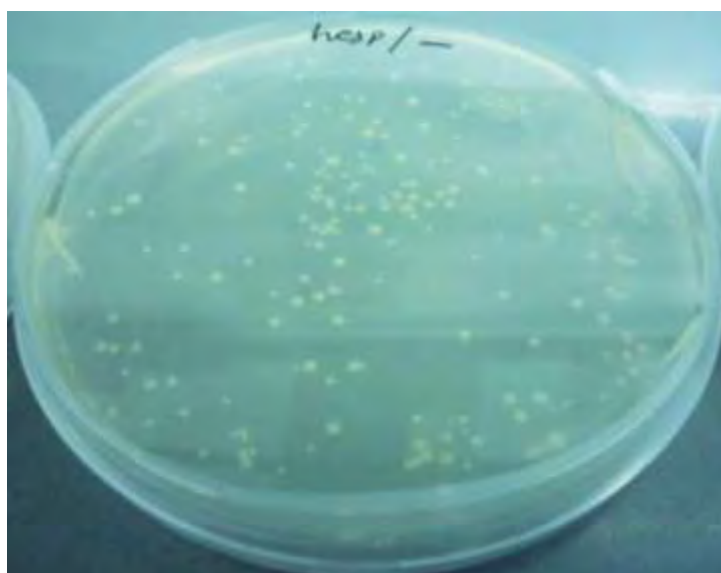
**Εικόνα 5**

*Κύτταρα ζύμης που μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια HESP- pGBK και OXT6-pGAD και κατάφεραν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υπόστρωμα απουσία λευκίνης/τρυπτοφάνης*



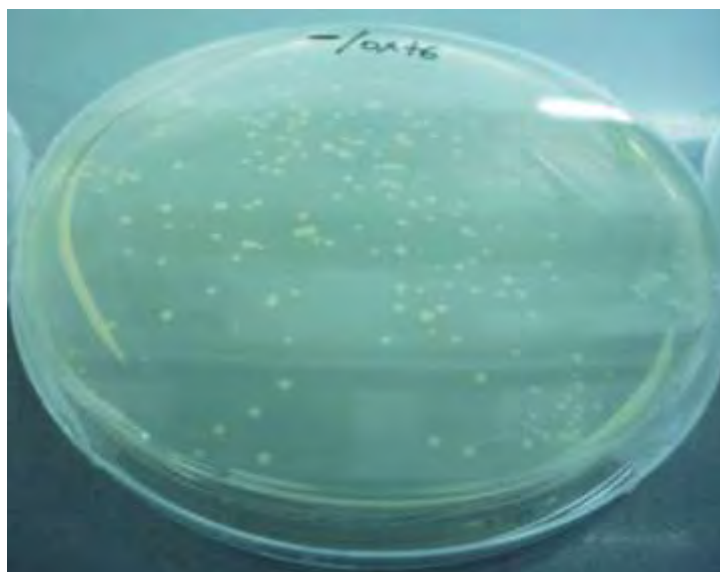
**Εικόνα 6**

*Κύτταρα ζύμης που μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια HESP-pGBK και GRP7-pGAD και κατάφεραν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υπόστρωμα απουσία λευκίνης/τροποφάνης.*



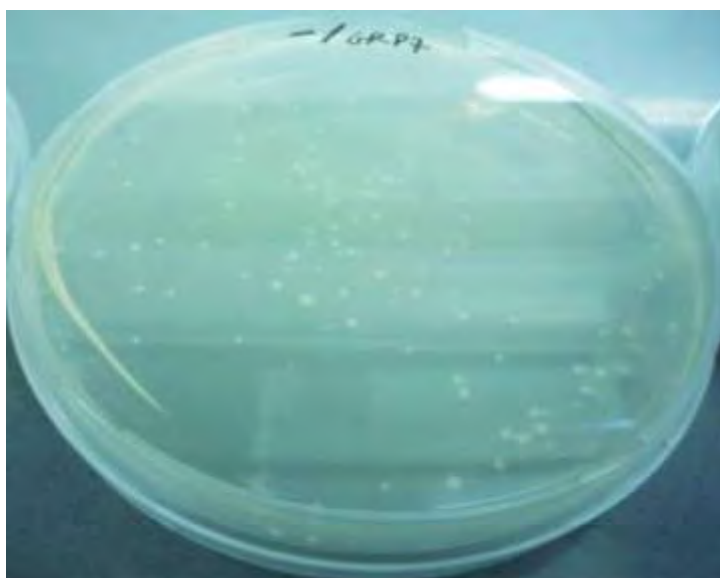
**Εικόνα 7**

*Κύτταρα ζύμης που μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια HESP- pGBK και pGAD και κατάφεραν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υπόστρωμα απουσία λευκίνης/τροποφάνης.*



