

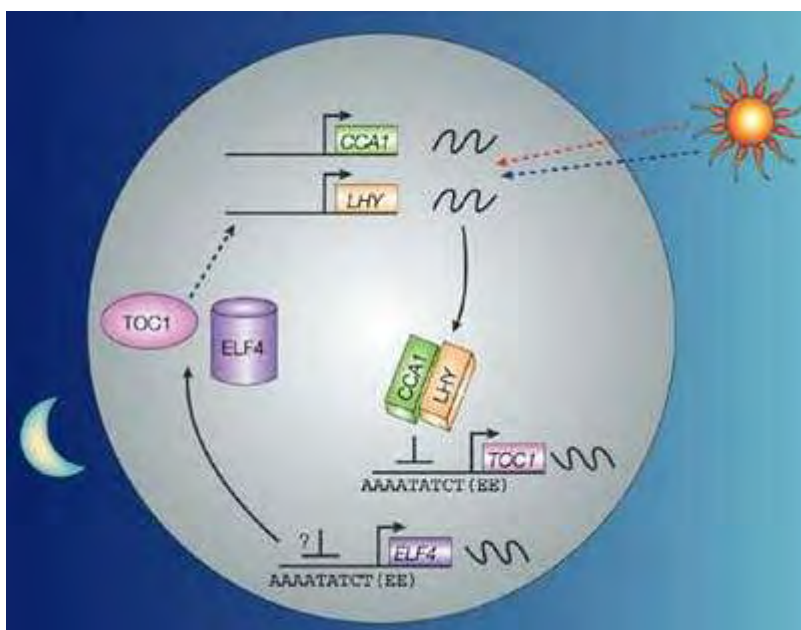
# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ Δ. ΓΚΕΒΡΟΣ

Το γονίδιο *HESPI* του *Arabidopsis thaliana* ελέγχεται από τον  
κirkάδιο ρυθμό



ΛΑΡΙΣΑ 2011

**Το γονίδιο *HESP1* του *Arabidopsis thaliana* ελέγχεται από  
τον κερκάρδιο ρυθμό**

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Επίκουρη Καθηγήτρια, κα. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και την κατανόηση της. Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής, κ. Μπαλατσό Νικόλαο, Λέκτορα TBB, Π.Θ. και κ. Καρούζα Δημήτριο, Επίκουρο καθηγητή TBB, Π.Θ. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κα. Τσίκου Δανιέλα, Λέκτορα επί συμβάσει (ΠΔ 407/80), TBB, Π.Θ., για την αμέριστη βοήθεια, τις πολύτιμες συμβουλές και την άψογη συνεργασία μας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

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

Τριμελής Επιτροπή:

**Παπαδοπούλου Καλλιόπη**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Βιοτεχνολογία Φυτών, TBB, Π.Θ.

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Λέκτορας, Βιοχημεία, TBB, Π.Θ.

**Καρούζας Δημήτριος**, Επίκουρος Καθηγητής, Περιβαλλοντική Μικροβιολογία και Βιοτεχνολογία, TBB, Π.Θ.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	5
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	6
1.1 ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΙ.....	6
1.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΙΡΚΑΔΙΚΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΣΤΟ <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	8
1.3 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ <i>CCA1</i> , <i>LHY</i> ΚΑΙ <i>TOC1</i> .....	9
1.4 ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΕΣ.....	10
1.5 Η ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΗ ΝΟΚΤΟΥΡΝΙΝΗ (NOCTURNIN) ΕΛΕΓΧΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΙ.....	11
1.6 ΤΟ ΦΥΤΟ <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	12
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	14
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	15
2.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ, ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	15
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	15
2.3 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	17
2.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA, RNA) ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	17
2.5 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΛΙΚΟΥ RNA.....	18
2.6 Η ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ.....	19
2.7 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ (REVERSE) ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.....	20
2.8 RT-qPCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ.....	20
2.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	21
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup> ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	22
3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ.....	22
3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA.....	22
3.3 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	24
3.4 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA.....	27
3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>HESP</i> .....	28
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	34
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	37

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εσπερίνη ή νοκτουρνίνη (*HESP* ή *NOC*) είναι μια κιρκάδια ρυθμιζόμενη αποαδενυλάση με μέγιστη έκφραση τις βραδινές ώρες. Μέχρι στιγμής δεν έχει μελετηθεί η έκφραση της στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Αρχικά για να διαπιστωθεί αν η έκφραση της *HESPI* του *A. thaliana* ρυθμίζεται από το κιρκάδιο ρολόι, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης της σε φυτά αγρίου τύπου που μεγάλωναν με σταθερή φωτοπερίοδο, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές του 24ώρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν χαμηλή έκφραση τις πρωινές ώρες και αυξημένη το μεσημέρι και τις βραδινές ώρες. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι πιθανώς η έκφραση ελέγχεται από το κιρκάδιο ρολόι. Για να επιβεβαιώσουμε τον παραπάνω συλλογισμό μελετήσαμε και την έκφραση της *HESPI* σε μεταλλαγμένα φυτά, στα οποία απουσίαζαν βασικά γονίδια (*CCA1*, *LHY*, *TOC1*) ρύθμισης του κιρκάδιου ρολογιού. Στο τριπλό μετάλλαγμα *cca1/lhy/toc1* βρέθηκε σαφώς μειωμένη ρυθμική δραστηριότητα. Επίσης σε αντίθεση με τα αγρίου τύπου η έκφραση παρουσίαζε ένα μέγιστο το μεσημέρι και μετά μειωνόταν. Το γεγονός ότι η μέγιστη έκφραση του γονιδίου μετατοπίζεται το μεσημέρι στο τριπλό μετάλλαγμα υποδεικνύει ότι η έκφραση του *HESPI* επηρεάζεται από την απορρύθμιση του κιρκαδικού ρολογιού. Συμπερασματικά, η έκφραση του γονιδίου *HESPI* φαίνεται να είναι άμεσα συνδεδεμένη με τον κιρκάδιο ρυθμό.

## ABSTRACT

*HESP* or *NOC* is a circadian regulated deadenylase with maximum expression in the evening. Until now the gene expression has not been studied in the plant *Arabidopsis thaliana*. Initially, to determine whether the expression of *A. thaliana HESPI* is regulated by the circadian clock, we studied the expression levels in wild type plants grown at a constant photoperiod at different times of the day. The results showed low gene expression at the early morning hours and increased expression the midday and evening hours. This result indicates that the expression of the gene is probably controlled by the circadian clock. To confirm this, we studied the expression of *HESPI* in a mutant plant line, which carries mutations in key genes (*CCA1*, *LHY*, *TOC1*) regulating the circadian clock. In the triple mutant *cca1/lhy/toc1* reduced rhythmic activity was clearly observed. In contrast to the expression observed in the wild type, the gene showed a maximum expression the midday and then decreased. The induced gene expression the midday and the significant reduction in the evening are indicative of the fact that the mutant arrhythmia influences the *HESPI* expression. According to these results, it is concluded that the expression of *HESPI* is directly related to the circadian rhythm.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>Ο</sup>

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΪ

Είναι γνωστό ότι η πλειοψηφία των ζωντανών οργανισμών έχουν μία έμφυτη ικανότητα να αντιλαμβάνονται το χρόνο. Με βάση την ικανότητα τους αυτή δημιουργούν ημερήσιους ρυθμούς, οι οποίοι διατηρούνται και δίχως την παρουσία εξωγενών ερεθισμάτων. Η δημιουργία των ημερήσιων ρυθμών συνεπώς φαίνεται να ελέγχεται από ένα ενδογενές κιρκάδιο ρολόι. Το κιρκάδιο ρολόι ή κιρκάδιος ρυθμός είναι κατ' επέκταση ο 24ωρος κύκλος που παρουσιάζει η βιολογική δραστηριότητα όλων των ζωντανών οργανισμών. Εναλλακτικά ο όρος κιρκάδιος ρυθμός αναφέρεται σε αυτόνομες βιολογικές ταλαντώσεις που διαδραματίζονται ελεύθερα σε έναν οργανισμό μέσα σε ένα σταθερό πλαίσιο με περιοδικότητα κοντά στις 24 ώρες (Harmer et al., 2001). Ο ενδογενής αυτός κιρκάδιος ρυθμός (circadian) των 24 ωρών τέθηκε ως όρος για πρώτη φορά από τον Franz Halberg το 1959 από τις λατινικές λέξεις "circa" (κύκλος) και "dies"(ημέρα).

Η ρυθμική αυτή δραστηριότητα παρατηρείται σε μία ποικιλία οργανισμών από τους προκαρυώτες έως τους ευκαρυώτες και από τα φυτά ως τα ζώα. Το κιρκάδιο ρολόι μπορεί να επαναρυθμιστεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το φως και η θερμοκρασία (Lui et al., 1998).

Πολλά βήματα έχουν γίνει προσφάτως σχετικά με την αποκρυπτογράφηση των μοριακών βάσεων του κιρκάδιου συστήματος. Ένα ευρέως διαδεδομένο μοντέλο που ακολουθείται για το σκοπό αυτό είναι η επαναλαμβανόμενη τάση της αυτορρύθμισης των θετικών/αρνητικών βρόχων ανατροφοδότησης (Alabadi et al. 2001) . Επιπλέον το μοντέλο αυτό έχει επαληθευτεί μαθηματικώς και η προκύπτουσα εξίσωση εντολέων μπορεί να εφαρμοστεί (Locke et al., 2005).

Οι περισσότερες λειτουργίες των ζωντανών οργανισμών ελέγχονται από βιολογικούς ρυθμούς. Οι κιρκάδιοι ρυθμοί είναι ένα υποσύνολο των βιολογικών ρυθμών με συγκεκριμένη χρονική περίοδο 24 ωρών. Οι βιολογικοί ρυθμοί είναι μια δυναμική έκφραση της ομοιόστασης και ο μηχανισμός τους ενεργοποιεί λειτουργίες

όταν τις χρειάζεται και τις απενεργοποιεί όταν δεν του είναι απαραίτητες. Ρυθμιστής αυτού του συστήματος είναι και ο κύκλος φώς-σκότους. Στα σπονδυλωτά, χαρακτηριστικό παράδειγμα της ρύθμισης του κύκλου αυτού αποτελεί η ορμόνη της μελατονίνης. Η έκκριση της μελατονίνης είναι μεγάλη κατά τη διάρκεια της νύχτας, ενώ αντίθετα κατά την διάρκεια της ημέρας ρυθμίζεται από το φως του οποίου η ένταση είναι το πιο σημαντικό στοιχείο. Η έκκριση αρχίζει όταν υπάρχει σκοτάδι και ο ρυθμός της παραμένει σταθερός ακόμη και χωρίς περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Έχει βρεθεί ότι δύο είναι οι κύριοι ρόλοι της μελατονίνης. Επηρεάζει τον κερκάδιο ρυθμό και ρυθμίζει εποχιακά την αναπαραγωγή σε ορισμένα ζώα. Φαίνεται πως η μελατονίνη επηρεάζει και συμμετέχει στην προσαρμογή ενδογενών κερκάδιων βιορυθμών των οργανισμών και στις εναλλαγές φώτους-σκότους του περιβάλλοντος. Αλλά και στον άνθρωπο είναι εμφανής ο κερκάδιος ρυθμός. Η σωστή διαδοχή φως-σκοταδιού, ανάλογα με τον κύκλο ημέρα-νύχτα έχει ως αποτέλεσμα τα σώματα μας να γνωρίζουν την κυκλική ημερονύχτια αλλαγή και να ρυθμίζουν ανάλογα το ξύπνημα, τον ύπνο, τις καθημερινές δραστηριότητες και την πείνα.

