



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας «ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-
ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ του ΠΑΠΑΠΟΣΤΟΛΟΥ ΔΗΜΗΤΡΗ

Διερεύνηση του φυσιολογικού ρόλου της At-NOC (Hesperin -
Εσπερίνης), μιας Αποαδενυλάσης που σχετίζεται με τον κερκάδιο
ρυθμό στο φυτό *Arabidopsis thaliana*.

ΛΑΡΙΣΑ 2012

Η εν λόγω διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κυρίως στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών, και μικρά τμήματά της στο εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (TBB), στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Καλλιόπη Παπαδοπούλου: Επικ. Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Τριμελής Επιτροπή:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Επικ. Καθηγήτρια TBB, Π.Θ.

Μπαλατσός Νικόλαος: Λέκτορας Βιοχημείας TBB, Π.Θ.

Λεωνίδας Δημήτριος: Αναπλ. Καθηγητής Βιοχημείας TBB, Π.Θ.

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής. Τους Καθηγητές κύριο Νίκο Μπαλατσό, την κυρία Καλλιόπη Παπαδοπούλου και τον κύριο Δημήτρη Λεωνίδα για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και την κατανόηση που έδειξαν προς το πρόσωπό μου. Ιδιαίτερα πρέπει να ευχαριστήσω την υπεύθυνη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών διδάκτορα κα Δανιέλα Τσίκου και την υποψήφια διδάκτορα κα Αφροδίτη Κροκιά, όπως επίσης και τον υποψήφιο διδάκτορα στο εργαστήριο Λειτουργικής Βιοτεχνολογίας κο Παναγιώτη Μαραγκοζίδα για την αμέριστη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές τους. Τέλος, ευχαριστώ όλους τους Καθηγητές που έδωσαν από τον πολύτιμο χρόνο τους για να με διδάξουν κατά τη διάρκεια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών, όπως επίσης και όλα τα παιδιά των εργαστηρίων που συνεργάστηκαν άψογα μαζί μου.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	3
Περίληψη.....	4
Εισαγωγή.....	4
Η Αποικοδόμηση του mRNA στους ευκαρυώτες.....	4
Η αποικοδόμησης του mRNA ειδικότερα στα φυτά.....	6
Αποαδενυλάσες.....	7
Ορισμός.....	7
Κατάταξη.....	8
Βιολογικός ρόλος.....	8
Έλεγχος δραστικότητας.....	8
Μελετημένες αποαδενυλάσες στο <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
Κιρκαδικοί Ρυθμοί.....	12
Χαρακτηρισμός και διάδοση του Κιρκαδικού Συστήματος.....	12
Οργάνωση του Κιρκαδικού Συστήματος.....	13
Μοριακή βάση των κιρκαδικών ρυθμών.....	14
Λίγα λόγια για το φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
AtNOC: Ταυτοποίηση και Χαρακτηρισμός.....	18
Σκοπός του πειράματος.....	21
Πειραματική Διαδικασία: Μεθοδολογία και Υλικά.....	21
T-DNA ένθεση – παραγωγή και καλλιέργεια μεταλλαγμένων σπόρων.....	21
Ταυτοποίηση Ομοζυγωτίας.....	22
Εξαγωγή RNA για Real-Time PCRs.....	36
cDNA και Real-Time PCRs.....	43
Αποτελέσματα.....	44
Συζήτηση.....	50
Βιβλιογραφία.....	52

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Η Αποαδενυλάση AtNOC (Hesperin/Εσπερίνη) είναι μια καινοτόμος αποαδενυλάση που κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε μόλις πρόσφατα στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Η ιδιαιτερότητά της έγκειται στο γεγονός ότι σχετίζεται με τον κικκάδιο ρυθμό, και η έκφρασή της εμφανίζει περιοδικότητα που ρυθμίζεται από το ενδογενές κικκαδικό ρολόι του φυτού που ανταποκρίνεται στα εξωτερικά ερεθίσματα από το περιβάλλον σε σχέση με την ύπαρξη στο χώρο φωτός ή σκότους. Αυτό το γεγονός, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το *Arabidopsis thaliana* είναι ένα εργαστηριακά πολύ εύχρηστο μοντέλο οργανισμός και ή ευκολία να προάγουμε επιθυμητές μεταβολές στην έκθεση του φυτού στο φως και να μεταβάλουμε μετρήσιμο τρόπο την έκφραση της AtNOC ανοίγει πολλές πόρτες για την μελέτη των αποαδενυλασών στα φυτά και όχι μόνο, όπως επίσης προσθέτει και ένα ακόμη κομμάτι στο παζλ της μελέτης των κικκάδιων μηχανισμών στα φυτά. Για να προχωρήσουμε σε περεταίρω μελέτες της αποαδενυλάσης αυτής ήταν απαραίτητο να καλλιεργήσουμε και να ταυτοποιήσουμε ένα μεταλλαγμένο φυτό που να του έχει αποσιωπηθεί το γονίδιο της AtNOC. Έτσι η έκφραση της πρωτεΐνης να είναι αισθητά πιο χαμηλή λίγο πριν πέσει το σκοτάδι, που κανονικά έχει μέγιστο. Αυτό και προσπαθήσαμε να κάνουμε στην εν λόγω πειραματική διαδικασία.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

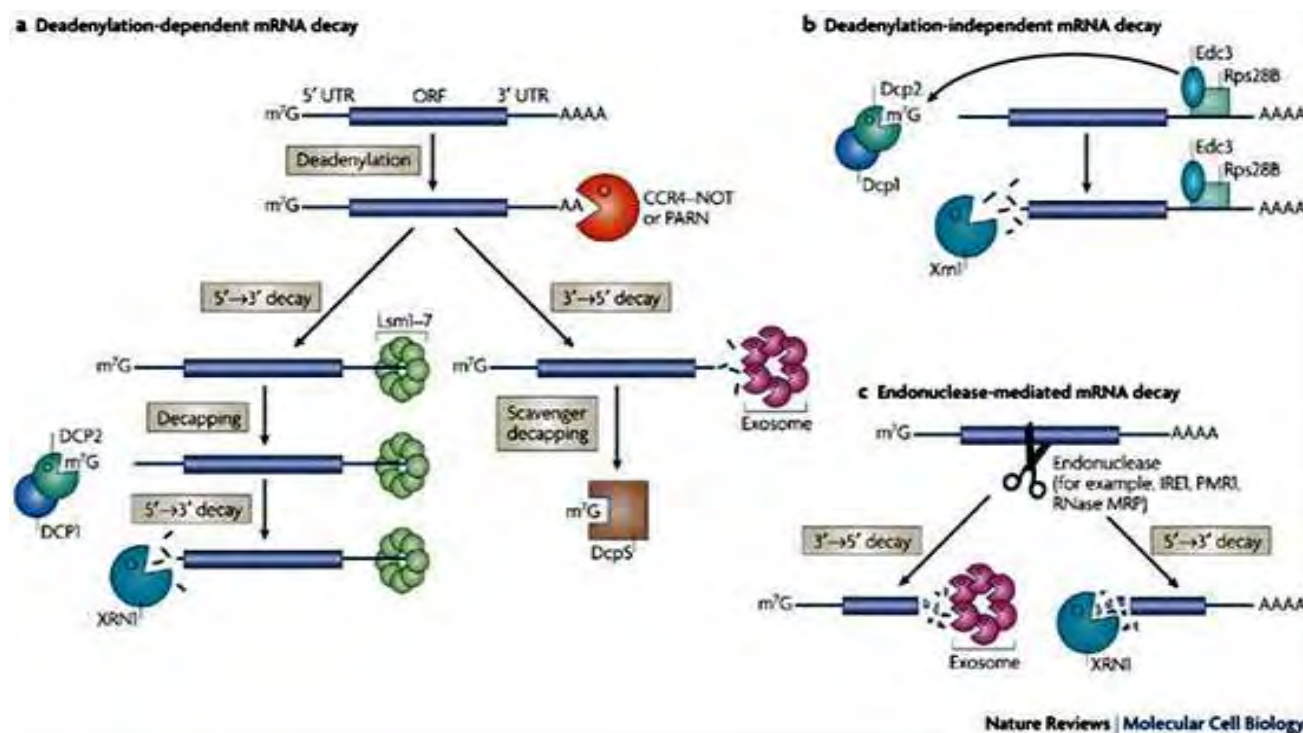
Η Αποικοδόμηση του mRNA στους ευκαρυώτες

Ένα από τα βασικά βήματα της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυώτες είναι η αποικοδόμηση του mRNA μιας που συμβάλει, mRNA και στην προστασία έναντι εξωγενούς ιικού γενετικού υλικού, και στον ποσοτικό και στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης του mRNA (Dyckhoorn et al., 2003; Maquat et al., 2000; Hoofvan et al., 1999). Με την διαδικασία της αποαδενυλίωσης στον πυρήνα, καθορίζεται το σωστό μήκος της πολύ (A) ουράς, το οποίο σωστό μήκος με τη σειρά του σηματοδοτεί την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα. Στο κυτταρόπλασμα, η πολυ(A) ουρά του mRNA προσδίδει σταθερότητα στο μόριο και ενεργοποιεί τη μετάφραση. Η εκτεταμένη αποαδενυλίωση του mRNA, πέρα από ένα συγκεκριμένο μήκος, ξεκινάει την αποικοδόμηση του.

Υπάρχουν δύο μονοπάτια αποικοδόμησης: αυτό που εξαρτάται από αποαδενυλίωση και αυτό που δεν εξαρτάται από αποαδενυλίωση. Στο πρώτο μονοπάτι, η αποικοδόμηση του mRNA ξεκινάει με την βράχυνση της πολυ(A) ουράς (αποαδενυλίωση) στο 3' άκρο του mRNA που εκτελείται από τις νουκλεάσες γνωστές ως αποαδενυλάσες (βλ. παρακάτω: § Αποαδενυλάσες-Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος δραστηριότητάς τους) (Tucker et al., 2000; Mitchell et al., 2001). Στη συνέχεια μπορεί να γίνει με δύο τρόπους: Είτε με κατεύθυνση 5'→3' από ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) το οποίο αφαιρεί το κάλυμμα στο 5' άκρο και κατόπιν από την 5'→3' εξωνουκλεάση Xrn1p, είτε, με κατεύθυνση 3'→5' από ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών, αφού πρώτα το κάλυμμα υδρολύεται από το DcpS (Μονοπάτι αποκοδόμησης εξαρτώμενο από την αποαδενυλίωση) (Garneau et al., 2004; Anderson et al., 1998; Chen et al., 2001; Wang and Kiledjian, 2001; Mukherjee et al., 2002, Liu et al., 2002) (**Εικόνα 1a**).

Στο δεύτερο μονοπάτι αποικοδόμησης το οποίο δεν εξαρτάται από αποδενυλίωσης στον *S. cerevisiae*, είναι απαραίτητη η στρατολόγηση της πρωτεϊνικής μηχανής υδρόλυσης του καλύμματος (Εικόνα 1b). Ωστόσο, κάποια μόρια mRNA η αποικοδομούνται είτε με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες είτε από το μηχανισμό του RNAi (Dodson et al., 2002). Έτσι παράγονται δύο θραύσματα με απροστάτευτα άκρα, τα οποία και αποικοδομούνται στη συνέχεια από το εξώσωμα και την Xrn1p (Εικόνα 1c).

Εικόνα 1. Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA (Goldstrohm and Wickens, 2008).



Πίνακας 1. Τα 2 κυριότερα μονοπάτια αποικοδόμησης του ευκαρυωτικού mRNA και οι πρωτεϊνικοί παράγοντες που εμπλέκονται σ' αυτά (Meyer et al., 2004).

Reaction	Enzymes		Effectors
	Yeast	Mammals	
I deadenylation	<ul style="list-style-type: none"> • Pan2p/Pan3p • CCR4-NOT complex 	<ul style="list-style-type: none"> • Pan2/Pan3 • CCR4-NOT complex • PARN 	PABPC PABPC cap
IIa decapping	<ul style="list-style-type: none"> • Dcp1p/Dcp2p 	<ul style="list-style-type: none"> • Dcp1/Dcp2 	Edc1p; Edc2p; Edc3p; Pat1p; Lsm1-7; Dhh1p; PABPC
IIb cap hydrolysis	<ul style="list-style-type: none"> • Dcs1p 	<ul style="list-style-type: none"> • DcpS 	
III 5'-3' exonucleolytic decay	<ul style="list-style-type: none"> • Xrn1p 	<ul style="list-style-type: none"> • Xrn1 	
IV 3'-5' exonucleolytic decay	<ul style="list-style-type: none"> • exosome 	<ul style="list-style-type: none"> • exosome 	Ski2p; Ski3p; Ski7p; Ski8p

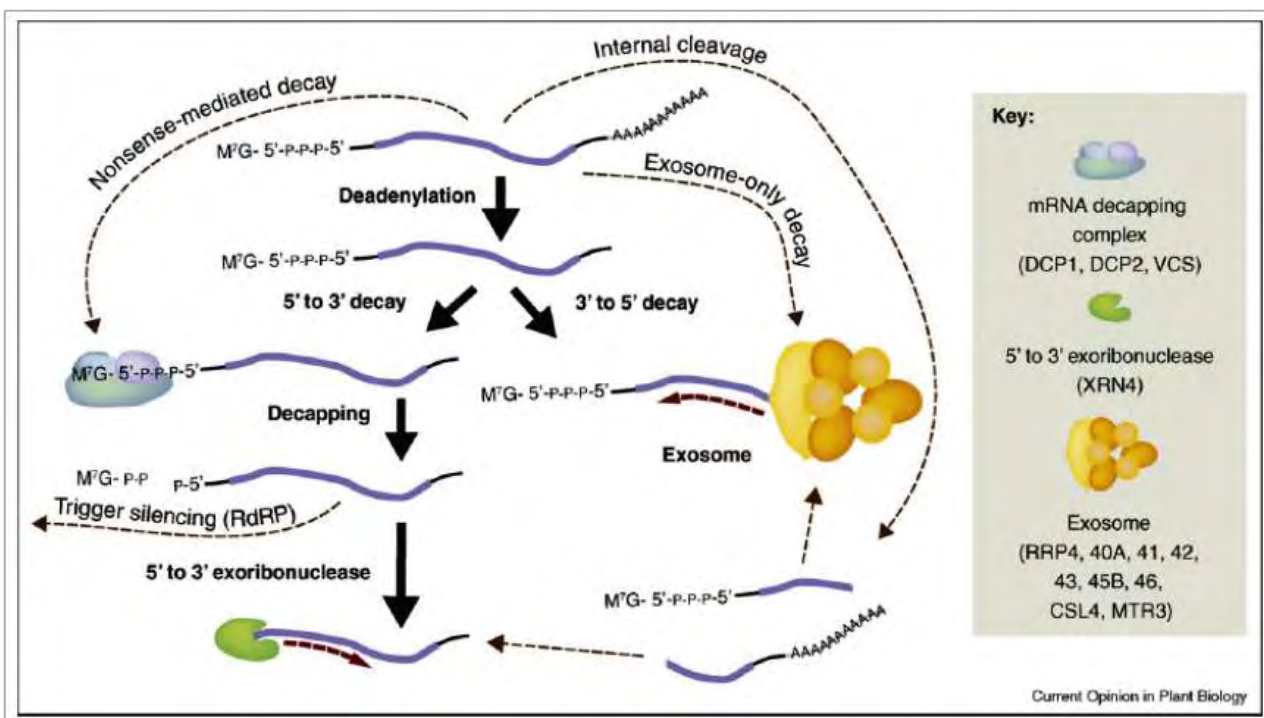
Η αποικοδόμηση του mRNA ειδικότερα στα φυτά

Στα φυτά, τα περισσότερα βιοχημικά σύμπλοκα που εμπλέκονται στην αποαδενυλίωση είναι συντηρημένα. Τα πιο κύρια είναι: η πολυ(A) ριβονουκλεάση PARN, το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4/CAF1 και η πολυ(A) νουκλεάση PAN (Πίνακας 2). Ενώ όμως είναι γνωστό ότι για την αποαδενυλίωση χρειάζονται και η PARN και το σύμπλοκο CCR4/CAF1 και το γεγονός ότι κάθε ενζυμικό σύμπλοκο είναι εξειδικευμένο ως το υπόστρωμά του, παραμένει όμως ο βαθμός εξειδίκευσης των αποαδενυλασών όπως επίσης και το πώς η κάθε αποαδενυλάση στοχεύει και αναγνωρίζει το υπόστρωμά της.

Μετά την αρχική αποαδενυλίωση του mRNA, το μονοπάτι αποικοδόμησης με φορά 5'→3' συνεχίζει με την απομάκρυνση της καλύπτρας στο 5' άκρο από το σύμπλοκο απομάκρυνσης της καλύπτρας (decapping). Τα κύρια συστατικά του συμπλόκου είναι οι παράγοντες **DCP1** και **DCP2**, που είναι συντηρημένοι στα φυτά. Επίσης, ο παράγοντας **VARICOSE (VCS)/HEDLS** του ίδιου συμπλόκου, αναγνωρίστηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά στα φυτά. Το ομόλογο στα θηλαστικά, ονομάζεται HEDLS και εμπλέκεται στην απομάκρυνση της καλύπτρας του mRNA ενώ λειτουργεί και ως μοριακή σκαλωσιά για τα μόρια DCP1 και DCP2. Στα mRNAs των θηλαστικών το DCP2 αναγνωρίζει αλληλουχίες που έχουν χαρτογραφηθεί στην 5'-αμετάφραστη περιοχή. Μετά τη απομάκρυνση της καλύπτρας, το 5' μονοφωσφορυλιωμένο άκρο του RNA γίνεται ευάλωτο στην XRN4 εξωριβονουκλεάση (Belostotsky and Sieburth, 2009).

Στο μονοπάτι αποικοδόμησης με φορά 3'→5', αφού πρώτα εκτελεστεί η απαραίτητη αποαδενυλίωση, την κύρια δράση εξονουκλεάσης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς την εκτελεί το εξώσωμα. Είναι ένας πολύπλευρος μακρομοριακός μηχανισμός που μπορεί να επεξεργαστεί μερικώς το RNA, να αποικοδομήσει πλήρως το RNA ή να πραγματοποιήσει ποιοτικό έλεγχο του RNA. Το τελευταίο σημαίνει ότι αποικοδομεί επιλεκτικά μόνο τα ελαττωματικά μόρια RNA, για παράδειγμα tRNA που δεν έχει αναδιπλωθεί σωστά.

Εικόνα 2. Τα 2 μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA στα φυτά (Belostotsky and Sieburth, 2009) .



Πίνακας 2. Παράγοντες του *Arabidopsis Thaliana* που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του RNA στο κυτταρόπλασμα (Belostotsky and Sieburth, 2009).

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

Αποαδενυλάσες

Ορισμός:

Ως αποαδενυλάσες ορίζουμε τις εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολύ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας 5'-AMP. Το κύριο υπόστρωμα των αποαδενυλασών είναι οι 3'- πολυ(A) ουρές. Έχει δειχτεί, όμως, το σε ορισμένες περιπτώσεις ότι αποικοδομούν, λιγότερο αποτελεσματικά, και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή (Goldstrohm and Wickens, 2008). Βασικό γνώρισμα των γνωστών αποαδενυλασών είναι ότι είναι Mg²⁺-εξαρτώμενα ένζυμα.

Οι γκάμες των αποαδενυλασών που μπορούμε να συναντήσουμε διαφέρουν για κάθε είδους οργανισμού. Παραδείγματος χάριν, μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και Angel είναι παρόντα σε όλους τους ευκαρυώτες, ενώ άλλες αποαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες (π.χ. η *Drosophila melanogaster* στερείται τόσο της PARN όσο και της CAF1Z (Goldstrohm and Wickens, 2008). Υπάρχουν αποαδενυλάσες που στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs και αποδίδουν έτσι υψηλό βαθμό εξειδίκευσης στον μηχανισμό αποικοδόμησης του mRNA, ενώ υπάρχουν και διαφορετικές αποαδενυλάσες που

μπορούν να δράσουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες, που αποδίδουν μεγαλύτερη ευελιξία και προσαρμοστικότητα.

Κατάταξη:

Υπάρχουν δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες αποαδενυλασών, ανάλογα με την παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο. Η **DEDD** υπερ-οικογένεια έχει λάβει το όνομά της από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης, τα οποία συντονίζουν τα ιόντα Mg^{2+} . Σε αυτή την ομάδα κατατάσσονται η αποαδενυλάση *POP2* (γνωστή και ως *CAF1*), η *CAF1Z*, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (*PARN*), καθώς και οι οικογένειες των *PAN2* αποαδενυλασών. Από την άλλη μεριά η υπερ-οικογένεια των εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών (**exonuclease-endonuclease-phosphatase, EEP**), περιλαμβάνει αποαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Σε αυτή την ομάδα κατατάσσονται οι αποαδενυλάσες *Nocturnin*, *CCR4* και *Angel*.

Βιολογικός Ρόλος:

Εκτός από την βασική λειτουργία της αποικοδόμησης του συνόλου των μεταγράφων και των ελλατωματικών, οι αποαδενυλάσες μπορεί να έχουν και αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς ρόλους. Μερικές είναι σημαντικές για την επιβίωση των οργανισμών, ενώ μεταλλάξεις αυτών μπορεί να προκαλέσουν ποικιλία φαινοτύπων. Επιπλέον, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες είναι απαραίτητες για συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες, γεγονός που αποδεικνύει πως ο έλεγχος ορισμένων mRNAs είναι καθοριστικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία αυτών των διεργασιών (Goldstrohm and Wickens, 2008; Parke and Song, 2004). Παραδείγματος χάριν, αρκετές αποαδενυλάσες, συμπεριλαμβανομένων της *PARN* του *Xenopus laevis* και της *CCF-1* του *C. elegans*, είναι σημαντικές κατά την πρώιμη ανάπτυξη, ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα (όπως η *CNOT7* στα ποντίκια) και τη μεταβολική ομοιόσταση (ποντίκια που στερούνται *Nocturnin*, λαμβάνουν λιγότερο σωματικό βάρος και λίπος σε σύγκριση με τα ποντίκια που τη διαθέτουν, κάτω από ίδιες συνθήκες διατροφής και συμπεριφοράς).

Έλεγχος Δραστικότητάς:

Η αποτελεσματικότητα της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNAs. Αυτή η διαδικασία ελέγχεται από παράγοντες-ρυθμιστές οι οποίοι προσδένονται ειδικά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες των mRNAs. Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3' αμετάφραστες περιοχές συγκεκριμένων mRNAs (3'-UTR) ενισχύουν την αποαδενυλίωση τους. Αυτά τα στοιχεία δεσμεύονται από παράγοντες οι οποίοι στρατολογούν συγκεκριμένες αποαδενυλάσες προωθώντας έτσι την αποαδενυλίωση. Τέτοια παραδείγματα παραγόντων που δεσμεύονται στις 3'-UTR περιοχές μορίων mRNA αποτελούν οι CUG-BP, miRNAs, PUF και CPEB (Goldstrohm and Wickens, 2008; Kadyrova et al., 2007; Hook et al., 2007). Εναλλακτικά, προώθηση της αποαδενυλίωσης μπορεί να επιτευχθεί και μέσω αλληλεπίδρασης της PABP και συγκεκριμένων αποαδενυλασών (π.χ η PABP στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3). Άλλος ένας ρυθμιστικός παράγοντας, είναι η 5' καλύπτρα του mRNA που μπορεί να

επηρεάσει θετικά την αποαδενυλίωση αυξάνοντας την δραστικότητα κάποιων αποαδενυλασών όπως η PARN.

Ένα μέσο ρύθμισης της αποαδενυλίωσης είναι και η *έκφραση* των αποαδενυλασών που ανάλογα με το πού και πότε εκφράζονται (όπως επίσης και η έκφραση των αντίστοιχων ρυθμιστών τους) επηρεάζουν τον χρόνο και τον τόπο που μπορεί να γίνει ρύθμιση της αποαδενυλίωσης. Για παράδειγμα, η έκφραση της νοκτουρνίνης είναι ρυθμική και ελέγχεται από τον κερκάδιο ρυθμό, ενώ οι αποαδενυλάσες της οικογένειας των POP2 είναι ιδιοσυστατικές. Επίσης, κάτω από διάφορες μορφές stress (UV, οξειδωση, οσμωτική πίεση ή έλλειψη γλυκόζης) η ρύθμιση της αποαδενυλίωσης μπορεί να μεταβληθεί ώστε επαγωγικά να μεταβληθεί και η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ως απάντηση του κυττάρου στον στρεσογόνο παράγοντα. Ο χώρος εντοπισμού των αποαδενυλασών παίζει επίσης ρόλο στην ρύθμιση της αποαδενυλίωσης. Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται επίσης από δύο μορφές χωρικού ελέγχου: τον πυρρηνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών και την εντόπισή τους σε κοκκία. Στην περίπτωση που προκύψει λανθασμένος διαχωρισμός των αποαδενυλασών μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος μπορεί να αποικοδομηθούν mRNAs που δεν θα έπρεπε να αποικοδομηθούν. Από τη άλλη μεριά, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία, τα οποία περιέχουν κατασταλμένα mRNAs, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ενεργοποιηθούν. *Η συν-εντόπιση αυτών των αποαδενυλασών με τα υποστρώματα τους πιθανότατα διευκολύνει την κινητική της αποαδενυλίωσης* (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Ένας άλλος παράγοντας που ρυθμίζει τη δραστικότητα των αποαδενυλασών είναι και το γεγονός ότι δρουν σε σύμπλοκα, με τον ρόλο των ρυθμιστικών παραγόντων να παίζουν οι άλλες προτεΐνες των συμπλόκων. Παραδείγματος χάριν, η PAN2 δεσμεύεται στην PAN3 που με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την PABP και τελευταία στρατολογεί όπως αναφέρθηκε το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στην πολυ(A) ουρά των mRNA-στόχων (Hammet et al., 2002). Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι άλλες αποαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή, αυξάνοντας έτσι σημαντικά την ποικιλία των συμπλόκων των αποαδενυλασών, καθώς διαφορετικά ετεροδιμερή έχουν και διαφορετικές ενζυμικές και ρυθμιστικές ιδιότητες. Όλα αυτά (αλληλεπίδραση των πολυάριθμων πιθανών συμπλόκων αποαδενυλασών, τεράστια ποικιλία των ρυθμιστών των αποαδενυλασών, μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ρυθμιστικών στοιχείων επί των 3'-UTR περιοχών των mRNA-στόχων) προσδίδουν υψηλού βαθμού και ιδιαίτερη πολυπλοκότητα στην αποαδενυλίωση των mRNA (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Στον **Πίνακα 3** παρουσιάζεται συνοπτικά η κατάταξη των αποαδενυλασών στις δύο υπερ-οικογένειες καθώς και ενδεικτικά παραδείγματα ενζύμων που εντοπίζονται σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών.