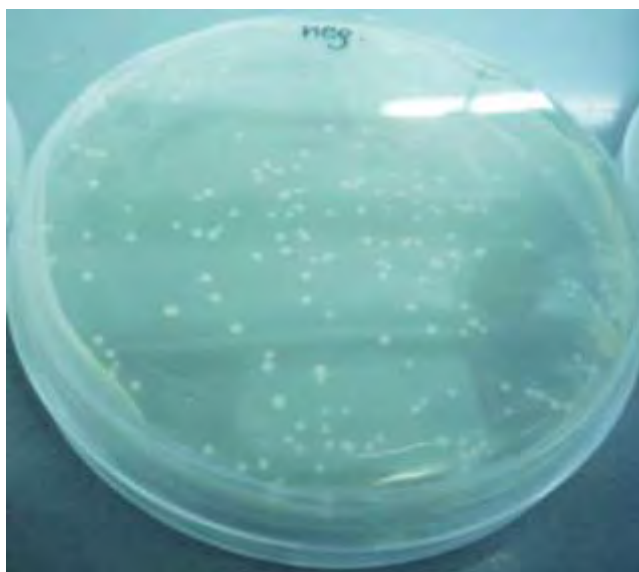
**Εικόνα 8**

*Κύτταρα ζύμης που μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια pGBK και OXT6-pGAD και κατάφεραν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υπόστρωμα απουσία λευκίνης/τρυπτοφάνης.*



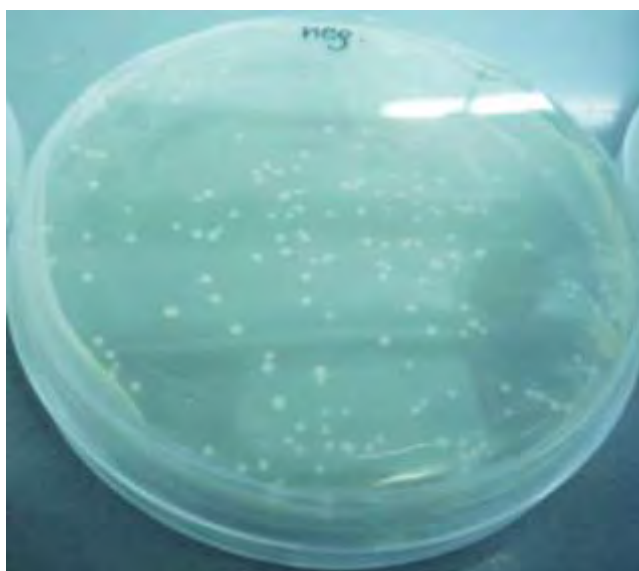
**Εικόνα 9**

*Κύτταρα ζύμης που μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια pGBK και GRP7.pGAD και κατάφεραν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υπόστρωμα απουσία λευκίνης/τρυπτοφάνης.*



**Εικόνα 10**

*Κύτταρα ζύμης που μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια αρνητικού ελέγχου pGBK και pGAD και κατάφεραν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υπόστρωμα απουσία λευκίνης/τροπτοφάνης.*



**Εικόνα 11**

*Κύτταρα ζύμης που μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια θετικού ελέγχου pGBK-53 και pGAD-T και κατάφεραν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υπόστρωμα απουσία λευκίνης/τροπτοφάνης.*



Από τις παραπάνω εικόνες διακρίνεται ότι σε όλους τους συνδυασμούς τα κύτταρα έχουν προσλάβει και τα δύο πλασμίδια αφού δημιουργήθηκαν αποικίες απουσία των αμινοξέων της λευκίνης και της τρυπτοφάνης από το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης.