Πολλά γονίδια επηρεάζουν ή επηρεάζονται από το κερκάδιο ρολόι. Το πρώτο από αυτά που ανακαλύφθηκε ήταν το γονίδιο *per* το 1971 (που πήρε την ονομασία του από την ελληνική λέξη περίοδος), το οποίο σχετίζεται με ένα γενετικό τόπο στη *Drosophila*. Στο γονίδιο αυτό υπάρχουν διάφοροι αλληλόμορφοι, ο καθένας από τους οποίους συνδέεται με μια ορισμένη διάρκεια του ημερήσιου κερκάδιου ρυθμού. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι το γονίδιο καθορίζει την χρονική διάρκεια του «τραγουδιού» της άρρενος δροσόφιλας, όταν «φλερτάρει» την θηλυκή.

Στον άνθρωπο, έρευνες έδειξαν ότι σε άτομα που είναι φορείς μεταλλαγμένων *per2* γονιδίων επηρεάζεται η ρύθμιση της κατανάλωσης του αλκοόλ. Μια κατάσταση που ενέχει παθολογικές προεκτάσεις και προσδιορίζει έναν πιθανό μηχανισμό που αιτιολογεί την εξάρτηση από το αλκοόλ με βάση τη διαταραχή του κερκάδιου ρυθμού. Επιπλέον, σε πρόσφατη έρευνα του πανεπιστημίου της Καλιφόρνιας βρέθηκε ότι διαταραχή του κερκάδιου ρυθμού σχετίζεται και με τον ύπνο. Συγκεκριμένα, γυναίκες που φέρουν μια μη φυσιολογική παραλλαγή του γονιδίου *DEC2*, το οποίο επηρεάζει τον κερκάδιο ρυθμό, βρέθηκε να χρειάζονται λιγότερο ύπνο.

## 1.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΙΡΚΑΔΙΚΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΣΤΟ *Arabidopsis thaliana*

Τα τελευταία χρόνια χαρακτηρίζονται από μια αξιόλογη πρόοδο στην μελέτη του κirkάδιου ρυθμού στο *A.thaliana*. Ειδικά την τελευταία δεκαετία έχει ανακαλυφθεί ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων συνδεδεμένων με το κirkάδιο ρολόι (Gardner et al., 2006). Οι κirkάδιοι ρυθμοί στο *A. thaliana* εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διαδικασιών (Barak et al., 2000).

Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι τα γονίδια του κirkάδιου ρυθμού λειτουργούν με βάση το μοντέλο της αυτορρύθμισης του βρόχου ανατροφοδότησης. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα των γονιδίων αυτών προωθούν ρυθμικές ταλαντώσεις στο κύτταρο, ρυθμίζοντας μεταβολικές και φυσιολογικές δραστηριότητες. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και ρύθμιση της σταθερότητας τους, η οποία σε συνδυασμό με την ύπαρξη φωτός, επηρεάζει το κirkάδιο ρυθμό του *A. thaliana*. Ακόμη η απόδειξη της ρυθμικής αλλαγής στη δομή της χρωματίνης έχει ανοίξει νέους ορίζοντες επιστημονικής έρευνας και μελέτης όσον αφορά την γονιδιακή έκφραση στον κirkάδιο ρυθμό. Οι παραπάνω μηχανισμοί σε συνδυασμό με το περιβάλλον είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχή ανάπτυξη των φυτών *A.thaliana* (Mas P., 2008).

Σε πρόσφατες έρευνες τεκμηριώθηκε ότι ο βρόχος ανατροφοδότησης στην οποία βασίζεται η κirkάδια ρυθμικότητα στο *A. thaliana* οφείλεται στην αλληλεπίδραση δύο γονιδίων της οικογένειας *MYB*, του *LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL)* και του *CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1)*. Τα δύο αυτά γονίδια πρωινής δράσης είναι οι αρνητικοί καταστολείς του ταλαντωτή στο φυτό *A. thaliana* (Schaffer et al., 1998). Συγκεκριμένα υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων των γονιδίων αυτών οδηγεί σε αρρυθμία διαταράσσοντας τον κirkάδιο ρυθμό.

Ακόμη λεπτομερής έρευνα της μετάλλαξης του γονιδίου *TOC1 (TIMING OF GAB EXPRESSION 1)* έδειξε ότι ο ρυθμιστής *PRR1 (pseudo-response regulator)* αποτελεί βασική συνιστώσα του ταλαντωτή του *A. thaliana*. Το γονίδιο *TOC1* ή αλλιώς *PRR1* ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών *PRR* μαζί με άλλα πέντε μέλη: το *PRR9*, το *PRR7*, το *PRR5* και το *PRR3* (Matsushika et al., 2000). Η δράση του γονιδίου αυτού παρατηρείται χρονικά το βράδυ κωδικοποιώντας μια πρωτεΐνη άγνωστης βιοχημικής δραστηριότητας (Alabadi et al., 2001). Υπερέκφραση του γονιδίου *TOC1* προκαλεί αρρυθμία.



Είναι σαφές ότι τα γονίδια *TOC1*, *LHY* και *CCA1* είναι βασικά στην λειτουργία του κικκάδιου ρυθμού στο *A. thaliana*.

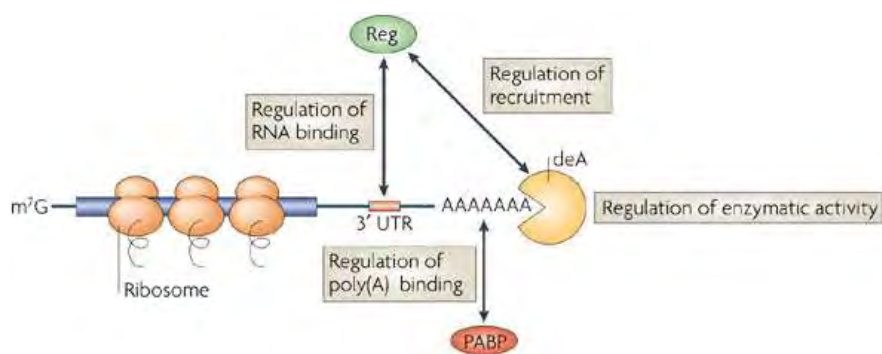
### 1.3 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ *CCA1*, *LHY* ΚΑΙ *TOC1*

Τα γονίδια *CCA1*, *LHY* και *TOC1* αποτελούν τον κεντρικό ταλαντωτή στο φυτό *A. thaliana*. Τα γονίδια *CCA1* και *LHY* ανήκουν στην οικογένεια MYB και είναι δύο μεταγραφικοί παράγοντες των οποίων τα επίπεδα mRNA καθώς και τα επίπεδα πρωτεΐνης εμφανίζουν την μέγιστη δράση τους την αυγή. Εκτός του ότι τα συγκεκριμένα γονίδια είναι μέλη ενός βρόχου ανατροφοδότησης που σταθεροποιεί την κικκάδια ρυθμικότητα, καταστέλλουν την έκφραση αρκετών άλλων γονιδίων που συγχρονίζονται το βράδυ προωθώντας παράλληλα την αύξηση της έκφρασης συγχρονισμένων γονιδίων με το πρωί. Τα γονίδια *TOC1* συμμετέχουν στη μεταγραφική ρύθμιση μειώνοντας παράλληλα τα επίπεδα του mRNA των παραγόντων *CCA1* και *LHY*. Επίσης τα συγκεκριμένα γονίδια καταστέλλουν την έκφρασή τους οδηγώντας σε παράλληλη καθοδική ρύθμιση των *CCA1* και *LHY* γονιδίων.

Μαθηματικές προσεγγίσεις οδήγησαν πειραματικές διαδικασίες στην τελειοποίηση ενός απλοϊκού βρόχου όπου τα γονίδια *CCA1/LHY* και *TOC1* ήταν τα μόνα στοιχεία του κικκάδιου συστήματος (Locke et al., 2005). Έτσι για να γίνει περαιτέρω διερεύνηση του κικκάδιου ρυθμού στο *A. thaliana* και να αποκαλυφθεί η γενετική σχέση των γονιδίων *TOC1* και *CCA1/LHY* κατασκευάστηκε το τριπλό μετάλλαγμα *cca1-lhy-toc1*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ρυθμική δραστηριότητα υπήρξε σαφώς αλλαγμένη στο τριπλό μετάλλαγμα. Επίσης η ανθοφορία των λουλουδιών που ρυθμίζεται από το γονίδιο *TOC1* εξαρτάται από τα γονίδια *CCA1* και *LHY* στο τριπλό μετάλλαγμα. Βέβαια η μεταξύ τους ρύθμιση και σύνδεση στο τριπλό μετάλλαγμα δεν εμποδίζει το γονίδια αυτά να ακολουθούν διαφορετικές στρατηγικές. Ακόμη σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού (LL) το τριπλό μετάλλαγμα παρουσίασε μια αρρυθμία στη σχετική έκφραση των γονιδίων γεγονός που αποδεικνύει την απορρύθμιση που προκαλούν οι μεταλλάξεις στον κικκάδιο ρυθμό του *A. thaliana*. (Ding et al., 2007).