Πίνακας 3. Συνοπτική κατάταξη των αποαδενυλασών (Goldstrohm and Wickens, 2008).

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

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

Μελετημένες αποαδενυλάσες στο *Arabidopsis thaliana*:

Σε γενικές γραμμές είναι λίγες οι μελέτες που έχουν εκπονηθεί σχετικά με τις αποαδενυλάσες στα φυτά.

AtPARN:

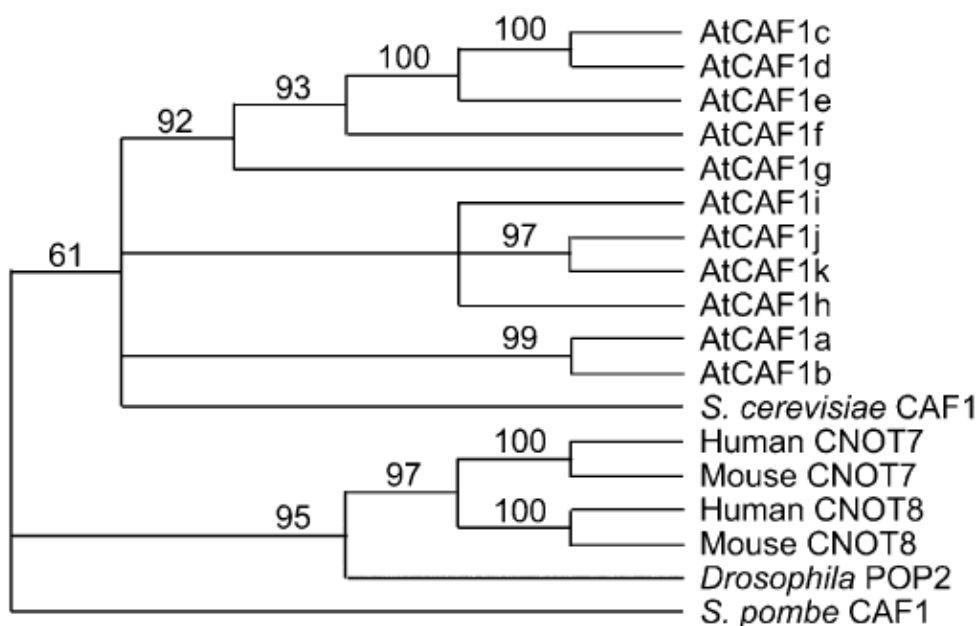
Στο *Arabidopsis*, έχει μελετηθεί το ομόλογο της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN). Η PARN είναι μία αποαδενυλάση που πρωτοχαρακτηρίστηκε σε θηλαστικά ενώ απουσιάζει από τη ζύμη και τη *Drosophila* (Πίνακας 3). Η PARN του *Arabidopsis* (AtPARN) που εκφράστηκε σε κύτταρα *E.coli* διαθέτει αποικοδομητική ενεργότητα *in vitro*, γεγονός που συνδέεται με την ύπαρξη συντηρημένων περιοχών και κατάλοιπων αμινοξέων που είναι σημαντικά για την καταλυτική ενεργότητα (Reverdatto 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 μονόκλιωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν επιστρατεύει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA. Τα πειράματα πρωτεϊνικού εντοπισμού σε φυτικά κύτταρα δείχνουν ότι η AtPARN βρίσκεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα.

Ακόμη, πειράματα με μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της AtPARN δείχνουν ότι το γονίδιο της είναι σημαντικό κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης. Αν και, μέχρι τώρα, δεν έχουν απενεργοποιηθεί ομόλογα γονίδια της AtPARN σε άλλους οργανισμούς, όλες οι παρατηρήσεις φανερώνουν τη σημαντικότητα του ενζύμου και τη χρησιμότητά του σε πολλούς άλλους πολυκύτταρους οργανισμούς (Chiba et al., 2003).

AtCAF1:

Η φαινοτυπική ανάλυση του των μεταλλαγμάτων *caf1* που έχει γίνει σε μια σειρά των πρότυπων οργανισμών, καταδεικνύει ότι η CAF1 είναι ζωτικής σημασίας για ένα ευρύ φάσμα των βιολογικών διαδικασιών. Μια μελέτη βρήκε ότι η υπερέκφραση ενός ομολόγου CAF1 της πιπεριάς (*Capsicum annuum CaCAF1*) στην ντομάτα οδήγησε στην αύξηση της αντίστασης στο παθογόνο *Phytophthora oomycete infestans*. Αντιθέτως, όταν αποσιωπείται η *CaCAF1* στο πιπέρι υπάρχει σημαντική καθυστέρηση στην ανάπτυξη του φυτού και υπάρχει μεγαλύτερη ευαισθησία στο παθογόνο *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria*. Στο *Arabidopsis* έχουν βρεθεί 11 *caf1* γονίδια εκ των οποίων 2 γονίδια ταυτοποιήθηκαν, τα AtCAF1a και AtCAF1b που φαίνεται να απαντούν σε ορμονικούς και στρεσογόνους παράγοντες όπως το Ιασμονικό Οξύ, ο τραυματισμός του φυτού, το κρύο και παθογόνα. Επίσης, πειράματα αποδεικνύουν ότι τα AtCAF1a και AtCAF1b έχουν ελαφρά επικαλυπτόμενο ρόλο και ότι μπορούν να *στοχεύουν συγκεκριμένα* mRNAs (Justin W. Walley et al. 2010)

Εικόνα 3. Φυλογενετικό δέντρο της οικογένειας των CAF1 στο *Arabidopsis* (Justin W. Walley 2010).



Κιρκαδικό Ρυθμοί

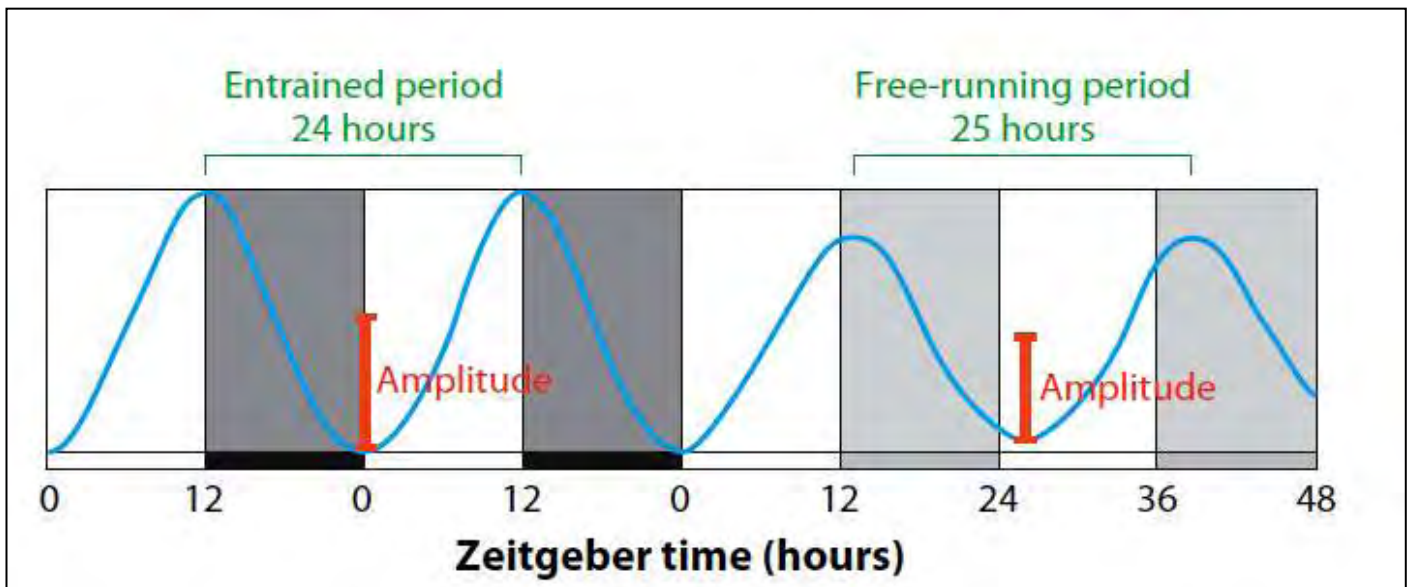
Χαρακτηρισμός και διάδοση του Κιρκαδικού Συστήματος:

Καθώς η γη περιστρέφεται γύρω από τον άξονά της, η μέρα διαδέχεται τη νύχτα. Καθώς η γη περιστρέφεται γύρω από τον ήλιο, οι εποχές διαδέχονται η μία την άλλη. Οι αλλαγές στο περιβάλλον είναι ατελείωτες. Κάποιες είναι μοναδικές και κάποιες επαναλαμβάνονται περιοδικά. Οι ζώντες οργανισμοί αντιλαμβάνονται αυτές τις αλλαγές και προσαρμόζουν ανάλογα την βιοχημική συμπεριφορά τους και την φυσιολογία τους. Η εναλλαγή μεταξύ μέρας και νύχτας και οι συνθήκες που αυτή επιβάλλει, είναι πολύ σημαντικές για την επιβίωση των οργανισμών. Γι αυτό οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που τους βοηθούν να αντιλαμβάνονται έμφυτα το χρόνο ακόμα και χωρίς την εφαρμογή κάποιου εξωγενούς ερεθίσματος, με στόχο να κρατούν μια ενδογενή περιοδικότητα και να αποφεύγουν τις συχνές ραγδαίες μεταπτώσεις στην φυσιολογία τους. Παραδείγματα τέτοιων λειτουργιών είναι ο κύκλος ύπνου/αφύπνισης στα ζώα, αναπτυξιακές μεταβάσεις σε νηματοειδείς μύκητες, η συχνότητα των καρδιακών προσβολών σε ανθρώπους, και οι αλλαγές στη θέση του οργάνου στα φυτά. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν αυτούς τους ενδογενείς περιοδικούς ρυθμούς ονομάζονται **κιρκάδια ρολόγια**.

Οι εν λόγω διαδικασίες, ορίζονται ως αποτέλεσμα του κιρκαδικού ρυθμού και όχι απλές απαντήσεις στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, αν πληρούν τα ακόλουθα κριτήρια. Πρώτον, οι κιρκαδικοί ρυθμοί εξακολουθούν να ισχύουν με περιοδικότητα περίπου (αλλά ποτέ ακριβώς) 24-ώρες μετά την μεταφορά ενός οργανισμού από ένα περιβάλλον που ποικίλλει ανάλογα με την ώρα της ημέρας σε ένα αμετάβλητο περιβάλλον. Δεύτερον, ο χρόνος της έναρξης αυτών των ρυθμών μπορεί να μηδενιστεί με τα κατάλληλα περιβαλλοντικών συνθήματα, όπως αλλαγές στα επίπεδα του φωτός ή της θερμοκρασίας. Τέλος, οι κιρκαδικοί ρυθμοί εμφανίζονται με περίπου την ίδια περιοδικότητα σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών. Αυτό τελευταίο χαρακτηριστικό επιτρέπει στο κιρκαδικό σύστημα να διατηρήσει την ακριβή ώρα, ακόμη και όταν συνθήκες περιβάλλοντος είναι κρύες ή ζεστές.

Κιρκαδικοί ρυθμοί συχνά παίρνουν τη μορφή ημιτονοειδών κυμάτων που μπορούν να περιγραφούν με μαθηματικούς όρους, όπως η περίοδος, φάση, και το πλάτος. Περιβαλλοντικά συνθήματα, όπως το φως, μπορούν να επανασυγχρονίσουν το ρολόι και μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη ρυθμική ένταση του αποτελέσματος του ρολογιού. Ως σύμβαση, έχουμε ορίσει, το χρονικό σημείο έναρξης ενός σήματος που επαναφέρει το ρολόι, ως **Zeitgeber** («Δωρητής του χρόνου») το χρόνο 0, συντομογραφία ΖΤ0. Μετά την τελευταία μετάβαση υπό συνθήκες φωτός (**Εικόνα 4**), η διάρκεια ΖΤ0-ΖΤ12 αντιπροσωπεύει την υποκειμενική ημέρα, το διάστημα που ο οργανισμός έχει εκτεθεί στο φως, ενώ το διάστημά ΖΤ12-ΖΤ24 αντιπροσωπεύει την υποκειμενική νύχτα (Stacey L. Harmer 2009).

Εικόνα 4. Ένα ιδανικό κιρκαδικό ρολόι απεικονίζεται με κύκλους φωτός/σκότους (συνθήκες χειρισμού όπου ο οργανισμός «εκπαιδεύεται» και με κατάσταση συνεχούς φωτός. Η περίοδος αυτού του αποτελέσματος είναι ακριβώς 24 ώρες κύκλοι φωτός/σκότους, λόγω της «εκπαίδευση» του ρολογιού από φως. Ωστόσο, σε σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες, αποκαλύπτεται η μεταβολή στην περιοδικότητα εντός 25 ωρών αντί 24.



Οι κίρκαδικόι ρυθμοί έχουν μελετηθεί εντατικά στα φυτά από τον 18ο αιώνα (τα ζώα δεν αναγνωρίζονται να έχουν ως κίρκαδικά ρολόγια έως τον 20ο αιώνα (McClung CR. 2006). Με πειράματα που έγιναν σε διάφορους οργανισμούς μοντέλα, αποδείχθηκε ότι όχι μόνο οι κίρκαδικόι ρυθμοί σε ανόμοιους οργανισμούς συνεχίζουν να ισχύουν υπό συνεχή περιβαλλοντικές συνθήκες και δείχνουν αντιστάθμιση σε διαφορετικές θερμοκρασίες, αλλά και να ανταποκρίνονται με παρόμοιο τρόπο σε ερεθίσματα που επαναφέρουν το ρολόι. Αν και η ευαισθησία του ρολογιού στα διάφορα ερεθίσματα μπορεί να διαφέρει κατά τη διάρκεια της ημέρας. Ένα άλλο σημείο της ομοιότητας μεταξύ των ρολογιών σε διαφορετικούς οργανισμούς είναι η κυτταρική αυτονομία. Εκλεπτυσμένα πειράματα χειρισμού που εξετάζουν ρυθμούς της γονιδιακής έκφρασης δείχνουν ότι υπάρχει λίγη ή δεν υπάρχει καθόλου επικάλυψη μεταξύ των ρολογιών των κυττάρων που βρίσκονται στο ίδιο όργανο.

Ένας πιθανός λόγος, γιατί τα κίρκαδικά ρολόγια είναι τόσο ευρέως διαδεδομένα στους οργανισμούς, είναι ότι επιτρέπουν στους οργανισμούς να προβλέπουν τακτικές αλλαγές στο περιβάλλον και να συγχρονίζουν διαφορετικές φυσιολογικές διεργασίες μεταξύ τους. Ένα πλεονέκτημα των κίρκαδικών ρολογιών σε σχέση με ένα άλλο σύστημα που θα μέτραγε αντίστροφα από την έναρξη ενός ερεθίσματος, όπως η έναρξη της φωτοπεριόδου, είναι ότι τα κίρκαδικά ρολόγια επιτρέπουν την διαφορική ρύθμιση των εκφράσεών τους, έτσι ώστε παραδείγματος χάριν, η κορυφή της έκφρασης να συμβαίνει την σωστή στιγμή, ακόμη και η περίοδος του φωτός αλλάζει.

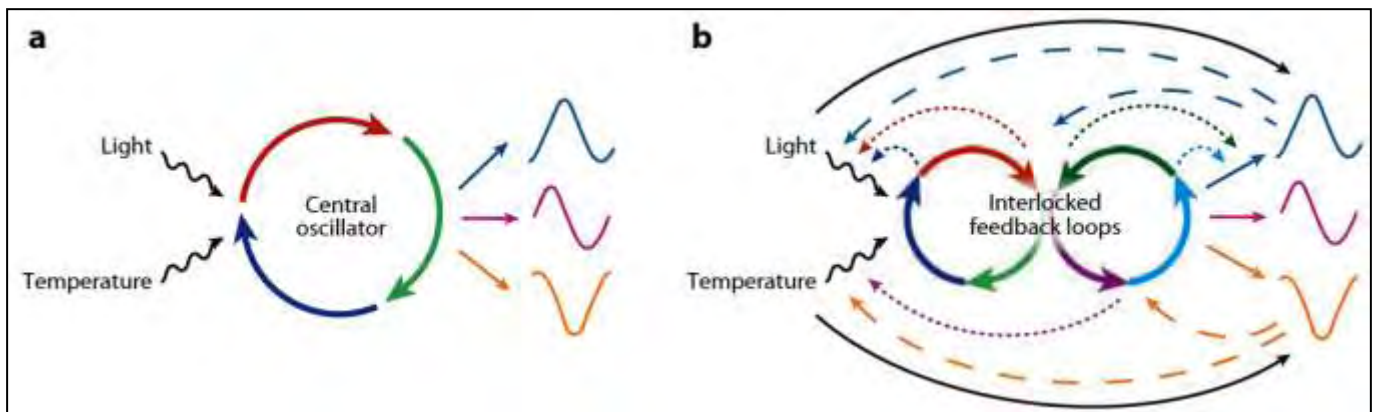
Οργάνωση του Κίρκαδικού Συστήματος:

Παρόλο που με πρώτη ματιά θα μπορούσαμε να περιγράψουμε το Κίρκαδικό Σύστημα ως ένα κεντρικό ρολόι ή ένα ταλαντωτή που δημιουργεί ρυθμικές επαγωγές μέσω ειδικών μονοπατιών σηματοδότησης, και που αυτός ο ταλαντωτής μπορεί να επανασυγχρονισθεί από περιβαλλοντικά σήματα, όπως το φως ή τη θερμοκρασία (Εικόνα 5a) στην πραγματικότητα είναι ένα πολύ πιο πολύπλοκο σύστημα. Το κεντρικό ρολόι είναι πιθανό να αποτελείται από πολλαπλούς συμπλεκόμενους βρόχους ανάδρασης, ενώ οι εκφράσεις του ρολογιού μπορεί επίσης να ρυθμίζονται ευθέως από

μονοπάτια σηματοδότησης που εισάγουν εξωτερικά ερεθίσματα στο ρολόι εισόδου, και τα συστατικά του ρολογιού μπορούν να ενεργούν τόσο στο κεντρικό ρολόι όσο και στα μονοπάτια σηματοδότησης και εισόδου και εξόδου σημάτων (**Εικόνα 5b**) (Stacey L. Harmer 2009).

Επειδή οι κερκαδικοί ρυθμοί είναι κυτταρικά αυτόνομοι, οι πολυκύτταροι οργανισμοί περιέχουν πολλαπλά ρολόγια. Ωστόσο, δεν υπάρχουν πειστικά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι υπάρχουν πολλαπλά ρολόγια μέσα στα μεμονωμένα κύτταρα των ζώων. Αντίθετα, υπάρχουν ενδείξεις ότι μονοκύτταροι οργανισμοί, όπως η φύκη *Lingulodinium polyedrum*, έχουν πολλαπλούς ταλαντωτές.

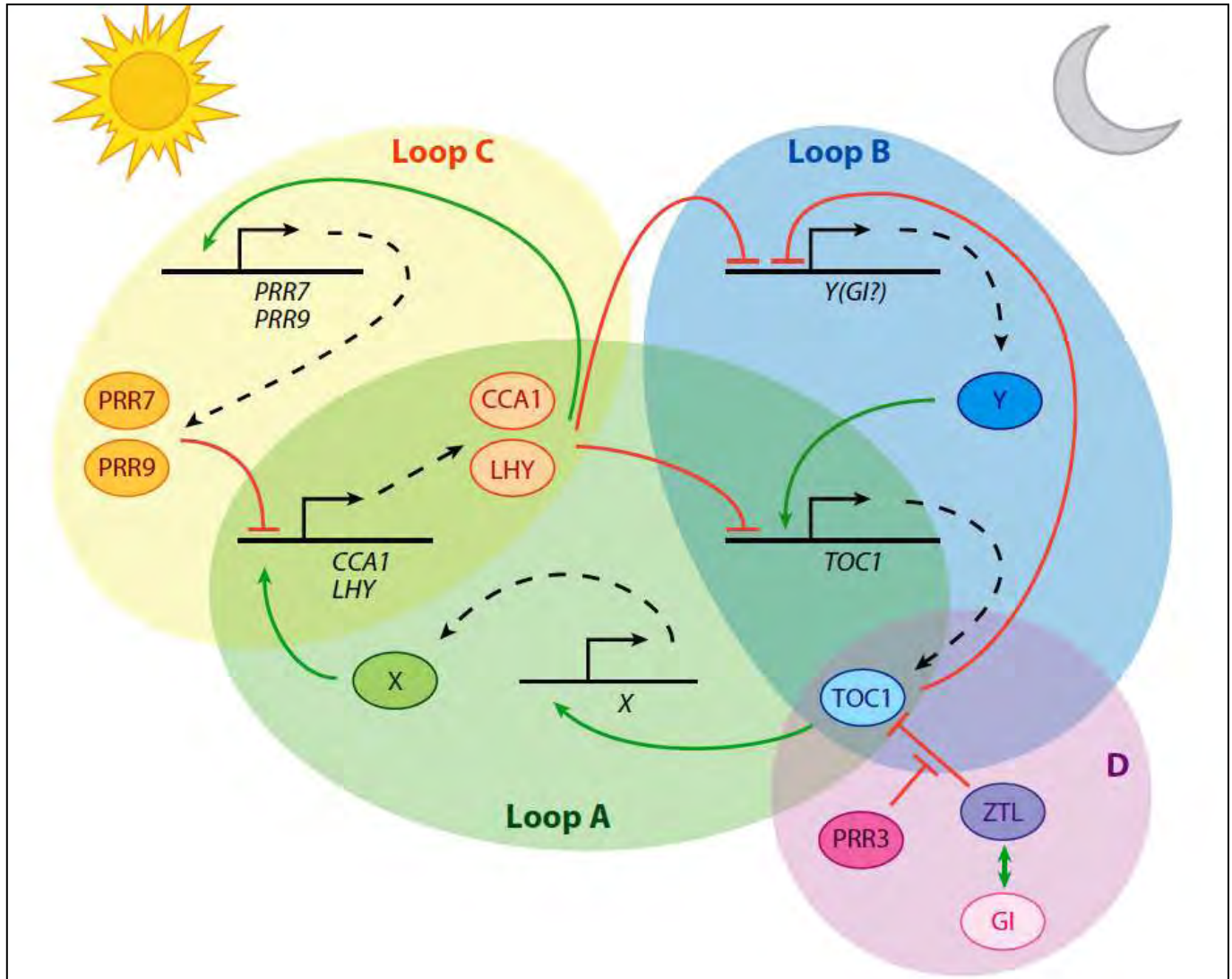
Εικόνα 5. Μοντέλα του ρολογιού ως μια γραμμική πορεία σηματοδότησης και ως σηματοδοτικό δίκτυο. **(a)** Τα πρώτα μοντέλα του κερκαδιανού συστήματος υπονοούν ότι έχει κατασκευασθεί από τρία διακριτά μέρη: ένα κεντρικό ταλαντωτή ή ρολόι, μονοπάτια επανασυγχρονισμού που αλλάζουν τη φάση του ρολογιού για την αντιμετώπιση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων όπως το φως και η θερμοκρασία, καθώς και μια ποικιλία ρυθμικών εκφράσεων εξόδου. **(b)** Συσσωρευμένα στοιχεία που προτείνουν αντ' αυτού ότι το κερκαδικό σύστημα είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο. Ο ταλαντωτής αποτελείται από πολλαπλούς συνδυασμούς βρόγχων ανάδρασης (στερεού χρώματος γραμμές). Τα γονίδια του ρολογιού συχνά έχουν πολλαπλές λειτουργίες, που ενεργούν τόσο στο εσωτερικό του ταλαντωτή όσο και στα μονοπάτια σηματοδότησης εισόδου και εξόδου του ρολογιού (διακεκομμένες γραμμές). Τα σήματα εξόδου μπορούν να ανατροφοδοτήσουν το σύστημα και να επαναρυθμίσουν τα συστατικά του ρολογιού ή και τα μονοπάτια σηματοδότησης (διακεκομμένες γραμμές). Το ίδιο μπορούν να κάνουν και τα σήματα εισόδου (στερεές μαύρες γραμμές).