### 3.4 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών

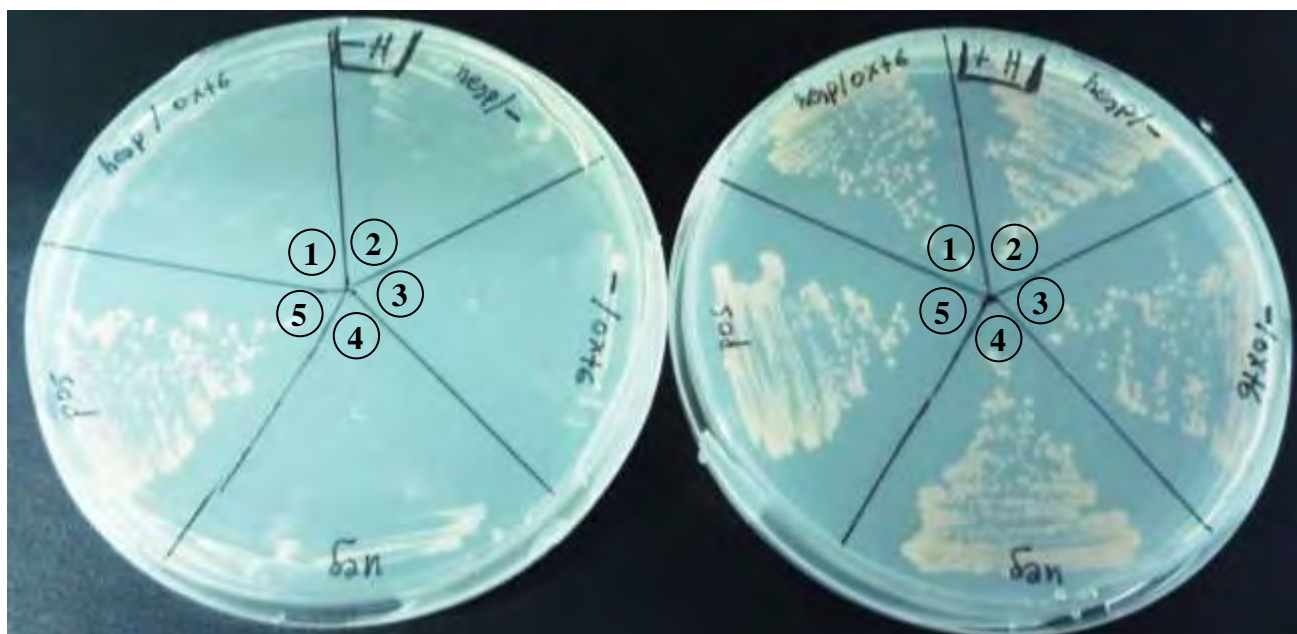
Οι αποικίες που κατάφεραν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό SD -leu/Trp, αναπτύχθηκαν στη συνέχεια σε θρεπτικό υπόστρωμα που στερείται λευκίνη, τρυπτοφάνη και ιστιδίνη. Σε περίπτωση αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών που εκφράζονται, τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο που λείπει η ιστιδίνη.

Στις παρακάτω εικόνες (12-14) φαίνεται η ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης σε θρεπτικό υπόστρωμα άνευ λευκίνης, τρυπτοφάνης και ιστιδίνης. Για κάθε περίπτωση παρουσιάζεται η ανάπτυξη των κυττάρων ζύμης τόσο σε θρεπτικό υπόστρωμα SD χωρίς λευκίνη και τρυπτοφάνη όσο και σε θρεπτικό υπόστρωμα SD χωρίς λευκίνη, τρυπτοφάνη και ιστιδίνη.

Αρχικά ελέγχθηκε η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών HESP-OXT6. Οι συνδυασμοί που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 2 και τα αποτελέσματα στην εικόνα 12.