## 1.4 ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΕΣ

Οι αποαδενυλάσες (deadenylases) είναι ένζυμα, γνωστά και ως εξωριβονουκλεάσες, εξαρτώμενα από το μαγνήσιο ( $Mg^{2+}$ ) που αποικοδομούν την πολύ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας 5'-AMP (Bartlam et al., 2010). Οι αποαδενυλάσες υπάρχουν τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Πολλές βιοχημικές και γενετικές αναλύσεις έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια για τον εντοπισμό και προσδιορισμό των ενζύμων αυτών. Πρόσφατα ταξινομήθηκαν σε δύο μεγάλες οικογένειες με βάση την νουκλεονική τους περιοχή. Την DEDD οικογένεια που πήρε το όνομα της από τα συντηρημένα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu, τα οποία βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης. Μέλη της παραπάνω οικογένειας είναι οι αποαδενυλάσες POP2, CAF1Z, η πολύ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN) καθώς και οι αποαδενυλάσες PAN2. Η δεύτερη είναι η οικογένεια των εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών (exonuclease-endonuclease-phosphatase, EEP), που πήρε το όνομα της από τα συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His. Μέλη της οικογένειας αυτής είναι οι αποαδενυλάσες CCR4, Nocturnin και ANGEL. Οι αποαδενυλάσες ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων οργανισμών τόσο ως προς το είδος όσο και προς τον αριθμό. Έτσι οι POP2, CCR4, PAN2 είναι παρόντες σε όλους τους ευκαρυώτες, ενώ άλλες αποαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες (όπως η PARN και η CAF1Z που δεν υπάρχουν στη *Drosophila melanogaster*).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Εικόνα 1:** Σχηματική αναπαράσταση αποικοδόμησης mRNA. (Aaron C. Goldstrohm & Marvin Wickens, 2008).

Στο φυτό *A.thaliana* έχουν γίνει μελέτες στο ομόλογο της πολύ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN). Η αποαδενυλάση αυτή (AtPARN) εκφράστηκε σε κύτταρα του *E.coli* διαθέτοντας αποικοδομητική δραστηριότητα *in vitro*. Η PARN βρέθηκε να είναι σημαντική για την επιβίωση των φυτών *A. thaliana*, ενώ έμβρυα φυτών από τα οποία απουσίαζε η PARN παρουσίασαν καθυστερημένη ανάπτυξη (Reverdatto et al., 2004).

Επιπλέον στο *A. thaliana* έχουν μελετηθεί και τα γονίδια *AtCAF1a* και *AtCAF1b* των οποίων η έκφραση έχει βρεθεί να επηρεάζεται από συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης. Συγκεκριμένα, τα γονίδια αυτά παρουσιάζουν γρήγορη επαγωγή της έκφρασης μετά από τραυματισμό (Walley et al., 2010).

## **1.5 Η ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΗ ΝΟΚΤΟΥΡΝΙΝΗ (NOCTURNIN) ΕΛΕΓΧΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΙ**

Στο *Xenopus* ταυτοποιήθηκε ένα γονίδιο με ρυθμική έκφραση, η νοκτουρνίνη, που ονομάστηκε έτσι επειδή το mRNA της μεταγράφεται σε υψηλά επίπεδα νωρίς τη νύχτα. Στα θηλαστικά, η νοκτουρνίνη λειτουργεί ως αποαδενυλάση στερούμενη όμως μεταγραφικού παράγοντα ενεργοποίησης. Έχει ιδιαίτερα υψηλή έκφραση σε στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών (BMSCs), ηπατοκύτταρα και λιποκύτταρα. Επίσης η μέγιστη έκφραση της νοκτουρνίνης χρονικά παρατηρείται νωρίς τη νύχτα σε μια ποικιλία ιστών όπως το συκώτι, τα νεφρά και η σπλήνα.

Η ανάλυση στις βάσεις δεδομένων έδειξε ότι η νοκτουρνίνη είναι μια νέα πρωτεΐνη με ακολουθία όμοια με την πρωτεΐνη Ccr4p του *Saccharomyces cerevisiae* που ταυτοποιήθηκε ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής. Η νοκτουρνίνη και ο Ccr4p ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια νουκλεασών εξαρτώμενων από το μαγνήσιο. Η C-τελική περιοχή του Ccr4p που εμφανίζει ομοιότητα με τη νοκτουρνίνη φαίνεται να έχει δράση αποαδενυλάσης (Baggs & Green, 2003). Ο ρόλος της νοκτουρνίνης στην αποαδενυλίωση δεν είναι ακόμα γνωστός αλλά υπάρχουν αποδείξεις ότι ελέγχεται από τον κιρκάδιο ρυθμό δρώντας στο επίπεδο της αποικοδόμησης του mRNA και της μετάφρασης (Douris & Green, 2009).

Σε προγενέστερη έρευνα βρέθηκε ότι σε ποντίκια με χαμηλή θερμοκρασία σώματος η κιρκάδια ρυθμιζόμενη νοκτουρνίνη έδρασε αποτρεπτικά σε διατροφή που προκαλεί παχυσαρκία, σε αντίθεση με ποντίκια στα οποία είχε απορρυθμιστεί η

νοκτουρνίνη οδηγώντας σε παχυσαρκία. Ένα ασφαλές συμπέρασμα είναι ότι ο κirkάδιος ρυθμός έκφρασης της νοκτουρνίνης έχει άμεσο αντίκτυπο στο σώμα των ποντικών (Potts, 2010).

Η σχέση μεταξύ κirkάδιου ρυθμού και μεταβολισμού είναι ιδιαίτερα στενή και πολύπλοκη. Στα ποντίκια, η νοκτουρνίνη εκφράζεται ρυθμικά σε μια ευρεία ποικιλία ιστών, αλλά παρατηρήθηκε αρρυθμία στην έκφραση της στο λευκό λιπώδη ιστό (eWAT) των ποντικών που είχαν ελεύθερη πρόσβαση στο φαγητό και δεν ακολουθούσαν συγκεκριμένη δίαιτα. Απεναντίας υπήρχε σταθερή έκφραση νοκτουρνίνης στους λευκούς λιπώδεις ιστούς (eWAT) σε ποντίκια με περιορισμένη σίτιση. Η νοκτουρνίνη ρυθμίζεται από την απουσία των αναμενόμενων γευμάτων στους eWAT των ποντικών που τρεφόταν με περιορισμένο διαιτολόγιο. Η επαγωγή της νοκτουρνίνης στους eWAT από νηστεία είναι πιθανή με τη μεσολάβηση της ίδιας οδού που ενεργοποιεί την λιπόλυση. Ως εκ τούτου το γεγονός αυτό δείχνει μια άμεση σύνδεση της νοκτουρνίνης μέσω του κirkάδιου ρυθμού και των θρεπτικών συστατικών που αναλόγως ενεργοποιούν το λιπίδιο που κινητοποιεί τα λιποκύτταρα (Gilbert et al., 2011).

## 1.6 ΤΟ ΦΥΤΟ *Arabidopsis thaliana*

Το φυτό *A. thaliana* (κοινή ονομασία αραβίδοψις ή θαλιάνειος) είναι ένα μη απειλούμενο είδος της οικογένειας *Brassicaceae* το οποίο τα τελευταία χρόνια έχει ευρεία χρήση σε επιστημονικές μελέτες και πειράματα γενετικής και μοριακής βιολογίας. Στην κατεύθυνση αυτή έχει συμβάλλει ο μικρός βιολογικός του κύκλος, κάτω από άριστες και ελεγχόμενες συνθήκες μπορεί να διαρκέσει έως και 6 εβδομάδες από τον ώριμο σπόρο έως την βλάστηση. Ακόμη το μικρό μέγεθος του φυτού και η παράγωγή μεγάλου αριθμού σπερμάτων διευκολύνουν πολύ την εργαστηριακή του χρήση για εύρεση φαινοτυπικών μεταλλάξεων. Ο χρόνος ανθοφορίας του είναι σχετικά μεγάλος, ενώ σε γενετικό επίπεδο διαθέτει πολύ μικρό γονιδίωμα στο οποίο έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια η ακολουθία των βάσεων του DNA. Ακόμη το *A. thaliana* παρουσιάζει στο γονιδίωμα του ένα ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό μη επαναλαμβανόμενου DNA της τάξης του 50% επί του συνολικού DNA. Είναι δικοτυλήδονο φυτό και η ρίζα του παρουσιάζει απλή ιστολογική και πρότυπη οργάνωση.



**Εικόνα 2:** Το φυτό μοντέλο *A.thaliana* στο στάδιο της ανθοφορίας.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της εσπερίνης (*HESPI*) σε σχέση με τον κιρκάδιο ρυθμό στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Αρχικά για να ελέγξουμε αν το γονίδιο επηρεάζεται από το κιρκάδιο ρολόι, μελετούμε τα επίπεδα έκφρασης του σε φυτά αγρίου τύπου σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές του 24ώρου. Στη συνέχεια προς επιβεβαίωση την αρχικής μας εκτίμησης, μελετούμε και τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου τις ίδιες χρονικές στιγμές σε μεταλλαγμένα φυτά, τα οποία φέρουν μεταλλάξεις σε βασικά γονίδια του κιρκάδιου ρυθμού (*CCA1*, *LHY*, *TOC1*). Η σύγκριση του πρότυπου έκφρασης του γονιδίου σε φυτά αγρίου τύπου και στα μεταλλαγμένα φυτά μπορεί να μας απαντήσει στο ερώτημα αν τελικά η έκφραση της *HESPI* ελέγχεται από τον κιρκάδιο ρυθμό και ίσως από τα βασικά γονίδια που συνιστούν τον κεντρικό μηχανισμό ρύθμισης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ, ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Σπόροι *Arabidopsis thaliana* επώστηκαν για 1 λεπτό σε διάλυμα που περιείχε 20% NaOCl και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν έξι φορές με αποστειρωμένο νερό και τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS. Οι σπόροι επώστηκαν στους 4 °C στο σκοτάδι για ένα βράδυ και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών σε θερμοκρασία 23<sup>ο</sup>C. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον με φωτοπερίοδο 12 ώρες μέρα/12 ώρες νύχτα.

#### 2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Για την απομόνωση ολικού RNA από τους ιστούς του *Arabidopsis thaliana* ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Φυτικοί ιστοί που έχουν διατηρηθεί στους -80<sup>ο</sup>C ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτριβήσεως παρουσία υγρού αζώτου.
- Μετά την εξάτμιση του υγρού αζώτου προστίθενται ρυθμιστικό διάλυμα (REB buffer) 800μl και 600μl φαινόλης/χλωροφόρμιου σε αναλογία 2:1. Στη συνέχεια το δείγμα αναδεύεται καλά για 30 δευτερόλεπτα με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα eppendorf και προστίθενται 600μl φαινόλης/χλωροφόρμιου σε αναλογία 1:1. Το δείγμα αναδεύεται καλά για 30 δευτερόλεπτα με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδατινή φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf και προστίθενται 500μl χλωροφόρμιου/ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 49:1. Το δείγμα αναδεύεται καλά για 30 δευτερόλεπτα με τη χρήση μηχανικού

αναδευτήρα (vortex) και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου..