Μοριακή βάση των κερκαδικών ρυθμών:

Ο πρώτος βρόγχος που ταχτοποιήθηκε αποτελείται από τρία συστατικά: το *TOC1*, γνωστό επίσης ως *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 1 (PRR1)*, που είναι ένα απογευματινής έκφρασης γονίδιο που ρυθμίζεται από το ρολόι και που η μοριακή λειτουργία του δεν έχει διερευνηθεί πλήρως. Το *TOC1* κωδικοποιεί για έναν ρυθμιστή (pseudo-response regulator), του οποίου η έκφραση έχει μέγιστο το σούρουπο. Μεταλλάξεις στο *TOC1* μικραίνουν την περίοδο όλων των κερκαδικών ρυθμών που έχουν ελεγχθεί μέχρι τώρα. Επιπρόσθετα, αύξηση στη δόση του *TOC1* μεγαλώνει την περίοδο των κερκαδικών ταλαντωτών ενώ η υπερέκφρασή του από έναν ιδιοσύστατο υποκινητή προκαλεί αρρυθμία. Η πρωτεΐνη *TOC1* που εντοπίζεται στον πυρήνα προάγει έμμεσα την έκφραση δύο, καθοδικών

μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την οικογένεια Myb, των *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (CCA1) και *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (LHY). Οι πρωτεΐνες CCA1 και LHY έχουν μερικώς πλεονάζουσες λειτουργίες. Δεσμεύονται άμεσα στον υποκινητή του *TOC1* και αναστέλλουν την έκφραση του. Αυτή η αρνητική ανάδραση συνεπώς αποτελείται από τα CCA1, LHY, *TOC1*, και ένα άγνωστος X συστατικό που πιστεύεται ότι δρα μεταξύ του *TOC1* και των υποκινητών των CCA1 και LHY (Εικόνα 6, βρόγχος Α



Θεωρείται όμως, ότι υπάρχει και ένας βρόγχος απογευματινής φάσης που περιέχει ένα άγνωστο συστατικό Y, που ρυθμίζει θετικά την έκφραση του *TOC1*, ενώ με την σειρά του ρυθμίζεται αρνητικά από τα *TOC1*, CCA1 και LHY (Εικόνα 6, Βρόγχος Β).

Το γονιδίωμα του *Arabidopsis* περιέχει 4 πρωτεΐνες παραπλήσιες του *TOC1*, τις *PRR3*, 5, 7, 9 οι οποίες και αυτές έχουν ένα συντηρημένο τοπικά μοτίβο, το CCT, οποίο επάγει ένα σήμα εντοπιζόμενο στον πυρήνα. Ένας συνδυασμός πειραματικών μελετών και εκπόνησης μοντέλων προτείνει ότι τα CCA1 και LHY την προωθούν την έκφραση των *PRR7* και *PRR9*. Και τα δύο πρωινής φάσης γονίδια, *PRR7* και *PRR9* αναστέλλουν κατά κάποιο τρόπο την έκφραση των CCA1 και LHY. Έτσι CCA1, LHY, *PRR7*, και *PRR9* πιστεύεται ότι αποτελούν ένα ή δύο το πρωινής φάσης βρόγχους ανάδρασης (Εικόνα 6, Βρόγχος C).

Η σταθερότητα και η μετάφραση μερικών mRNAs επηρεάζονται από το κίρκαδικό ρολόι και από φωτεινά σήματα, και η αφθονία πολλών πρωτεϊνών του ρολογιού είναι κάτω από μεταμεταφραστικό έλεγχο. Μια τέτοια ταυτοποιημένη πρωτεΐνη είναι η ZTL, η οποία περιέχει ένα F-box μοτίβο και είναι μέρος του συμπλόκου Skp/Cullin/F-box (SCF) E3 ουβικουϊτίνης- λιγάσης. Η ZTL επίσης περιέχει ένας επίτοπο LOV, με μια φλαβινο μονονουκλετιδική περιοχή δέσμησης που παρέχει τη δυνατότητα να αντισταθμίζεται το μπλε φως. Η ZTL αλληλεπιδρά τόσο με την TOC1 όσο και με την PRR5, κάτι που οδηγεί σε αποικοδόμηση μέσω του μονοπατιού του πρωτεοσώματος. Μελέτες δείχνουν πως η ZTL αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη GIGANTEA (GI) κάτω από την επίδραση μπλε φωτός που σταθεροποιεί έτσι το σύμπλοκο των δύο πρωτεϊνών και εμποδίζει την ZTL να αλληλεπιδράσει με άλλα υποστρώματα. Αυτό οδηγεί σε ραγδαία αποικοδόμηση των ZTL και GI και των υποστρωμάτων τους TOC1 και PRR5 υπό συνθήκες σκότους (**Εικόνα 6, D**).

Μια πρόσφατη μελέτη προσθέτει μια επιπλέον πτυχή: το TOC1 συνδέεται άμεσα με την PRR3 με τρόπο που να παρεμβαίνει στη δέσμηση του TOC1 στη ZTL. Έτσι η PRR3 φαίνεται να σταθεροποιεί το TOC1 με την παρεμπόδιση της πρόσληψης στο σύμπλοκο SCF και να επακολουθεί αποικοδόμησή της από το πρωτεόσωμα (**Εικόνα 6, D**) (Stacey L. Harmer 2009).

Άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με το κίρκαδικό ρολόι των οποίων η αφθονία ρυθμίζεται από το φως και / ή το ρολόι περιλαμβάνουν τις LHY, μία ρυθμιστική υπομονάδα μιας κινάσης καζεΐνης 2 (Κινάση της καζεΐνης 2B4, CKB4), και XAP5 CIRCADIAN TIMEKEEPER (XCT), μια καινοτόμα πυρηνική πρωτεΐνη.

Επίσης η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών το ρολογιού μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του Κίρκαδικού Συστήματος αφού σε άλλες περιπτώσεις οδηγεί σε αποικοδόμηση και σε άλλες σε επαγωγή λειτουργίας όπως στην περίπτωση του CCA1.

Το κίρκαδικό σύστημα λειτουργεί ως ενωποιητής της σηματοδότησης, αλληλεπιδρώντας με πολλά άλλα σηματοδοτικά δίκτυα για να περιορίσει τις απαντήσεις των φυτών σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος στην πιο κατάλληλη ώρα της ημέρας. Αυτά τα μονοπάτια σηματοδότησης με τη σειρά τους μπορούν να ανατροφοδοτήσουν να επηρεάσουν τη λειτουργία του ρολογιού (Stacey L. Harmer 2009).

Στον παρακάτω **Πίνακα 4** φαίνονται κάποια Κιρκαδικά Γονίδια που ταχτοποιήθηκαν στο *Arabidopsis thaliana* (McClung, 2006):

Circadian Clock Phenotype				
Gene	Locus ID	Function	Loss-of-Function	Overexpression
<i>CCA1</i>	At2g46830	Single Myb domain transcription factor	Short period	Arrhythmic
<i>CKB3</i>	At3g60250	Casein kinase II regulatory subunit	Not known (gene family)	Short period
<i>CRY1</i>	At4g08920	Blue light photoreceptor	Long period in blue light	Short period in blue light
<i>CRY2</i>	At1g04400	Blue light photoreceptor	Long period in blue light	Short period in blue light
<i>DET1</i>	At4g10180	Repressor of photomorphogenesis	Short period	Not known
<i>ELF3</i>	At2g25930	Unknown	Arrhythmic in continuous light	Long period
<i>ELF4</i>	At2g40080	Unknown	Arrhythmic	Not known
<i>GI</i>	At1g22770	Unknown	Short period, low amplitude	Short period, low amplitude
<i>LHY</i>	At1g01060	Single Myb domain transcription factor	Short period	Arrhythmic
<i>LUX</i>	At3g46640	Myb transcription factor	Arrhythmic	Arrhythmic
<i>PHYA</i>	At1g09570	Red light photoreceptor	Long period in far-red light	Short period in far-red light
<i>PHYB</i>	At2g18790	Red light photoreceptor	Long period in red light, leading phase in white light	Short period in red light, lagging phase in white light
<i>PIF3</i>	At1g09530	Basic helix-loop-helix transcription factor	Wild type	Wild type
<i>PRR3</i>	At5g60100	Pseudo-response regulator	Short period	Wild type
<i>PRR5</i>	At5g24470	Pseudo-response regulator	Short period	Low amplitude, long period
<i>PRR7</i>	At5g02810	Pseudo-response regulator	Long period	Not known
<i>PRR9</i>	At2g46790	Pseudo-response regulator	Long period	Short period
<i>SRR1</i>	At5g59560	Unknown	Leading phase, low amplitude	Not known
<i>TIC</i>		Gene not yet identified	Short period, low amplitude	Not known
<i>TOC1</i>	At5g61380	Pseudo-response regulator	Short period	Arrhythmic
<i>ZTL</i>	At5g57360	F-box protein	Long period	Arrhythmic

Λίγα λόγια για το φυτό *Arabidopsis thaliana*

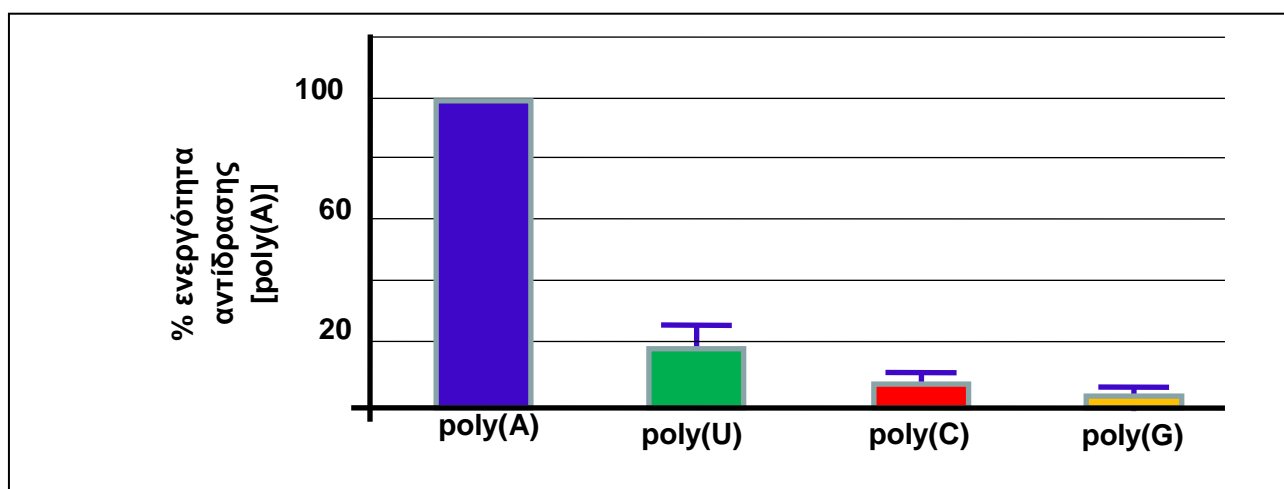
Είναι ένα μικρό ποώδες φυτό που ευδοκimeί στην Ευρώπη, στην Ασία και την Βορειοδυτική Αφρική. Πρωτοανακαλύφθηκε το 1577 στα βουνά Harz από τον Johannes Thal και το όνομά του προκύπτει από το ελληνικό “Αραβιδόψις” (μειάζει με Αραβίδα) και από το επίθετο του Thal. Έχει σχετικά μικρό κύκλο ζωής. Έχει μικρό γονιδίωμα — με 157 εκ. bps και 5 χρωμοσώματα, με 27,000 γονίδια που κωδικοποιούν 35,000 πρωτεΐνες. Είναι λοιπόν εύκολη η γενετική χαρτογράφηση και η αλληλούχιση του γονιδιώματος. Έχει μικρό μέγεθος (γύρω στα 25cm) και μικρό κύκλο ζωής (ολοκληρώνει τον κύκλο ζωής του σε περίπου 2 μήνες). Το μικρό του μέγεθος βολεύει ώστε να καλλιεργηθεί σε κλειστούς χώρους και επιπλέον δίνει πολλές χιλιάδες σπόρους. Επίσης, η αυτογονιμοποίηση που μπορεί να κάνει, εξυπηρετεί τα γενετικά πειράματα. Η γενετική μεταμόρφωση του *Arabidopsis* είναι πλέον ρουτίνα, με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens* για την ένθεση DNA στο γονιδίωμα του φυτού (T-DNA insertion) Η περιοχή των εισαγωγών T-DNA έχει καθοριστεί για πάνω από 300.000 ανεξάρτητες διαγονιδιακές σειρές, και μέσα από βάσεις δεδομένων είναι εύκολη η πρόσβαση σε πληροφορίες αλλά και σε παραγγελία διαγονιδιακών σπόρων. Τέλος, το φυτό αυτό είναι χρήσιμο και για ανάλυση με μικροσκοπία φωτός, μιας που τα νεαρά φυτά εν όλω, και ποιο πολύ οι ρίζες τους είναι ιδιαίτερα διαφανείς.

AtNOC: Ταυτοποίηση και Χαρακτηρισμός

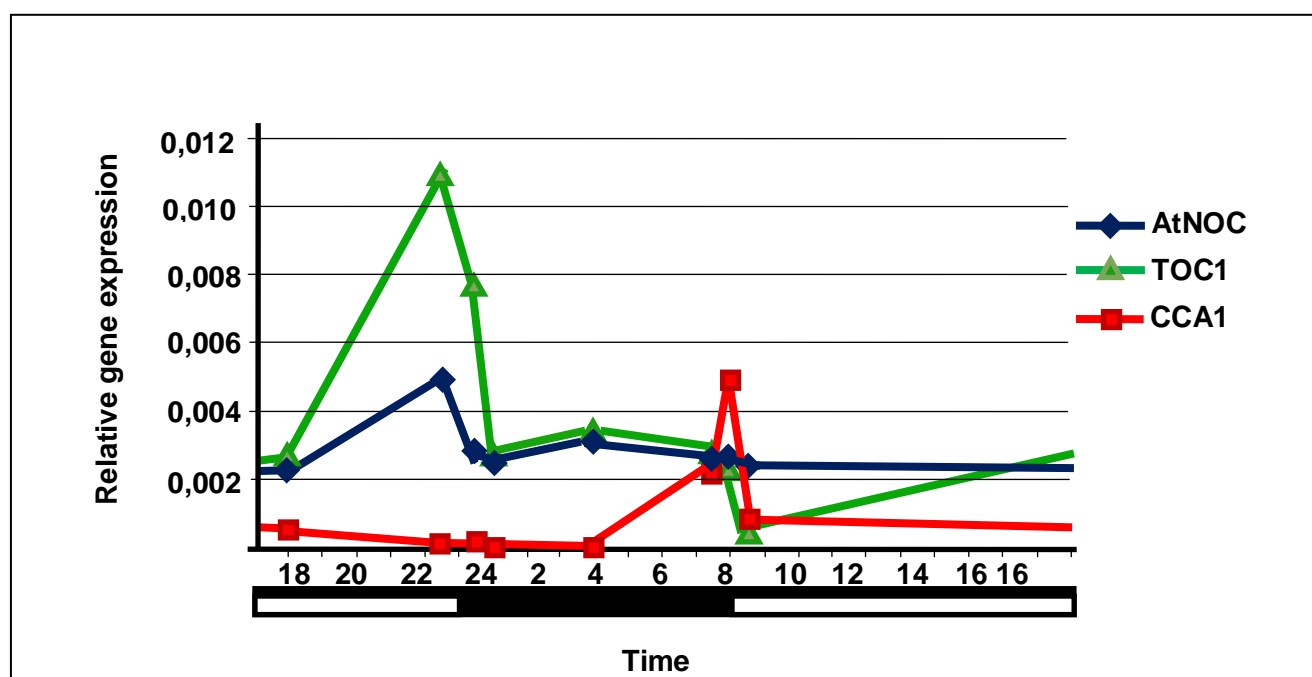
- ⊙ Η AtNOC είναι μια ιδιαίτερη Αποαδενυλάση γιατί όχι μόνο αποαδενυλιώνει συγκεκριμένα mRNAs αλλά επειδή δεν εκφράζεται ιδιοστατικά, αλλά ρυθμίζεται περιοδικά και από εξωγενή σήματα όπως η διάρκεια του φωτός. Στα ζώα η ομόλογη της AtNOC είναι η πρωτεΐνη Nocturnin ή οποία, ύστερα από ανάλυση της βάσης δεδομένων, φάνηκε ότι είναι μια νέα πρωτεΐνη με ακολουθία όμοια, μόνο στο C-τελικό άκρο, με την πρωτεΐνη Ccr4p του *Sacharomyces cerevisiae* που ταχτοποιήθηκε ως ένας μεταγραφικός συνενεργοποιητής. Μετά από ανάλυση των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν για παράγοντες με ομολογία με την νοκτουρνίνη, εντοπίστηκαν τρεις υποψήφιες αλληλουχίες με τα χαρακτηριστικά αυτά. Ακολούθως, σχεδιάστηκαν εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες PCR για την κλωνοποίηση. Στη συνέχεια, αφού επιλέχθηκε ένα από τα τρία υποψήφια γονίδια, κλωνοποιήθηκε ο παράγοντας σε φορείς υπερέκφρασης σε καλλιέργειες κυττάρων *E.coli*. Το επόμενο βήμα ήταν ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης. Στις αντιδράσεις που πραγματοποιήσαμε χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το πολυ(A) ώστε να διαπιστωθεί η τυχόν δράση αποαδενυλάσης.
 - > Παρατηρήθηκε πως οι καλύτερες συνθήκες για το ένζυμο είναι pH=6,5 και T=25°C. Η AtNOC παρουσιάζει $K_M = 0,34 \mu\text{g poly(A)/ml}$ και $V_{\max} = 6,2 \mu\text{g poly(A)/(ml} \times \text{min)}$.
 - > Παρατηρήθηκε ότι απουσία Mg^{+2} η ενεργότητα του ενζύμου είναι σχεδόν μηδενική, γεγονός που δείχνει πως το ένζυμο χρειάζεται τα ιόντα αυτά για να δράσει.

- > Παρατηρήθηκε ότι η ενεργότητα του ενζύμου AtNOC μειώνεται σημαντικά παρουσία του υποστρώματος πολυ(U), ενώ γίνεται σχεδόν μηδενική παρουσία των υποστρωμάτων πολυ(C) και πολυ(G) (Εικόνα7).
- > Για να εξεταστεί η έκφραση της AtNOC από τον κirkάδιο ρυθμό πραγματοποιήθηκαν real time PCR. Ως μάρτυρες κirkαδικής έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια TOC1 και CCA1, όπου είναι γνωστό πως υπόκεινται σε κirkαδική έκφραση (James et al. 2008). Παρατηρήθηκε ότι το γονίδιο AtNOC ακολουθεί την κατατομή έκφρασης του γονιδίου TOC1, παρουσιάζοντας μέγιστο έκφρασης λίγο πριν σταματήσει η έκθεση στο φώς, που σημαίνει ότι η έκφραση του γονιδίου AtNOC ρυθμίζεται από τον κirkάδιο ρυθμό. (Διπλωματική Εργασία Τουμασίδου Αναστασίας)

Εικόνα 7. Διαφορές στην ενεργότητα της AtNOC ανάλογα με το υπόστρωμα της αποαδενυλίωσης



Εικόνα 8. Η έκφραση της AtNOC σε σχέση με το χρόνο. Φαίνεται να έχει περιοδικότητα στην έκφρασή της με μέγιστη έκφραση λίγο πριν πέσει το σκοτάδι (το μαύρο τμήμα της χρονικής μπάρας αντιπροσωπεύει τις ώρες συσκότισης, ενώ τα λευκά τις ώρες που τα φυτά βρίσκονται υπό σταθερό φως). Ως μάρτυρες χρησιμοποιούνται τα γνωστά κirkαδικά γονίδια TOC1 και CCA1.



Η αλληλουχία του γονιδίου της AtNOC που κλωνοποιήθηκε είναι:

```
atgttagttctacaactctgcatcatcttctcctcgcgaatcttcttctccaggaaagttatctcgagaagaatgag
tacgaatcctgcaattgaaccaaagttcgaaaattgaatctgttgaaggagttgatattggttcaagaaataaatccg
atggatcagattccgtcttgtttcatataacatattagctcaggtttatgtgaagagtgacttctcccactctcca
cctgcctgtctcaaatggaaagctcgttcacatgcaattctcagcgttctcaaaaatctccaggctgatttctttgtct
gcaggaagtagatgagtagatagcttttacagaaataacatggactctctgggatattctgggatttatattcagagaa
ccggccagaggaagcgtgatggttgcaatcttctacaagccaagctgtgcagagttagtcacaaaggaacggatcgaa
tataatgatcttggactcaataaaagcagatagtgttcctgcagcgaacagaagattgagacatccaacgaaggaaa
agattctgaaaagacagtcgtgacctaatgatccactagtgagactaaaacgtgattgcgttgaataatggctgctt
ttaggatcaacaagccgttccagcatatcgttatcgtggcaaacacacatcttactgggaccctgaattggctgatgtc
aagcttgctcaagccaagtatctactgtcacgactagctcagttcaaaacactaatatcagatgaattgagtgacacc
ttcattgctactagctggcgacttcaattcaattcctggggataggtttgattcagtttcttacattgagttccctaa
ttgttcaatctatttgcaaaaataaaagattgggtttacggtggtaaaatcctgatactgtcgtcgtttccaggttta
tagttacctagatcgggtaatgctaaaccacagagaccatagaagaagaagaagctccagttcctctgtctagtgtct
Atgaagtcacaagaggagagcctaagttcacaattgcactcctggcttcacaacacacttgactacatcttcatctct
ccttcagacttcattaaacctgtgagtatccttcaactacctgagccggatttccagatgtgtcgggttcttaccgaa
tcatcatcaccgagtgatcattacctataggagctgagtttgagattcgtcgggaatag
```

Εμπεριέχοντας **1261** βάσεις

Η πρωτεϊνική αλληλουχία της Εσπερίνης είναι:

```
MFSSTTLHHLPRPNLLLPRKVISRRMSTNPAIEPKVRKFESVEGVDIGSRNKSDGIRFRLVSYNILAQVYVKSALLPHSPPA
CLKWKARSHAILSVLKNLQADFFCLQEVEYDSFYRNNMDSLGYSGIYIQRGTGQRKRDCGAIFYKPSCAELVTKERIEYN
DLVDSIKADSVSCSEQKIETSNEGKDSRKDSRDLNDPLVRLKRDCVGIMAAFRINKPFQHIVIVANTHLYWDPELADVKL
AQAKYLLSRLAQFKTLISDEFECTPSLLLAGDFNSIPGDMV
```

Έχοντας **285** αμινοξέα.

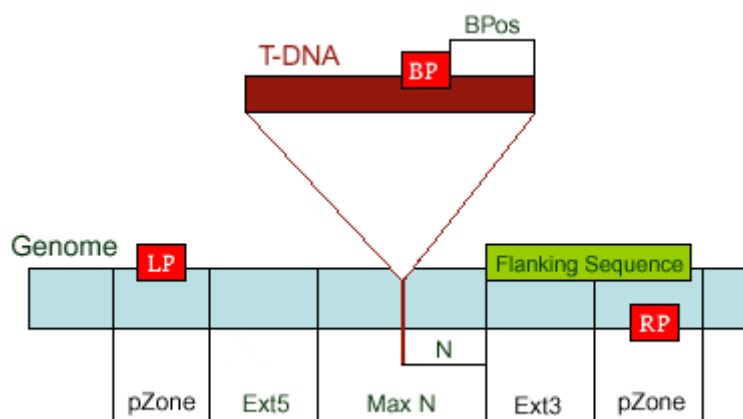
Σκοπός του πειράματος:

Η προσπάθειά μας στο παρών πείραμα ήταν, αφού πρότερα είχε ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί η AtNOC σαν Αποαδενυλάση που ρυθμίζεται από τον Κιρκάδιο Ρυθμό του φυτού, να καλλιεργήσουμε και να ταυτοποιήσουμε ομόζυγα φυτά που να έχουν αποσιωπημένο σε κάποιο εμφανή βαθμό το γονίδιο της AtNOC

Πειραματική Διαδικασία: Μεθοδολογία και Υλικά

T-DNA ένθεση – παραγωγή και καλλιέργεια μεταλλαγμένων σπόρων

Για να μελετήσουμε τις συνέπειες της αποσιώπησης του γονιδίου της Εσπερίνης AtNOC στο φυτό *Arabidopsis thaliana* παραγγείλαμε 5 παρτίδες mutant φυτά στα οποία σε κάθε παρτίδα σπόρων είχε γίνει ένθεση ενός μεγάλου τμήματος DNA μέσα στο γονίδιο της εσπερίνης ώστε να διακόπτεται η φυσιολογική αλληλουχία του γονιδίου και να μην εκφράζεται έτσι η φυσιολογική πρωτεΐνη. Η εισαγωγή του τμήματος DNA έγινε με την τεχνική της T-DNA ένθεσης (**Εικόνα 9**) και το τμήμα DNA που εισήχθη προέρχεται από τον vector pBIN-pROK2. Σε κάθε παρτίδα η ένθεση θα μπορούσε να έχει μπει σε διαφορετικά σημεία του γονιδίου και να έχει προκαλέσει αποσιώπηση με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικό βαθμό. Οι παρτίδες αυτές είναι οι: η χαρακτηρισμένη ως ετερόζυγη παρτίδα Het-Salk 104803 και οι χαρακτηρισμένες ως ομόζυγες παρτίδες Hom-Salk 105290c, Hom-Salk 079535c, Hom-Salk 37900c και Hom-Salk 127310c. Οι παρτίδες αυτές θεωρούντουσαν ως ετερόζυγη η πρώτη και ομόζυγες οι άλλες τέσσερις, αλλά σε κάθε περίπτωση έπρεπε να ελεγχθούν ως προς αυτό και να απομονώσουμε ομόζυγους απογόνους, από κάθε παρτίδα για τα επόμενα στάδια του πειράματος.