**Πίνακας 2**

<b>1</b>	<b>HESP.pGBK</b>	<b>OXT6.pGAD</b>	
<b>2</b>	<b>HESP.pGBK</b>	<b>pGAD</b>	<b>Αρνητικός έλεγχος</b>
<b>3</b>	<b>pGBK</b>	<b>OXT6.pGAD</b>	<b>Αρνητικός έλεγχος</b>
<b>4</b>	<b>pGBK</b>	<b>pGAD</b>	<b>Αρνητικός έλεγχος</b>
<b>5</b>	<b>pGBK-53</b>	<b>pGAD-T</b>	<b>Θετικός έλεγχος</b>



**Εικόνα 12**

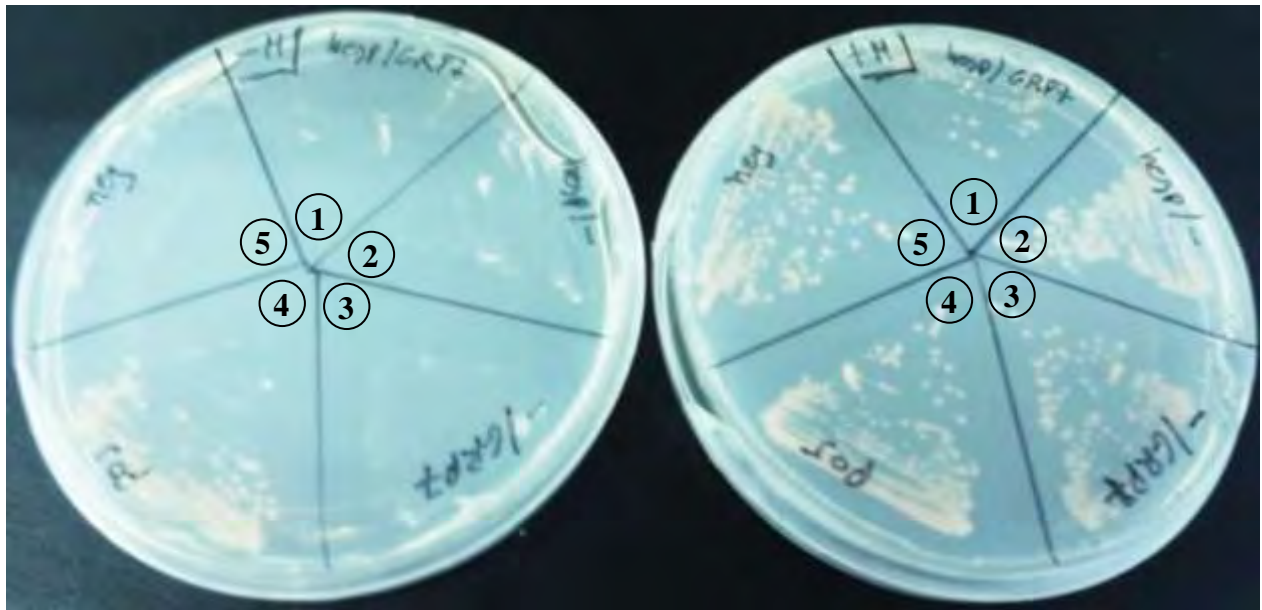
*Έλεγχος αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών HESP-OXT6, με όλους τους απαραίτητους ελέγχους.*

Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια HESP.pGBK και OXT6.pGAD δεν αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που στερείται ιστιδίνης, άρα οι πρωτεΐνες HESP και OXT6 δεν αλληλεπιδρούν. Οι συνδυασμοί αρνητικών ελέγχων χρησιμοποιήθηκαν για να βεβαιώσουμε ότι καμιά από τις πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρά με τους “άδειους φορείς”. Τα κύτταρα που έφεραν τα πλασμίδια θετικού ελέγχου κατάφεραν να αναπτυχθούν στο θρεπτικό χωρίς ιστιδίνη.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η αλληλεπίδραση HESP-GPR7. Οι συνδυασμοί που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 3 και τα αποτελέσματα στην εικόνα 13.