- Το δείγμα μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και προστίθενται 800μl χλωριούχου λιθίου συγκέντρωσης 8M (LiCl 8M).
- Το διάλυμα αφήνεται για ένα βράδυ στους 4°C.
- Το ολικό RNA συλλέγεται με φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- Το ίζημα των νουκλεϊνικών οξέων επαναδιαλύεται σε 200μl νερό και το RNA κατακρημνίζεται εκλεκτικά με την προσθήκη 1/10 του διαλύματος οξικού νατρίου (NaAc PH 5.3) και 2,5 x του όγκου του διαλύματος αιθανόλης.
- Έπειτα αφήνουμε τα δείγματα μας στους -80°C για 20 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- Το ίζημα ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη
- Γίνεται φυγοκέντρωση για 15 λεπτά και επαναδιάλυση σε νερό.
- Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζονται φωτομετρικά ενώ η ακεραιότητα διαπιστώνεται με ανάλυση του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης.

#### Διαλύματα απομόνωσης RNA από φυτικούς ιστούς

##### **Διάλυμα REB**

25 mM Tris-HCl pH:8.3 , 75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS.

##### **3M Οξικό νάτριο pH:5.3**

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

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

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



### 2.3 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA βασίστηκε στη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των προς εξέταση δειγμάτων στα 260nm και 280 nm. Η μέτρηση στα 260nm μας επιτρέπει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης τόσο του RNA όσο και του DNA σύμφωνα με το νόμο των Beer-Lambert. Σε καθαρά δείγματα RNA, όπου δεν υπάρχουν προσμίξεις, ο λόγος  $O.D_{260}/O.D_{280}$  ισούται με 2. Ισχύει ότι οπτική απορρόφηση στα 260nm ίση με τη μονάδα, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση RNA ίση με 40μg/ml. Έτσι ο προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης του RNA υπολογίζεται από την εξίσωση :

$$[RNA]_{mg/ml} = 40_{mg/ml} \times O.D_{260} \text{ του δείγματος} \times \text{συντελεστή αραίωσης}$$

Σε καθαρά δείγματα DNA, όπου δεν υπάρχουν προσμίξεις, ο λόγος  $O.D_{260}/O.D_{280}$  ισούται με 1,8. Επίσης ισχύει ότι οπτική απορρόφηση στα 260nm ίση με τη μονάδα, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA ίση με 50μg/ml. Έτσι ο προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης του DNA υπολογίζεται από την εξίσωση :

$$[DNA]_{mg/ml} = 50_{mg/ml} \times O.D_{260} \text{ του δείγματος} \times \text{συντελεστή αραίωσης}$$

### 2.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA, RNA) ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος του μεγέθους των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτική αγαρόζη με τη βοήθεια μιας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων. Η χρωστική ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο και φθορίζει υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η αναλυτική ικανότητα της πηκτικής αγαρόζης είναι ανάλογη της περιεκτικότητάς της σε αγαρόζη. Η συνήθης συγκέντρωση κυμαίνεται από 0.7%-2% αγαρόζη. Για την πιστοποίηση του μεγέθους χρησιμοποιείται μάρτυρας DNA γνωστού μοριακού βάρους.

1. Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε 1x TAE.
2. Θέρμανση του μείγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διάφανο.

3. Προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.005% v/v.
4. Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Μετά την πήξη, απομακρύνεται η κτένα και προστίθεται στη συσκευή κατάλληλος όγκος διαλύματος 1x TAE που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης.
6. Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται κατάλληλη ποσότητα χρωστικής.
7. Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120V, ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού και την περιεκτικότητά της σε αгарόζη.

## 2.5 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης του RNA από τους φυτικούς ιστούς απομονώνεται και μέρος του γονιδιωματικού DNA, επομένως, απαιτείται ο καθαρισμός του RNA από το γονιδιωματικό DNA. Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται σε ένζυμα που κόβουν - καταστρέφουν το DNA, ενώ ταυτόχρονα αφήνουν ανέπαφο το RNA.

### Αντίδραση:

Ολικό RNA 0.5μg

10x DNase buffer 1μl

RNase Inhibitor 0,5μl (20 units)

DNaseI (Invitrogen) 1μl (1 unit)

H<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 10μl

- Η αντίδραση επωάζεται για 1 ώρα στους 37<sup>0</sup>C.
- Ακολουθεί απενεργοποίηση της DNase I για 10 λεπτά στους 65<sup>0</sup>C

## 2.6 Η ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR – Polymerase Chain Reaction)

### Αντίδραση PCR

Αντιδραστήρια PCR	Ποκνό διάλυμα	όγκος	Τελική συγκέντρωση
Μήτρα DNA	-	1μl	
Εκκινητής 1	5μM	1,6μl	0,4μM
Εκκινητής 2	5μM	1,6μl	0,4μM
Μείγμα dNTP's	10mM	0,4μl	200μM
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10X	2μl	1X
KapaTaq πολυμεράση	5units/μl	0,08μl	0.4 units
ddH <sub>2</sub> O	-	εώς 20μl	-

### Συνθήκες ενίσχυσης

Συνθήκες ενίσχυσης	
Αρχική αποδιάταξη	95 <sup>0</sup> C για 2 λεπτά
Σύνδεση εκκινητή	95 <sup>0</sup> C για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	56 <sup>0</sup> C για 30 δευτερόλεπτα
Αποδιάταξη	72 <sup>0</sup> C για 30 δευτερόλεπτα
	αριθμός κύκλων 40
	72 <sup>0</sup> C για 2 λεπτά

## 2.7 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ (REVERSE) ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

- Σε σωλήνα eppendorf προστίθενται 1-2 µg ολικού RNA, 1µl Oligo dT (500 µg/ml), 1µl μίγμα dNTPs (10mM) και ddH<sub>2</sub>O έως τελικού όγκου 12µl
- Τα δείγματα αποδιατάσσονται με θέρμανσή τους στους 65<sup>0</sup>C για 5 λεπτά, οπότε και πραγματοποιείται ο υβριδισμός εκκινητή-RNA. Το δείγμα μεταφέρεται αμέσως σε πάγο για να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση
- Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση και προστίθενται 4µl 5x first-strand buffer, 1µl (40units) RNaseOUT παρεμποδιστή ριβονουκλεάσης και 2µl 0.1M DTT
- Η αντίδραση προθερμαίνεται στους 42<sup>0</sup>C για 2 λεπτά πριν την προσθήκη 1µl (200 units) SuperScript II αντίστροφης μεταγραφάσης.
- Το μείγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 42<sup>0</sup>C για 50 λεπτά και ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση στους 70<sup>0</sup>C για 15 λεπτά.

## 2.8 RT-qPCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

- 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 κυμαίνεται από 150 έως 250 ζεύγη βάσεων.
- Η αντίδραση PCR περιλάμβανε το μίγμα της SYBR Green (KAPA SYBR FAST qPCR Kit), τους εξειδικευμένους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0.2µM ο καθένας και 1µl της μήτρας cDNA.
- Οι αντιδράσεις του ποσοτικού RT-PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα MX3005P της εταιρίας Stratagene.
- Το πρόγραμμα του PCR περιλάμβανε 3 λεπτά επώαση στους 95<sup>0</sup>C και ακολούθησαν 40 κύκλοι με 95<sup>0</sup>C για 15 δευτερόλεπτα, 58<sup>0</sup>C για 20 δευτερόλεπτα και 72<sup>0</sup>C για 11 δευτερόλεπτα.

- 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 παρουσιαζόταν 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  $E^{Ct(U)}/E^{Ct(X)}$  και E είναι η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR.
- Η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR (E) για κάθε γονίδιο υπολογίστηκε από την γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της απορρόφησης ανά κύκλο αντίδρασης, χρησιμοποιώντας το λογισμικό LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003).
- Όλες οι αντιδράσεις qPCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις.

## 2.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με t-test με επίπεδο σημαντικότητας 95% ( $P=0.05$ ). Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του προγράμματος SigmaStat 3.5 και τα διαγράμματα με το πρόγραμμα SigmaPlot 10.0.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΪΕΣ

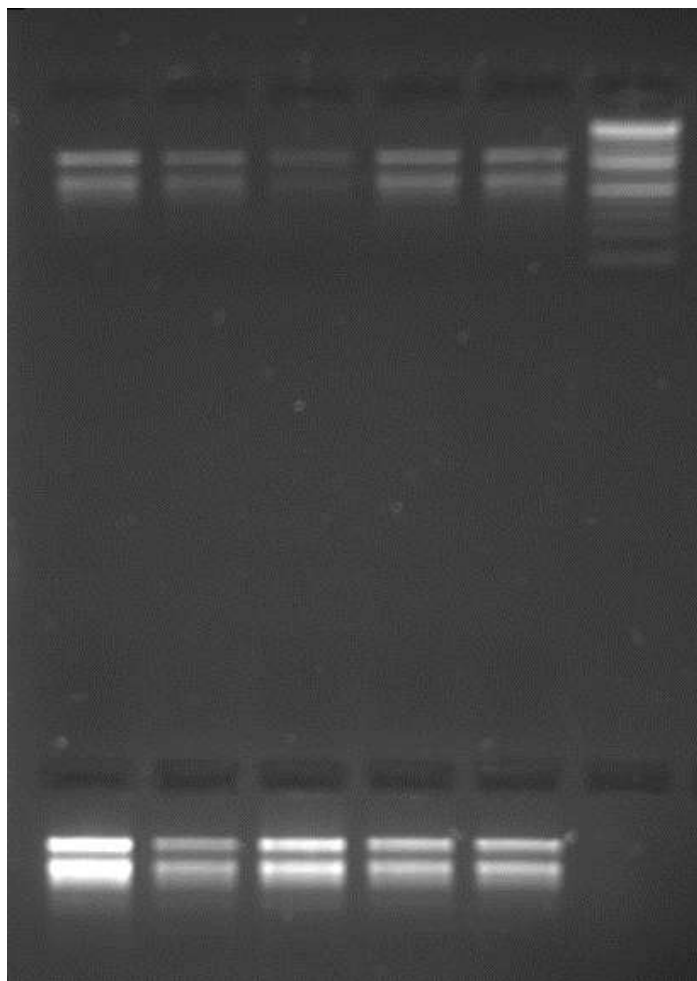
Η ανάπτυξη των φυτών *Arabidopsis thaliana* πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες. Αρχικά σε σποράκια αγρίου τύπου (Wild type) καθώς και σε σποράκια με το τριπλό μετάλλαγμα (*cca1 lhy toc1*) του *A. thaliana* έγινε απολύμανση και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MS. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 23<sup>ο</sup>c και η φωτοπερίοδος ρυθμισμένη σε 12 ώρες ημέρα (8 το πρωί με 20 το απόγευμα)-12 ώρες νύχτα (20 το απόγευμα-8 το πρωί). Τα φυτά παρέμειναν στον θάλαμο ανάπτυξης για 8 ημέρες.

Την 9<sup>η</sup> ημέρα πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία παρουσία υγρού αζώτου με ιδιαίτερη προσοχή και χωρίς να διακόπτεται η φωτοπερίοδος. Από τα νεαρά φυτά *A. thaliana* αφαιρέθηκαν οι ρίζες, ενώ το υπέργειο μέρος μεταφέρθηκε σε σωλήνες eppendorfs.. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές του 24ώρου τόσο κατά τη διάρκεια της μέρας όσο και της νύχτας. Πιο συγκεκριμένα, πάρθηκαν δείγματα στις 07:30 και στις 09:30 το πρωί, χρονικά σημεία που αντιστοιχούν σε περίοδο μισή ώρα πριν το ξημέρωμα και 1,5 ώρα μετά το ξημέρωμα, αντίστοιχα, στις 14:00 το μεσημέρι, και στις 19:00 και 21:30 το βράδυ, χρονικά σημεία που αντιστοιχούν σε περίοδο μίας ώρας πριν νυχτώσει και 1,5 ώρα αφού νυχτώσει, αντίστοιχα. Συνολικά για το πείραμα συλλέξαμε 5 δείγματα από φυτά αγρίου τύπου (wild type) και 5 δείγματα από φυτά που έφεραν το τριπλό μετάλλαγμα (*cca1 lhy toc1*) τις ώρες 07:30,09:30,14:00,19:00 και 21:30. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο καταψύκτη στους -80<sup>ο</sup>C

#### 3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Απομονώθηκε RNA από τα 5 δείγματα από φυτά αγρίου τύπου (wild type) και τα 5 δείγματα από φυτά που έφεραν το τριπλό μετάλλαγμα (*cca1 lhy toc1*) τις ώρες

07:30,09:30,14:00,19:00 και 21:30. Ο έλεγχος της ποιότητας του RNA έγινε κατόπιν ανάλυσης των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 1,5% (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3:** Στην πάνω σειρά παρατηρούμε τα πέντε δείγματα αγρίου τύπου (WT, wild type) ξεκινώντας (από αριστερά προς δεξιά) με το WT 07:30 WT 09:30, WT 14:00, WT 19:00, WT 21:30 καθώς και τελευταίο το μάρτυρα μοριακών βαρών. Στην κάτω σειρά παρατηρούμε τα πέντε δείγματα του τριπλού μεταλλάγματος (*ccal lhy tocI*) με την ίδια ακριβώς χρονική σειρά.

Για να μετρήσουμε την ποσότητα RNA που απομονώθηκε από τα διαφορετικά δείγματα έγινε φωτομέτρηση. Για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκαν 2μl δείγματος που αραιώθηκαν σε 48μl H<sub>2</sub>O, ενώ ως τυφλό δείγμα για το μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε μόνο H<sub>2</sub>O. Για την εκτίμηση της καθαρότητας των δειγμάτων υπολογίστηκε ο λόγος A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>. Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση του RNA είναι ικανοποιητική και σχετικά καλής καθαρότητας.

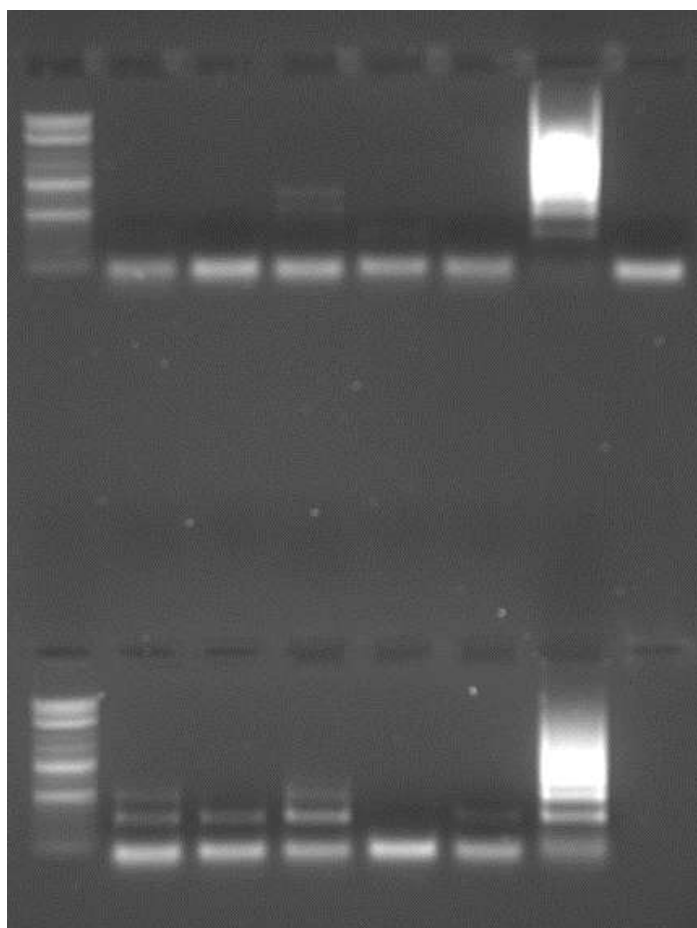
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ng/μl	ΛΟΓΟΣ A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
WT 07:30	333	1.63
WT 09:30	227	1.51
WT 14:00	105	1.54
WT 19:00	201	1.68
WT 21:30	335	1.69
MUT 07:30	800	1.73
MUT 09:30	426	1.73
MUT 14:00	610	1.70
MUT 19:00	480	1.71
MUT 21:30	413	1.69

**Πίνακας 1:** Τιμές συγκέντρωσης RNA (ng/μl) και καθαρότητας των δειγμάτων (λόγος A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) κατόπιν φωτομέτρησης. (WT=Wild Type, MUT=τριπλό μετάλλαγμα *cca1 lhy toc1*)

### 3.3 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

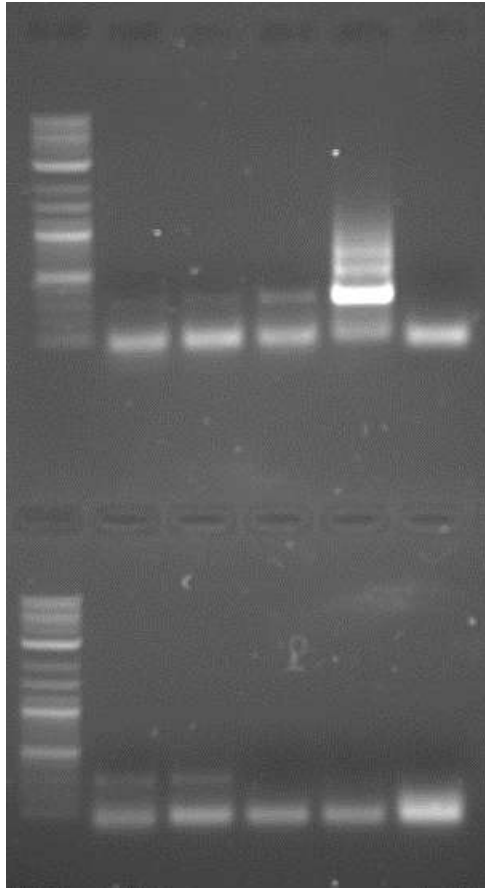
Μετά την απομόνωση RNA ακολούθησε η αντίδραση DNάσης ώστε τυχόν υπολείμματα DNA που έχουν απομείνει στο δείγμα μας να καθαριστούν πλήρως. Η αντίδραση DNάσης πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα στους 37<sup>0</sup>C. Ο έλεγχος της ύπαρξης υπολειμμάτων DNA στα RNA δείγματα ακόμη και μετά την αντίδραση DNάσης, πραγματοποιήθηκε με αντίδραση PCR. Στην αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών που ενισχύει ένα τμήμα περίπου 90bp της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου της ουβικιτίνης. Η ουβικιτίνη αποτελεί για το φυτό *A. thaliana* γονίδιο αναφοράς καθώς η έκφρασή του είναι σταθερή σε όλες τις συνθήκες. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1% (Εικόνα 4). Τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR έδειξαν ότι μόνο τα τρία από τα δέκα δείγματά μας είναι απαλλαγμένα από υπολείμματα DNA (και συγκεκριμένα το WT 09:30, WT 21:30 και το MUT 19:00). Τα υπόλοιπα επτά φαίνεται να φέρουν ακόμη DNA καθώς η ύπαρξη ζωνών που ανιχνεύονται στην πηκτική αгарόζης δηλώνουν ότι το γονίδιο της ουβικιτίνης μπορεί και πολλαπλασιάζεται στα δείγματα αυτά.





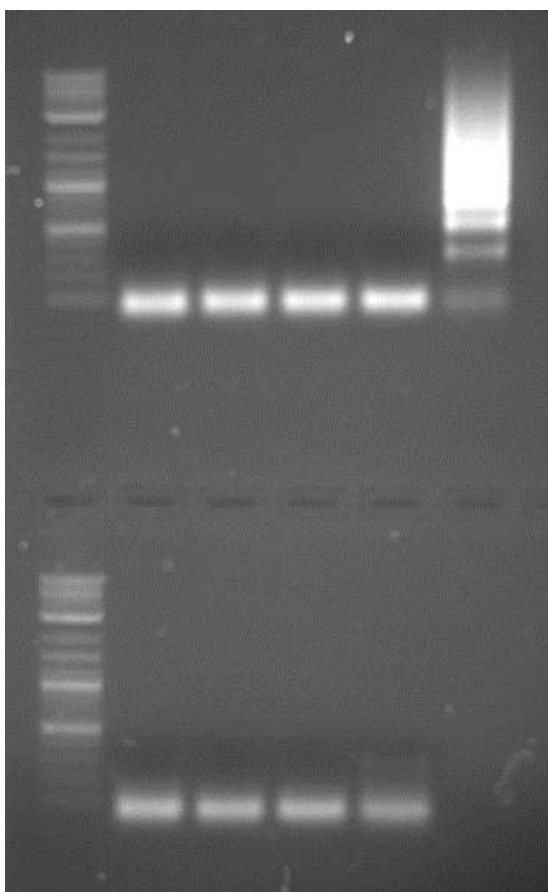
**Εικόνα 4:** Στην πάνω σειρά (από αριστερά προς τα δεξιά) παρατηρούμε πρώτα το μάρτυρα μοριακών βαρών, έπειτα τα 5 δείγματα αγρίου τύπου (wild type 7:30, 9:30, 14:00, 19:00, 21:30), δίπλα ένα παλαιότερο δείγμα cDNA (δείγμα θετικού ελέγχου 1) και τελευταίο ένα δείγμα με σκέτο νερό (δείγμα αρνητικού ελέγχου). Στην κάτω σειρά (από αριστερά προς τα δεξιά) παρατηρούμε πρώτα το μάρτυρα μοριακών βαρών, έπειτα τα 5 δείγματα του τριπλού μεταλλάγματος (*cca1 lhy toc17*:30, 9:30, 14:00, 19:00, 21:30) και τελευταίο ένα δείγμα RNA που δεν είχε υποβληθεί στην αντίδραση της DNάσης (δείγμα θετικού ελέγχου 2).

Με την πρώτη αντίδραση DNάσης καθάρισαν 3 δείγματα. Στα υπόλοιπα επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία μειώνοντας όμως αυτή τη φορά στο μισό την ποσότητα ολικού RNA της αντίδρασης. Επιπλέον, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 15 λεπτά στους 220C, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας παρασκευής του ενζύμου DNάση. Από τα 7 δείγματα μόνο ένα δείγμα, το mutant 14:00, κατάφερε να απαλλαγθεί από τα υπολείμματα DNA και τελικά να μην πολλαπλασιαστεί το γονίδιο της ουβικιτίνης στην αντίδραση PCR που ακολούθησε (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5:** Στην πάνω σειρά (από αριστερά προς τα δεξιά) παρατηρούμε πρώτα το μάρτυρα μοριακών βαρών, έπειτα τα 3 δείγματα αγρίου τύπου (wild type 07:30, 14:00, 19:00), δίπλα ένα παλαιότερο δείγμα cDNA (δείγμα θετικού ελέγχου 1) και τελευταίο ένα δείγμα με σκέτο νερό ( δείγμα αρνητικού ελέγχου). Στην κάτω σειρά (από αριστερά προς τα δεξιά) παρατηρούμε πρώτα το μάρτυρα μοριακών βαρών, έπειτα τα 4 δείγματα του τριπλού μεταλλάγματος (*cca1 lhy toc* 07:30,09:30,14:00,21:30) και τελευταίο ένα δείγμα RNA που δεν είχε υποβληθεί στην αντίδραση της DNάσης (δείγμα θετικού ελέγχου 2).

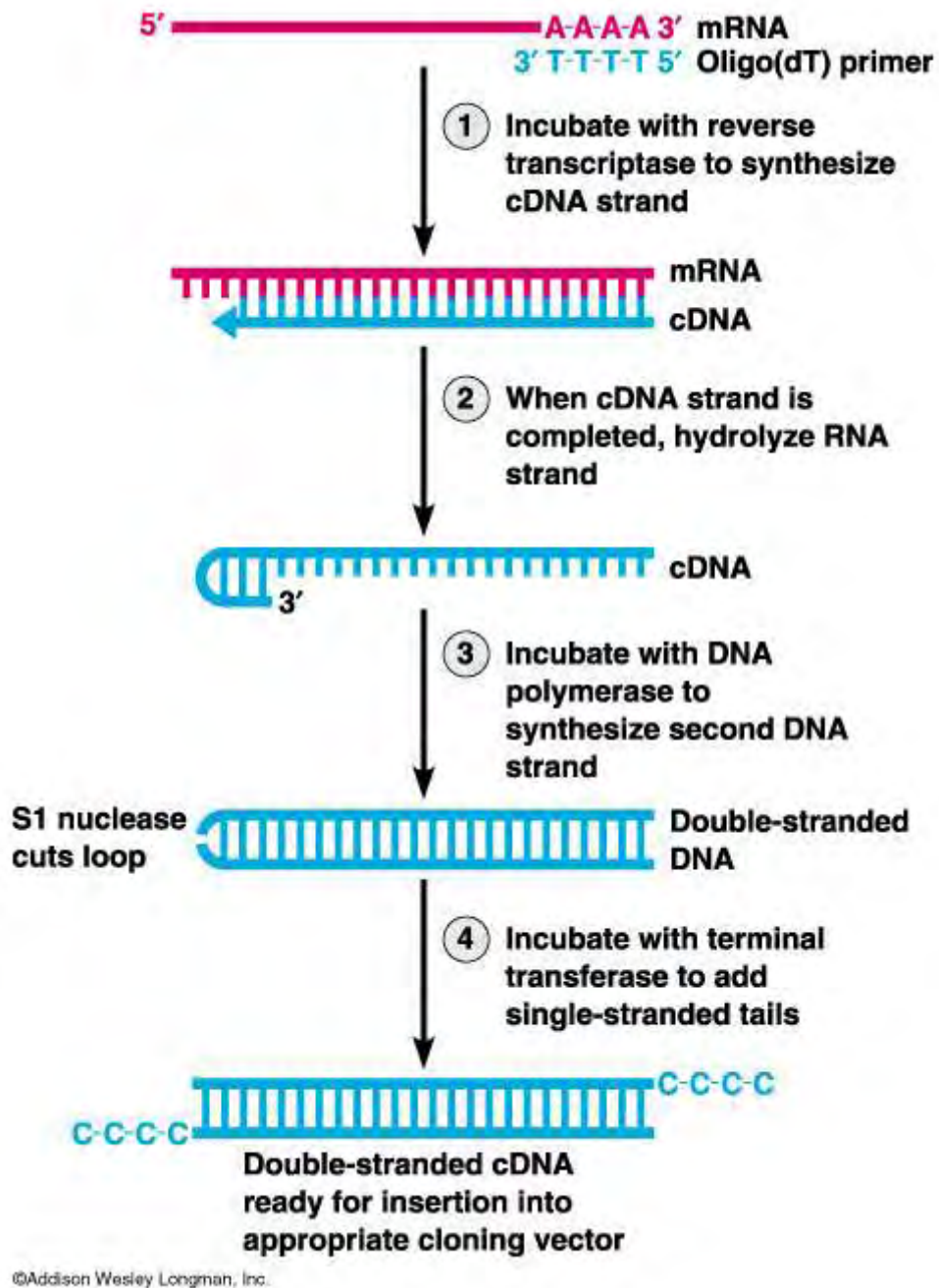
Με την δεύτερη αντίδραση DNάσης καθάρισε ακόμα ένα δείγμα το *mut.* 14:00. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με τα υπόλοιπα 6 δείγματα χρησιμοποιώντας ξανά την μισή ποσότητα ολικού RNA στην αντίδραση. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου DNάσης στην αντίδραση και τελικά η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα στους 37<sup>0</sup>C. Ο έλεγχος της απομάκρυνσης DNA από τα δείγματα έγινε ξανά με αντίδραση PCR, τα προϊόντα της οποίας αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (Εικόνα 6). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR, ο συνδυασμός μικρότερης ποσότητας αρχικού δείγματος RNA με ταυτόχρονη χρήση μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου DNάσης και επώαση 1 ώρα στους 37<sup>0</sup>C αποδεικνύεται να είναι ο ιδανικός καθώς όλα τα δείγματα RNA δείχνουν να είναι πλέον απαλλαγμένα από DNA.



**Εικόνα 6:** Στην πάνω σειρά (από αριστερά προς τα δεξιά) παρατηρούμε πρώτα το μάρτυρα μοριακών βαρών, έπειτα τα 3 δείγματα αγρίου τύπου (wild type 07:30, 14:00, 19:00), δίπλα ένα δείγμα με σκέτο νερό (δείγμα αρνητικού ελέγχου) και τελευταίο ένα παλαιότερο δείγμα cDNA (δείγμα θετικού ελέγχου 1). Στην κάτω σειρά (από αριστερά προς τα δεξιά) παρατηρούμε πρώτα το μάρτυρα μοριακών βαρών, έπειτα τα 3 δείγματα του τριπλού μεταλλάγματος (*cca1 lhy toc* 07:30,09:30,21:30) και τελευταίο ένα δείγμα RNA που δεν είχε υποβληθεί στην αντίδραση της DNάσης (δείγμα θετικού ελέγχου 2).

### 3.4 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

Το RNA των δειγμάτων μας που έχει απομονωθεί μετατρέπεται σε DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας την αντίδραση της cDNA σύνθεσης. Στην διαδικασία αυτή μετέχει η αντίστροφη μεταγραφή, ένα ένζυμο που μπορεί να συνθέσει DNA με μήτρα το RNA. Κατά την διαδικασία αυτή το ένζυμο συνθέτει μια αλυσίδα DNA συμπληρωματική με το RNA και έτσι δημιουργείται ένα υβρίδιο DNA-RNA. Έπειτα παράγεται και η δεύτερη αλυσίδα DNA. Έτσι το αρχικό RNA παίρνει την μορφή δίκλωνου DNA (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Τμηματική αναπαράσταση cDNA σύνθεσης.

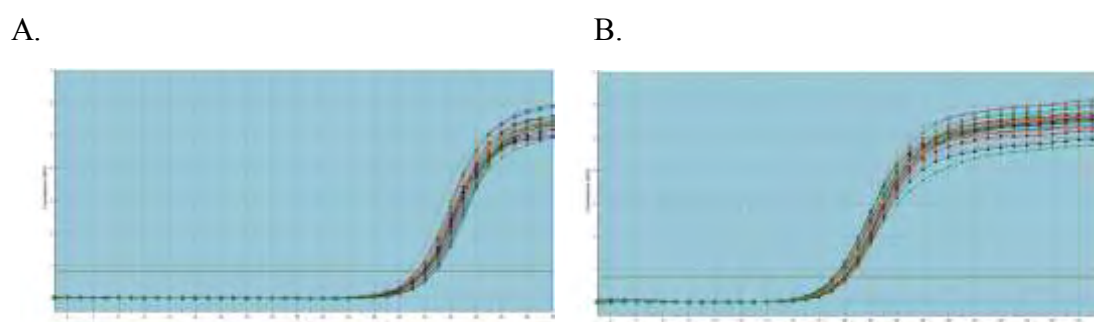
### 3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *HESPI*

Μετά τη σύνθεση του cDNA από τα δείγματά μας ακολούθησε μελέτη της έκφρασης του γονιδίου σε αυτά. Για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *HESPI* επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real time qPCR). Η μέθοδος της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί

σήμερα μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό DNA και RNA. Πρόκειται για μια πολύ ευαίσθητη τεχνική στην οποία ο πραγματικός χρόνος χρησιμοποιείται για να καθορίσει την έκφραση mRNA ενός γονιδίου καθώς και τα επίπεδα έκφρασης του (αριθμός αντιγράφων mRNA) που πολλαπλασιάζονται.

Η έκφραση του γονιδίου μελετήθηκε τόσο στα δείγματα από τα φυτά αγρίου τύπου (wild type) όσο και στα δείγματα από τα φυτά που φέρουν το τριπλό μετάλλαγμα (*cca1 lhy toc1*), που πάρθηκαν στις διάφορες χρονικές στιγμές του 24ώρου. Ταυτόχρονα με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *HESPI*, μετρήθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης ενός γονιδίου του *A. thaliana* που κωδικοποιεί για ουβικιτίνη. Το γονίδιο της ουβικιτίνης αποτελεί εσωτερικό μάρτυρα καθώς τα επίπεδα έκφρασής του χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση στις μικρές διαφορές που παρουσιάστηκαν στις ποσότητες του cDNA. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ουβικιτίνη επιλέχθηκε εξαιτίας του γεγονότος ότι η έκφρασή του θεωρείται σταθερή σε όλους τους ιστούς.

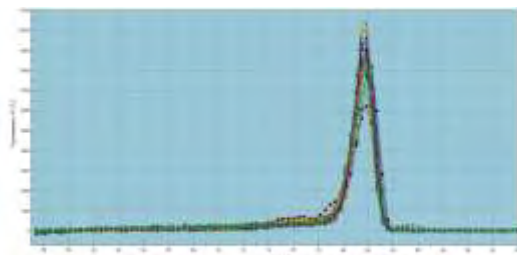
Η εικόνα 8 δείχνει τις καμπύλες ενίσχυσης που προέκυψαν τόσο από την ενίσχυση του γονιδίου *HESPI* όσο και από την ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς. Στις καμπύλες φαίνεται η αύξηση του φθορισμού της SYBR® Green με την αύξηση του αριθμού των κύκλων της PCR.



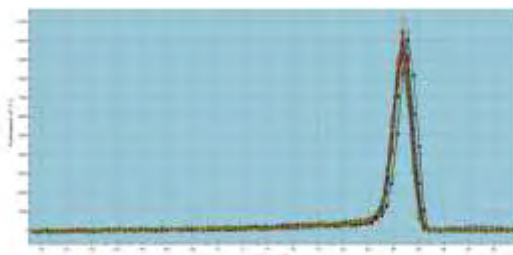
**Εικόνα 8:** Καμπύλες ενίσχυσης της qRT-PCR. A) γονίδιο *HESPI* B) γονίδιο ουβικιτίνης

Η εξειδίκευση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση qRT-PCR ελέγχθηκε για κάθε ζεύγος χωριστά από τις καμπύλες αποδιάταξης (εικόνα 9).

A.

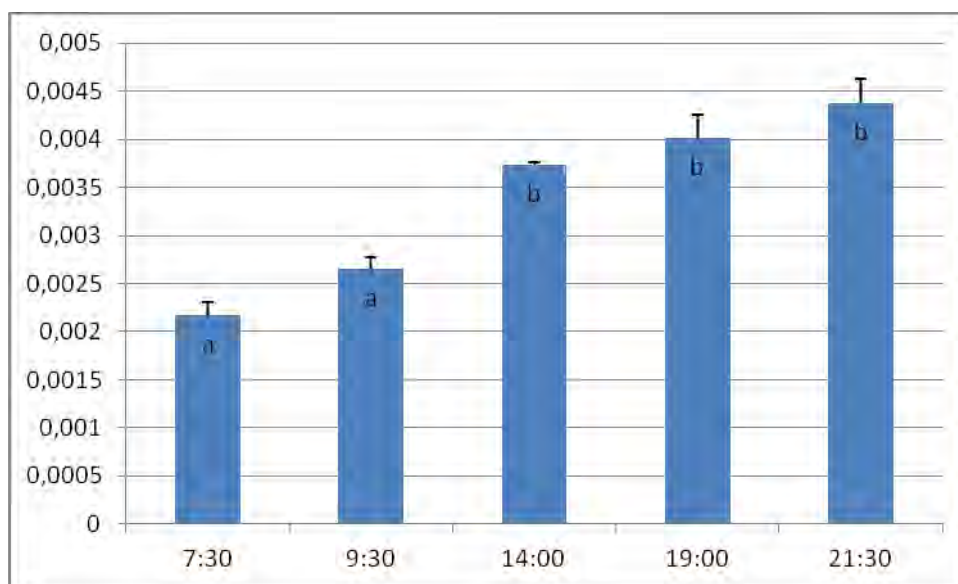


B.



**Εικόνα 9:** Εξειδίκευση της qRT-PCR. Καμπύλες αποδιάταξης A) γονίδιο *HESPI* B) γονίδιο ουβικιτίνης

Για να ελέγξουμε αν το γονίδιο *HESPI* ρυθμίζεται κερκαδικά, μελετήσαμε την έκφρασή του σε φυτά αγρίου τύπου σε διαφορετικές χρονικές στιγμές του 24ώρου ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν διαφορές. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η έκφραση του γονιδίου είναι μικρότερη τις πρωϊνές ώρες ενώ παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης το μεσημέρι και το βράδυ (εικόνα 10).



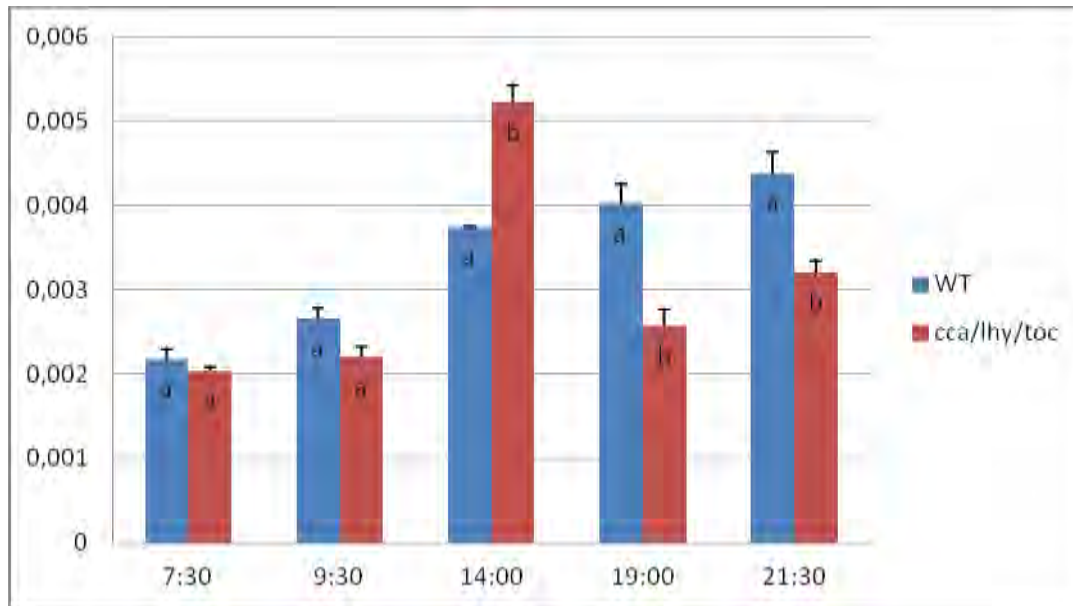
**Εικόνα 10:** Σχετική έκφραση του γονιδίου της εσπερίνης (*HESPI*) στα φυτά αγρίου τύπου μέσα στη διάρκεια του 24ώρου. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου έχουν κανονικοποιηθεί με βάση την έκφραση του γονιδίου της ουβικιτίνης. Οι μπάρες δείχνουν μέσους όρους με τυπικό σφάλμα (3 επαναλήψεων). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές έχουν σημειωθεί με διαφορετικά γράμματα.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου τις μεσημεριανές και βραδινές ώρες είναι στατιστικώς σημαντική.

Δείγματα	Στατιστικώς σημαντικά	Τιμή <i>P</i>
7:30 vs 9:30	OXI	0.080
7:30 vs 14:00	NAI	<0.001
7:30 vs 19:00	NAI	<0.001
7:30 vs 21:30	NAI	<0.001
9:30 vs 14:00	NAI	<0.001
9:30 vs 19:00	NAI	<0.001
9:30 vs 21:30	NAI	<0.001
14:00 vs 19:00	OXI	0.277
14:00 vs 21:30	OXI	0.063
19:00 vs 21:30	OXI	0.177

**Πίνακας 2:** Στατιστική επεξεργασία της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *HESPI* σε φυτά αγρίου τύπου σε διαφορετικές χρονικές στιγμές του 24ώρου.

Το γεγονός ότι το γονίδιο *HESPI* παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης μέσα στη διάρκεια του 24ώρου, είναι ενδεικτικό της πιθανής ρύθμισης της έκφρασής του από τον κερκάδιο ρυθμό. Για να επιβεβαιώσουμε την ένδειξη αυτή μελετήσαμε την έκφραση του γονιδίου *HESPI* και στο τριπλό μετάλλαγμα *cca1 lhy toc*. Στο τριπλό μετάλλαγμα παρουσιάζεται απορρύθμιση του κερκαδικού ρολογιού καθώς απουσιάζουν ταυτόχρονα τα τρία σημαντικά γονίδια που συνιστούν το κέντρο ρύθμισης του κερκάδιου ρυθμού στο *A. thaliana*. Για να μελετήσουμε την έκφραση του *HESPI* στο τριπλό μετάλλαγμα πάρθηκαν δείγματα στις ίδιες ακριβώς χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν και στα φυτά αγρίου τύπου ώστε να υπάρχει άμεση σύγκριση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 11.



**Εικόνα 11:** Σύγκριση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου της εσπερίνης (*HESPI*) στα φυτά αγρίου τύπου και στα φυτά που φέρουν το τριπλό μετάλλαγμα *cca1 lhy toc1* μέσα στη διάρκεια του 24ώρου. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου έχουν κανονικοποιηθεί με βάση την έκφραση του γονιδίου της ουβικιτίνης. Οι μπάρες δείχνουν μέσους όρους με τυπικό σφάλμα (3 επαναλήψεων). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές έχουν σημειωθεί με διαφορετικά γράμματα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου στο τριπλό μετάλλαγμα, παρουσιάζεται μεγάλη και απότομη επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου το μεσημέρι (14:00) που μειώνεται όμως σημαντικά τις βραδινές ώρες. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών έδειξε ότι τόσο η μεγάλη αύξηση το μεσημέρι όσο και η μείωση τις βραδινές ώρες είναι στατιστικώς σημαντικές (πίνακας 3).

WT vs <i>cca1 lhy toc1</i>	Στατιστικώς σημαντικά	Τιμή P
7:30	OXI	0.364
9:30	OXI	0.061
14:00	NAI	0.002
19:00	NAI	0.009
21:30	NAI	0.016

**Πίνακας 3.** Στατιστική επεξεργασία της έκφρασης του γονιδίου *HESPI* σε φυτά αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα *cca1 lhy toc1* σε διαφορετικές χρονικές στιγμές του 24ώρου.



Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου τις πρωϊνές ώρες (λίγο πριν και λίγο μετά το ξημέρωμα) που είναι μειωμένη δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυτών αγρίου τύπου και των φυτών που φέρουν το τριπλό μετάλλαγμα. Αντιθέτως, στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων φυτών παρουσιάζονται το μεσημέρι (στις 14:00) και τις βραδινές ώρες (λίγο πριν και λίγο αφού νυχτώσει) τότε δηλαδή που στα φυτά αγρίου τύπου παρουσιάζεται επαγωγή της έκφρασης. Επιπλέον, το γεγονός ότι η μέγιστη έκφραση του γονιδίου μετατοπίζεται το μεσημέρι στο τριπλό μετάλλαγμα υποδεικνύει ότι η έκφραση του *HESPI* επηρεάζεται από την απορρύθμιση του κίρκαδικού ρολογιού.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γονίδιο At1g31500 βρέθηκε σε προηγούμενη εργασία να κωδικοποιεί για μια λειτουργική αποαδενυλάση (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Το γονίδιο ονομάστηκε *HESPI* καθώς φαίνεται να είναι μια εσπερίνη, δηλαδή γονίδιο που επηρεάζεται από τον κιρκάδιο ρυθμό και παρουσιάζει αυξημένη έκφραση τις βραδινές ώρες.

Στο *A thaliana* έχουν δημοσιευτεί μελέτες για γονίδια που κωδικοποιούν για αποαδενυλάσες, και συγκεκριμένα έχουν μελετηθεί τα γονίδια *AtPARN* (Reverdatto et al., 2004) και *AtCAF1a* και *AtCAF1b* (Walley et al., 2010). Για κανένα όμως από τα γονίδια αυτά δεν έχει αναφερθεί να παρουσιάζουν έκφραση που να επηρεάζεται από τον κιρκάδιο ρυθμό. Το γονίδιο *HESPI* ανήκει σε μια ειδική κατηγορία αποαδενυλασών που ελέγχουν ή ελέγχονται από τον κιρκάδιο ρυθμό και μέχρι στιγμής δεν έχουν μελετηθεί στο *A thaliana*.

Αρχικά, για να διαπιστώσουμε αν πράγματι η έκφραση του γονιδίου επηρεάζεται από τον κιρκάδιο ρυθμό, μελετήσαμε την έκφρασή του σε φυτά αγρίου τύπου που μεγάλωναν για οκτώ ημέρες σε φωτοπερίοδο 12 ώρες φως/12 ώρες σκοτάδι (8 το πρωί / 8 το απόγευμα). Πέντε δείγματα πάρθηκαν στην διάρκεια ενός 24ώρου που αντιστοιχούν σε: ένα δείγμα στις 7:30 λίγο πριν ξημερώσει, ένα δείγμα στις 9:30 λίγο μετά το ξημέρωμα, ένα δείγμα ακριβώς στην μέση της ημέρας στις 14:00, ένα δείγμα στις 19:00 λίγο πριν νυχτώσει και τελευταία δειγματοληψία στις 21:30 χρονικό σημείο στο οποίο είχε νυχτώσει.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση του *HESPI* είναι σχετικά χαμηλή τις πρωινές ώρες ενώ επάγεται το μεσημέρι και το βράδυ. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην έκφραση του γονιδίου το πρωί και το βράδυ βρέθηκαν να είναι στατιστικώς σημαντικές, γεγονός που δηλώνει ότι ο εντοπισμός αυξημένου αριθμού μεταγραφημάτων το μεσημέρι και το βράδυ δεν είναι τυχαίος. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει το γονίδιο να επηρεάζεται άμεσα από την εναλλαγή μέρας-νύχτας οπότε πιθανότατα η έκφρασή του είναι υπό την επίδραση του κιρκάδιου ρυθμού.

Για να επιβεβαιώσουμε το αποτέλεσμα αυτό αποφασίσαμε να μελετήσουμε την έκφραση του γονιδίου και σε μεταλλαγμένα φυτά στα οποία η ρύθμιση του

κιρκαδικού ρολογιού είχε διακοπεί, δηλαδή σε φυτά που ήταν απορρυθμισμένα. Είναι γνωστό ότι τα βασικά γονίδια που συμμετέχουν στον κεντρικό μηχανισμό ρύθμισης του ρολογιού είναι τα *TOC*, *CCA*, *LHY*. Ο βασικός ρόλος των γονιδίων αυτών έχει ήδη περιγραφεί σε αρκετές δημοσιεύσεις, ενώ έχουν περιγραφεί και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, καθώς βρέθηκε ότι τα γονίδια *CCA*, *LHY* επιδρούν στο *TOC*, και το αντίστροφο (Alabadi et al. 2001). Η ύπαρξη ενός τριπλού μεταλλάγματος ως προς τα τρία βασικά γονίδια του κεντρικού μηχανισμού ρύθμισης του κιρκαδικού ρολογιού μας έδωσε τη δυνατότητα να μελετήσουμε την έκφραση του γονιδίου *HESPI* στην περίπτωση που τα τρία αυτά γονίδια απουσιάζουν. Στο τριπλό μετάλλαγμα *cca1 lhy toc1* βρέθηκε ότι η ρυθμική δραστηριότητα ήταν δραματικά εξασθενημένη, γεγονός που αποδεικνύει την απορρύθμιση που προκαλεί το μετάλλαγμα στον κιρκαδίο ρυθμό του *A.thaliana*. (Ding, et al., 2007).

Ενώ στα φυτά αγρίου τύπου παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *HESPI* τις βραδινές ώρες, στα μεταλλαγμένα *cca1 lhy toc1* φυτά η έκφραση του γονιδίου παρουσιάζει μια μέγιστη τιμή το μεσημέρι και στη συνέχεια μειώνεται τις βραδινές ώρες. Η επαγωγή της έκφρασης το μεσημέρι είναι αξιοσημείωτη, καθώς βρέθηκε να είναι 2,5 φορές παραπάνω από την έκφραση που παρατηρείται στα φυτά λίγο πριν το ξημέρωμα και 2 φορές παραπάνω από την έκφραση που παρατηρείται στα φυτά λίγο πριν νυχτώσει.

Εκτός από τα πολύ αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα το μεσημέρι, εντύπωση προκαλεί το γεγονός των μειωμένων μεταγραφικών επιπέδων τις βραδινές ώρες. Συγκεκριμένα, η έκφραση του γονιδίου στα μεταλλαγμένα φυτά είναι 1,5 φορές μειωμένη λίγο πριν νυχτώσει και 1,4 φορές μειωμένη λίγο αφού νυχτώσει, σε σύγκριση με την αντίστοιχη έκφραση που παρατηρείται στα φυτά αγρίου τύπου τις ίδιες χρονικές στιγμές. Επομένως στα μεταλλαγμένα φυτά φαίνεται η αυξημένη έκφραση που εντοπίζεται το μεσημέρι να μην συνοδεύεται από μια επίσης αυξημένη έκφραση τις βραδινές ώρες και σε αυτό ακριβώς το σημείο εντοπίζεται η διαφοροποίηση του προτύπου έκφρασης από τα φυτά αγρίου τύπου.

Η απορύθμιση που παρατηρείται στο *HESPI* έχει παρατηρηθεί σε αρκετά γονίδια που ελέγχονται από το ρολόι τόσο πρωινά όσο και απογευματινά. Για παράδειγμα τα γονίδια *GI* και *LUX*, που εκφράζονται το βράδυ, έχασαν το φυσιολογικό τους ρυθμό (το ρυθμικό πλάτος) στο τριπλό μετάλλαγμα μετά από ένα κύκλο συνεχούς φωτός. Ομοίως, το *PPR9*, που είναι ένα πρωινό γονίδιο, έδειξε σημαντικά περιορισμένη έκφραση στο *cca1 lhy toc1* μετάλλαγμα (Ding et al., 2007).

Από τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανές ότι το πρότυπο έκφρασης του *HESPI* στα μεταλλαγμένα *cca1 lhy toc1* φυτά είναι σημαντικά διαφορετικό από εκείνο που παρατηρείται στα φυτά αγρίου τύπου. Από ότι φαίνεται, η έκφραση του γονιδίου δεν παραμένει ανεπηρέαστη στα φυτά από τα οποία απουσιάζουν τα τρία βασικά γονίδια της κερκαδικής ρύθμισης. Αυτό σημαίνει ότι η έκφραση του *HESPI* είναι άμεσα συνδεδεμένη με τον κερκάδιο ρυθμό και δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο η έκφρασή του να ελέγχεται με κάποιο τρόπο από κάποια από τα γονίδια αυτά ή και από όλα ταυτοχρόνως, ένα ερώτημα που μένει να απαντηθεί στο μέλλον.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alabadi D, Oyama T, Yanovsky M.J, Harmon FG, Mas P, Kay SA. (2001) Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY / CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **293**: 880 – 883.

Alabadi, D., Yanovsky M. J, Mas P., Harmer S. L. and Kay S. A. (2002) Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **12**: 757–761

Baggs JE., Green CB. (2003) *Current Biology*. **13**: 189-198

Barak , S. , Tobin , E.M. , Andronis , C. , Sugano , S. and Green , R.M. ( 2000 ) All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. *Trends Plant Sci.* **5** :517 – 522 .

Bartlam M., Yamamoto T. (2010) The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex. *Protein Cell* **1(5)**: 443–452

Ding Z, Doyle MR, Amasino RM, Davis SJ. (2007) A Complex Genetic Interaction Between *Arabidopsis thaliana* TOC1 and CCA1/LHY in Driving the Circadian Clock and in Output Regulation. *Genetics* **176**: 1501–1510

Douris N., Green CB. (2008) *Annals of Medicine*. **40**: 622-626

Gardner M.J. , Hubbard K.E., Hotta C.T., Dodd A.N. and Webb A.A. ( 2006 ) How plants tell the time. *Biochem. J.* **397**: 15 – 24.

Gilbert MR., Douris N., Tongjai S., Green C.B. (2011) Nocturnin Expression Is Induced by Fasting in the White Adipose Tissue of Restricted Fed Mice. *PlosOne* **6(2)**:e17051

Goldstrohm A, Wickens M. (2008) *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **9**:337-344

Harmer S. L., Panda S., Kay S. A. (2001) Molecular bases of circadian rhythms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**: 215–253.

Liu Y., Merrow M., Loros J. J., Dunlap J. C. (1998) How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science* **281**: 825–829.

Locke J. C., Millar A. J. and Turner M. S. (2005) Modelling genetic networks with noisy and varied experimental data: the circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *J. Theor. Biol.* **234**: 383–393.

Locke J. C., Southern M. M, Kozma-Bognar L., Hibberd V., Brown P. E. et al. (2005) Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Mol. Syst. Biol.* **1**: 2005.0013.

Mas P. (2008) Circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*: time beyond transcription. *Cell*.

Matsushika A., Makino S., Kojima M. and Mizuno T. (2000) Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol.* **41**: 1002–1012.

Reverdatto SV, Dutko JA, Chekanova JA, Hamilton DA, Belostotsky DA. (2004) mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *RNA*. **10(8)**:1200-14.

Schaffer R., Ramsay N., Samach A., Corden S., Putterill J. et al. (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**: 1219–1229.

Walley JW, Kelley DR, Nestorova G, Hirschberg DL, Dehesh K. (2010) Arabidopsis deadenylases AtCAF1a and AtCAF1b play overlapping and distinct roles in mediating environmental stress responses. *Plant Physiology* **152(2)**:866-75