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής T-DNA Ένθεσης

Γι' αυτό επειδή το φυτό *Arabidopsis thaliana* μπορεί να κάνει αυτογονιμοποίηση, το καλοκαίρι (τέλη Μαΐου) φυτέψαμε μερικούς σπόρους από κάθε παρτίδα.

Πρώτα έγινε αποστείρωση των σπόρων. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, οι σπόροι έμειναν για 2 λεπτά σε διάλυμα 70% αιθανόλης και μετά, αφού η αιθανόλη αφαιρέθηκε, προστέθηκε διάλυμα πλύσης Buffer I (που στα 10 ml διαλύματος περιέχει 4 ml NaOCl, 6 ml dH₂O και 2 μl Tween 20). Οι σπόροι παρέμειναν στο διάλυμα πλύσης αυτό για 15 λεπτά, υπό ελαφρά ανάδευση. Κατόπιν

ακολούθησαν 10 διαδοχικές πλύσεις με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό, ώστε να απομακρυνθεί η χλωρίνη καλά.

Μετά οι σπόροι επιστρώθηκαν σε αποστειρωμένα τριβλία άγαρ 1% με θρεπτικό υλικό MS (προσθέσαμε 4,4 gr MS σε 1 L υγρό άγαρ) ^{*3}. Αρχικά τα τριβλία παρέμειναν overnight στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 4°C. Μετά τους αφήσαμε για 24 ώρες στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος τους αφήσαμε μία εβδομάδα σε θερμοκρασία δωματίου υπό φωτοπερίοδο 16ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι. Και κατά την αποστείρωση των σπόρων και κατά την επίστρωσή τους στα τριβλία φωρούσαμε καθαρά αποστειρωμένα γάντια μιας χρήσεως.

Όταν οι σπόροι εκβλάστησαν και είχαν μεγαλώσει αρκετά μέσα στα τριβλία μεταφτεύτηκαν (με μια λαβίδα τα παίρναμε από τα τριβλία και προσεχτικά τα ακουμπούσαμε στο νωπό χώμα) σε γλαστράκια με χώμα μαύρη τύρφη για να μεγαλώσουν και να δώσουν απόγονους που θα προέρχονταν από αυτογονιμοποίηση. Παρέμειναν έτσι σε δωμάτιο υπό θερμοκρασία περίπου 23°C και φωτοπερίοδο 16ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι. Τα ποτίζαμε συχνά, όταν ήταν εμφανές πως το χώμα στα γλαστράκια είχε χάσει σχεδόν όλη την υγρασία, με νερό βρύσης, που το ρίχναμε μέσα στο δίσκο που ήταν τοποθετημένα τα γλαστράκια, και λόγω διήθησης το νερό πέρναγε μέσα από τις τρύπες στα γλαστράκια και μέσω του χώματος ανέβαινε ως τις ρίζες των φυτών.

Μετά από δύο μήνες (Ιούνιο, Ιούλιο) τα φυτά ήταν έτοιμα να ρίξουν τους σπόρους. Έτσι, αφού κουκουλώσαμε το κάθε φυτό με χαρτοσακούλα (σαν αυτές που βάζουμε τους ξυρούς καρπούς) ώστε να μπορεί να διαφύγει η υγρασία, και σφίξαμε την σακούλα στο κάτω μέρος για να μην πέσουν έξω οι σπόροι, αφήσαμε τα φυτά για ένα μήνα (Αύγουστο) χωρίς νερό, ώστε να ξεραθούν και ρίξουν τους σπόρους.

Το Σεπτέμβριο μαζέψαμε τους σπόρους κάθε παρτίδας και ένα μέρος αυτών (γύρω στους 80 σπόρους για κάθε παρτίδα) ξαναφτεύτηκε, αφού πρώτα οι σπόροι είχαν αποστειρωθεί με την ίδια ακριβώς διαδικασία όπως είχε γίνει με την πρώτη γενιά φυτών και αφού τα είχαμε αφήσει να εκβλαστήσουν μέσα σε τριβλία για μία εβδομάδα όπως ακριβώς και με τα πρώτα φυτά. Κάθε φυτό από κάθε παρτίδα mutant φτεύτηκε σε ξεχωριστό γλαστράκι και τα γλαστράκια μαρκαρίστηκαν με ένα ελληνικό γράμμα και ένα νούμερο οπότε κάθε φυτό που έπιασε και μεγάλωσε ήταν μοναδικά χαρακτηρισμένο με «όνομα» της μορφής π.χ. : Het-Salk 104803 B14.

Μία εβδομάδα αργότερα φτεύσαμε και wild type *Arabidopsis thaliana* Columbia από τα οποία θέλαμε να πάρουμε σπόρους και να πάρουμε επίσης γενωμικό DNA ώστε να το έχουμε ως θετικό control για τις PCR ταυτοποίησης αν τα φυτά ήταν ετερόζυγα ή ομόζυγα.

Ταυτοποίηση Ομοζυγωτίας:

Μετά από τρεις εβδομάδες, όταν τα περισσότερα φυτά είχαν μεγαλώσει αρκετά και είχαν πετάξει αρκετά φύλλα (η αφαίρεση ενός να μην προκαλέσει σοβαρό σοκ στο αναπτυσσόμενο ακόμα φυτό) ξεκινήσαμε τη δειγματοληψία φύλλων για extraction DNA. Η δειγματοληψία έγινε μέσα σε τρεις

μέρες, και γινόταν για μία μία παρτίδα την φορά ώστε να μην ανακατευτούν τα δείγματα από κάθε παρτίδα. Για την δειγματοληψία χρειαστήκαμε αποστειρωμένα erpendorfs των 1,5 ml (τόσα όσα και τα φυτά από τα οποία και πήραμε δείγμα φύλλων) και υγρό άζωτο μέσα σε θερμός. Αφού κάθε ένα από τα erpendorfs μαρκαριστήκαν με το όνομα από κάθε ένα φυτό αντίστοιχα, π.χ. **Hom-Salk 037900c Δ18** με ανεξίτηλο μαρκαδόρο ξεκινήσαμε την δειγματοληψία. Φορώντας γάντια μιας χρήσεως, και σταθεροποιώντας με μια λαβίδα απαλά το φυτό στο χώμα ώστε να μην ξεριζωθεί κατά την αποκοπή του φύλλου, με το άλλο χέρι παίρναμε το κάθε erpendorf και προσεχτικά ώστε να μην ακουμπήσει πουθενά και μην μπει τίποτα ξένο σώμα (χώμα, σκόνη, τρίχες, ξένα κύτταρα) μέσα, βάζαμε μέσα στο στόμιο του αντίστοιχου erpendorf ένα φύλλο από το αντίστοιχο φυτό και καθώς κλείναμε ερμητικά τα καπάκι, το φυλλαράκι αποκοπτόταν από το φυτό και αμέσως το erpendorf το πετάγαμε μέσα στο θερμός με το υγρό άζωτο, ώστε οι ιστοί του φύλλου να παγώσουν ακαριαία και να διατηρηθούν. Τα δείγματα από κάθε παρτίδα συγκεντρώθηκαν σε πέντε ξεχωριστά σακουλάκια και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο στους -80 °C.

Στη συνέχεια ξεκινήσαμε την διαδικασία της λειοτρίβισης και του extraction του DNA από τα δείγματα φύλλων που είχαμε πάρει. Για τις διαδικασίες αυτές χρειαστήκαμε υγρό άζωτο, 100 ml διάλυμα CTAB/δείγμα, 1 ml μερκαπτοαιθανόλη/δείγμα, 150 ml χλωροφόρμιο/δείγμα, 1:25 του χλωροφόρμιου ισοαμυλική αλκοόλη (6 ml), ισοπροπανόλη ~70 ml / δείγμα, 100% w/v αιθανόλη 0,5 ml/δείγμα, καθαρά αποστειρωμένα erpendorfs τόσα όσα και τα δείγματα στα οποία κάνουμε extraction μαρκαρισμένα με τα αντίστοιχα ονόματα των δειγμάτων, αποστειρωμένα tips και πιπέτες ακριβείας και αποστειρωμένα εμβολάκια.

Για την προετοιμασία του Buffer CTAB 150 ml προσθέτουμε:

- ✓ 15 ml Tris-HCl 100mM pH 8.0
- ✓ 6 ml EDTA 20 mM pH 8.0
- ✓ 70 ml NaCl 1,4 M
- ✓ 2% w/v (3 gr) CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)
- ✓ 1% w/v (1,5 gr) PVP 40.000 (polyvinyl pyrrolidone)

Το buffer λειτουργεί αποδοτικότερα όταν δεν είναι αποστειρωμένο.

Για τη λειοτρίβιση και τα extraction, αφού κάναμε τους απαραίτητους υπολογισμούς, σύμφωνα με το πόσα δείγματα θα χειριζόμασταν κάθε φορά, για να φτιάξουμε τα απαραίτητα master mixes (**master mix1 = 100λ CTAB/δείγμα + 1λ μερκαπτοαιθανόλη/δείγμα**), (**master mix2 = 150λ χλωροφόρμιο/δείγμα + 6λ ισοαμυλικής αλκοόλης/ δείγμα**), καθαρίζαμε με αιθανόλη τους πάγκους και τις πιπέτες που θα χρησιμοποιούσαμε, βγάλαμε και μαρκάραμε τα νέα erpendorfs τα οποία θα χρησιμοποιούσαμε για κατά την διάρκεια της διαδικασίας, με τα αντίστοιχα ονόματα των δειγμάτων που είχαμε πάρει κάθε φορά από τους -80 °C και προθερμαίναμε το «heater» στους 65 °C.

Η διαδικασία για τη λειοτρίβιση και το extraction έγιναν ως εξής:

Φορώντας γάντια μιας χρήσεως, παίρναμε το κάθε ένα erpendorf που περιείχαν τα φύλλα-δείγματα μέσα από το άζωτο που τα είχαμε βάλει αμέσως μετά που τα βγάλαμε από τους -80 °C και με ένα αποστειρωμένο κάθε φορά εμβολάκι, του οποίου την μύτη είχαμε παγώσει μέσα στο υγρό άζωτο ώστε να μην κολλάει ο ιστός του φύλλου πάνω στο πλαστικό έμβολο αλλά να παραμένει μέσα στο erpendorf, πιέζαμε και κονιορτοποιούσαμε το κάθε φύλλο μέσα στα erpendorfs.

Κατόπιν προσθέταμε σε κάθε δείγμα 101 μl master mix1 (CTAB + μερκαπτοαιθανόλη) δουλεύοντας στον απαγωγό για να αποφύγουμε την έντονα άσχημη οσμή. Κάναμε ένα σύντομο vortex στα δείγματα και τα επωάζουμε για 15 min στους 65 °C. Μετά, προσθέταμε 156 μl master mix2 (χλωροφόρμιο + ισοαμυλική αλκοόλη) συνεχίζοντας να δουλεύουμε στον απαγωγό. Αφού κάναμε ένα καλό vortex στα δείγματα, τα φυγοκεντρώσαμε για 5 min στις 13.000 rpm. Από τη φυγόκεντρο βγάσαμε τα δείγματα με μεγάλη προσοχή για να μην ανακατέψουμε τις φάσεις, και παίρναμε την **πάνω φάση** (~100 μl) στο αντίστοιχο νέο erpendorf και προσθέταμε 0,7 του όγκου ισοπροπανόλη (70 μl) και ανακατεύαμε με το χέρι. Επωάζαμε τα δείγματα για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ παράλληλα βάζαμε την αιθανόλη που θα χρησιμοποιούσαμε παρακάτω, στο ψυγείο να κρυώσει στους 4 °C. Στη συνέχεια φυγοκεντρώσαμε για 15 min στις 13.000 rpm και μετά πολύ προσεχτικά αφαιρούσαμε το **υπερκείμενο**. Προσθέταμε 0,5 ml παγωμένης αιθανόλης σε κάθε δείγμα, ανακινούσαμε με το χέρι και φυγοκεντρώσαμε ξανά για 5 min στις 13.000 rpm. Πετούσαμε το υπερκείμενο και ξανακάναμε φυγοκέντριση των δειγμάτων για 1 min στις 13.000 rpm για να γίνει καλύτερος διαχωρισμός και με πολύ μεγάλη προσοχή αφαιρούσαμε τα τελευταία μl υπερκείμενου. Αφήναμε τα erpendorfs να στεγνώσουν σε πλάγια θέση (για να μην πέσουν μέσα σκόνης) για 5 – 10 min και τέλος επαναδιαλύαμε το ίζημα σε 50 μl με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Φυλάσσαμε τα δείγματα στους -20 °C.

Από κάθε επαναδιαλυμένο δείγμα DNA, παίρναμε μια ποσότητα 8 μl και τρέχαμε gel αγαρόζης 1,5% w/v για να δούμε αν πράγματι η απομόνωση γενωμικού DNA από τα φύλλα είχε γίνει σωστά. Στις πρώτες απομονώσεις, οι εικόνες από τα αντίστοιχα gel έδειχναν ότι δεν είχαμε κάνει σωστά το extraction και δεν παίρναμε αρκετή ποσότητα DNA. Γι' αυτό φτιάξαμε καινούργιο buffer CTAB την μισή ποσότητα του οποίου αποστειρώσαμε και την άλλη μισή όχι και ξανακάναμε απομόνωση DNA. Τα αποτελέσματα από την εικόνα του gel γενωμικού DNA που τρέξαμε έδειξαν ότι τα extraction που κάναμε με μη αποστειρωμένο CTAB ήταν πολύ αποδοτικότερα.

- Αφού κάναμε DNA extraction από τα φυτά δεύτερης γενιάς ξεκινήσαμε τις PCR για ταυτοποίηση των ομόζυγων φυτών από κάθε παρτίδα. Σε σωλήνα erpendorf προστίθενται τα παρακάτω σε τελικό όγκο 20μl.
 - 14,12 μl ddH₂O
 - 2μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα Kara Taq
 - 0,4μl μίγμα dNTPs
 - 1 μl γενωμικό DNA
 - 0,8μl εκκινητής έμπροσθεν LP
 - 0,8μl εκκινητής έμπροσθεν LBb1.3
 - 0,8μl εκκινητής ανάστροφος RP
 - 0,08μl DNA πολυμεράση kara Taq (1Unit/μl)
- Το μίγμα αναμιγνύεται με γρήγορη φυγοκέντρωση και τοποθετείται στη συσκευή PCR, προκειμένου να εκτελεστεί το παρακάτω πρόγραμμα:

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

Ο primer LBb1.3 είναι ίδιος για όλες τις παρτίδες: ATTTTGCCGATTTCCGGAAC

Για την παρτίδα Het-Salk 104803 οι primers είναι: LP CGGAATCTGATACCTGAAAACAC

RP TCATTTACGTCAATCCCCTTG

Για την παρτίδα Hom-Salk 079535c οι primers είναι: LP AAAAAGGTTCTCAAGGGAAGC

RP AATTCCTGGGGATATGGTTTG

Για την παρτίδα Hom-Salk 105290c οι primers είναι: LP CGGAATCTGATACCTGAAAACAC

RP ATTGGTGTGAAGCTTTTTGGG

Για την παρτίδα Hom-Salk 127310c οι primers είναι: LP AAAAAGGTTCTCAAGGGAAGC

RP AATTCCTGGGGATATGGTTTG

Για την παρτίδα Hom-Salk 037900c οι primers είναι: LP AAGCTCAGAAATTCGTAAGATCG

RP CGCAATAGTGTATATTGGTCCG

Χρησιμοποιούσαμε τα σετ των primers έτσι όπως προβλεπόταν από το σχεδιασμό των T-DNA ενθέσεων (βλέπε ιστοσελίδα T-DNA primer design) βάζοντας σε κάθε αντίδραση 3 primers, τους LP και RP για να ανιχνεύσουν και να πολλαπλασιάσουν το wild type γονίδιο της εσπερίνης και τον LBb1.3 για να αλληλεπιδράσει με τον RP και να ανιχνεύσει την T-DNA ένθεση (όπου υπάρχει η κάθε μπάντα σε κάθε περίπτωση). Τις PCR τις κάναμε αρχικά με denaturation period 30 δευτερόλεπτα και σε Tm 54°C όπως είχαμε υπολογίσει τα Tm των primers με τη μέθοδο:

$Tm = 81,5 + 16,6 \cdot \log M + 0,41 (\%GC) - 500/n$ όπου

M= συγκέντρωση αλάτων στο buffer του ενζύμου

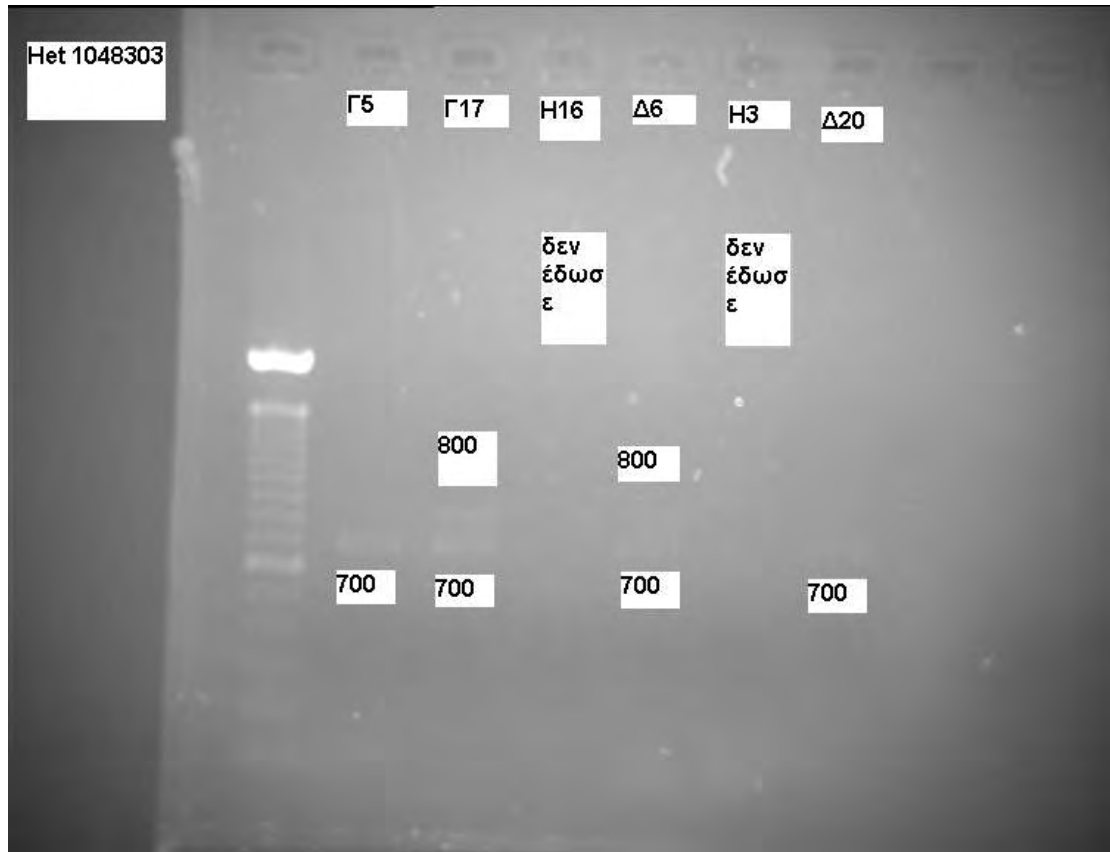
%GC = περιεχόμενο σε G,C βάσεις του κάθε primer

n= το μήκος σε βάσεις του κάθε primer

Τα αποτελέσματα που περιμέναμε ήταν να δούμε στα ομόζυγα με ένθεση φυτά 1 μόνο μπάντα μεταξύ 400-700 bps, στα ετερόζυγα φυτά 2 μπάντες, 1 στα 400-700 bps και 1 στα 1100 bps και στα ομόζυγα wild type (χωρίς ένθεση) 1 μπάντα στα 1100 bps.

Ξεκινήσαμε να ελέγχουμε φυτά από την παρτίδα Het-Salk 104803 που ήταν χαρακτηρισμένη ως ετερόζυγη για να βρούμε ομόζυγα φυτά της δεύτερης γενιάς. Πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα

Η παρακάτω εικόνα είναι από το πρώτο gel με ετερόζυγα στο οποίο δεν είχαμε βάλει Wild Type θετικό control

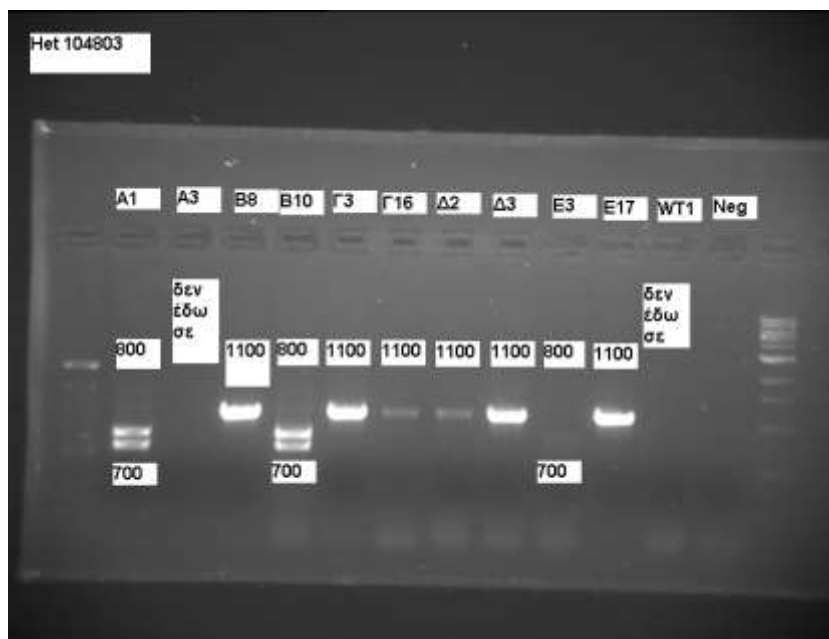


2 δείγματα δεν δούλεψαν καθόλου, 2 δείγματα δώσανε δύο μπάντες την μία αναμενόμενη στα 700 bps και μία μη ειδική* στα 800 bps και δύο δείγματα δώσανε 1 μπάντα την αναμενόμενη για ομόζυγα με ένθεση φυτά στα 700 bps.

*Σημείωση: αρχικά υποθέσαμε ότι η μπάντα 800 bps ήταν αυτή που εμείς **περιμέναμε** να δούμε στα 1100 bps.

Όταν τρέξαμε γενωμικό DNA από τα παραπάνω δείγματα, σήμα δώσανε και τα 6 με τη διαφορά ότι τα δείγματα Γ17, H3, H16 είχαν δώσει πιο αχνή μπάντα.

Εδώ είναι η δεύτερη παρτίδα ετερόζυγων



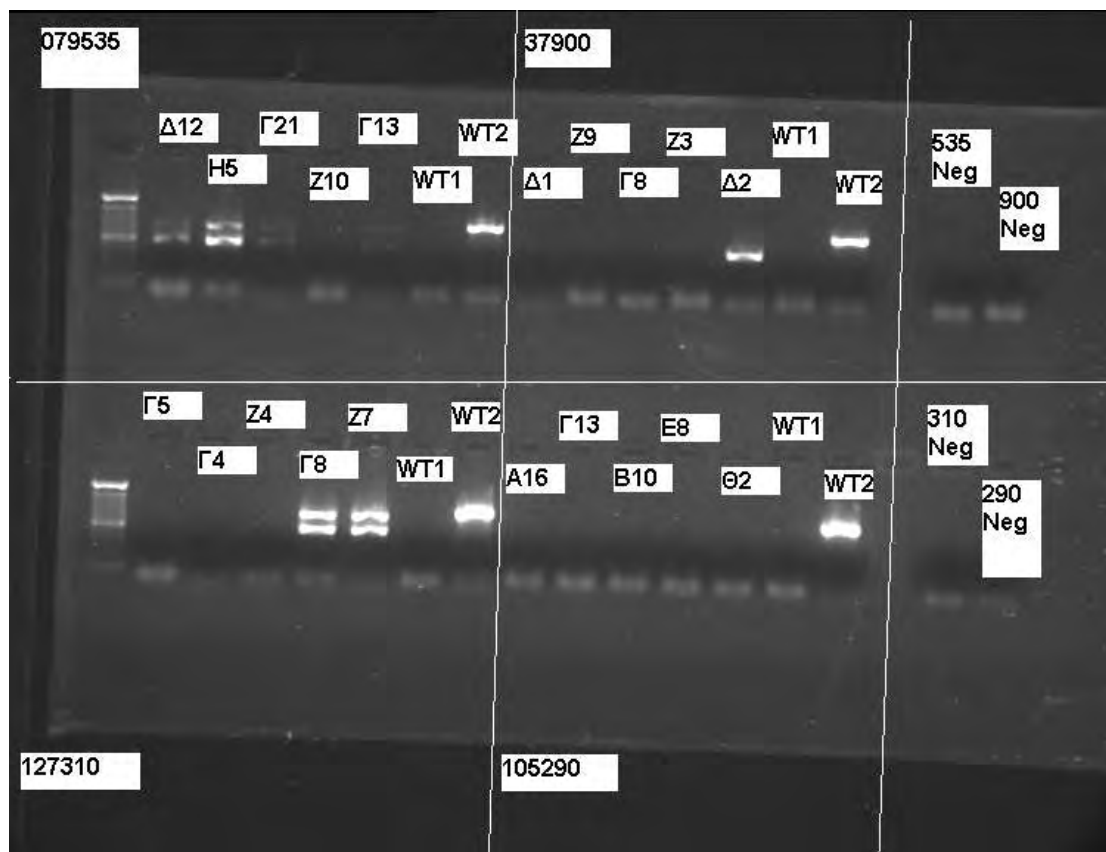
3 δείγματα μας έδωσαν 2 μπάντες 700 + 800, 6 δείγματα μας έδωσαν μία μπάντα 1100 και 2 δείγματα τίποτα. Το θετικό control WT1 δεν έδωσε εικόνα.