**Πίνακας 3**

1	<b>HESP.pGBK</b>	<b>GPR7.pGAD</b>	
2	<b>HESP.pGBK</b>	<b>pGAD</b>	<b>Αρνητικός έλεγχος</b>
3	<b>pGBK</b>	<b>GPR7.pGAD</b>	<b>Αρνητικός έλεγχος</b>
4	<b>pGBK-53</b>	<b>pGAD-T</b>	<b>Θετικός έλεγχος</b>
5	<b>pGBK</b>	<b>pGAD</b>	<b>Αρνητικός έλεγχος</b>

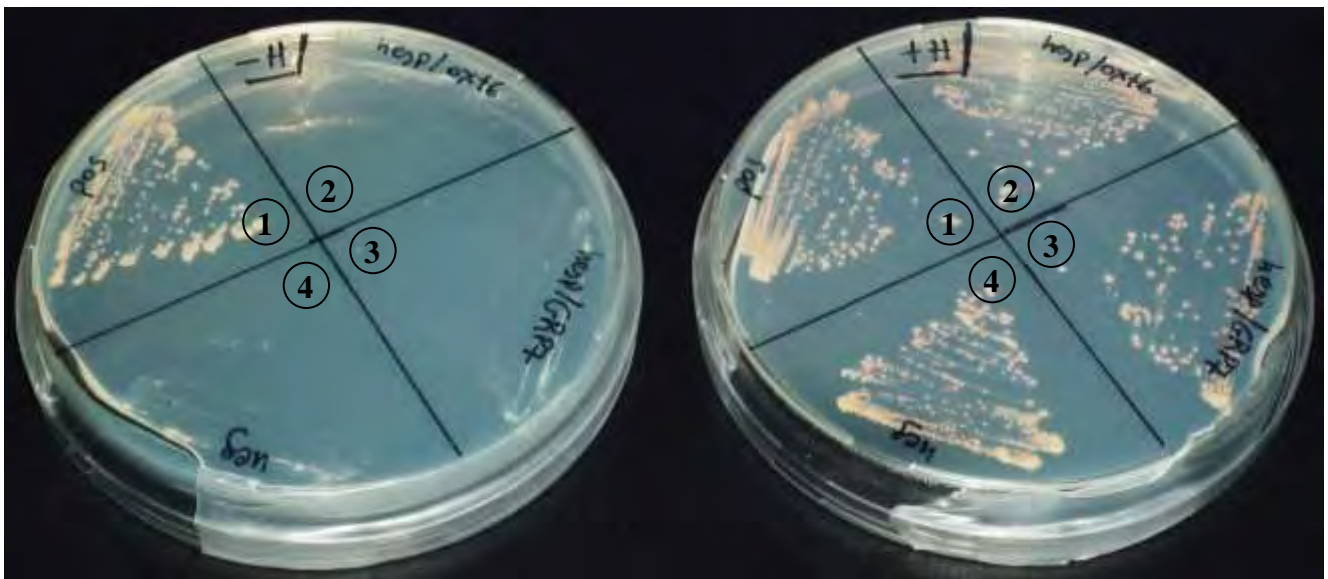


**Εικόνα 13**

*Έλεγχος αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών HESP και GRP7, με όλους τους απαραίτητους ελέγχους.*

Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια HESP.pGBK και GRP7.pGAD δεν αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που στερείται ιστιδίνης, άρα οι πρωτεΐνες HESP και GRP7 δεν αλληλεπιδρούν. Οι συνδυασμοί αρνητικών ελέγχων χρησιμοποιήθηκαν για να βεβαιώσουμε ότι καμιά από τις πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρά με τους “άδειους φορείς”. Τα κύτταρα που έφεραν τα πλασμίδια θετικού ελέγχου κατάφεραν να αναπτυχθούν στο θρεπτικό χωρίς ιστιδίνη.

Στην εικόνα 14 συνοψίζονται τα τελικά αποτελέσματα. Βλέπουμε ότι τα κύτταρα που φέρουν πλασμίδια θετικού ελέγχου (εικόνα 14,1) κατάφεραν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό που απουσίαζε ιστιδίνη. Απεναντίας, τα μετασχηματισμένα κύτταρα ζύμης που εκφράζουν τις πρωτεΐνες HESP-OXT6 (εικόνα 14,2) και HESP-GRP7 (εικόνα 14,3) δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υπόστρωμα δίχως ιστιδίνη.



**Εικόνα 14**

*Η πρωτεΐνη HESP δεν αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες OXT6 και GRP7.*

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το γονίδιο *HESP* του *Arabidopsis thaliana*. Το γονίδιο *HESP* ή αλλιώς νοκτουρνίνη ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια νουκλεασών εξαρτώμενων από το μαγνήσιο που έχει δράση αποαδενυλάσης. Ο ρόλος της νοκτουρνίνης στην αποαδενυλίωση δεν είναι ακόμα γνωστός, αλλά υπάρχουν αποδείξεις ότι ελέγχεται από τον κirkάδιο ρυθμό δρώντας στο επίπεδο της αποικοδόμησης του mRNA και της μετάφρασης.

Σκοπός της εργασίας ήταν ο έλεγχος πιθανής αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης HESP1 του *Arabidopsis thaliana* με τις πρωτεΐνες OXT6 και GRP7.

Το γονίδιο *OXT6* παράγει 2 μόρια mRNA. Ένα μεγάλο και ένα μικρό. Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσίασε το μικρό mRNA, το CPSF30, το οποίο κωδικοποιεί έναν παράγοντα πολυαδενυλίωσης, ο οποίος συμμετέχει στην επεξεργασία του mRNA πριν γίνει η πολύ-αδενυλίωση. Τα αποτελέσματα της έρευνας εμπλέκουν την πρωτεΐνη CPSF30 του *Arabidopsis* στον μετά-μεταγραφικό έλεγχο στις αντιδράσεις των φυτών σε αβιοτική καταπόνηση και συγκεκριμένα στην έκφραση ενός συνόλου γονιδίων που φαίνεται ότι προσδίδουν ανθεκτικότητα στην οξειδωτική καταπόνηση.

Η πρωτεΐνη GRP7 εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα των κυττάρων όσο και στο κυτταρόπλασμα και η λειτουργία της είναι να προσκολλάται σε μόρια RNA και να τα εξάγει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Επίσης λόγω της ιδιότητας να εκφράζεται στα καταφρακτικά κύτταρα, φαίνεται ότι παίζει ρόλο και στην αβιοτική καταπόνηση.

Από έρευνα που έχει γίνει στο εργαστήριο για την έκφραση του γονιδίου *HESP* σε βάσεις δεδομένων, υπήρχαν ενδείξεις ότι το γονίδιο αυτό εμπλέκεται σε αβιοτικές καταπονήσεις. Επομένως, ελέγχθηκε πιθανή αλληλεπίδραση με τα γονίδια *OXT6* και *GRP7* που επίσης εμπλέκονται σε αβιοτικές καταπονήσεις.

Η πιθανή αλληλεπίδραση των παραπάνω πρωτεϊνών μελετήθηκε με το σύστημα δύο υβριδίων. Αρχικά, κλωνοποιήσαμε τα γονίδια σε κατάλληλους φορείς

έκφρασης και τα εισάγαμε σε κύτταρα ζύμης σε διάφορους συνδυασμούς. Κάθε φορά χρησιμοποιήσαμε τους κατάλληλους θετικούς και αρνητικούς ελέγχους.

Αρχικά τα μετασχηματισμένα κύτταρα ζύμης αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα που δεν περιείχε τα αμινοξέα τρυπτοφάνη και λευκίνη. Συνεπώς στα κύτταρα που θα αναπτυχθούν κανονικά αποδεικνύεται ότι έχει πραγματοποιηθεί η εισαγωγή και των δύο πλασμιδίων. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν απέδειξαν ότι η εισαγωγή των πλασμιδίων έγινε επιτυχώς.

Στη συνέχεια, οι αποικίες που κατάφεραν να αναπτυχθούν μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα που δεν περιείχε λευκίνη, τρυπτοφάνη και ιστιδίνη. Σε περίπτωση αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών που εκφράζονται, τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο που του λείπει ιστιδίνη.

Οι ζύμες που εκφράζανε τους συνδυασμούς των πρωτεϊνών HESP-OXT6 και HESP-GRP7 δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό χωρίς ιστιδίνη, ενώ τα κύτταρα που έφεραν το συνδυασμό του θετικού ελέγχου κατάφεραν να αναπτυχθούν στο θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζε η ιστιδίνη (εικόνες 12-14). Επομένως, συμπεραίνουμε ότι οι πρωτεΐνες HESP-OXT6 και HESP-GRP7 δεν αλληλεπιδρούν.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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., Nilsson P., Mazza C., Cuzack S., & Virtanen A. (2006). Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *Journal of Biological Chemistry*, 281: 4517–4522.
- Bargiello, T.A., Jackson, F.R., & Young, M.W. (1984). Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature*. 312: 752-754.
- Bläsing, O. E., Gibon, Y., Günther, M., Höhne, M., Morcuende, R., Osuna, D., Thimm, O., Usadel, B., Scheible, W.R., & Stitt, M. (2005). Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(12): 3257-3281.
- Brent R., & Ptashne, M. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, 43 (3): 729–736.
- Bruce, V.G. (1972). Mutants of the biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 70(4):537–548.
- Bünning, E. (1936). Die endogene Tagesperiodik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 54: 590-608.
- Chiba, Y., Johnson, M.A., Lidder, P., Vogel, J.T., Van Erp, H., Green, P.J. (2003). AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in *Arabidopsis*. *Gene*, 328: 95-102.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., & Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 88: 9578–9582.

Darwin, C., (1981). The power of movements in plants. New York : D. Appleton and Co.

Douris, N., & Green, C.B. (2009) NOC out the fat: a short review of the circadian deadenylase Nocturnin. *Annals of medicine*, 40(8): 622–626.

Dowson-Day, M., & J. Millar, A. (1999). Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 17 (1), 63–71.

Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96: 271-290.

Feldman, J.F., Hoyle, M.N. (1973). Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics*. 75(4):605–613.

Green, C.B. (2003). Molecular Control of *Xenopus* Retinal Circadian Rhythms. *Journal of Neuroendocrinology*; 15: 350-354.

Goldstrohm, A. C., & Wickens ,M., (2008). Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Molecular Cell Biology*, 9: 337-344.

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. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 99(17): 11513–11518.

Guthrie, C., & Fink, G. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Academic Press

Harmer, S. L., Panda, S., & Kay, S. A., (2001). Molecular bases of circadian rhythms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 17: 215-253.

Hope, IA, & Struhl, K. (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, 46(6):885–894.



Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkalications. *Journal of Bacteriology*, 153: 163–168

Johnson, M. W. (2005). Our war with the insects: Analysis of lost battles: 207-223. In Heinz, K. M., Frisbie, R., & Bográn, C. (eds.), *Entomology at the Land Grant University: Perspectives from the Texas A&M University Department Centenary*, Texas A&M Press, College Station, TX.: 341

Jouve, C., Palmeirim, I., Henrique, D., Beckers, J., Gossler, A., Ish-Horowicz, D., & Pourquie, O. (2000). Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy like gene HES1 in the presomitic mesoderm. *Development*, 127, 1421-142.

Keegan, L., Gill, G., & Ptashne, M. (1986) Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science*, 231:699-704.

Kim, J.S., et al. (2008). Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 55:455–466.

Kloppstech, K. (1985). Diurnal and circadian rhythmicity in the expression of light-induced plant nuclear messenger RNAs. *Planta*, 165: 502-506.

Koncz, C., Nemeth, K., Redei, G.P., & Schell, J. (1992). *T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*. 20: 963–976.

Konopka R. J. & Benzer S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 68: 2112-2116.

Ma, J. & Ptashne, M. (1988). Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell*, 55(3): 443–446.

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

McClung, C., Fox, B., & Dunlap, J. (1989). The *Neurospora* clock gene frequency shares a sequence element with the *Drosophila* clock gene period. *Nature*, 339:558 – 562.

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

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

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 Physiology*, 44: 360–365.

Pittendrigh, C. S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*,. 25:159-184.

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.

Pruitt, E.R., & Meyerowitz, M.E. (1986). Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana* *Journal of Molecular Biology*, Volume 187, Issue 2, 20 January 1986, Pages 169–183.

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

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.

Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E., & Song, H. (2005). Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO Journal*, 24: 4082-4093.

Yanovsky, M., & Kay, S. A., (2003). Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 265-276.

Zehring, W.A. (1984). P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 39: 369- 376.

Zhang, J., Addepalli, B., Yun, K., Hunt, A., Xu, R., Rao, S., Li, Q., Falcone, D. (2008). A Polyadenylation Factor Subunit Implicated in Regulating Oxidative Signaling in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 3(6): e2410. doi:10.1371.