Μας παραξένεψε που βλέπαμε και μπάντες 800 bps και 1100 bps αρχικά, αλλά επειδή δεν γνωρίζαμε ακριβώς πού πιάνουν οι primers πάνω στο full length γονίδιο θεωρήσαμε ότι στα ετερόζυγα μπορεί να ήταν αυτή η σωστή εικόνα.

Όταν είχαμε τρέξει γενωμικό DNA από αυτά τα δείγματα, είχαμε πάρει εικόνα από όλα τα δείγματα.

Στη συνέχεια ξεκινήσαμε να ελέγχουμε 5 δείγματα από κάθε μία από τις τέσσερις χαρακτηρισμένες ως ομόζυγες παρτίδες Hom-Salk 079535c, Hom-Salk 037900c, Hom-Salk 127310c και Hom-Salk 105290c

Πήραμε την παρακάτω εικόνα στο gel:



Συνεχίζει σε όλες τις παρτίδες το θετικό control WT1 μην δουλεύει, αλλά δούλεψε σε όλες τις παρτίδες το θετικό control **WT2**.

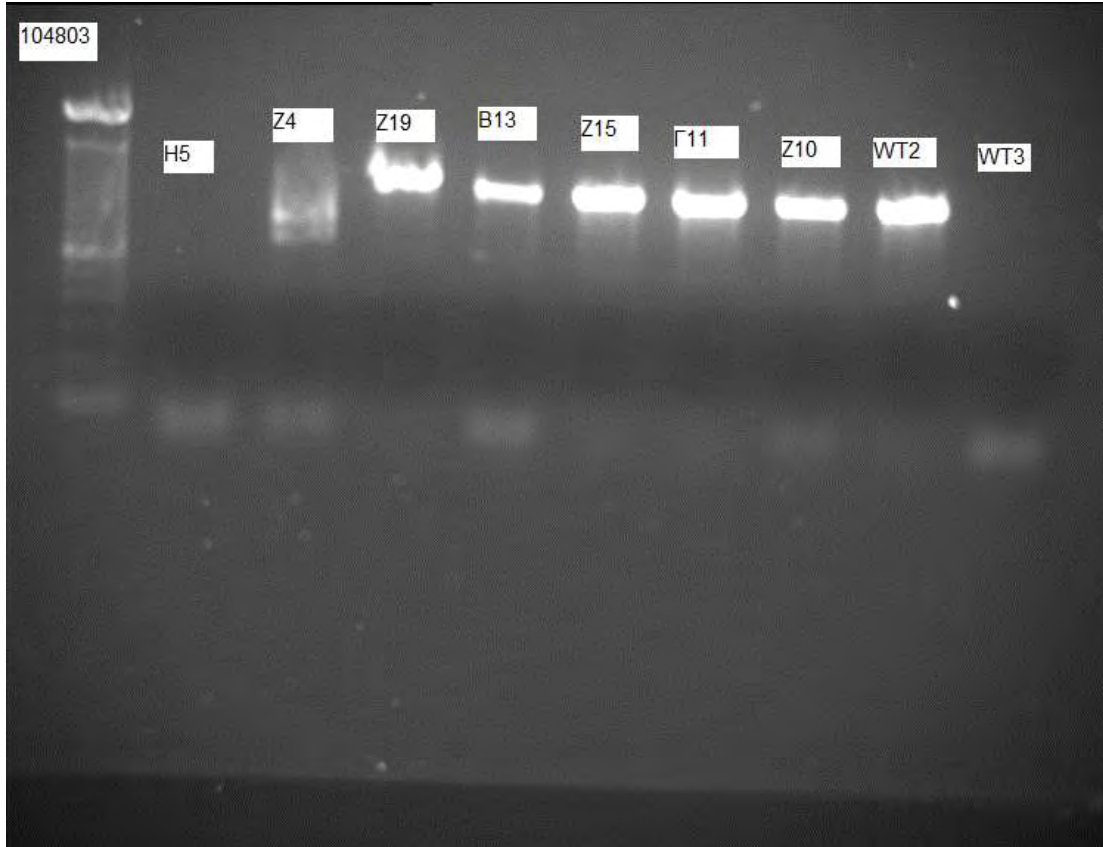
Η παρτίδα 105290 δεν έδωσε PCR product σε κανένα δείγμα. Μάλιστα όταν είχαμε τρέξει γενωμικό DNA από αυτά τα δείγματα μόνο το 290Γ13 είχε δώσει μπάντα.

Η παρτίδα 37900 έδωσε μία μπάντα MONO στο δείγμα 900Δ2 γύρω στις ~600 bps. Όταν είχαμε τρέξει γενωμικό DNA από αυτά τα δείγματα μπάντες είχαν δώσει μόνο τα δείγματα 900Δ2 και 900Z3

Η παρτίδες 079535 και 127310 παρουσίασαν μία εικόνα παρόμοια με την εικόνα που παίρναμε στα ετερόζυγα φυτά δίνοντας μία μπάντα κοντά στα 600 bps και μια μπάντα κοντά στα 1100 bps δίνοντας την εντύπωση ότι μπορεί η παρτίδες αυτές να είναι τελικά ετερόζυγες.

Μετά βάλουμε και μία τρίτη PCR σε 6 δείγματα της παρτίδας Het-Salk 104803 μήπως βρούμε και ένα τρίτο ομόζυγο φυτό από αυτή την παρτίδα και παράλληλα ελέγξαμε αν δουλεύει και ένα τρίτο extraction από θετικό control το WT3.

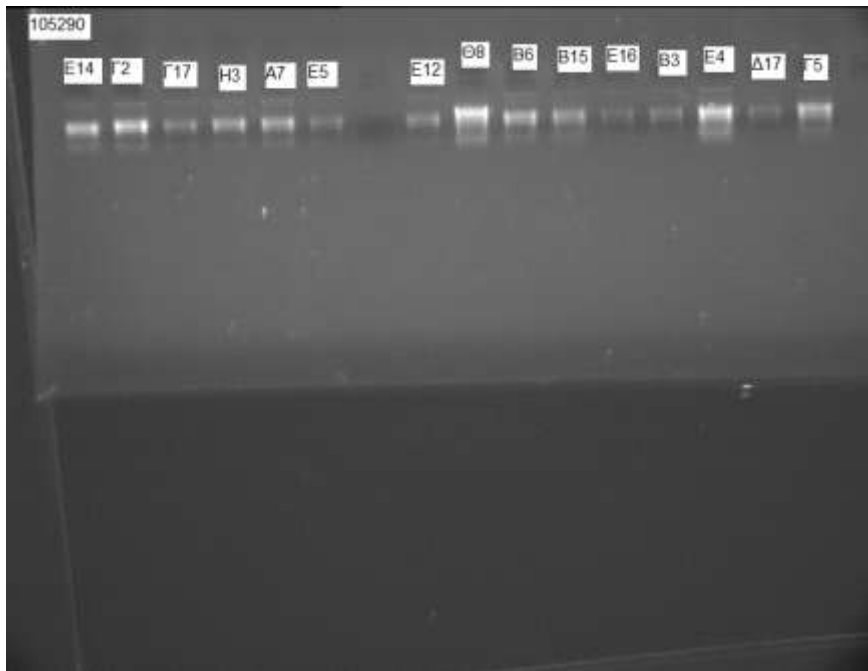
Πήραμε την παρακάτω εικόνα:



Δεν φορτώσαμε negative γιατί δεν είχε χώρο το gel.

Το H5 και το WT3 δεν δούλεψαν, το Z4 έδωσε την χαρακτηριστική εικόνα των ετερόζυγων φυτών με τις 2 μπάντες και τα υπόλοιπα έδωσαν μια μπάντα ~1100 bps

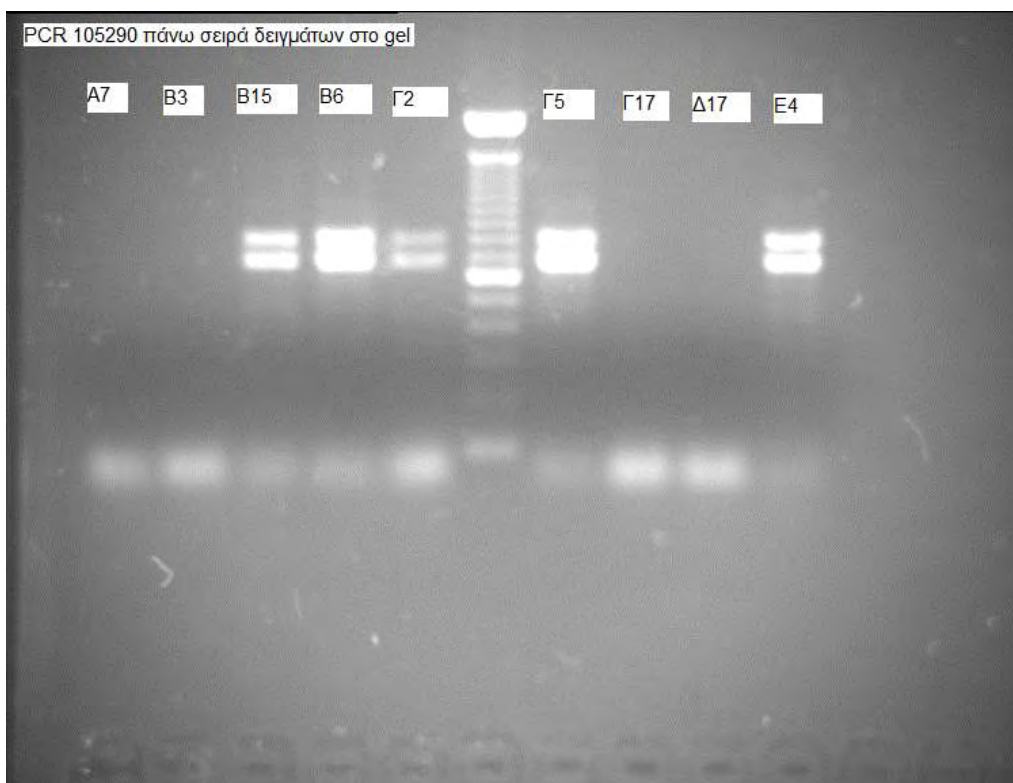
Στη συνέχεια κάναμε ξανά extraction από 15 δείγματα της παρτίδας Hom-Salk 105290c



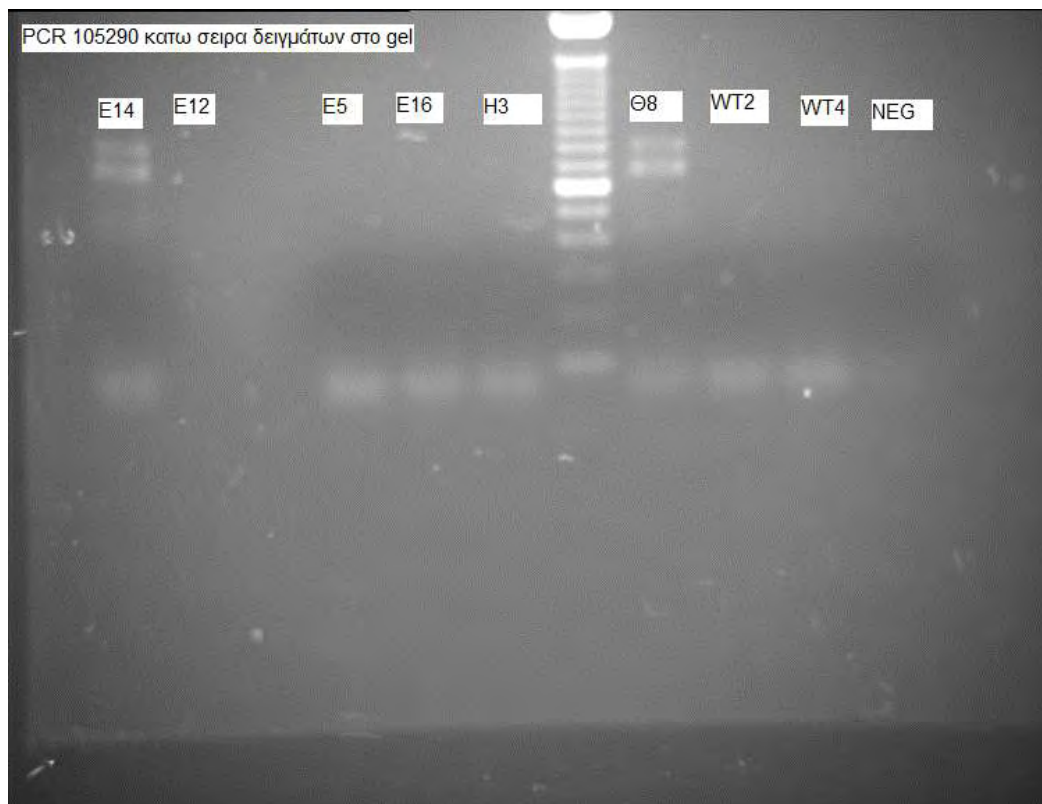
Το έβδομο πηγαδάκι ήταν κενό.

Κατόπιν κάναμε έλεγχο PCR και αφού τρέξαμε τα PCR products σε δυο σειρές στο ίδιο gel πήραμε τις παρακάτω εικόνες:

Πάνω σειρά δειγμάτων:



Κάτω σειρά δειγμάτων:

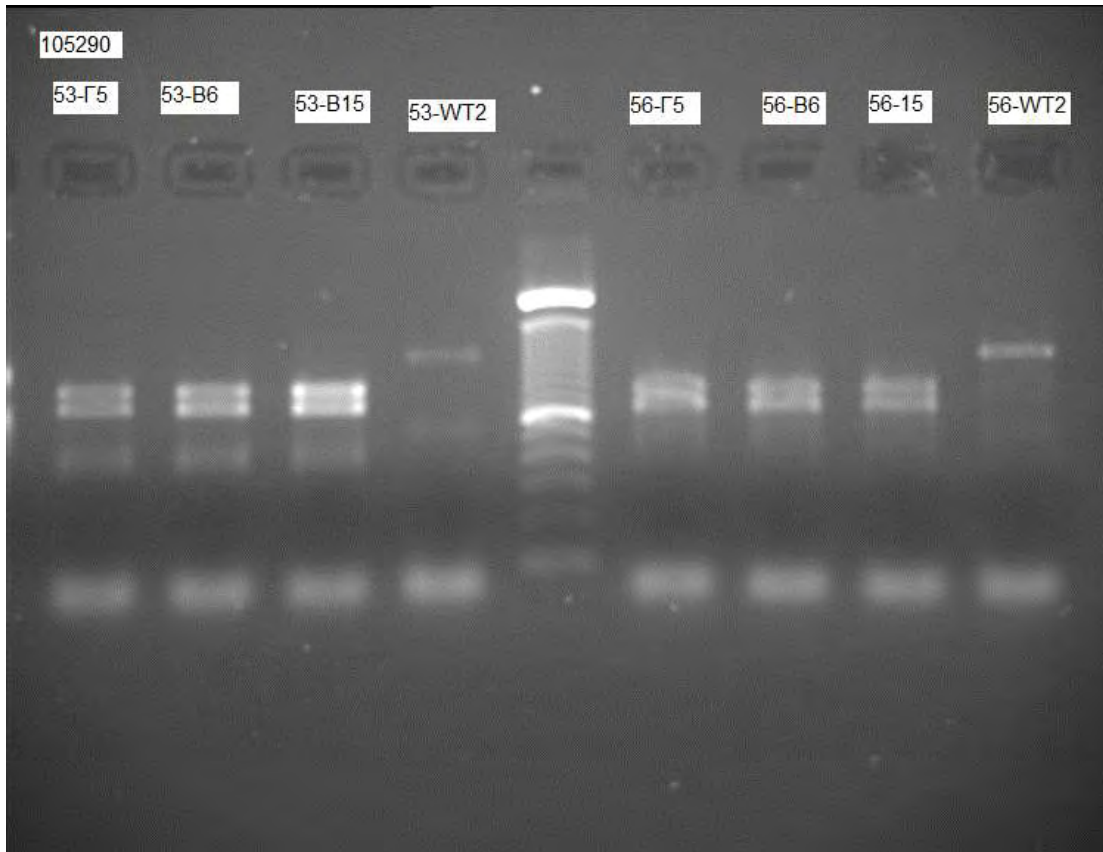


Τα δείγματα A7, B3, Γ17, Δ17, E5, E16, H3, WT2, WT4 δεν έδωσαν εικόνα (πιθανότατα γιατί είχε γίνει απομονωθεί μικρή ποσότητα DNA από τα αντίστοιχα φυτά). Το E12 λόγω λάθους κατά το φόρτωμα του gel μερική ποσότητα βγήκε έξω από το πηγαδάκι και διαχύθηκε προς τα δεξιά κοντά στο επόμενο πηγαδάκι το οποίο και δεν φορτώσαμε για αποφυγή επιμόλυνσης. Τα δείγματα B15, B6, Γ2, Γ5, E4, E14, Θ8 δώσανε την συνηθισμένη αλλά παράξενη εικόνα με τις δύο μπάντες 700 bps και 800 bps.

Σημείωση: ο Lader είναι κατοστάρης με πρώτη έντονη μπάντα στα 600 bps.

Από εκεί και πέρα ξεκινήσαμε PCR ελέγχου σε δείγματα ομόζυγων παρτίδων αλλάζοντας κάποιες συνθήκες.

Αρχικά βάλουμε στα τρία δείγματα από την παρτίδα Hom-Salk 105290c Γ5, B15, B6 και στο WT2 2 PCR. Μία PCR με $T_m = 53^\circ\text{C}$ για να δούμε αν λόγω λανθασμένα ανεβασμένου T_m δεν παίρνουμε την 1100 bps μπάντα και μία PCR με $T_m = 56^\circ\text{C}$ για να δούμε αν λόγω λανθασμένα κατεβασμένου T_m παίρνουμε την μη ειδική 800 bps μπάντα. Τα PCR products τα τρέξαμε στην ίδια σειρά στο ίδιο gel, πρώτα αυτά με $T_m = 53^\circ\text{C}$ και μετά αυτά με $T_m = 56^\circ\text{C}$.



Πήραμε ξανά την συνηθισμένη εικόνα με τις μπάντες στα 700 bps και 800 bps αλλά στα δείγματα με $T_m = 53^\circ\text{C}$ πήραμε μια επιπλέον μη ειδική μπάντα περίπου στα 400 bps.

Συνεπώς καταλάβαμε ότι δεν φταίνει τα T_m των primers.

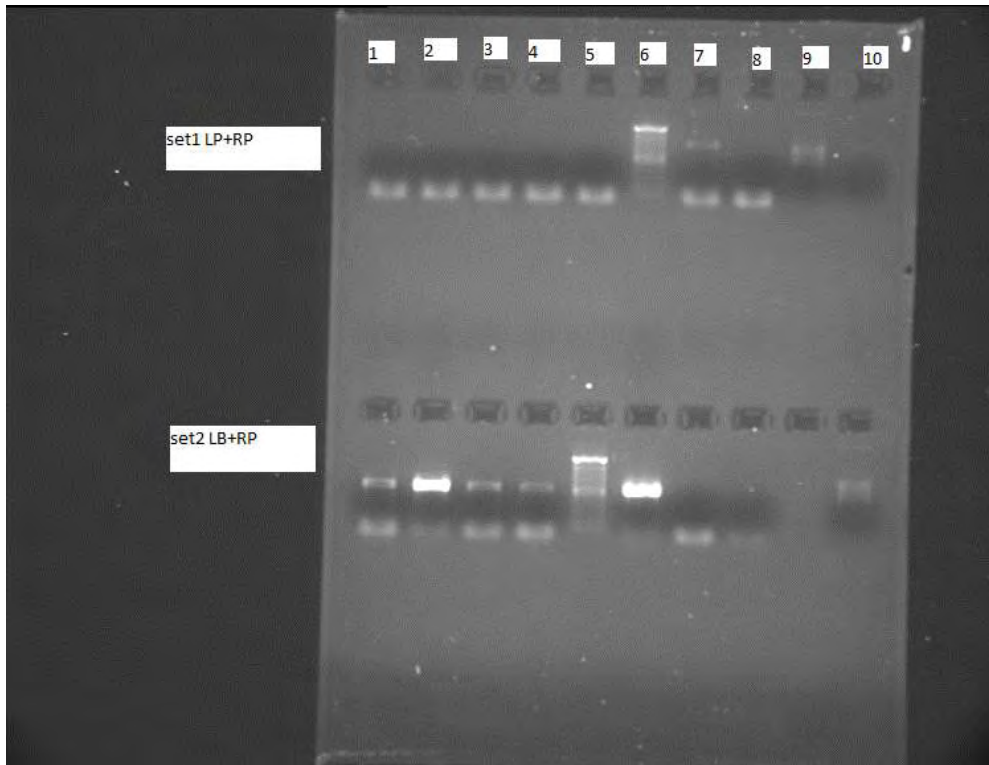
Αλλάξαμε λοιπόν τις συνθήκες που κάναμε τις PCR ξανά.

Τρέξαμε για έλεγχο 5 δείγματα που ξέραμε ότι δίνουν εικόνα στην PCR. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν από την χαρακτηρισμένη ως ομόζυγη παρτίδα Hom-Salk 105290c που στις προηγούμενες PCR που είχαμε βάλει τα ίδια δείγματα μας δίνανε όλα 2 μπάντες 700 και 800 (????) bps. Κάναμε 2 αλλαγές σε σχέση με το πώς κάναμε τις προηγούμενες PCR.

Εμείς μέχρι τότε στις ομόζυγες mutant παρτίδες δεν βλέπαμε την 1100 μπάντα και βλέπαμε μπάντα 800 bps. Γι' αυτό για να ελέγξουμε αν υπάρχει κάποια περιπλοκή όταν δουλεύουν μαζί και οι τρεις primers στην ίδια αντίδραση, δεν βάλουμε μαζί τα ζεύγη, αλλά κάναμε μια PCR με το **set1 LP+RP** και μια δεύτερη PCR με το **set2 LB+RP**.

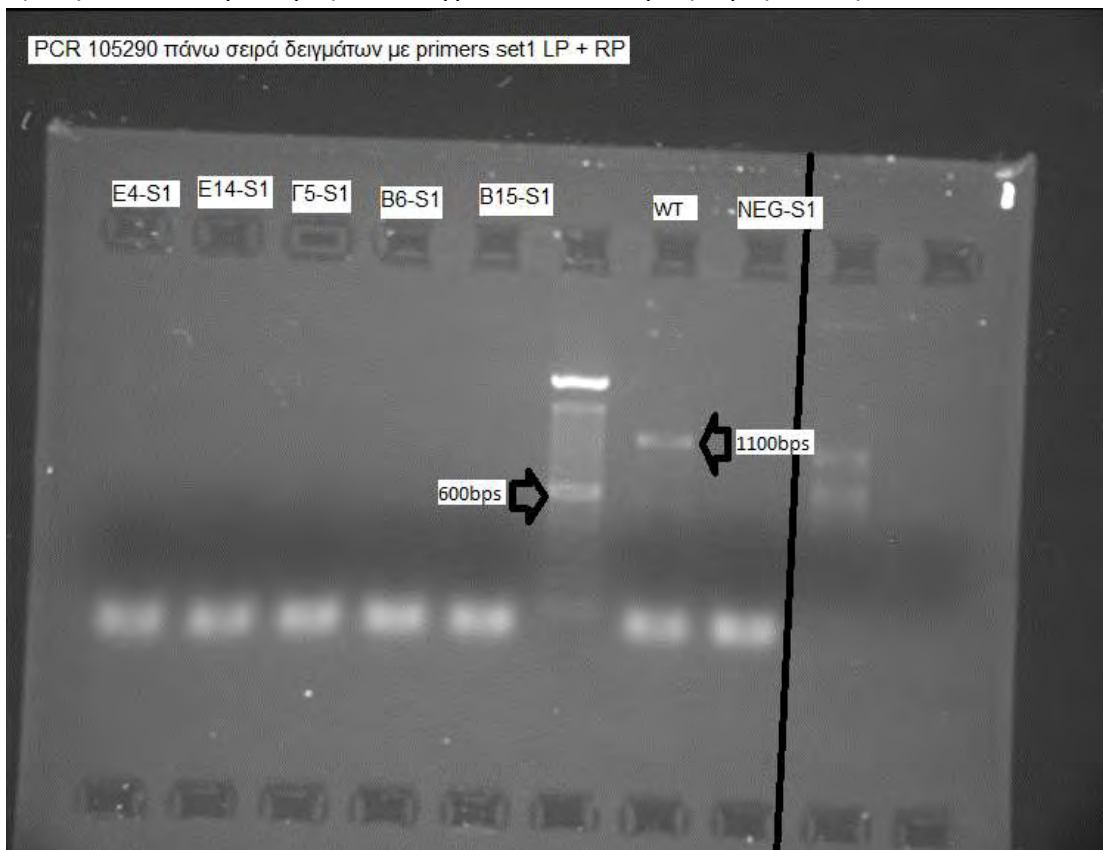
Επίσης μεταβάλλαμε το denaturation period της PCR από 30 δευτερόλεπτα σε 1 λεπτό μήπως τα φυτά ήταν ετερόζυγα και δεν άνοιγαν καλά οι κλώνοι.

Πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα:



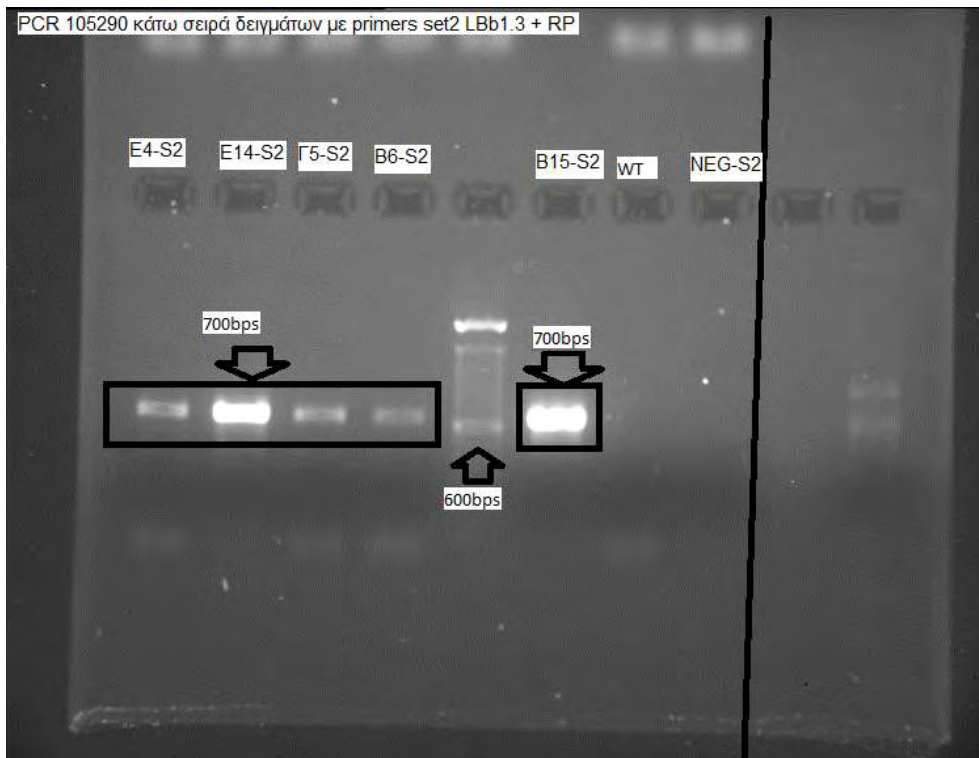
Προσοχή: στα πηγαδάκια 9 και 10 πάνω και κάτω έχω τρέξει γενωμικό DNA από άλλα δείγματα από άλλη παρτίδα για να δω αν έχει γίνει καλά το extraction, οπότε δεν τα κοιτάμε.

- 1) Στα πηγαδάκια 7 πάνω και κάτω έτρεξα τα θετικά control από wild type φυτό.
- 2) Στα πηγαδάκια 8 πάνω και κάτω έτρεξα τα αρνητικά control που είναι καθαρά!
- 3) Στην πάνω σειρά έτρεξα τα δείγματα του set1 με ζεύγος εκκινητών LP+RP



Εδώ βλέπουμε ότι δούλεψε μόνο το Wild Type και έδωσε την αναμενόμενη μπάντα στα 1100 bps. Τα δείγματα 1,2,3,4,5 δεν έδωσαν τίποτα άρα δεν είναι ούτε Wild Type ούτε ετερόζυγα mutant.

4) Στην κάτω σειρά έτρεξα τα δείγματα του set2 με ζεύγος εκκινήτων LB+RP



Εδώ βλέπουμε πώς το Wild Type δεν δούλεψε αφού δεν έχει ένθεση και όλα τα δείγματα (πηγαδάκια 1,2,3,4,6) έδωσαν 1 μπάντα στα 700 bps

Φαίνεται ότι τελικά είναι ομόζυγα με την αναμενόμενη ένθεση και το γεγονός ότι βλέπουμε πριν και μια μη ειδική μπάντα μάλλον οφείλεται σε πολύπλοκη αλληλεπίδραση των τριών εκκινήτων μέσα στην multiplex PCR!

Στη συνέχεια κάνουμε το ίδιο και σε 5 δείγματα από κάθε μία παρτίδα από τις άλλες τρεις χαρακτηρισμένες ως ομόζυγες Hom-Salk 079535c, Hom-Salk 127310c, Hom-Salk 037900c

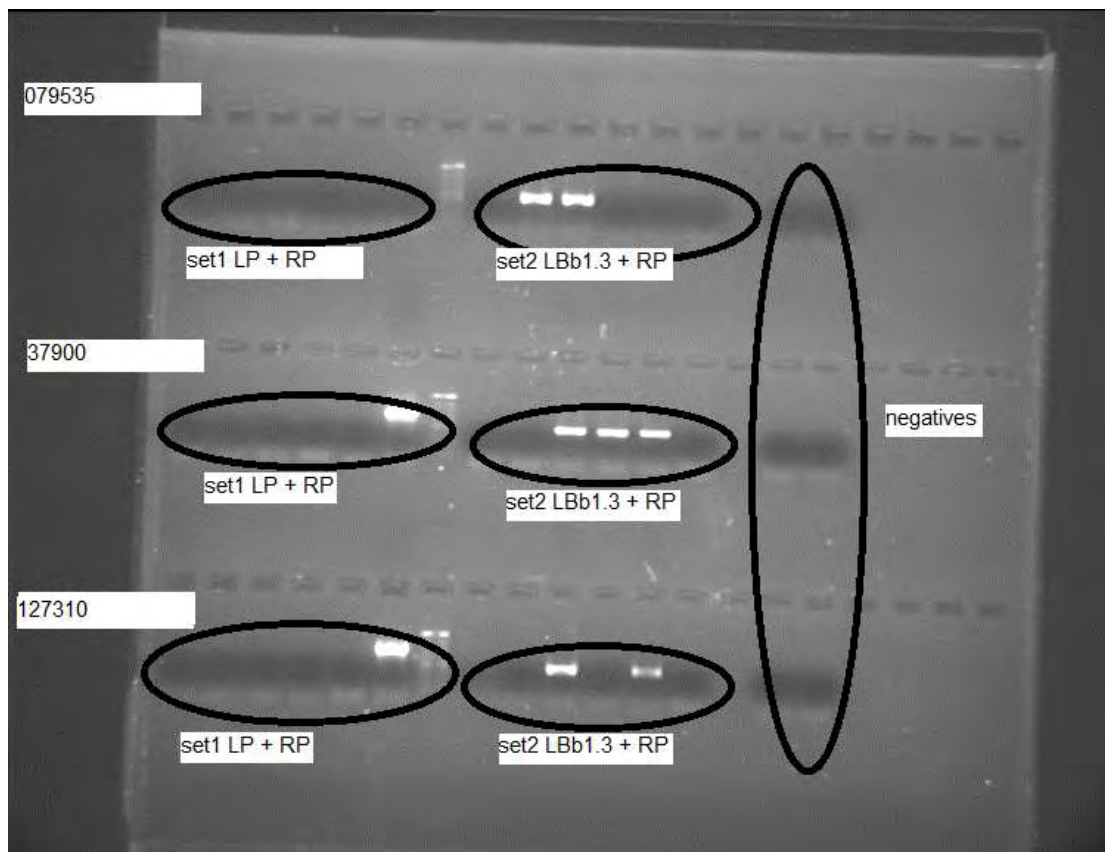
Τα δείγματα ήταν (με σειρά όπως τα τρέξαμε στο gel)

Hom-Salk 079535c: Z10, H5, Δ12, Γ21, Γ13

Hom-Salk 037900c: Γ10, Z13, Γ12, B9, H11

Hom-Salk 127310c: Γ5, Z4, Γ8, Γ4, Z7

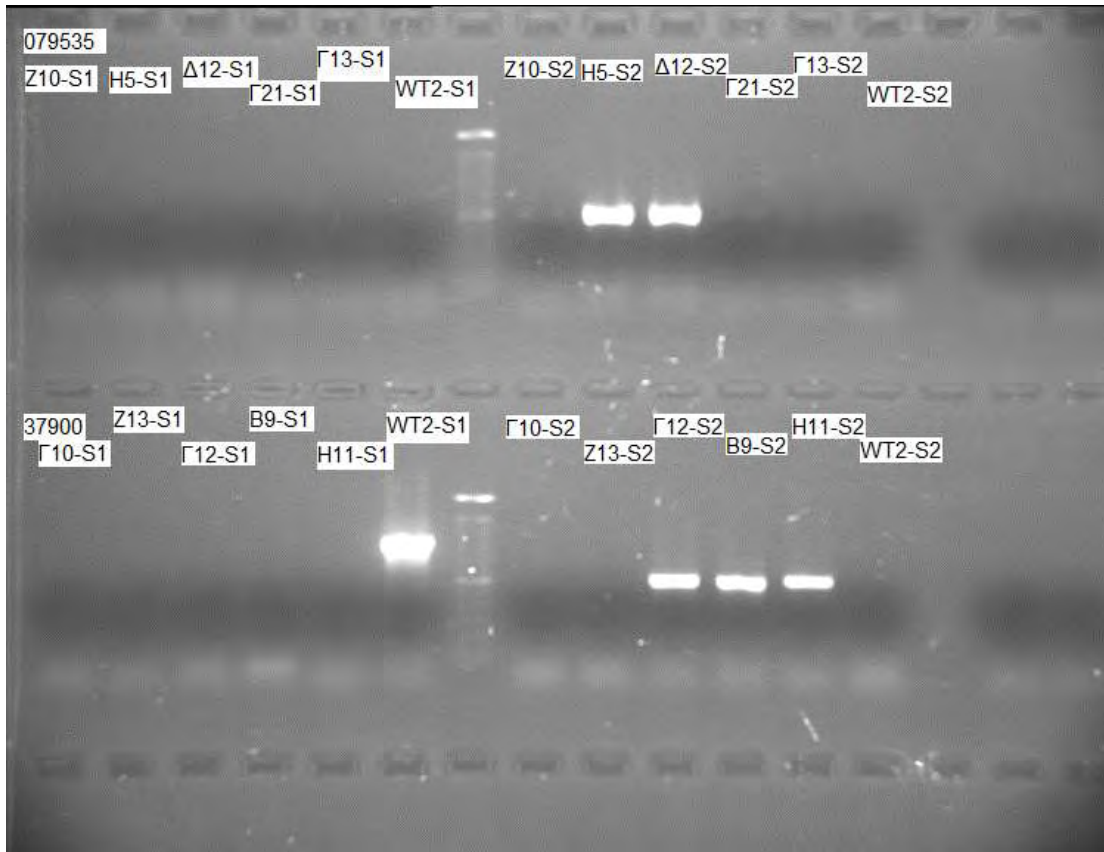
Πήραμε τις παρακάτω εικόνες.



Σε κάθε σειρά τρέξαμε τα δείγματα από την ίδια παρτίδα. Ο Lader είναι κατοστάρης. Πριν το Lader είναι τα PCR products με primers set1 LP + RP και μετά το Lader είναι τα PCR products με primers set2 LBb1.3 + RP. Στο τέλος τρέχουμε τα negatives από τις 2 PCR. Ως θετικό control έχουμε χρησιμοποιήσει το WT2 (το οποίο δεν δούλεψε στην PCR 079535 set1 LP + RP)

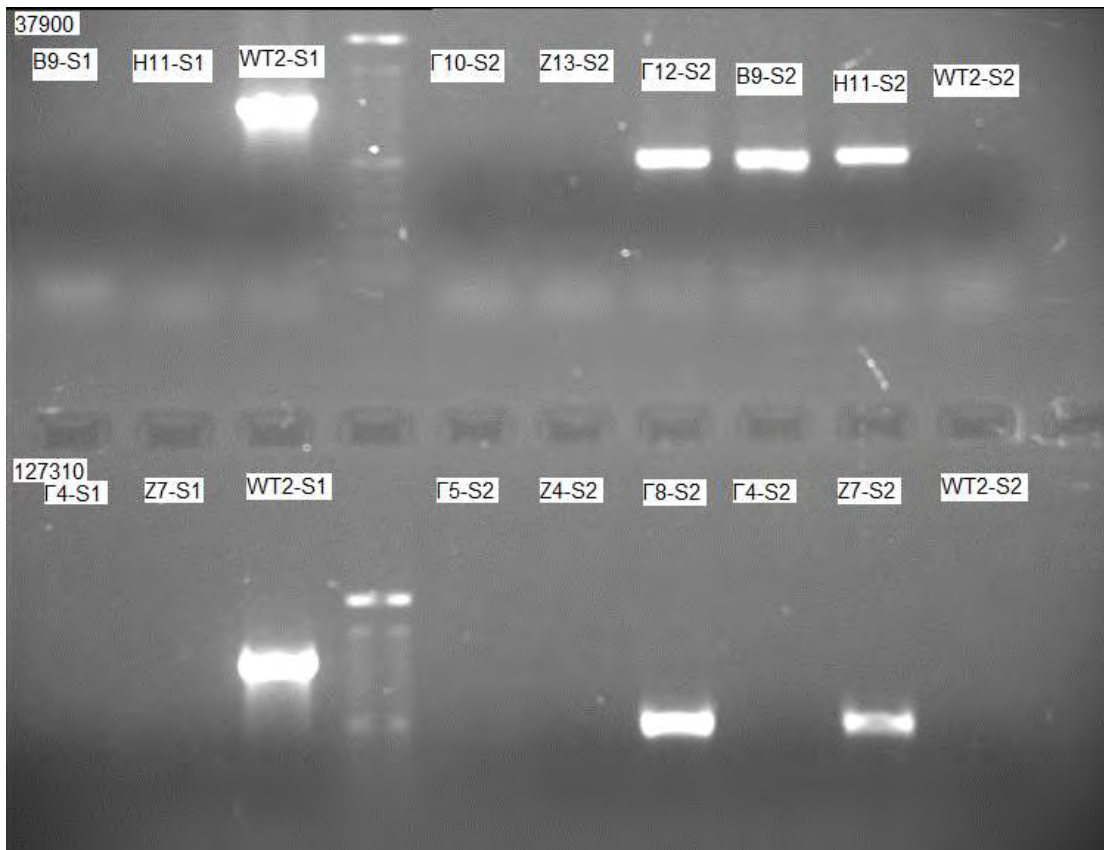
Όπως αναμενόταν για ομόζυγα με T-DNA ένθεση φυτά, οι PCR με set1 LP + RP primers δεν έδωσαν προϊόντα ενώ οι PCR με set2 LBb1.3 + RP primers έδωσαν μία μπάντα ~600 bps. Και στις τρεις παρτίδες. Όλα τα negatives ήταν καθαρά.

Ξεχωριστά βλέπουμε:



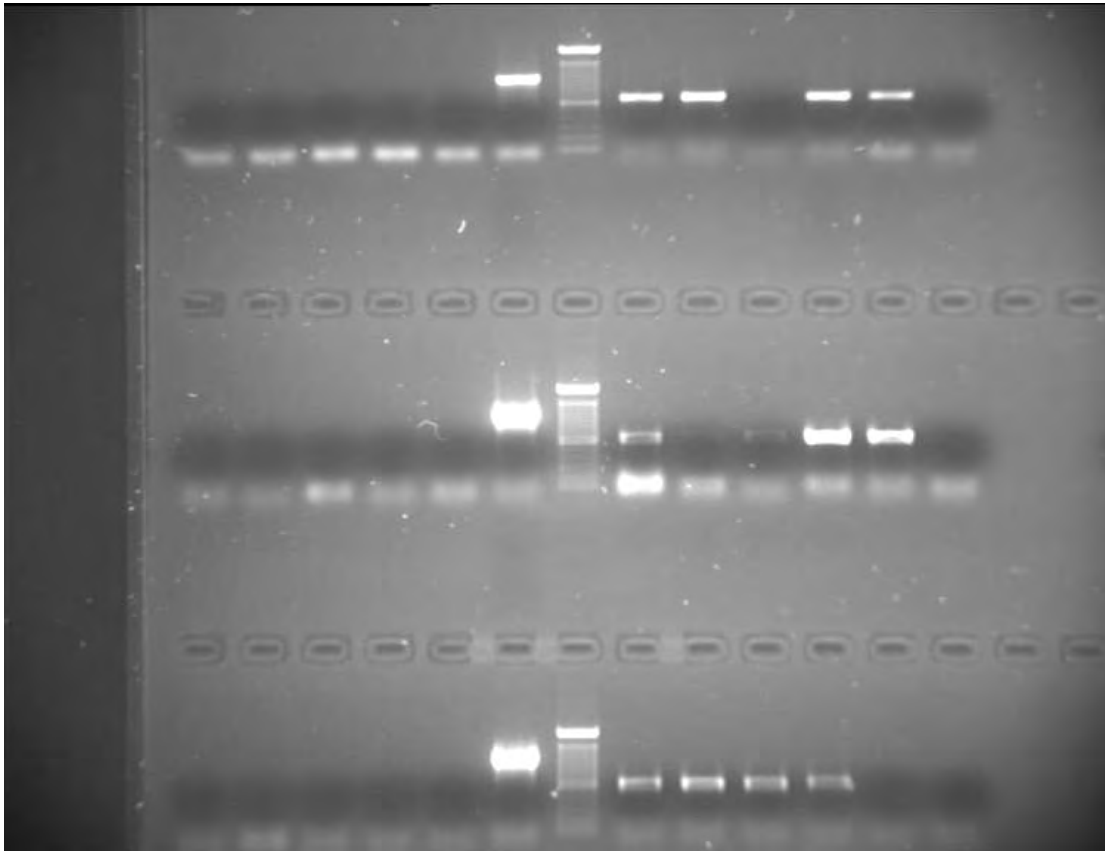
Στην παρτίδα 079535 δεν δούλεψε το WT2-S1 αλλά και τα 5 δείγματα έχουν δώσει μία μπάντα στα 600 bps.

Στην παρτίδα 37900 τα δείγματα S1 δεν έδωσαν κάποια μπάντα ενώ τα δείγματα Γ12-S2, B9-S2 και H11-S2 δώσανε μία μπάντα στα 600 bps.



Στην παρτίδα 127310 τα δείγματα S1 δεν έδωσαν κάποια μπάντα ενώ τα δείγματα Γ8-S2 και Z7-S2 δώσανε μία μπάντα στα 600 hrs.

Για επαλήθευση ξανακάναμε τις ίδιες PCR στα ίδια δείγματα και τα ξανατρέξαμε με την ίδια σειρά και πήραμε την παρακάτω εικόνα:



Αυτή η εικόνα μας επιβεβαιώνει ότι και οι παρτίδες Hom-Salk 079535c, Hom-Salk 037900c και Hom-Salk 127310c είναι ομόζυγες.

Κατόπιν μεταφύτευσα από την Het-Salk 104803 παρτίδα τα φυτά Γ5 και Δ20

από την Hom-Salk 105290c παρτίδα τα φυτά E14, Γ5 και B6

από την Hom-Salk 079535c παρτίδα τα φυτά Η5, Δ12, Z10, Γ13 και Γ21

από την Hom-Salk 037900c παρτίδα τα φυτά Γ12, Β9 και Η11

από την Hom-Salk 127310c παρτίδα τα φυτά Γ8 και Z7.

Εξαγωγή RNA για Real-Time PCRs

Χρειάστηκαν περίπου 2 μήνες ώστε τα φυτά από τις παρτίδες που είχαμε ταυτοποιήσει ως ομόζυγα και φυτέψαμε σπόρους από τις ίδιες παρτίδες, να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους και να δώσουν και αυτά με τη σειρά τους αρκετούς σπόρους για απόθεμα και περαιτέρω μελέτη.

Όταν αυτό έγινε ήρθε η ώρα να καλλιεργήσουμε σπόρους από αυτές τις παρτίδες. Αφότου αυτά τα νεαρά φυτά θα τα είχαμε υποβάλει σε συγκεκριμένη φωτοπερίοδο (16h φως/ 8h σκοτάδι) θα κάναμε δειγματοληψία των φύλων τους σε 3 διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της νύχτας (μιας και γνωρίζαμε ότι το γονίδιο της AtNOC εκφράζεται κατά το σούρουπο με μέγιστο έκφρασης λίγο πριν πέσει το σκοτάδι και η πρωτεΐνη είναι δραστική κατά τις νυχτερινές ώρες). Κατόπιν με RNA extraction από τα φύλλα των φυτών θα μετρούσαμε τα επίπεδα mRNA του γονιδίου σε κάθε time point δειγματοληψίας με την τεχνική της Real Time PCR.

Δυστυχώς, λόγω βλάβης και απορρύθμισης του χρονοδιακόπτη της φωτοπεριόδου, η πρώτη προσπάθεια δεν στέφτηκε με επιτυχία και χρειάστηκε να επαναληφτεί η διαδικασία.

Αρχικά, παρασκευάσαμε τριβλία 1% Άγαρ με MS και κάναμε πλύση και επίστρωση σπόρων όπως ακριβώς έχουμε περιγράψει παραπάνω. Αφήσαμε τα τριβλία να στεγνώσουν καλά από την περιττή υγρασία γιατί το άγαρ κάτω από την λάμπα της φωτοπεριόδου «ιδρώνει» και συσσωρεύονται μεγάλα σταγονίδια νερού στα τριβλία και επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη των φυτάρων. Σε κάθε τριβλίο βάλαμε περισσότερους από 35 σπόρους από κάθε παρτίδα, κατά τη δειγματοληψία να μπορούμε να πάρουμε δείγμα από τουλάχιστον 10 φυτάρια σε κάθε time point και να έχουμε έτσι αρκετό υλικό για επεξεργασία. Οι παρτίδες σπόρων που καλλιεργήσαμε αντιστοιχούσαν στα πατρικά ταυτοποιημένα φυτά:

Hom-Salk 074535c Γ21

Het-Salk 104803 Δ20

και Wild Type *Arabidopsis thaliana* (Columbia)

Αφού αφήσαμε τα τριβλία σκεπασμένα για ένα overnight στους 4° C και μετά για 2 μέρες πάλι σκεπασμένα με αλουμινοχαρτο σε θερμοκρασία δωματίου, τα αποκαλύψαμε και τα αφήσαμε για 8 μέρες κάτω από συγκεκριμένη φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι (το σκοτάδι έπεφτε στις 24:00 μ.μ. ώρα τα μεσάνυχτα και το φως επανερχόταν στις 08:00 π.μ. το πρωί).

Για την διαδικασία της δειγματοληψία χρειαζόντουσαν: Αποστειρωμένα ependorfs, Αποστειρωμένη λαβίδα και αποστειρωμένο νυστεράκι για να τέμνουμε τα φυτά ώστε να διαχωρίζουμε το ριζίδιο του φυτού και να κρατάμε μόνο το φύλλωμα (μας ενδιέφερε να μετρήσουμε την έκφραση της AtNOC μόνο στα φύλλα), θερμός με ποσότητα υγρού αζώτου για στιγμιαία κατάψυξη των ιστών πριν επέλθει αποικοδόμηση του RNA, καθαρή αιθανόλη για να αποστειρώνουμε συνεχώς τα εργαλεία μας μια λάμπα με ερυθρό φως για τις δειγματοληψίες κατά τη διάρκεια της συσκότισης (το λευκό φως στη λάθος στιγμή της φωτοπεριόδου είναι απαγορευτικό και μπορεί να προκαλέσει μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου και αν αλλοιώσει τα αποτελέσματα). Οι δειγματοληψίες έγιναν κατά τις χρονικές στιγμές 21:00 μ.μ.

23:30 μ.μ

02:00 π.μ.

Και τα δείγματα αποθηκεύθηκαν αμέσως σε θερμοκρασία -80°C .

Εξαγωγή ολικού RNA από τον ιστό φύλλων:

Χρειάζεστε να έχετε έτοιμα αποστειρωμένα έμβολα λειοτρίβισης, δοχείο με υγρό άζωτο και εύκαιρο πάγο, αποστειρωμένα tips πιπετών και erendorfs. Πρέπει επίσης να έχετε προετοιμάσει τα εξής διαλύματα:

1. Διάλυμα REB 800μl ανά δείγμα το οποίο εμπεριέχει σε όγκο 20 ml:
 - 25mM Tris-HCl → 500μl
 - 25mM EDTA → 1ml
 - 75mM NaCl → 1,5ml
 - 1% SDS → 2ml
 - 15ml DEPC-H₂O

Όταν τα stock είναι:

- Tris-HCl → 1M pH 8.0
 - EDTA → 0,5M pH 8.0
 - NaCl → 1M
 - SDS → 10%
2. Διάλυμα phenol / chloroform 2:1 600μl ανά δείγμα
 3. Διάλυμα phenol / chloroform 1:1 600μl ανά δείγμα
 4. Διάλυμα chloroform / isoamyl alcohol 49:1 500μl ανά δείγμα
 5. Διάλυμα αποστειρωμένου LiCl 8M 250μl ανά δείγμα
 6. Διάλυμα NaAc pH5.3 20μl ανά δείγμα
 7. Διάλυμα 100% EtOH 500μl ανά δείγμα
 8. Διάλυμα 70% EtOH 500μl ανά δείγμα
 9. Επαρκής ποσότητα DEPC-H₂O (περισσότερα από 215μl ανά δείγμα)

Τα διαλύματα τα προετοιμάζετε και τα χειρίζεστε μέσα στο χώρο του απαγωγού γιατί μυρίζουν άσχημα (κυρίως τα διαλύματα με χλωροφόρμιο). Οι περισσότερες φυγοκεντρήσεις γίνονται στις 13000 rpm για 5 λεπτά!

Όταν ξεκινήσαμε την εξαγωγή του RNA, κάναμε τη λειοτρίβιση των ιστών με τα αποστειρωμένα έμβολα, έχοντας το erendorf του δείγματος εντός υγρού αζώτου. Βάλαμε τα erendorfs με τα δείγματα σε πάγο και αφού αφήσαμε λίγο να εξατμιστεί το υγρό άζωτο, προσθέσαμε 800μl διαλύματος REB και 600μl διαλύματος phenol / chloroform 2:1. Κάναμε vortex και φυγοκεντρήσαμε. Πρέπει να προσέχετε το χειρισμό της φαινόλης και του χλωροφορμίου. Η φαινόλη προστατεύει το RNA από RNAσες, αλλά είναι φωτοευαίσθητη και τα διαλύματά σας μπορεί να οξειδωθούν και να μην είναι λειτουργικά. Το χλωροφόρμιο, προστατεύει το δείγμα και συνδέεται με την φαινόλη για να την απομακρύνει, αλλά γλιστράει από το tip και για αυτό πρέπει να κάνετε γρήγορες κινήσεις.

Μετά την φυγοκέντρηση ανακτήσαμε το υπερκείμενο προσεχτικά και προσθέσαμε 600μl phenol / chloroform 1:1. Κάναμε vortex και φυγοκεντρήσαμε.

Ανακτήσαμε το υπερκείμενο προσεχτικά και προσθέσαμε 500μl chloroform / isoamyl alcohol 49:1 για να καθαριστούν καλά οι φαινόλες. Κάναμε vortex και φυγοκεντρήσαμε.

Ανακτήσαμε το υπερκείμενο προσεχτικά και προσθέσαμε 250μl LiCl 8M (για να κατακρημνίσουμε το RNA αλλά όχι το DNA).

Αφήσαμε τα δείγματα για ένα overnight στους 4°C

Φυγοκεντρήσαμε για να συλλέξουμε το RNA ίζημα. Η φυγοκέντρηση γίνεται στους 4°C (coldroom) στις 13000 rpm για 30 λεπτά.

Κρατήσαμε το ίζημα και φυλάξαμε το υπερκείμενο στον πάγο. (Το ίζημα μπορεί και να μην είναι ορατό).

Επαναδιαλύσαμε το ίζημα σε 200μl υπερκάθαρο νερό, πιπετάροντας καλά. Προσθέσαμε NaAc 20μl pH 5.3 και προσθέσαμε 500μl 100% EtOH. Ανακουνήσαμε τα δείγματα και ανακατεύσαμε με το χέρι, μετά τα τοποθετήσαμε σε στατώ και τα βάλουμε στου -80°C για 20 λεπτα.

Φυγοκεντρήσαμε για 30 λεπτά στους 4°C (coldroom) στις 13000 rpm.

Πετάξαμε το υπερκείμενο και κρατήσαμε το ίζημα.

Πλύναμε με 500μl 70% EtOH. Ανακατεύσαμε κτυπώντας ελαφρά με το δάχτυλο.

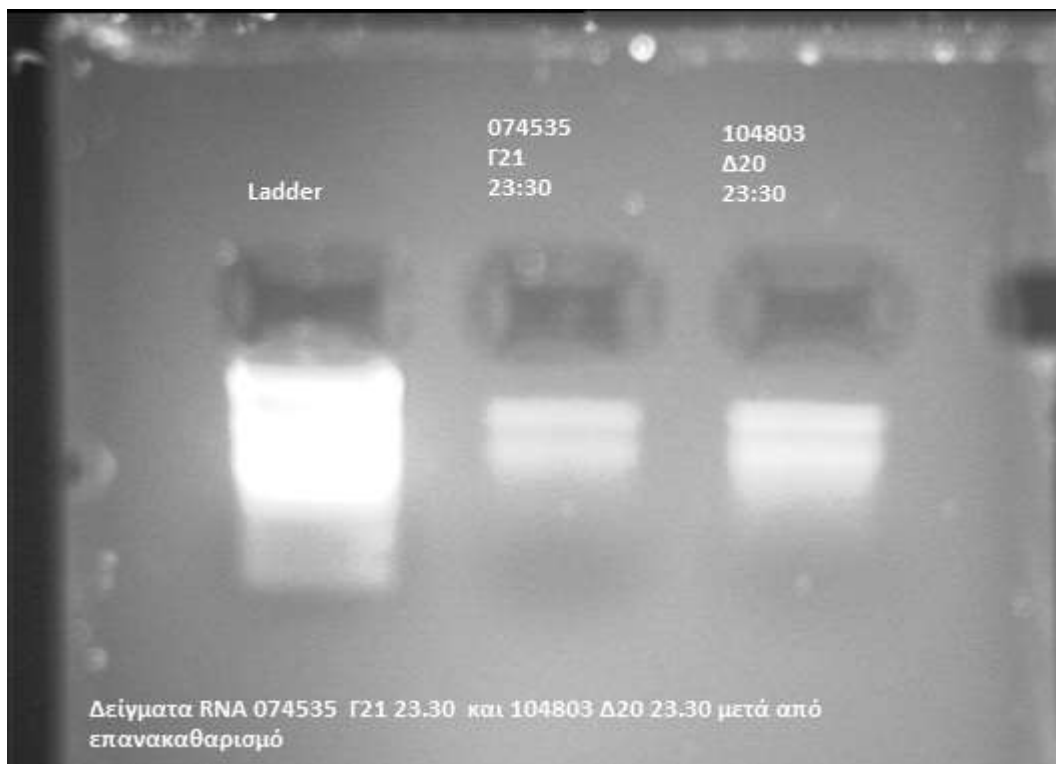
Φυγοκεντρήσαμε για 15 λεπτά στους 4°C (coldroom) στις 13000 rpm. Πετάξαμε το υπερκείμενο και κρατήσαμε το ίζημα. Αφήσαμε για 15 λεπτά στον πάγο τα erpendorfs για να στεγνώσουν.

Επαναδιαλύσαμε το ίζημα σε 15μl υπερκάθαρο νερό και φυλάξαμε τα δείγματα στους -20°C

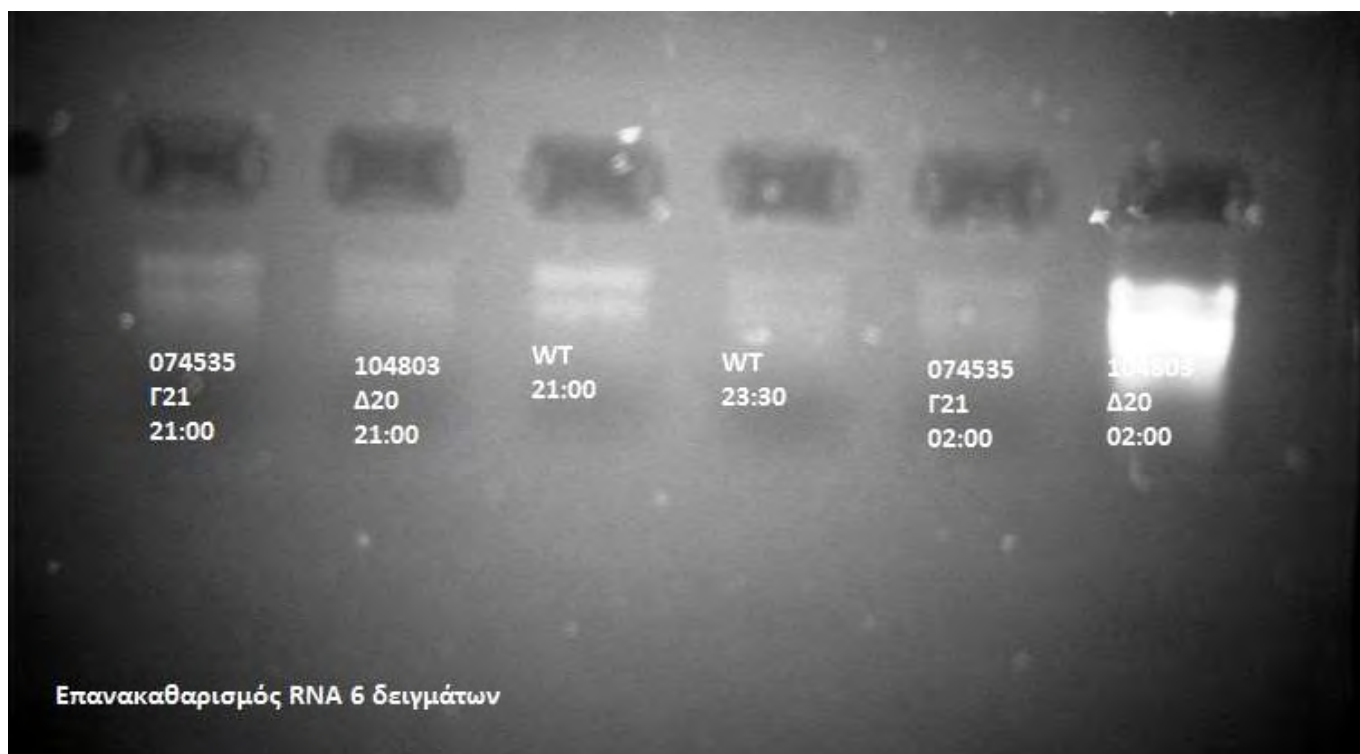
Στη συνέχεια τρέξαμε 2 μl RNA σε τζελ αγαρόζης 2% με ειδική χρωστική, για να δούμε αν έχουμε πάρει RNA και σε τι βαθμό είναι καθαρό, αλλά φάνηκε ότι δεν είχε γίνει σωστά ο καθαρισμός και το τελευταίο WT δείγμα φαινόταν να μην είχε δώσει τίποτα. Δύο ήταν οι πιθανοί λόγοι. Ότι μπορεί κατά τον καθαρισμό των φάσεων να μην παίρναμε μόνο από το υπερκείμενο αλλά και από την βρώμικη κάτω φάση! Επίσης μετά από προσεχτικό έλεγχο παρατηρήσαμε ότι η ποσότητα της φαινόλης από την οποία είχαμε χρησιμοποιήσει στα διαλύματα έδειχνε σημάδια οξείδωσης.



Αποφασίσαμε να κάνουμε επιπλέον καθαρισμό σε 2 δείγματα για να δούμε τι δεν πήγε καλά. Μετά τον καθαρισμό τρέξαμε τα 2 δείγματα σε τζελ και είδαμε και στα 2 καθαρό RNA!



Επανακαθαρίσαμε λοιπόν και τα υπόλοιπα δείγματα εκτός από το WT 02:00 και πήραμε την παρακάτω εικόνα:



Όπως φαίνεται παραπάνω, τα περισσότερα δείγματα δώσανε πολύ καλή εικόνα, εκτός από το Het-Salk 104803 Δ20 02:00, κάτι που μπορεί να οφείλεται σε κακό χειρισμό κατά τον καθαρισμό.

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήσαμε για τον επανακαθαρισμό είναι το εξής:

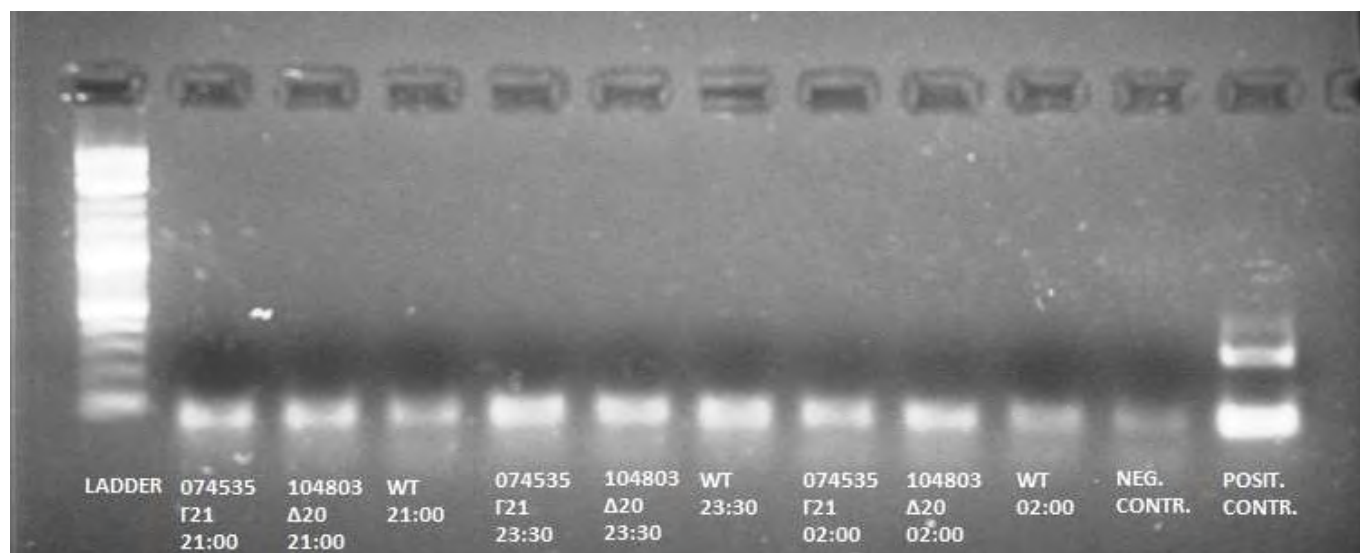
Είχαμε δείγμα 150μl (8μl δείγμα από το RNA extraction + 142μl DEPC-H₂O) και προσθέσαμε 150μl διαλύματος phenol / chloroform 1:1. Κάναμε vortex για μισό λεπτό και μετά φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13000 rpm. Μεταφέραμε προσεχτικά την επάνω φάση σε νέο erpendorf και προσθέσαμε 150μl chloroform. Κάναμε vortex για μισό λεπτό και μετά φυγοκέντρωση για για 5 λεπτά στις 13000 rpm. Μεταφέραμε προσεχτικά την επάνω φάση σε νέο erpendorf και προσθέσαμε 15μl 3M sodium acetate και 375μl παγωμένη EtOH. Ανακατεύσαμε απαλά με το χέρι και αφήσαμε τα δείγματα περίπου 30 λεπτά στον πάγο να στεγνώσουν και μετά τα βάλαμε για 20 λεπτά στους -80° C. Στη συνέχεια φυγοκεντρήσαμε στους 4° C για 30 λεπτά στις 13000 rpm. Κατόπιν πετάξαμε το υπερκείμενο, και προσθέσαμε 500μl 70% EtOH ανακατεύσαμε με το χέρι. Ξανακάναμε μια τελευταία φυγοκέντρωση στους 4° C για 15 λεπτά στις 13000 rpm και αφού πετάξαμε το υπερκείμενο, αφήσαμε για 10 λεπτά το ίζημα στον πάγο να στεγνώσει και μετά επαναδιαλύσαμε με 8μl H₂O.

Αφού είδαμε ότι το πρωτόκολλο επανακαθαρισμού σε γενικές γραμμές δούλεψε αποφασίσαμε να συνεχίσουμε με επεξεργασία των δειγμάτων με DNAσες! Για την επεξεργασία με DNAσες των δειγμάτων χρησιμοποιήσαμε το kit DNase της invitrogen και βάλαμε σε κάθε δείγμα:

- 8μl δείγμα RNA extraction
- 1μl 10x DNase I Reaction Buffer
- 1μl DNase
- 0μl DEPC-H₂O γιατί ο τελικός όγκος της αντίδρασης θέλαμε να είναι 10μl.

Επώασαμε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετά προσθέσαμε 1μl EDTA και επώασαμε για 10 λεπτά στους 65 °C.

Στη συνέχεια κάναμε PCR ελέγχου με primers ουβικουΐτινης που στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* δίνει αρκετές εμφανείς μπάντες για να δούμε αν συνεχίζουν να υπάρχουν ίχνη DNA στα δείγματά μας μετά την πέψη με DNase. Ως θετικό control δείγμα χρησιμοποιήσαμε ένα παλαιότερο cDNA δείγμα: το «20:30 1:40» από τα cDNA του Λέκτορα Δελή Κωνσταντίνου. Η εικόνα που πήραμε στο τζελ ήταν καθαρή για όλα τα δείγματα εκτός από αυτή του θετικού control όπως φαίνεται παρακάτω.



Το επόμενο βήμα ήταν να κάνουμε φωτομέτρηση των δειγμάτων. Τα αποτελέσματά της φωτομέτρησης για κάθε δείγμα ήταν:

- | | | | |
|-----------------------------|-------|---|-------------|
| • Hom-Salk 074535c Γ21 | 21:00 | → | 80,7 ng/μl |
| • Het-Salk 104803 Δ20 | 21:00 | → | 84,7 ng/μl |
| • Wild Type Arabidopsis th. | 21:00 | → | 100,1 ng/μl |
| • Hom-Salk 074535c Γ21 | 23:30 | → | 142,1 ng/μl |
| • Het-Salk 104803 Δ20 | 23:30 | → | 119,8 ng/μl |
| • Wild Type Arabidopsis th. | 23:30 | → | 97,1 ng/μl |
| • Hom-Salk 074535c Γ21 | 02:00 | → | 116,8 ng/μl |
| • Het-Salk 104803 Δ20 | 02:00 | → | 95,7 ng/μl |
| • Wild Type Arabidopsis th. | 02:00 | → | 86,7 ng/μl |

cDNA και Real-Time PCRs

Μετά φτιάξαμε cDNA χρησιμοποιώντας το εμπορικό kit της Invitrogen. Η διαδικασία ήταν η εξής: Δουλεύαμε πάντα έχοντας τα δείγματα σε πάγο. Αρχικά ανακατεύσαμε λίγο και φυγοκεντρήσαμε τα δείγματα. Στη συνέχεια φτιάξαμε για κάθε παρτίδα δείγματος από ένα διάλυμα που περιείχε:

9μl δείγματος

1μl oligo(dT)

1μl dNTPs

1μl DEPC-H₂O

αυτά τα συστατικά τα βάλουμε σε master mix και μετά τα μοιράσαμε την κατάλληλη ποσότητα στα erpendorfs των δειγμάτων.

Επώασαμε τα δείγματα για 5 λεπτά στους 65° C και μετά τα βάλουμε στον πάγο για τουλάχιστον 1 λεπτό.

Στην συνέχεια ετοιμάσαμε το παρακάτω cDNA Synthesis master mix που περιείχε τις αναλογικές ποσότητες για όλα τα δείγματα. Για κάθε ένα δείγμα βάλουμε

4μl 5x First – Strand Buffer

2μl DTT

1μl RNase Out

1μl SuperScript™ III RT

Προσθέσαμε 8μl cDNA Synthesis mix στο μείγμα των 12μl του δείγματος για να έχουμε τελικό όγκο 20μl. Επώασαμε για 50 λεπτά στους 50° C. Τερματίσαμε την αντίδραση στους 85° C για 5 λεπτά και μετά βάλουμε τα δείγματα στον πάγο. Κάναμε μια ελαφριά φυγοκέντρηση και προσθέσαμε σε κάθε δείγμα 1μl RNase H και επώασαμε για 20 λεπτά στους 37° C. Τέλος αποθηκεύσαμε τα δείγματα στους -20° C.

Αφού φτιάξαμε τα cDNAs κάναμε Real-Time PCR με primers ουβικουΐτινης για να κανονικοποιήσουμε τα δείγματα.

Στα διαλύματα για την Real-Time PCR βάλουμε:

- > 10μl Buffer
- > 0,8μl Primer (έμπροσθεν)
- > 0,8μl Primer (ανάστροφος)
- > 1μl δείγμα
- > 0,4μl ROX (χρωστική αναφοράς)
- > 7μl H₂O
- >

Και τρέχουμε το πρόγραμμα της Real-Time PCR για την ουβικουΐτινη που έχει τα εξής στάδια:

- Step 1: 95° C για 3 λεπτά
- Step 2: 95° C για 30 δευτερόλεπτα

} [43]

- Step 3: 56° C για 30 δευτερόλεπτα
 - Step 4: 72° C για 11 δευτερόλεπτα
 - Step 5: 95° C για 1 λεπτό
 - Step 6: 55° C για 30 δευτερόλεπτα
 - Step 7: 95° C για 30 δευτερόλεπτα
 - Step 8: 25° C για 3 λεπτά
- 42 κύκλοι

Χρειάστηκε επιπλέον να γίνουν άλλες 2 Real-Time PCRs ώστε να πάρουμε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα, πού όμως χρησιμοποιήσαμε και primers για το γονίδιο αναφοράς της ουβικουϊτίνης αλλά και primers για την AtNOC:

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

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

Τα δείγματα που μπήκαν στις PCRs ήταν εις τριπλούν ώστε να μπορούμε να κάνουμε και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

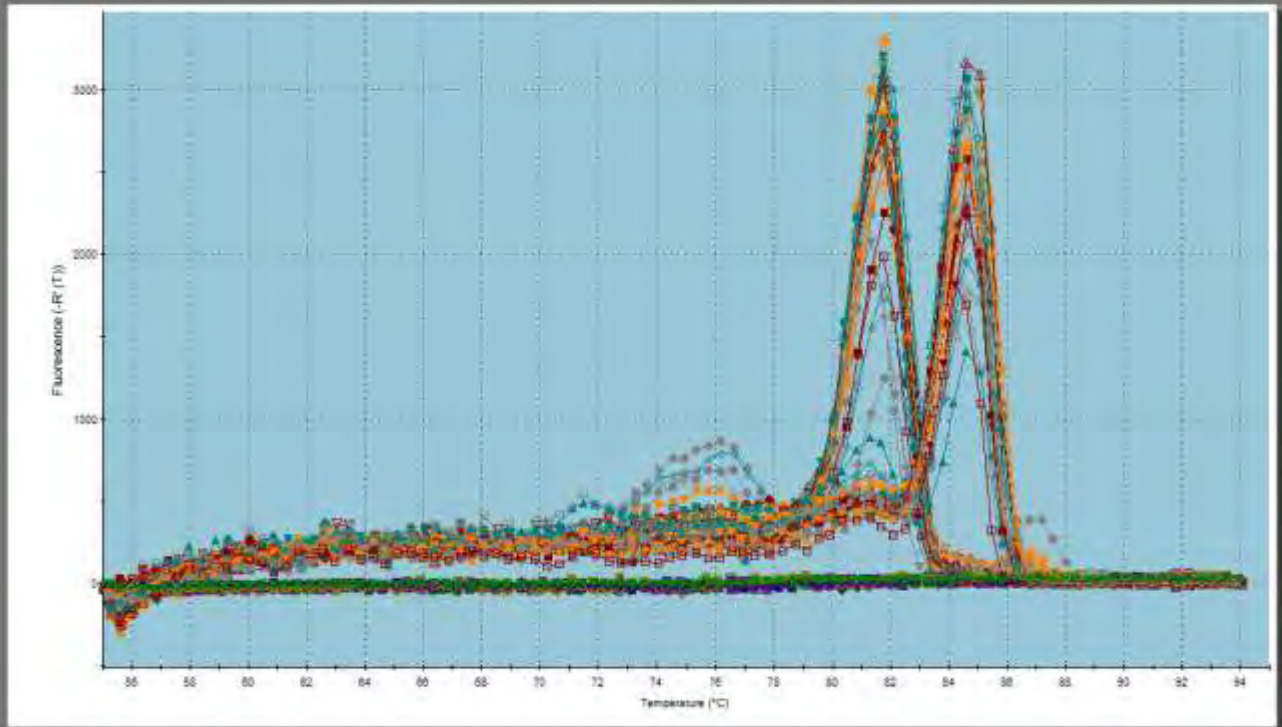
Μετά την λήψη των αποτελεσμάτων της έκφρασης του γονιδίου της AtNOC στα mutant φυτά για την AtNOC κάναμε και Real-Time PCR με primers για τα γονίδια TOC1 και CCA1 , πάλι με γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της ουβικουϊτίνης, για να δούμε τυχόν μεταβολή της έκφρασης αυτών των γονιδίων στα μεταλλάγματα της AtNOC.

Αποτελέσματα:

Μετά τις Real-Time PCRs κανονικοποιήσεων βάλαμε μια Real-Time PCR στα δείγματα Hom-Salk 074535c Γ21 και Het-Salk 104803 Δ20 και WT Arabidopsis thaliana ελέγχοντας την έκφραση της AtNOC και της Ουβικουϊτίνης στα time points 21:00, 23:30, 02:00 που κάναμε τις δειγματοληψίες. Η PCR μπήκε εις τριπλούν για καλύτερη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

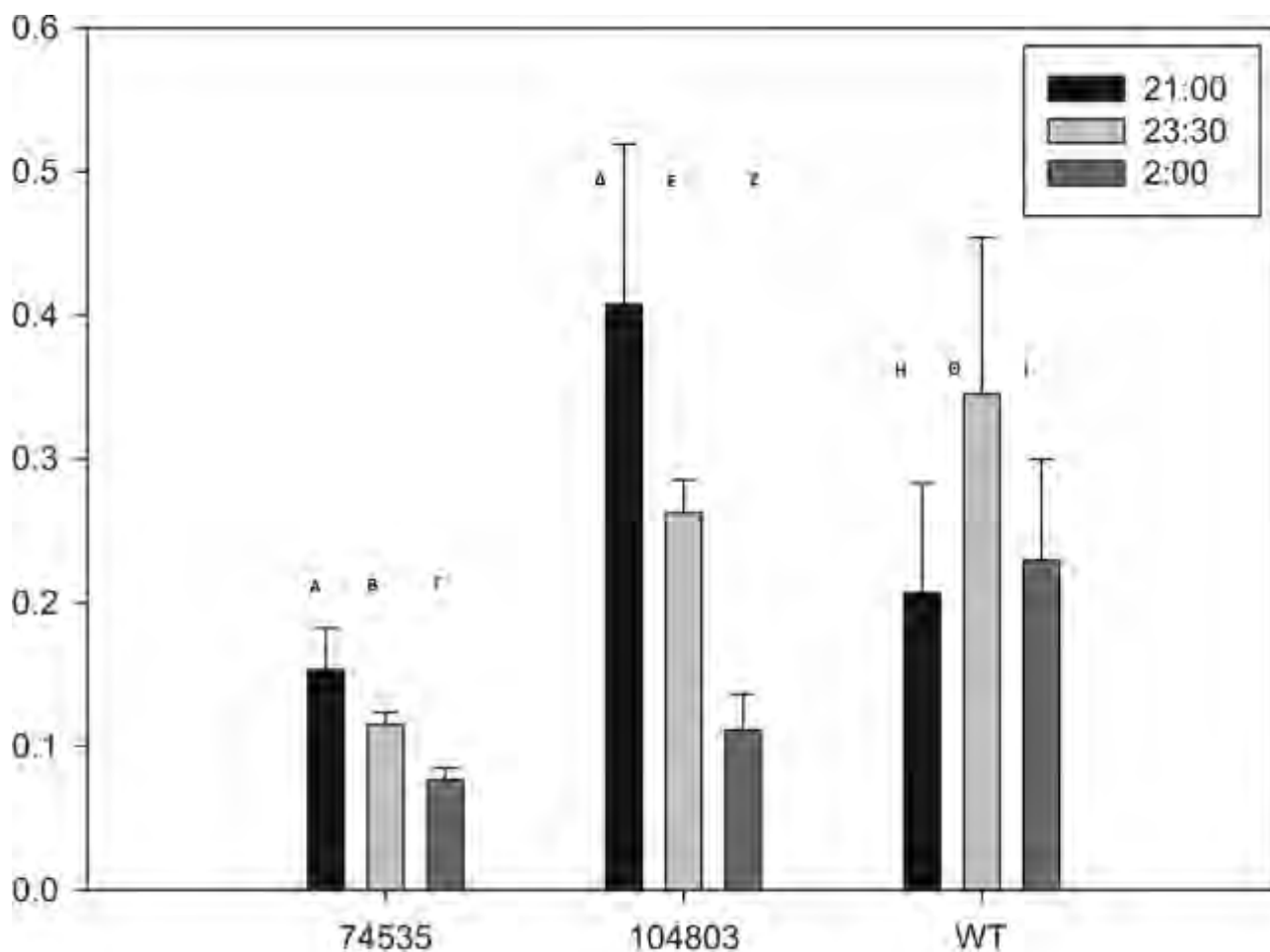
Πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα:

Dissociation Curve

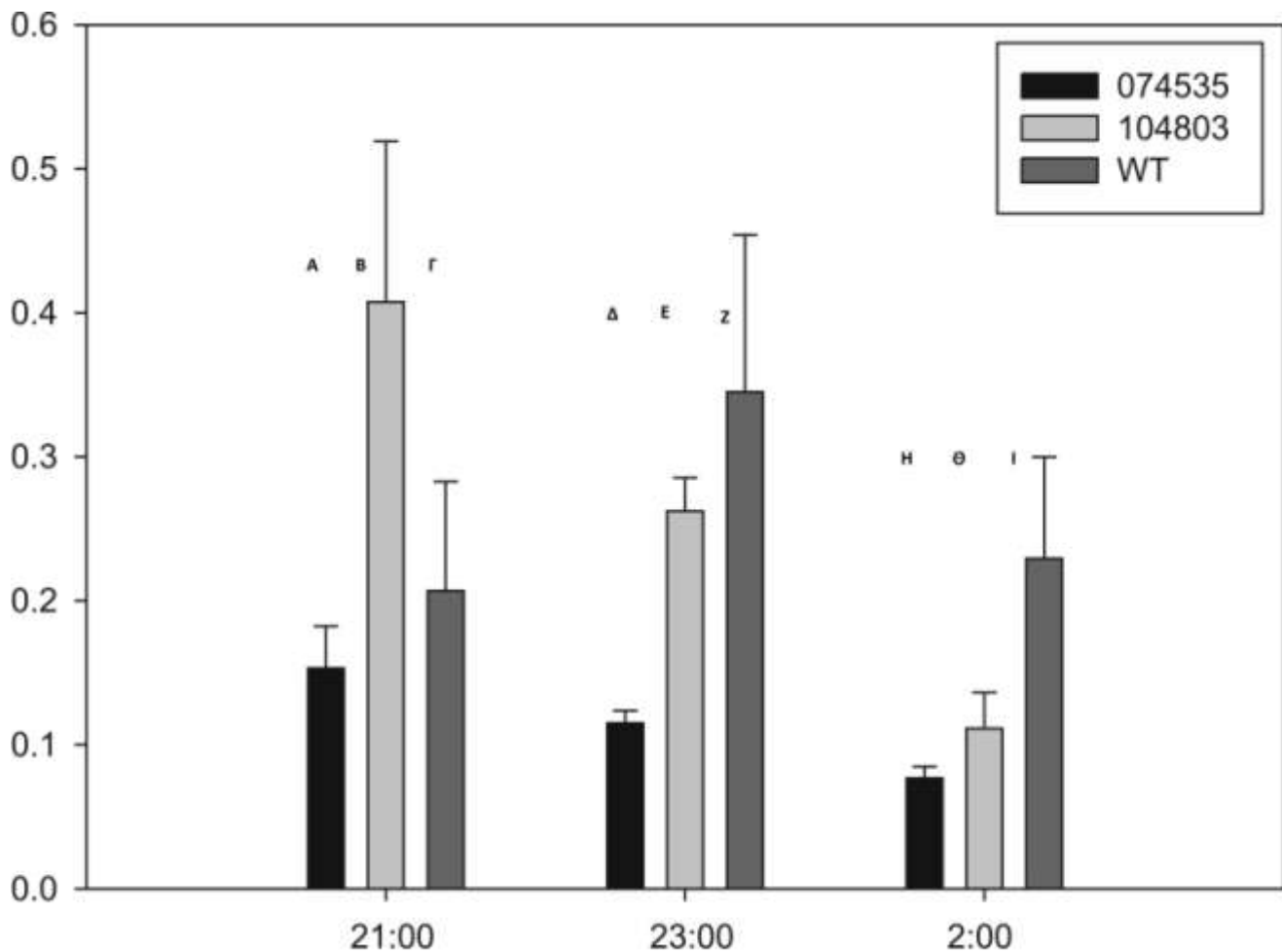


Στην παραπάνω εικόνα βλέπουμε ότι η PCR έχει δουλέψει σχετικά καλά χωρίς να έχει δώσει μη ειδικές καμπύλες. Έχουμε δύο κορυφές. Η πρώτη είναι της AtNOC σε T_m περίπου 82°C και η δεύτερη αντιστοιχεί στην UBQ σε T_m περίπου 85°C .

Μετά την εξαγωγή των αποτελεσμάτων στο excel και την στατιστική επεξεργασία και τη διόρθωση του στατιστικού σφάλματος τους με το πρόγραμμα **LinRegPCR** πήραμε τις παρακάτω εικόνες:



Εικόνα . Τα Α, Β, Γ, αντιστοιχούν στα δείγματα Hom-Salk 074535 Γ21 21:00, 23:30, 02:00 αντίστοιχα. Τα Δ, Ε, Ζ, αντιστοιχούν στα δείγματα Het-Salk 104803 Δ20 21:00, 23:30, 02:00 αντίστοιχα. Τα Η, Θ, Ι αντιστοιχούν στα Wild Type *Arabidopsis thaliana* 21:00, 23:30, 02:00 αντίστοιχα.

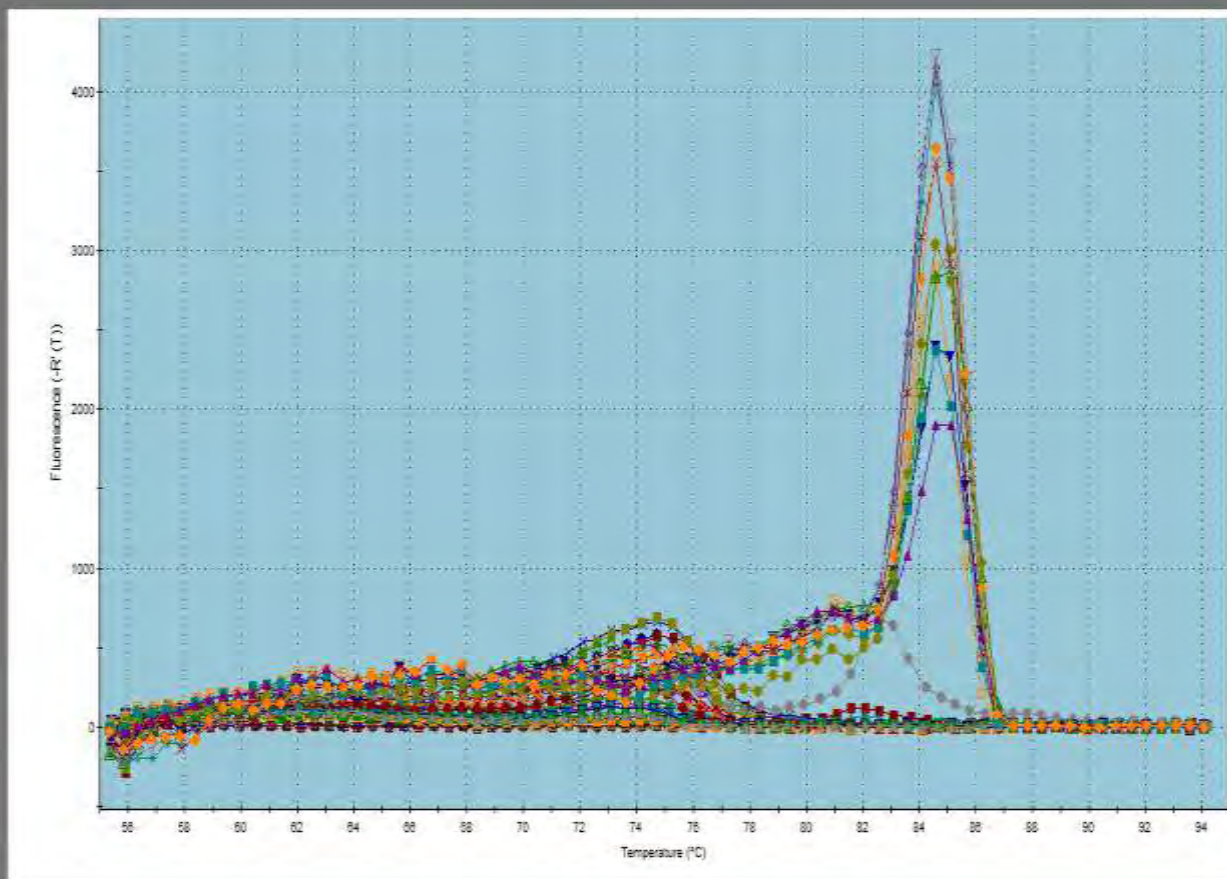


Εικόνα . Τα Α, Β, Γ, αντιστοιχούν στις δειγματοληψίες που έγιναν στις 21:00 από τις παρτίδες Hom-Salk 074535 Γ21, Het-Salk 104803 Δ20, Wild Type *Arabidopsis thaliana* αντίστοιχα. Τα Δ, Ε, Ζ, αντιστοιχούν στις δειγματοληψίες που έγιναν στις 23:30 από τις παρτίδες Hom-Salk 074535 Γ21, Het-Salk 104803 Δ20, Wild Type *Arabidopsis thaliana* αντίστοιχα. Τα Η, Θ, Ι αντιστοιχούν στις δειγματοληψίες που έγιναν στις 02:00 από τις παρτίδες Hom-Salk 074535 Γ21, Het-Salk 104803 Δ20, Wild Type *Arabidopsis thaliana* αντίστοιχα..

Και από τις δύο εικόνες γίνεται εμφανές ότι το αγρίου τύπου φυτό έχει δώσει την αναμενόμενη καμπύλη έκφρασης με μέγιστο στις 23:00 λίγο πριν πέσει το σκοτάδι στις 24:00. Τα δύο μεταλλάγματα έχουν εμφανώς πολύ μικρότερη έκφραση της AtNOC, σε σχέση με το WT. Κυρίως το Hom-Salk 074535 Γ21. Πράγμα που σημαίνει ότι η προσπάθειά μας να ταυτοποιήσουμε ένα φυτό που να είναι αποσιωπημένο όσον αφορά την έκφραση της AtNOC, ήταν επιτυχής.

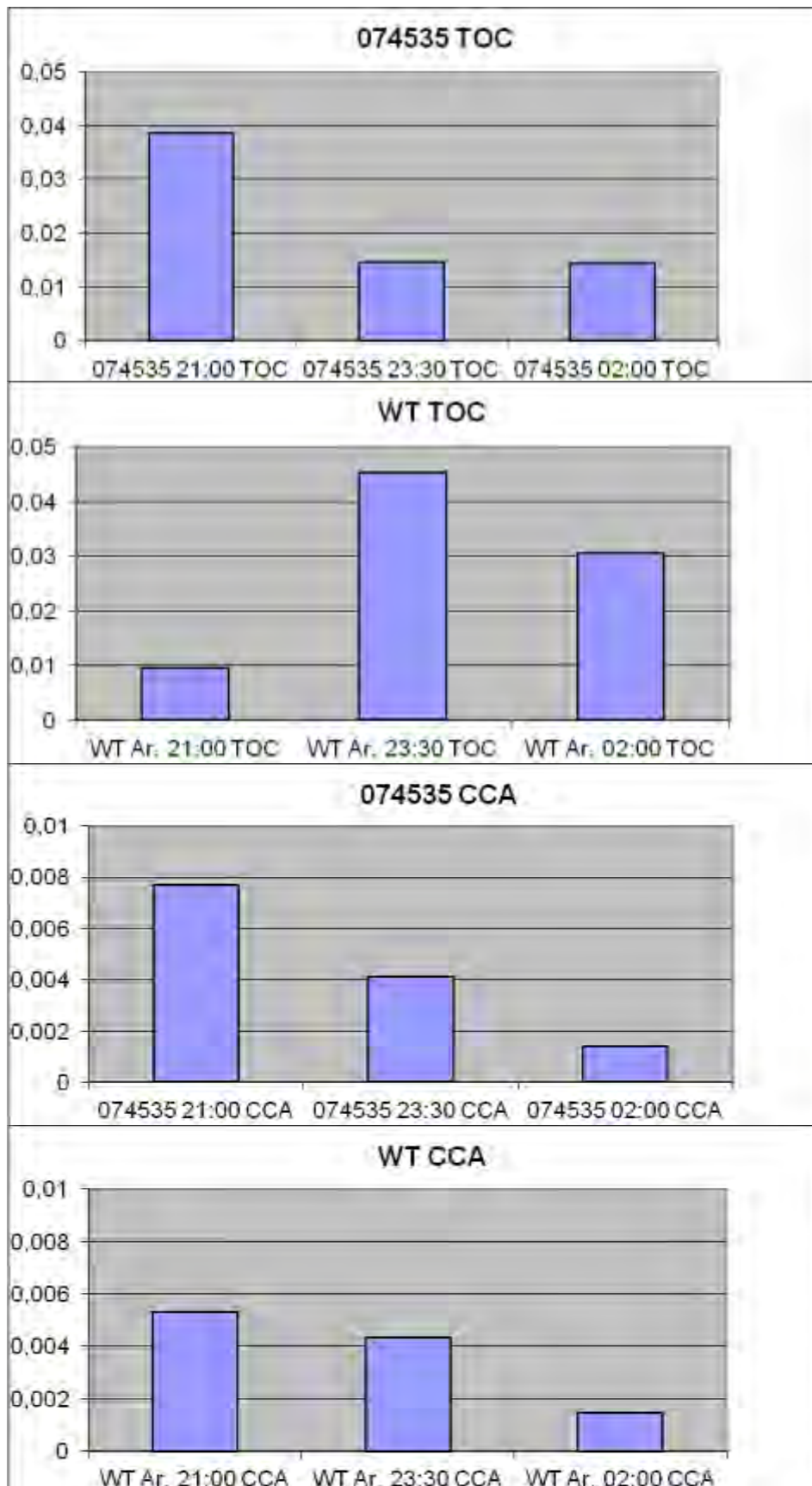
Στη συνέχεια, αφού βρήκαμε το φυτό που ψάχναμε ώστε να έχει χαμηλότερη έκφραση AtNOC από το Wild Type φυτό, βάλαμε μια Real-Time PCR με primers τα κερκαδικά γονίδια TOC1 και Cca1 και το γονίδιο αναφοράς της UBQ, στο αποσιωπημένο φυτό και στο αγρίου τύπου. Και πήραμε τα εξής αποτελέσματα.

Dissociation Curve



Βλέπουμε ότι ενώ η PCR για την UBQ έχει δουλέψει κανονικά, φαίνεται όμως ότι για τα άλλα δύο γονίδια δεν έχουμε πάρει καμπύλες που θα μας έδιναν σαφή εικόνα.

Ύστερα από την εξαγωγή των αποτελεσμάτων στο excel και την στατιστική επεξεργασία τους και διόρθωσή τους, βλέπουμε τις εξής εικόνες.



Ενώ μετά τις διορθώσεις φαίνεται ότι οι κορυφές από τα Wild Type Φυτά ομοιάζουν με τις αναμενόμενες πρότυπες καμπύλες, και το γεγονός ότι το CCA1 γονίδιο δεν εμφανίζει ιδιαίτερη μεταβολή στην έκφρασή του, κάτι που συνάδει με το γεγονός ότι είναι πρωινό γονίδιο και δεν εκφράζεται τις ώρες τις δειγματοληψίας, δεν μπορούμε να εκφράσουμε ασφαλή συμπεράσματα μιας και η καμπύλη δεν είναι πολύ ειδική, και όριο του στατιστικού λάθους είναι πολύ σημαντικό.

Συζήτηση:

Σκοπός του πειράματος ήταν να μελετήσουμε μια καινοτόμα Αποαδένυλαση, την AtNOC ή αλλιώς Εσπερίνη και μάλιστα σε ένα φυτικό σύστημα. Η αποαδενυλάση αυτή είναι καινοτόμα γιατί είναι η πρώτη απόαδενυλάση που ταυτοποιείται να σχετίζεται με τον κερκάδιο ρυθμό στα φυτά. Οι αποαδενυλάσες που έχουν μελετηθεί στα φυτά είναι πολύ λίγες (οι AtPARN και AtCAF1) και γενικά τα δεδομένα που είναι γνωστά είναι πολύ λίγα.

Αυτό όμως που είναι πραγματικά ενδιαφέρον με την AtNOC είναι το γεγονός πως επειδή είναι μια αποαδενυλάση που ρυθμίζεται κερκάδια και εμπλέκεται στο κερκαδικό ρυθμό του φυτού είναι για εμάς πιο εύκολο να καταφέρουμε να αναγνωρίσουμε τα στοχευόμενα υποστρώματά της. Παρότι αρκετές μελέτες έχουν γίνει πάνω σε αποαδενυλάσες σε διάφορα οργανικά συστήματα, δεν υπάρχει σαφή εικόνα, παρά μόνο θεωρίες, για το πώς άλλες αποαδενυλάσες καταφέρνουν να έχουν υψηλή εξειδίκευση για τα υποστρώματα που αποαδενυλιώνουν ενώ άλλες έχουν πιο ευρύ και επικαλυπτόμενο φάσμα υποστρωμάτων και προσδίδουν έτσι στον οργανισμό προσαρμοστικότητα. Δεν μπορούμε όμως να γνωρίζουμε τι εξωτερικά ερεθίσματα τις ενεργοποιούν. Η AtNOC είναι ιδιαίτερη σε αυτό τον τομέα, αφού ένα εξωτερικό ερέθισμα που την ρυθμίζει είναι το φως. Κάτι που μπορούμε να χειριστούμε εύκολα στο εργαστήριο.

Έτσι ελπίζουμε ότι αν κατανοήσουμε πώς η AtNOC ρυθμίζεται η ίδια και με τη σειρά της ρυθμίζει την έκφραση άλλων γονιδίων θα μπορέσουμε να κατανοήσουμε πολλά περισσότερα για τις αποαδενυλάσες, αλλά και για τις βιολογικές λειτουργίες των φυτών!

Για να προχωρήσουμε όμως περισσότερο, έπρεπε να καλλιεργήσουμε ένα φυτό που θα είναι αποδεδειγμένα μετάλλαγμα ως προς την έκφραση της AtNOC, για να δούμε τι επιπτώσεις μπορεί να έχει στη φυσιολογία του φυτού αλλά και στην έκφραση άλλων γονιδίων η αποσιώπηση της AtNOC. Αυτό το επιτύχαμε, με την τεχνική της T-DNA ένθεσης μπορέσαμε να εισάγουμε εξωγενές γενετικό υλικό εντός του γονιδίου της AtNOC και να διαταράξουμε την έκφρασή της. Μετά από καλλιέργειες αυτογονιμοποιούμενων φυτών και ταυτοποίηση τους ως προς την ομοζυγωτία της ένθεσης, και αφού υποβάλαμε φυτάρια από αυτές τις ομόζυγες παρτίδες σε συνθήκες φωτοπεριόδου 16 ώρες φως / 8 ώρες σκότους, με την τεχνική της Real-Time PCR βρήκαμε στέλεχος φυτού που έχει σημαντικά μειωμένη έκφραση της AtNOC. Δεν παρατηρήσαμε όμως κάποια εμφανή μεταβολή στην ανάπτυξη ή την φυσιολογία του φυτού.

Στο μέλλον θα πρέπει να δούμε πώς αυτά τα μεταλλάγματα ανταποκρίνονται και υπό άλλες συνθήκες, όπως αλλατότητα, υγρασία κ.α. Όπως επίσης να διευκρινίσουμε και τον μοριακό μηχανισμό αλληλεπίδρασης της AtNOC με άλλα συστατικά του Κερκάδικου Ρολογιού.

Βιβλιογραφία:

Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να αποδώσω στην φοιτήτρια, νυν μεταπτυχιακή φοιτήτρια, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Αναστασία Τουματσίδου, που ή εξαιρετική δουλειά της για την κλωνοποίηση και τον χαρακτηρισμό του γονιδίου της AtNOC και η διπλωματική της εργασία έβαλαν τις βάσεις για την δικιά μου δουλειά, όταν υπάρχουν τόσο λίγες πληροφορίες για φυτικές αποαδενυλάσες! Ευχαριστώ!

Stacey L. Harmer *Annu. Rev. Plant Biol.* 2009

Justin W. Walley et al. *Plant Physiology* February 2010

Anderson J.S.J., Parker R., *EMBO J.* 1998; 17: 1497–1506

Åström, J., Åström A., Virtanen A., *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 18154–18159

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

Belostotsky DA., Sieburth LE., *Current Opinion in Plant Biology* 2009; 12: 96-102

Besharse JC., *PNAS* 2007; 104: 9888-9893

Cermakian N., Sassone- Corsi P., *Nature* 2000; 1: 59-67

Cheng Y., Liu W., Yan Y., Zhou H., *Protein and Peptide Letters* 2006; 13: 125-128

Chen C.Y. et al., *Cell* 2001; 107, 451–464

Chiba Y., Johnson MA., Lidder P., Vogel JT., Van Erp H., Green PJ., *Gene* 2004; 328: 95-102

Dodson R.E., Shapiro D.J., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2002; 72: 129–164

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

Dunlap J.C., *Cell* 1999; 96: 271-290

Dykhhoorn D.M., Novina C.D., Sharp, P.A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4: 457–467

Garneau N., Wilusz J., Wilusz, C., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007; 8: 113–126

Green CB., *Journal of Neuroendocrinology* 2003; 15: 350-354

Green CB., Douris N., Kojima S., Strayer CA., Fogerty J., Lourim D., Keller SR.,

Greiner-Stoeffele T., Grunow M., Hahn U., *Analytical Biochemistry* 1996; 240: 24-28

Houseley J., Tollervey D., *Cell* 2009; 136: 763-776

Hoof van A., Parker R., *Cell* 1999

Hunter-Ensor M., Ousley A., Sehgal A., *Cell* 1996; 84: 677-685

James AB., Monreal JA., Nimmo GA., Kelly CL., Herzyk P., Jenkins G., Nimmo HG., *Science* 2008; 322: 1832-1835

Körner CG., *EMBO J.* 1998; 17: 5427–5437

Liu X., Green CB., *Molecular and Cellular Biology* 2002; 22: 7501-7511

Liu H., Rodgers N.D., Jiao X., Kiledjian M., EMBO J. 2002; 21: 4699–4708

Maquat L.E., Carmichael, G.G., Cell 2000; 26: 173–176

McClung RC, Plant Cell 2006; 18: 792-803

Meyer S., Temme C., Wahle E., Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 2004; 39:197–216

Mitchell P., Tollervey D., Curr. Opin. Cell Biol. 2001; 13: 320–325

Mukherjee D. et al., EMBO J. 2002; 21: 165–174

Més P., Int.J. Dev. Biol. 2005; 49: 491-500

Tucker M., Parker R., Annu. Rev. Biochem. 2000; 69: 571–595

Wang Z., Kiledjian M., Cell 2001; 107: 751–762

Wu M., Reuter M., Lilie H., Liu Y., Wahle E., Song H., EMBO Journal 2005; 24: 4082-4093

Yamashita A., Nature Structural & Molecular Biology 2005;12: 1054–1063

Yanovsky MJ., Kay SA., Nature 2003; 4: 265-275

Shuang Niu et al. Journal Pone November 2011

T-DNA Primers Design (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers>)

Wikipedia (http://en.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana)