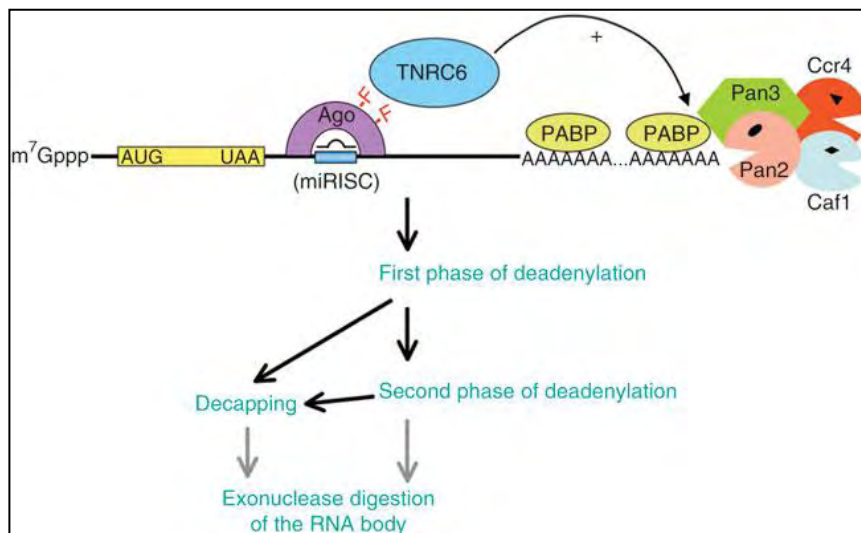


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών Του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Διερεύνηση του ρόλου της αποαδενυλάσης AtHesp σε αβιοτικές καταπονήσεις στο φυτό
Arabidopsis thaliana



ΛΑΡΙΣΑ 2016

Διερεύνηση του ρόλου της αποαδενυλάσης AtHesp σε αβιοτικές καταπονήσεις στο φυτό
Arabidopsis thaliana
Investigation of the role of deadenylase AtHesp at abiotic stress in plants of *Arabidopsis*
thaliana

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, και κυρίως την Κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη, η οποία ανέλαβε την εποπτεία της παρούσας πτυχιακής μελέτης και συνέβαλε στην ομαλή διεξαγωγή και περάτωση της εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κυρία Κροκιδά Αφροδίτη υπογήφια διδάκτορα την περίοδο που πραγματοποιήθηκε το πείραμα για τη βοήθεια της, έτσι ώστε να διεξαχθεί το πείραμα, καθώς και όλους τους διδακτορικούς, μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας φυτών και Περιβάλλοντος για την ευχάριστη συνεργασία και τις συμβουλές το διάστημα που βρέθηκα στο εργαστήριο.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, ΤΒΒ, Π.Θ.

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, ΤΒΒ, Π.Θ.

Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, ΤΒΒ, Π.Θ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Η ΕΣΠΕΡΙΝΗ.....	6
1.2 ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΙ.....	9
1.3 ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ.....	12
1.4 ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΣΕ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ.....	15
ΣΚΟΠΟΣ.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
2.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ, ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	18
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	19
2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA,RNA) ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗ.....	20
2.4 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΛΙΚΟΥ RNA.....	21
2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR-Polymerase Chain Reaction).....	21
2.6 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ (REVERSE) ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.....	22
2.7 RT-qPCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ.....	23
2.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	24
3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ.....	24
3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA.....	28
3.3 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	30
3.4 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA.....	31
3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΕΣΠΕΡΙΝΗΣ.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εσπερίνη ή νοκτουρίνη (HESP ή NOC) είναι μια κίρκαδικά ρυθμιζόμενη αποαδενυλάση με μέγιστη έκφραση τις απογευματινές ώρες. Σύμφωνα με προηγούμενη πτυχιακή διατριβή της αποφοίτου του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Χατζή Μαρία- Ζαχαρούλα (2012) είχε δειχθεί με την μέθοδο Western Blot ότι η AtHesperin είναι ομόλογη της Νοκτουρίνης , μιας αποαδενυλάσης που υπάρχει στα θηλαστικά, μιας και το αντίσωμα της νοκτουρίνης αναγνωρίζει την ανασυνδιασμένη AtHesperin. Στην παρούσα εργασία σκοπός μας είναι η διερεύνηση του ρόλου της αποαδενυλάσης AtHesperin σε αβιοτικές συνθήκες και συγκεκριμένα τη δράση της AtHesperin σε συνθήκες αλατότητας. Αυτό έγινε με τη μελέτη της συμπεριφοράς μεταλλαγμένων φυτών, που η έκφραση του γονιδίου της AtHesp ήταν μειωμένη.

ABSTRACT

Hesperin or Nocturnin is a circadian adjustable deadenylase with high peak expression at afternoon time. According to a former dissertation written by Chatzi Maria-Zacharoula (2012) where had been shown, based on Western Blot method, that AtHesperin is equivalent to the Nocturnin, a deadenylase which exists in mammals due to an antibody of Nocturnin which is recognizes unpaired AtHesperin. Current thesis is to exploit deadenylase AtHesperin role in abiotic environment and more precisely, AtHesperin action in salty environment. To reach at this point a study over mutant plants was carried out, where as expression of AtHesperin gene was in decline.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ΕΣΠΕΡΙΝΗ

Η AtHesperin (AtHESP) είναι μια αποαδενυλάση που έχει εντοπιστεί στο *Arabidopsis thaliana* και είναι ένα γονίδιο που παρουσιάζει ομοιότητα με τη Nocturnin των θηλαστικών και βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του κερκαδικού ρολογιού. Η AtHESP μπορεί επαρκώς να αφαιρέσει την πολύ(A) ουρά που εμφανίζει αλλοστερική κινητική. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους και η ηλεκτροφόρηση σε συνδυασμό με την ανάλυση κινητικής έχει δείξει ότι το ένζυμο είναι ολιγομερές με τουλάχιστον 3 θέσεις σύνδεσης. Η υπερέκφραση της AtHESP στα φυτά επηρεάζει την έκφραση και την ρυθμικότητα των βασικών γονιδίων του κεντρικού ταλαντωτή TOC1 και CCA1. Η μελέτη έχει αποδείξει μια εξελικτική δραστηριότητα στη βράχυνση της πολύ (A) ουράς στα φυτά και προτείνει ότι η αποαδενυλίωση είναι ένας μηχανισμός που εμπλέκεται στην ρύθμιση του κερκαδικού ρυθμού[1].

Οι Κερκάδιοι ρυθμοί είναι πανταχού παρόντες στο φαινόμενο διατήρησης χρόνου στα ευκαρυωτικά κύτταρα με μια περίοδο περίπου 24 ωρών, που αντιπροσωπεύουν μια προσαρμοστική στρατηγική στις καθημερινές περιβαλλοντικές αλλαγές. Τα τρία κύρια συστατικά που αναγνωρίζονται στο κερκαδιανό σύστημα είναι τα μονοπάτια εισόδου, ο κεντρικός ταλαντωτής και η πορεία εξόδου. Ο βασικός μηχανισμός του ταλαντωτή είναι καλά διατηρημένος και στηρίζεται στη γενική αρχή της αυτορύθμισης των βρόγχων επανατροφοδότησης που αποτελούνται από συγκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες. Στο *Arabidopsis thaliana*, τα 3 γονίδια, LHY, CCA1 και TOC1, ρυθμίζουν τον κεντρικό ταλαντωτή μέσω ενός καλά περιγραφόμενου κατασταλτικού μηχανισμού σε μεταγραφικό επίπεδο, το οποίο έχει πρόσφατα επεκταθεί με πολλές συνιστώσες. Επιπλέον, μετά-μεταγραφικοί και μετά-μεταφραστικοί κανονισμοί, και μετασχηματισμός της χρωματίνης είναι κρίσιμοι για τη διατήρηση του κερκαδικού ρυθμού στα ευκαρυωτικά ρολόγια[1].

Αν και το φυτό *A.thaliana* μπορεί να έχει μέχρι 26 αποαδενυλάσες, οι 16 εξ αυτών έχουν μελετηθεί

εκτενώς, ενώ ένα ένζυμο αποικοδόμησης της πολύ(A) ουράς που σχετίζεται με το κίρκαδικό ρολόι είναι ακόμη ασαφές. Σε έρευνα που έχει γίνει έχει εντοπιστεί μία ομόλογη της Νοκτουρίνης αποαδενυλάσης στο φυτό *Arabidopsis thaliana* που μεταγράφεται σε υψηλότερα επίπεδα το βράδυ. Λόγω του προφίλ έκφρασης αναφέρεται ως *A. thaliana Hesperin* (AtHESP) από την Ελληνική λέξη Έσπερος, Το Αστέρι της Νύκτας. Η AtHESP είναι ένας νέος μεταγραφικός ρυθμιστής του κίρκαδικού ρυθμού που δραστηριοποιείται στην αποικοδόμηση της πολύ(A) ουράς και επηρεάζει ρυθμικά την έκφραση του mRNAs του πυρήνα ταλαντωτή στα φυτά[1].

Η AtHESP είναι ομόλογη προς τη κίρκαδικά ελεγχόμενη αποαδενυλάση NOC που εντοπίζεται σε θηλαστικά και άλλους οργανισμούς και είναι συντηρημένη σε φυτά. Το γονίδιο κωδικοποιεί για το 3' άκρο πολύ (A) εξώριβονουκλεάσης και η AtHESP ανήκει στην οικογένεια των EEP αποαδενυλασών. Το γονίδιο ρυθμίζεται από το κίρκαδικό ρολόι, αλλά και επηρεάζει τη μεταγραφή των κίρκαδικών ταλαντωτών, αναφερόμενοι στην αποαδενυλίωση και στην αλλαγή του mRNA ως μηχανισμό ρύθμισης του κίρκαδικού ρυθμού. Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του ομόλογου της NOC από άλλους οργανισμούς εξακολουθεί να είναι υποτυπώδης. Η AtHESP δείχνει μια μεγάλη ομοιότητα με CNOT6 και CNOT6L αποαδενυλασών της υπεροικογένειας των EEP. Μελέτες σε ζύμη με CCR4 αποαδενυλασών (ομόλογο του CNOT6) έχουν δείξει ότι η πολύ (A) ουρά είναι το προτιμώμενο υπόστρωμα, ενώ οι πολύ (U), πολύ (C), και πολύ (G) ήταν ανασταλτικές σε σύγκριση με την πολύ (A) για τη δραστηριότητα του περιορισμού[2]. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι AtHESP προτιμά πολύ (A) για την αποικοδόμηση. Πολύ (A) είναι επίσης το προτιμώμενο υπόστρωμα για την PARN που ανήκει στην υπεροικογένεια των DEDD αποαδενυλασών, ακολουθούμενη από την πολύ (U) η οποία αποικοδομείται λιγότερο αποτελεσματικά, ενώ η πολύ (C) και πολύ (G) είναι πολύ φτωχά υποστρώματα[3 & 4].

Η αλλοστερική συμπεριφορά της AtHESP μπορεί να γίνει κατανοητή λαμβάνοντας υπόψη το βασικό ρόλο της πολύ (A) ουράς στην σταθερότητα του mRNA. Οι αποαδενυλάσεις είναι ιδιαίτερα ρυθμιζόμενα ένζυμα και η δραστηριότητά τους επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, όπως η υποκυτταρική εντόπιση, μετά-μεταφραστική τροποποίηση, τα cis-δρώντα στοιχεία του στόχου mRNAs και τα trans-δρώντα στοιχεία των ρυθμιστικών παραγόντων [5, 6 & 7]. Η PARN, που είναι μια αποαδενυλάση που εκτεταμένα έχει μελετηθεί, είναι πράγματι μια αλλοστερικά ρυθμιζόμενη αποαδενυλάση με υπάρχουσες ολιγομερείς δομές και η δραστηριότητα της διαμορφώνεται από cis στοιχεία, όπως 5' cap, AU-πλούσια και κυτταροπλασματικά στοιχεία πολυαδενυλίωσης του mRNA, και trans παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων και των παραγόντων πρωτεΐνης, όπως είναι ο ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης, το σύμπλοκο σύνδεσης και διάσπασης του παράγοντα διέγερσης 5' cap, καθώς και μικρά μόρια, όπως τα νουκλεοτίδια και νουκλεοσίδια[6 & 8]

Επιπλέον, PARN υπάρχει ως ομοδιμερές σε αραιά διαλύματα, και αυτό είναι απαραίτητο για τη δραστηριότητα της σύνδεσης της πολύ (A) ουράς [9]. Ωστόσο, μπορεί επίσης να συνδεθεί μέσα σε ενεργό

τετραμερές και υψηλής τάξης ολιγομερές, τόσο in vitro όσο και σε ζωντανά κύτταρα[10]. Αποτέλεσμα έρευνας έδειξε ότι η AtHESP είναι ολιγομερές και αυτή η συμπεριφορά μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν ρυθμιστικό μηχανισμό[1]. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι οι αποαδενυλάσες δρουν συντονισμένα και πολλές αποαδενυλάσες μαζί μπορεί να ενεργούν στο ίδιο mRNA, με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες [5, 11 & 12]. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι σε κύτταρα ποντικού η κυτταροπλασματική αποαδενυλίωση ακολουθεί την εξής διαφασική κινητική. Η PAN2 αποαδενυλίωση καταλύει τη πρώτη φάση της πολύ (A) σύμπτυξης και ακολουθείται από τη δραστηριότητα του σύμπλοκου CCR4-CAF1[12]. Ως εκ τούτου, η ποικιλομορφία των αποαδενυλασών, η πολυπλοκότητα των συνεργών δέσμευσης, καθώς και η ρύθμισή τους συνθέτουν ένα πολύπλοκο σύστημα για να ρυθμίζουν με ακρίβεια την ενδοκυτταρική mRNA ομοιόσταση[7]. Αναμένεται ότι η αναγνώριση των συνεργών δέσμευσης της AtHESP θα συμβάλει στην κατανόηση της αλλοστερικής συμπεριφοράς της, ενώ ο προσδιορισμός των διακριτών περιοχών αναμένεται να προσφέρει τη δομική βάση για τις κανονιστικές απαιτήσεις της.

Η AtHESP συμβάλλει στον έλεγχο της κερκάδιας γονιδιακής έκφρασης και έρευνα έχει δείξει ότι η αποαδενυλίωση και ο κύκλος εργασιών του mRNA είναι ένας μηχανισμός που επηρεάζει τους κερκάδιους ταλαντωτές μεταγραφής. Η ρύθμιση της μεταγραφικής συσσώρευσης των γονιδίων του ρολογιού (TOC1 / CCA1 / LHY) είναι σημαντικά διαταραγμένα σε μεταλλαγμένα φυτά HESP που καλλιεργούνται σε ελεγχόμενους κύκλους φως/σκοτάδι. Η ρυθμική έκφραση του γονιδίου μπορεί να είναι περίπλοκη, με τη συμμετοχή όχι μόνο του κερκαδιανού κανονισμού, αλλά και διαφόρων συστηματικών και περιβαλλοντικών συνθηκών (π.χ. η ανάπτυξη, το στρες) ερεθίσματα, όπως έχουν προταθεί για το Noc γονίδιο των θηλαστικών [13]. Ο βασικός ρυθμιστικός μηχανισμός της υποκείμενης αποαδενυλίωσης μέσω του οποίου το HESP γονίδιο υποβαθμίζει το υπόστρωμα παραμένει άγνωστος.

Σε έρευνα υπερέκφρασης AtHESP έχουν παρακολουθηθεί τα επίπεδα έκφρασης του TOC και CCA1 παρουσία αυξημένου επιπέδου AtHESP. Σε αυτές τις διαγονιδιακές σειρές φυτού έχουν ανιχνευθεί αυξημένα επίπεδα TOC και CCA, αλλά διατηρήθηκε η κυκλική μορφή έκφρασης. Αυτή η έλλειψη αναστροφής φάσης της συσσώρευσης mRNA του TOC1 ή CCA1, υποδηλώνει ότι κανένα από τα γονίδια δεν είναι άμεσοι στόχοι της δραστηριότητας της αποαδενυλίωσης AtHESP. Έτσι, η AtHESP μπορεί να επηρεάσει τον κερκαδικό ρυθμό στο Arabidopsis με την αποαδενυλίωση ένα ή περισσότερων άγνωστων γονιδίων. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα πρόσφατα μοντέλα που περιγράφουν το κερκαδικό ρολόι σε φυτά περιλαμβάνουν 3 ή 4 πολλαπλούς βρόχους δυνατότητας αλληλεπίδρασης, το παγκόσμιο σύστημα βιολογίας, θα πρέπει επιδιώξει να εντοπίσει τους mRNAs στόχους της AtHESP. Εναλλακτικά, η υπερέκφραση της AtHESP μπορεί να μην είναι αρκετή για να διαταράξει τα σύμπλοκα που σχηματίζονται, και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η AtHESP μπορεί να ενεργεί σε συνεννόηση με άλλους συνεργούς, συμπεριλαμβανομένων και των άλλων αποαδενυλασών, να τελειοποιήσουν τη ρύθμιση του κερκαδικού ρολογιού[1].

Αν και οι αποαδενυλάσες στα φυτά δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς όπως σε άλλους οργανισμούς, είναι

σαφές ότι το *Arabidopsis* χρησιμοποιεί διαφορετικές αποαδενυλάσες για να στοχεύσει διακριτά mRNAs [14,15,16 & 17] και διάφορες αναπτυξιακές και φυσιολογικές διαδικασίες. Δύο γονίδια PARN αναγνωρίστηκαν στο *Arabidopsis*, μία εκ των οποίων, At1g55870 (AtPARN), είναι μια κυτταροπλασματική αποαδενυλάση απαραίτητη για εμβρυογένεση [18], που επηρεάζει ένα υποσύνολο των εμβρυϊκών μεταγραφών. Επιπλέον, CAF1 γονίδια είναι παρόντα σε *Arabidopsis*, που ορισμένα από αυτά συνδέονται με την καταπόνηση των φυτών [9,14,15 & 16]. Τα CAF1 έχουν επίσης συνδεθεί με την αντίσταση των φυτών σε μυκητιακές και βακτηριακές λοιμώξεις, που σημαίνει ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις παθογόνου-φυτού [15, 16 & 17]. Η ύπαρξη πολλαπλών αποαδενυλασών μπορεί να έχουν και διαφορετικές ανάγκες για την έκφραση των ειδικών mRNAs σε διαφορετικούς χρόνους σε κύτταρα ή ιστούς, αλλά και από την παρουσία ειδικών mRNAs σε διαφορετικές χρονικές περιόδους [5].

Η AtHESP μπορεί να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών, καθώς και στην αντιμετώπιση καταπόνησης. Η υπερέκφραση του γονιδίου σε διάφορα φυτά έχουν μια σοβαρή, αν και αναστρέψιμη καθυστέρηση και οι φαινότυποι με το μεταλλαγμένο HESP γονίδιο φαίνεται να προστατεύονται καλύτερα έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης. Έχει αναφερθεί ο ρόλος των πρωτεϊνών NOC που είναι ομόλογες με την AtHESP, που εκτείνεται σε ενώσεις για το μεταβολισμό των λιπιδίων και για τη λειτουργία τους στην κατάλληλη θέση μορφογένεσης και στάδιο της νέμφης σε θηλαστικά και *Drosophila*, αντίστοιχα. Είναι ενδιαφέρον να θεωρήσουμε ότι η AtHESP μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση τόσο του κίρκαδικού ρολογιού όσο και στις διαδικασίες γύρω από αυτό, όπως η απόκριση σε μηχανισμούς έναντι των αβιοτικών ή / και βιοτικών καταπονήσεων [19 & 20] όπως έχει ήδη περιγραφεί προηγουμένως για άλλα συστατικά του ρολογιού στα φυτά [21,22 & 23]. Η διαλεύκανση των μηχανισμών της διαμόρφωσης αυτής της νέας αποαδενυλάσης στη ρύθμιση και απορρύθμιση του κίρκαδικού ρολογιού στα φυτά ή / και στην ανάπτυξη και στο μεταβολισμό των φυτών, ειδικά κάτω από διάφορες συνθήκες καταπόνησης αποτελεί μια ελκυστική πρόκληση.

1.2 ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΙ

Το κίρκαδικό ρολόι είναι ένας ενδογενής μηχανισμός που επιτρέπει σε έναν οργανισμό να συντονίσει τη χρονική οργάνωση των βιολογικών διεργασιών σε συγκεκριμένες ώρες της ημέρας ή της νύχτας. Η λειτουργία ρολογιού είναι ευρέως διαδεδομένη μεταξύ των ειδών και οι περισσότεροι οργανισμοί προσαρμόζουν την φυσιολογία και τη συμπεριφορά τους στις περιοδικές ταλαντώσεις των εξωτερικών σημάτων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια κάθε ημερήσιου κύκλου [24 & 25]. Τα σήματα αυτά ορίζουν το ρυθμό του ρολογιού, που με τη σειρά του έχει την ικανότητα να οδηγεί σε αυτοελεγχόμενες ταλαντώσεις με περίοδο ~ 24 h [24 & 25]. Οι βιολογικοί ρυθμοί επιτρέπουν στον οργανισμό να προβλέψει την εμφάνιση

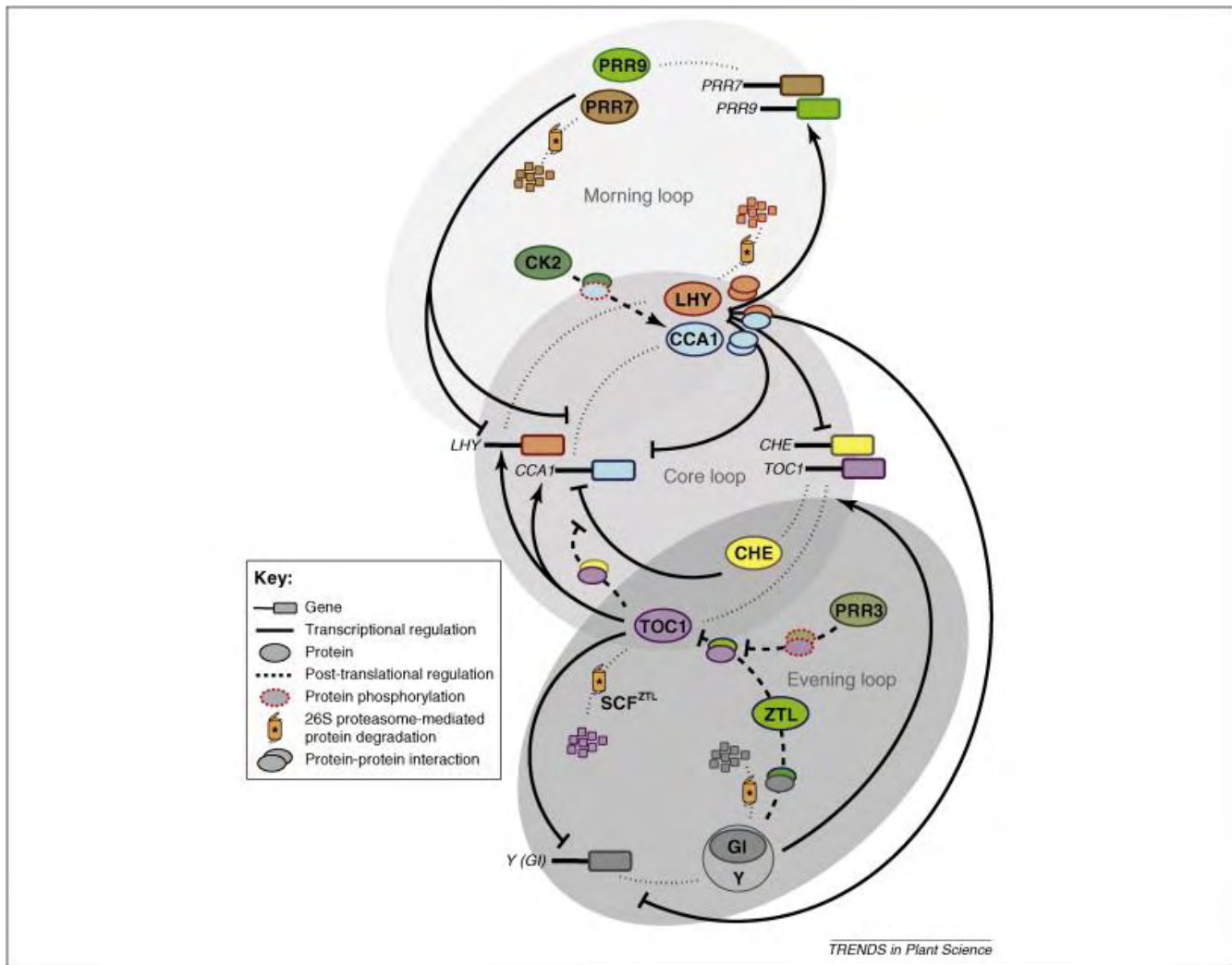
των περιβαλλοντικών αλλαγών παρέχοντας ένα προσαρμοστικό πλεονέκτημα που οδηγούν σε αυξημένη ικανότητα για επιβίωση [26, 27 & 28].

Μεταγραφικά κυκλώματα μέσα στον κირκαδικό ταλαντωτή

Στους περισσότερους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, το κირκαδικό ρολόι, προτείνεται να λειτουργεί ως βιοχημικός ταλαντωτής δομημένος με πολλαπλούς αλληλοσυνδεόμενους ρυθμιστικούς βρόχους [24, 25, 29 & 30]. Παρά την κοινή αρχιτεκτονική, σε κάθε είδος συναντώνται ειδικά συστατικά και βιοχημικές διεργασίες του ρολογιού [24 & 31]. Σε μελέτες που έγιναν στο μοριακό μηχανισμό του ρολογιού σε μεταλλάξεις του φυτού *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) έδειξαν ότι ο κირκαδικός ταλαντωτής στα φυτά ορίζεται από έναν κεντρικό βρόγχο ανάδρασης που συνδέει τις δύο φάσεις πρωί και βράδυ (Εικόνα 1). Ο κεντρικός μηχανισμός ανάδρασης βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωινών εκφρασμένων γονιδίων MYB, CCA1(CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1) και LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL), που αποτελούν τα αρνητικά στοιχεία του βρόγχου και των δύο βραδινών εκφρασμένων γονιδίων ARABIDOPSIS PSEUDORESPONSE REGULATOR 1 και Timing of CAB expression 1, που αποτελούν τον συμπαράγοντα TOC1 και αποτελεί το θετικό παράγοντα του βρόγχου [32, 33, 34 & 35]. Οι CCA1 και LHY είναι εν μέρει πλεονάζουσες και άμεσα καταστέλλουν την TOC1 με σύνδεση του μοτίβου μέσα στην περιοχή του υποκινητή του, αποκαλούμενο ως βραδινό στοιχείο EE (Evening Element). Αυτό το μοτίβο απαντάται συχνά στους υποκινητές γονιδίων για το συγχρονισμό του ρολογιού και είναι επαρκές για να οδηγήσει το ρυθμό στη βραδινή φάση όταν πολλαπλασιαστεί αρκετά.[36]. Ο μηχανισμός με τον οποίο επικαλυπτόμενα σήματα που συγκλίνουν στο EE πιθανώς περιλαμβάνει τη δέσμευση των εναλλακτικών σύμπλοκων παραγόντων μεταγραφής. Αυτό υποστηρίζεται από την ικανότητα των CCA1 και LHY να σχηματίσουν ομο- και ετεροδιμερή [37 & 38], καθώς και η παρουσία σύμπλοκου πρωτεΐνης-EE ακόμη και εν απουσία του CCA1 και LHY [36].

Από την άλλη μεριά του κεντρικού βρόγχου ανάδρασης, ο TOC1 ρυθμίζει την έκφραση των δύο μεταγραφών CCA1 και LHY [32 & 39]. Παρά το γεγονός ότι ορισμένα στοιχεία δείχνουν ότι οι λειτουργίες TOC1 ως μεταγραφικός ενεργοποιητής CCA1 και LHY [32, 40 & 41], είτε σε μειωμένα είτε σε αυξημένα επίπεδα TOC1 οδηγούν σε χαμηλή έκφραση των mRNA CCA1 και LHY [32 & 39]. Αυτή η παρατήρηση και η έλλειψη των γνωστών περιοχών δέσμευσης DNA σε TOC1 πρωτεΐνη [34] υποδεικνύουν έναν περίπλοκο μηχανισμό για τη ρύθμιση στους CCA1 και LHY με TOC1. Πρόσφατα, εντοπίσαμε μια TCP (TB1, CYC, PCFs) μεταγραφικού παράγοντα [42] που ονομάζεται CHE [43]. Ο παράγοντας τους βρέθηκε να προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου CCA1(όχι στον υποκινητή του LHY) και να τον καταστέλλει, καθώς και να αλληλεπιδρά in vitro με τον TOC1. Ο τρόπος δράσης του , έχει προταθεί πως έχει ως εξής: Την αυγή, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των CCA1 και LHY καταστέλλουν τον CHE, αλλά και την ίδια στους την έκφραση. Τα επίπεδα του CHE αυξάνονται, καθώς η ημέρα προχωρά, ώστε να διατηρούν τον CCA1 στο ελάχιστο. Μέχρι το τέλος στους ημέρας, ο TOC1 ανταγωνίζεται τον CHE, επαναφέροντας τον κύκλο, ώστε να ξεκινήσει

από τη αρχή [43].



Εικόνα 1 Το μοντέλο του Κιρκαδικού ρυθμού στο *Arabidopsis*. Οι μεταγραφικοί και οι μετά-μεταφραστικοί μηχανισμοί καθορίζουν τη βασική δομή του κιρκαδικού ρυθμού. Ο κεντρικός βρόγχος ανάδρασης αποτελείται από δύο MYB μεταγραφικούς παράγοντες, CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1) και LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), οι οποίοι ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση του TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1). Οι TOC1 είχε προταθεί για να ενεργοποιήσει την έκφραση των CCA1 και LHY. Ένα ακόμη κομμάτι μέσα στον βρόγχο περιλαμβάνει την αμοιβαία καταστολή μεταξύ CCA1 και CCA1 HIKING EXPEDITION (CHE). Η TOC1 ανταγωνίζεται μάλλον την CHE, μέσω μιας άμεσης αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης. Έχουν προταθεί δύο επιπλέον βρόγχοι ανάδρασης. Στον πρωινό βρόγχο, ενεργοποιείται η έκφραση των PSEUDORESPONCE REGULATOR 7 και 9 (PRR7 και PRR9), οι οποίοι με την σειρά στους καταστέλλουν τους CCA1 και LHY. Στο βραδινό βρόγχο, ο TOC1 καταστέλλει ένα άγνωστο συστατικό που γενικότερα ονομάζεται Y [GIGANTEA (GI) φαίνεται να είναι μέρος του Y], το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί το TOC1. Τα επίπεδα TOC1 ελέγχονται από την υποβάθμιση του πρωτεοσώματος που διαμεσολαβεί από την πρωτεΐνη F-box ZEITLUPE (ZTL). Ο μηχανισμός στους διαμορφώνεται από GI και την ανταγωνιστική αλληλεπίδραση μεταξύ ZTL και PSEUDORESPONCE REGULATOR 3 (PRR3) με TOC1. Η αλληλεπίδραση μεταξύ TOC1 και PRR3 πιθανώς ενονοείται από τη φωσφορλίωση των πρωτεϊνών αυτών. Για λόγους σαφήνειας, παραλείφθηκαν συστατικά του ρολογιού που δεν μπορούν να τοποθετηθούν με σιγουριά πάνω στους βρόγχους ανάδρασης

Gene	Locus ID	Function	Circadian Clock Phenotype	
			Loss of Function	Overexpression
CCA1	At2g46830	Single Myb domain transcription factor	Short period	Arrhythmic
CKB3	At3g60250	Casein kinase II regulatory subunit	Not known (gene family)	Short period
CRY1	At4g08920	Blue light	Long period in	Short period in blue

		photoreceptor	blue light	light
CRY2	At1g04400	Blue light photoreceptor	Long period in blue light	Short period in blue light
DET1	At4g10180	Repressor of photomorphogenesis	Short period	Not known
ELF3	At2g25930	Unknown	Arrhythmic in continuous light	Long period
ELF4	At2g40080	Unknown	Arrhythmic	Not known
GI	At1g22770	Unknown	Short period, low amplitude	Short period, low amplitude
LHY	At1g01060	Single Myb domain transcription factor	Short period	Arrhythmic
LUX	At3g46640	Myb transcription factor	Arrhythmic	Arrhythmic
PHYA	At1g09570	Red light photoreceptor	Long period in far-red light	Short period in far-red light
PHYB	At2g18790	Red light photoreceptor	Long period in red light, leading phase in white light	Short period in red light, lagging phase in white light
PIF3	At1g09530	Basic helix-loop-helix transcription factor	Wild type	Wild type
PRR3	At5g60100	Pseudo-response regulator	Short period	Wild type
PRR5	At5g24470	Pseudo-response regulator	Short period	Low amplitude, long period
PRR7	At5g02810	Pseudo-response regulator	Long period	Not known
PRR9	At2g46790	Pseudo-response regulator	Long period	Short period
SRR1	At5g59560	Unknown	Leading phase, low amplitude	Not known
TIC		Gene not yet identified	Short period, low amplitude	Not known
TOC1	At5g61380	Pseudo-response regulator	Short period	Arrhythmic
ZTL	At5g57360	F-box protein	Long period	Arrhythmic

Πίνακας 1 Γνωστά γονίδια του κερκάδιου ρυθμού στο *Arabidopsis*

1.3 ΑΠΟΑΔΕΝΥΑΙΩΣΗ

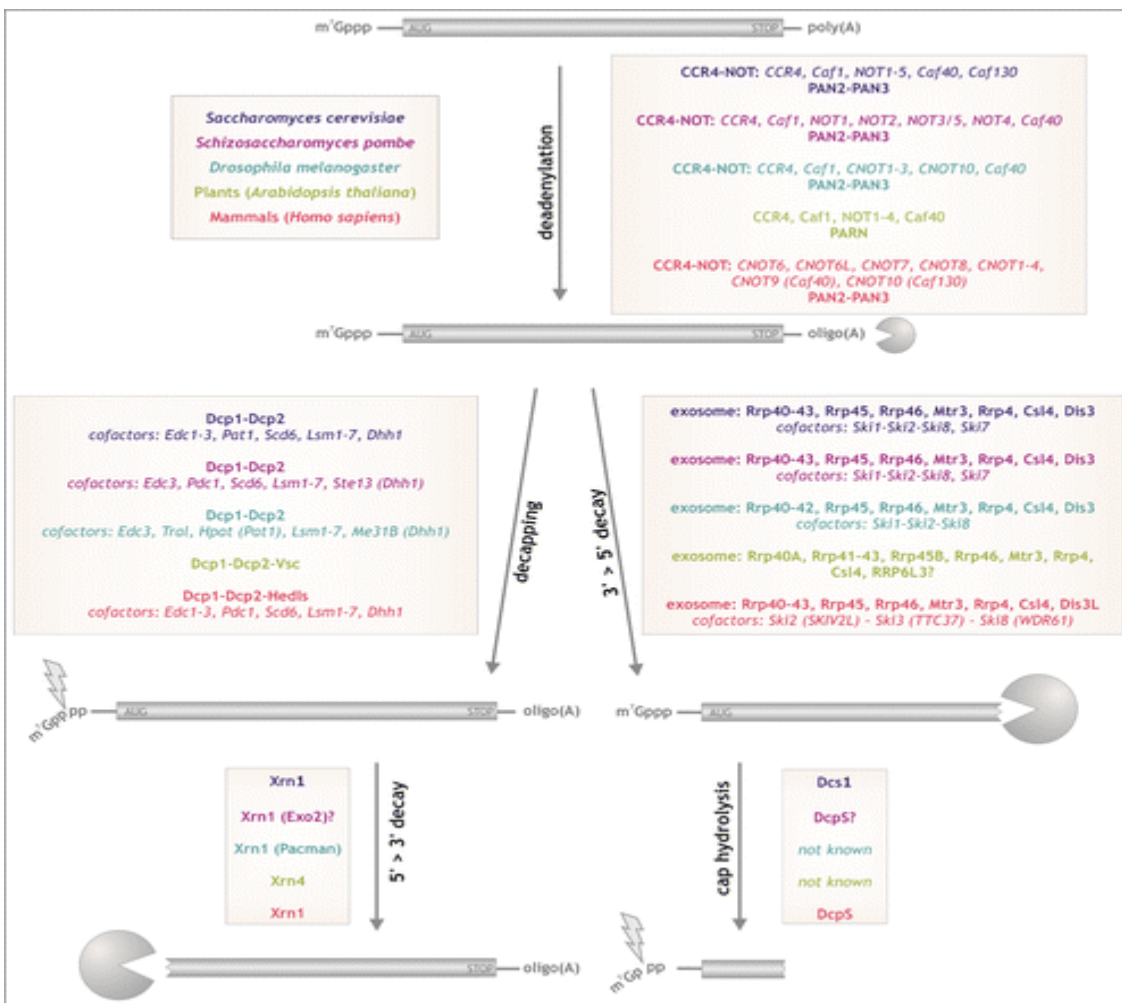
Η διαδικασία της αποικοδόμησης του mRNA θεωρείται μία πλατφόρμα ρύθμισης των γονιδίων έκφρασης μεταγραφής στα ευκαριωτικά κύτταρα. Με την αφαίρεση της πολύ (A) ουράς από το mRNA, οι αποαδενυλάσες προκαλούν την αποικοδόμηση του mRNA ή τη μεταγραφική καταστολή, ενώ η επαναδενυλίωση μπορεί να ενεργοποιήσει κάποια μόρια mRNA. Πιο συχνά, τα αποαδενυλιωμένα mRNAs αποικοδομούνται και από τις δυο οδούς: το 5'→3' μονοπάτι, όπου μετά την αφαίρεση του 5' cap του mRNA, ακολουθεί η αποικοδόμηση από την εξωριβονουκλεάση Xrn1 ή η αποικοδόμηση με κατεύθυνση 3'→5' που καταλύεται από το εξώσωμα.

Γενικοί οδοί αποικοδόμησης του mRNA

Αποαδενυλίωση

Το μήκος της πολύ-(A) ουράς στο νεοσυντιθέμενο μόριο mRNA εξαρτάται από τον οργανισμό. Μετά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα, είτε σταθεροποιείται με τις πολύ (A) δεσμευτικές πρωτεΐνες (PABP), οι οποίες διευκολύνουν την μετάφραση, είτε περιορίζεται από τις κυτταροπλασματικές νουκλεάσες [44]. Η αφαίρεση της πολύ (A) ουράς προκαλεί αποικοδόμηση του mRNA σε όλες σχεδόν τις οδούς αποικοδόμησης ευκαριωτικών οργανισμών(Εικόνα 2).

Με βάση τις βιοχημικές έρευνες και τις προσεγγίσεις της βιοπληροφορικής, οι αποαδενυλάσες μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες ομάδες: την DEDD ή την EEP νουκλεάσες [45 & 46]. Τα ένζυμα και από τις δύο ομάδες είναι εξωνουκλεάσες που καταλύουν την αποαδενυλίωση εξαρτώμενες από Mg²⁺ που υδρολύουν το mRNA με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας 5'-AMP. Οι DEDD νουκλεάσες ονομάστηκαν έτσι εξαιτίας των συντηρημένων καταλυτικών αμινοξικών καταλοίπων Asp και Glu τα οποία



Εικόνα 2: Η αποαδενυλίωση ως εξαρτώμενη αποδόμηση: Μονοπάτια και Ένζυμα. Η αποικοδόμηση του mRNA ξεκινά με βράχυνση της πολύ (A) ουράς (αποαδενυλίωση), που ακολουθείται από την αφαίρεση του καλύμματος της αλυσίδας κατεύθυνσης 5' → 3' από Xrn1 ή η αποικοδόμηση της αλυσίδας κατεύθυνσης 3' → 5' από το εξώσωμα και υδρόλυση του καλύμματος. Η κωδικοποίηση με διαφορετικά χρώματα αντιπροσωπεύει ομόλογα από διαφορετικούς οργανισμούς. Το ερωτηματικό υποδηλώνει ότι τα ομόλογα αυτά είναι παρόν σε μια βάση δεδομένων του συγκεκριμένου είδους, αλλά η συμμετοχή τους στη διαδικασία δεν επιβεβαιώθηκε πειραματικά.

είναι διάσπαρτα ανάμεσα σε τρία μοτίβα εξωνουκλεάσης που δεσμεύουν ιόντα μαγνησίου[47]. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει τις οικογένειες της POP2 (γνωστή και ως CAF1), της πολύ (A) ουράς ριβονουκλεάσης (PARN), την Caf1Z και την PAN2. Τα ένζυμα της ομάδας EEP περιλαμβάνουν την CCR4, NOCTURNIN, ANGEL και την 2' PDE και έχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His στην περιοχή με δράση νουκλεάσης [48].

Οι βασικοί δρόμοι αποικοδόμησης του mRNA έχουν εντοπιστεί και στα φυτά, καθώς τα περισσότερα από τα ένζυμα έχουν εντοπιστεί στα γονιδιώματα των διαφόρων φυτικών ειδών [49]. Το γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana* έχει βρεθεί ότι κωδικοποιεί 11 ομόλογα της CAF1, 16 έχουν βρεθεί στο ρύζι *Oryza sativa* και 4 στα σταφύλια (*Vitis vinifera*). Δεν έχει αποδείχθει αν όλες αυτές οι πρωτεΐνες είναι ενεργά αποαδενυλάσες. Ωστόσο όλα, όπως και το *S. pombe*, περιέχουν το πλήρως συντηρημένο μοτίβο της DEDD του ενεργού κέντρου[50].

Αποικοδόμηση του mRNA με κατεύθυνση 5'→3' που καταλύεται από την εξωριβονουκλεάση Xrn1

Ένα από τα πιθανά σενάρια για την αποικοδόμηση του mRNA μετά την αρχική αποαδενυλίωση είναι η αφαίρεση του 5' καλύμματος (Εικόνα 2). Η διαδικασία γίνεται από το ένζυμο Dcp2, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Nudix υδρολασών[51]. Τα προϊόντα της αντίδρασης είναι το m'GDP και το 5' μονοφωσφορικό RNA. Η δραστηριότητα του ενζύμου εξαρτάται από τα δισθενή κατιόντα. Το σώμα του RNA παίρνει επίσης μέρος στην κατάλυση και το ένζυμο έχει μια προτίμηση για υποστρώματα RNA όχι μικρότερα των 25 νουκλεοτιδίων [52]. Το Dcp2 σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το Dcp1[53 & 54] που είναι μια μικρή πρωτεΐνη που περιέχει μία EVH1 περιοχή η οποία είναι μια κοινή πλατφόρμα που γεφυρώνει την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών[55]. Επιπλέον, το Dcp1 είναι ο κύριος ενεργοποιητής της Dcp2[56]. Η διαδικασία αφαίρεσης του καλύμματος ρυθμίζεται από μια πληθώρα ενεργοποιητών και αναστολέων, αλλά η σύνθεσή τους διαφέρει μεταξύ των οργανισμών[51,57 & 58]. Στα φυτά η απομάκρυνση του 5' καλύμματος γίνεται από το σύμπλεγμα των Dcp1, Dcp2 και Varicose (Vsc), ομόλογο των θηλαστικών του Hedls/Ge-1. Το Dcp2 παρουσιάζει ενζυμική δραστηριότητα που παρακινείται από το Dcp1 και Vsc[59]. Ενώ η αφαίρεση του 5' καλύμματος στη ζύμη, ρυθμίζεται από μια ποικιλία ενεργοποιητών, στα φυτά, η πρωτεΐνη Dcp5 έχει βρεθεί να συνδέεται με την Dcp1, Dcp2 και την επιρροή τους στην καταστολή της μετάφρασης[60]. Το *Arabidopsis thaliana* έχει τρία ομόλογα της ζύμης Xrn1: Xrn2, Xrn3, Xrn4[61]. Οι Xrn2 and Xrn3 εμπλέκονται στην επεξεργασία του rRNA and snoRNA στον πυρήνα, ενώ η Xrn4 βρίσκεται στο κυτόπλασμα[62] και είναι υπεύθυνη για την βράχυνση των 5'→3' ειδικών αντιγράφων[63].

Αποικοδόμηση του mRNA με κατεύθυνση 3'→5' που καταλύεται από το εξώσωμα

Στην κυτταροπλασματική αποαδενυλίωση, η εξαρτώμενη οδός, εναλλακτικά η αποσύνθεση του mRNA

με κατεύθυνση 5'→3' μπορεί να αποικοδομεί το mRNA στην κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα. Το κάλυμμα που απομένει, υδρολύεται από το ένζυμο DcpS(Εικόνα 2). Το εξώσωμα είναι ένα σύμπλεγμα πολλαπλών υπομονάδων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση, στην επεξεργασία και τον ποιοτικό έλεγχο πολλών ομάδων του RNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το κυτταροπλασματικό ένζυμο αποτελείται από 9 υπομονάδες που είναι ενεργές ενζυμικά ριβονουκλεάσες. Στο γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana*, οι πρώτες υπομονάδες εξωσώματος που εντοπίστηκαν ήταν οι Rgr4 και Rgr41. Είναι ενδιαφέρον ότι, σε αντίθεση με τη μαγιά και τους ανθρώπους, το Rgr4 δείχθηκε να είναι καταλυτικά ενεργό στην φωσφορολυτική ριβονουκλεάση με κατεύθυνση 3'→5' από την οικογένεια RNase [64]

1.4 ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΣΕ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ

Η συγκέντρωση άλατος σε αρδευόμενες εκτάσεις συνεχώς αυξάνεται, που έχει ως αποτέλεσμα οι αποδόσεις των καλλιεργειών να αρχίζουν να μειώνονται σταδιακά, έτσι που να απειλείται το μέλλον της παραγωγής των τροφίμων. Η κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο τα φυτά ανταποκρίνονται στην καταπόνηση με αλάτι είναι, ως εκ τούτου, υψίστης σημασίας στη βασική έρευνα, καθώς και την εφαρμοσμένη έρευνα στον τομέα της βιολογίας των φυτών. Το στρες από αλάτι, όπως η υψηλή συγκέντρωση NaCl, προκαλεί υπεροσμωτικό στρες, ανισορροπία στη συγκέντρωση κυτταρικών ιόντων, και τοξικότητα που επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των φυτών. Πολυάριθμες μελέτες που έχουν διεξαχθεί για την οριοθέτηση των κυτταρικών αλλαγών κατά την έκθεση των φυτών σε καταπόνηση από αλάτι [65,66 & 67].

Σε πρόσφατες μελέτες που έχουν γίνει σε διαφορετικά είδη φυτών αναφέρεται ότι τα φυτά χρησιμοποιούν ποικιλία διαφορετικών μηχανισμών για να αντιμετωπίσουν τις συνθήκες στρες από αλάτι. Οι απαντήσεις είναι ιδιαίτερα κατανοητές σχετικά με τις φυσιολογικές αλλαγές και τις αλλαγές στο μεταβολισμό[67]

Μέσα σε 15 λεπτά η έκθεση σε υψηλή συγκέντρωση NaCl, οι αντιμεταφορείς Na^+ / H^+ ενεργοποιούνται για την ενεργή μεταφορά του κυτοσολικού Na^+ μέσα στα κενοτόπια ή να αντλήσουν αυτό εκτός μέσω της πλασματικής μεμβράνης[68 & 69]. Μια άλλη απάντηση είναι η αύξηση των προστατευτικών από όσμωση όπως είναι η προλίνη, οι βεταΐνες, τα σάκχαρα, και οι συμβατές διαλυμένες ουσίες με το κυτοσόλιο [70 & 71]. Επίσης, η αύξηση της παραγωγής των αντιοξειδωτικών ή η επαγωγή των βιοσυνθετικών ενζύμων για τη σύνθεση των αντιοξειδωτικών έχει παρατηρηθεί [72]. Αυτά τα αντιοξειδωτικά μπορεί να μειώσουν τη συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και άλλα ενεργά είδη οξυγόνου που έχουν προταθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση του NaCl[73]. Πρόσφατα πολλά γονίδια που εμπλέκονται στην καταπόνηση από αλάτι έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί σε μοριακό επίπεδο. Αυτά περιλαμβάνουν γονίδια που κωδικοποιούν H^+ -ATPάσες, H^+ -PPases, Ca^{2+} -ATPάσες, Na^+ ATPάσες, K^+/H^+

συμμεταφορείς, και K^+ μεταφορείς[74, 75 & 76]. Πολλά γονίδια που κωδικοποιούν οσμωρύθμιση έχουν επίσης απομονωθεί και μερικά από αυτά έχειδειχθεί να επάγονται υπό συνθήκες υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι[77].

Παρά τις πολυάριθμες μελέτες που έχουν γίνει έτσι ώστε να δοθούν απαντήσεις για την καταπόνηση των φυτών από αλάτι του στρες άλατος, δεν έχουμε μάθει πολλά ακόμα σχετικά με το μηχανισμό σηματοδότησης του στρες άλατος στα φυτά. Στη μαγιά, στην οποία ο μηχανισμός σηματοδότησης έχει μελετηθεί λεπτομερώς, έχειδειχθεί ότι προκαλείται από το μονοπάτι μιας MAP κινάσης[78 & 79]. Σε αυτό το μονοπάτι τα μόρια που λειτουργούν σαν αισθητήρες της όσμωσης, όπως είναι τα *Sln1p* και *Sho1p*, τα οποία βρίσκονται στη μεμβράνη του πλάσματος, κινούν το μονοπάτι της σηματοδότησης. Το σήμα τότε φτάνει σε διάφορες κινάσες όπως είναι οι όπως *Ssk1p*, *Pbs2p*, *Hog1p*[80 & 81]. Ένα παρόμοιο μονοπάτι σηματοδότησης έχει επίσης αποδειχθεί και για την απόκριση του άγγους στα ζωικά κύτταρα[82]. Εκτός από το μονοπάτι της MAP κινάσης, η μαγιά έχει ένα άλλο ανεξάρτητο μονοπάτι σηματοδότησης. Αυτή η οδός περιλαμβάνει καλσινευρίνη που είναι μια φωσφατάση που εξαρτάται από ιόντα Ca^{2+} και την καλμοδουλίνη[83 & 84]. Στα φυτά, μια φυτορμόνη, η ABA, έχει προσδιοριστεί ότι υπήρξε ως δεύτερος αγγελιοφόρος στο οσμωτικό στρες στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος[85 & 86]. Ωστόσο, τα πρωτεϊνικά συστατικά που εμπλέκονται σε αυτό το μονοπάτι σηματοδότησης παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστα. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, το αμψισικό οξύ είναι ευαίσθητο σε μεταλλάξεις όπως *abi1*, *abi2* και *abi3* που έχουν ταυτοποιηθεί και βρέθηκε να έχουν ελαττώματα στο μηχανισμό μεταγωγής σήματος. Πρόσφατα, τα γονίδια στα *abi1* και *abi2* loci αποδείχθηκε ότι κωδικοποιούν φωσφατάσες[87 & 88]. Επιπλέον, πολλές κινάσες επηρεάζονται από τη μεταχείριση με αλάτι[89 & 90]. Έτσι τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η πρωτεΐνη της φωσφορυλίωσης της μπορεί να διαδραματίσει έναν σημαντικό ρόλο στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος στην καταπόνηση από αλάτι. Είναι ενδιαφέρον ότι μια ομόλογη MAP κινάση στο φυτό, η *PsMAK*, έχει αποδειχθεί να συμπληρώνει το μεταλλαγμένο γονίδιο *hog1* του ζυμομύκητα [91]. Επίσης, το $p44^{MMK4}$, μία αφάλφα ομόλογη MAP κινάση, έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιούνται μετά από καταπόνηση με άλας, καθώς επίσης και άλλες καταπονήσεις [92], υποδηλώνοντας ότι οι MAP κινάσες μπορεί επίσης να εμπλέκονται στο μηχανισμό σηματοδότησης του στρες από άλας στα φυτά, όπως στην περίπτωση των ζυμομύκητων και των ζώων.

Στην προσπάθεια να μάθουμε περισσότερα για το μοριακό μηχανισμό της μεταγωγής σήματος από το στρες σε αλάτι, σε μελέτη που έχει γίνει κλωνοποίηση γονιδίων, που επάγονται από το στρες με αλάτι και έχει γίνει αναφορά στο χαρακτηρισμό των γονιδίων που συνδέονται με την επίδραση του NaCl σε μοριακό επίπεδο. Έχειδειχθεί ότι το γονίδιο, που ονομάζεται *AtCP1* (*Arabidopsis thaliana* Ca^{2+} συνδεδεμένη πρωτεΐνη 1), κωδικοποιεί μία νέα Ca^{2+} -σύνδεση πρωτεΐνη 1 όταν προκαλείται στρες με NaCl[93].

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της έκφρασης του γονιδίου της αποαδενυλάσης εσπερίνης AtHesp σε καταπόνηση αλατότητας στο φυτό *Arabidopsis Thaliana*. Αρχικά μελετούμε την ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου σε φυσιολογικές συνθήκες καθώς και σε συνθήκες μέσης και υψηλής αλατότητας και σε συγκεκριμένες στιγμές του 24ώρου. Στη συνέχεια μελετούμε την ανάπτυξη μεταλλαγμένων φυτών με μειωμένη την έκφραση του γονιδίου της αποαδενυλάσης εσπερίνης AtHesp τύπου σε φυσιολογικές συνθήκες καθώς και σε συνθήκες μέσης και υψηλής αλατότητας και σε συγκεκριμένες στιγμές του 24ώρου. Η σύγκριση της ανάπτυξης των μεταλλαγμένων φυτών με τα φυτά αγρίου τύπου μπορεί να μας δώσει απάντηση στο ερώτημα αν η αποαδενυλάση AtHesp παίζει ρόλο στην καταπόνηση των φυτών από αλάτι.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

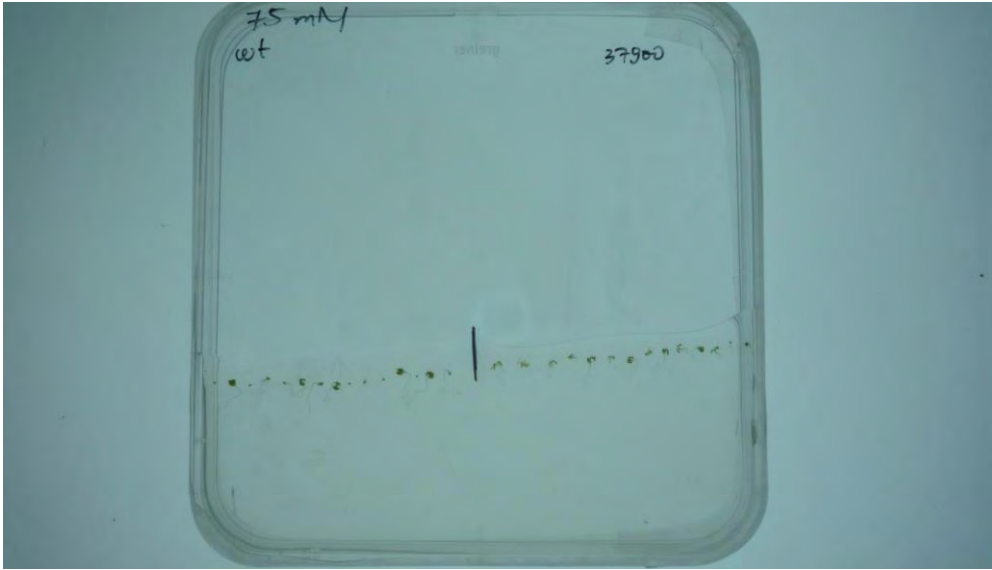
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ, ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν σπόροι άγριου τύπου *Arabidopsis thaliana* και σπόροι μεταλλαγμένου *Arabidopsis thaliana* ως προς το γονίδιο της αποαδενυλάσης *AtHesp* γνωστό ως 37900 και συγκεκριμένα μειωμένης έκφρασης του γονιδίου.

Για την ομοιόμορφη και γρήγορη βλάστηση των σπερμάτων του *Arabidopsis thaliana* είναι απαραίτητη η τοποθέτησή τους σε νερό στους 4°C για ένα βράδυ, για να επιταχύνουμε τη βλάστηση. Πριν την τοποθέτηση των σπερμάτων στα τρυβλία προηγείται η απολύμανση τους με διάλυμα περιεκτικότητας 20% χλωρίνης. Έπειτα ακολουθεί τοποθέτηση μισών σπόρων άγριου τύπου και μισών 37900 σε κάθε τρυβλίο. Χρησιμοποιήθηκαν 8 τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υπόστρωμα MS για την ανάπτυξη των φυτών και τη χρήση αυτών των φυτών ως μάρτυρες. Για την καταπόνηση των φυτών σε αλατότητα, χρησιμοποιήθηκαν από 8 τρυβλία με υπόστρωμα συγκεντρώσεως NaCl 75 mM και 100 mM αντίστοιχα, όπως απεικονίζονται στη φωτογραφία 1. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 23 °C και η φωτοπερίοδος ρυθμισμένη σε 12 ώρες ημέρα (8 το πρωί με 8 το απόγευμα) και 12 ώρες νύχτα (8 το απόγευμα με 8 το πρωί). Τα φυτά παρέμειναν στο θάλαμο ανάπτυξης για 22 ημέρες.

Στην 1^η, 2^η και 3^η εβδομάδα ανάπτυξης πάρθηκαν φωτογραφίες με σκοπό να μετρηθεί το μήκος της ρίζας, όπως και η βλαστικότητα. Την 22^η μέρα πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία παρουσία υγρού αζώτου με ιδιαίτερη προσοχή και χωρίς να διακόπτεται η φωτοπερίοδος. Από τα νεαρά φυτά αφαιρέθηκαν οι ρίζες, ενώ το υπέργειο τμήμα μεταφέρθηκε σε σωλήνες *erpendorfs*. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε 2 χρονικές στιγμές του 24ώρου και πιο συγκεκριμένα μία στις 10 το πρωί και μία στις 7 το απόγευμα. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο καταψύκτη στους -80 °C.



Φωτογραφία 1: Τρυβλίο με φυτά στην 1^η εβδομάδα ανάπτυξης.

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

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

- Φυτικοί ιστοί που έχουν διατηρηθεί στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτριβίσεως παρουσία υγρού αζώτου.
- Μετά την εξάτμηση του υγρού αζώτου προστίθενται ρυθμιστικό δ/μα (REB buffer) 800 μl και 600 μl φαινόλης/ χλωροφορμίου 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 13000 στροφές / λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα eppendorf και προστίθενται 600 μl φαινόλης/ χλωροφορμίου σε αναλογία 1:1. Το δείγμα αναδεύεται για 30 δευτερόλεπτα με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000 στροφές / λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδατινή φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf και προστίθενται 500 μl χλωροφορμίου/ ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 49:1. Το δείγμα αναδεύεται καλά για 30 δευτερόλεπτα με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000 στροφές / λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf και προστίθενται 800 μl χλωριούχου λιθίου συγκέντρωσης 8M(LiCl 8M).
- Το διάλυμα αφήνεται για ένα βράδυ στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Το ολικό RNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13000 στροφές / λεπτό στους 4 °C.
- Το ίζημα των νουκλεϊνικών οξέων επαναδιαλύεται σε 200 μl 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 η φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13000 στροφές / λεπτό στους 4 °C.
- Το ίζημα ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη.
- Γίνεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά και επαναδιάλυση σε νερό.
- Η ακεραιότητα διαπιστώνεται με ανάλυση του δείγματος σε πήκτη αγαρόζης.

2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA,RNA) ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος του μεγέθους των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πήκτη αγαρόζης με την βοήθεια της χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων. Η χρωστική ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο και φθορίζει υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η αναλυτική ικανότητα της πήκτης αγαρόζης είναι ανάλογη της περιεκτικότητας 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.(3 μl).
4. Η πήκτη τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να σταθεροποιηθεί 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 προστίθενται κατάλληλη ποσότητα χρωστικής.

7. Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120 V, ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού και την περιεκτικότητα της σε αγαρόζη.

2.4 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 3,5 μl

10 x DNase buffer 1 μl

RNase out 0,5 μl

DNaseI(Invitrogen) 1 μl

H₂O μέχρι τελικό όγκο 4 μl

Η αντίδραση επωάζεται για 50 λεπτά στους 37 °C.

Ακολουθεί απενεργοποίηση της DNaseI για 10 λεπτά στους 65°C

2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ(PCR-Polymerase Chain Reaction)

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

Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93 – 95 °C) ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation step).

Θερμοκρασία υβριδισμού (annealing step), προκειμένου οι εκκινητές να υβριδίσουν με το DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητά του σε G και C. Ο απλούστερος τρόπος υπολογισμού της θερμοκρασίας του εκκινητή είναι μέσω του τύπου $T_m = 2(A+T) +$

4(C+G). Η θερμοκρασία του υβριδισμού είναι τελικά 5°C κάτω από τον μέσο όρο των τιμών T_m των δύο εκκινητών της αντίδρασης.

Θερμοκρασία επιμήκυνσης ή πολυμερισμού (extension step) στους 72°C. Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος λαμβάνει χώρα η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, με τη δράση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω επαναλαμβάνεται για 25 – 35 κύκλους συνήθως. Κατά τη διάρκεια των κύκλων η παραγωγή των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό, εφόσον βέβαια δεν παρουσιαστούν περιοριστικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα έλλειψη νουκλεοτιδίων. Μετά το πέρας της αντίδρασης το προϊόν ενίσχυσης αναλύεται ή χρησιμοποιείται για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες. Η PCR βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς και, τελευταία, έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της παραπάνω βασικής αντίδρασης. Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη παραλλαγή είναι η RT-PCR, κατά την οποία χρησιμοποιείται - ως μήτρα για ενίσχυση - RNA, το οποίο πρώτα μεταγράφεται σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή (Reverse transcriptase). Για μια τυπική αντίδραση ενίσχυσης (τελικού όγκου 20 μl) αναμιγνύονται:

Μήτρα DNA	1 μl
Ορθόδρομος εκκινητής 5 μM	1,6 μl
Οπισθόδρομος εκκινητής 5 μM	1,6 μl
dNTPs (10mM το κάθε ένα)	0,4 μl
Taq DNA πολυμεράση	0,08μl (1 unit/μl)
10X ρυθμιστικό διάλυμα	2 μl
dH ₂ O	Μέχρις όγκου 20 μl

2.6 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ (REVERSE) ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

- Σε σωλήνα erpendorf προστίθενται 1-2 μg ολικού RNA, 1 μl Oligo dT (500 μg/ml), 1 μl dNTPs και dH₂O έως τελικού όγκου 12 μl
- Τα δείγματα αποδιατάσσονται με θέρμανση τους στους 65 °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 4 μl 5x first- strand buffer, 0,5 μl RNase out παρεμποδιστή ριβονουκλεάσης και 2 μl DTT.
- Η αντίδραση προθερμαίνεται στους 42 °C για 2 λεπτά πριν την προσθήκη 1 μl Superscript II αντίστροφης μεταγραφάσης.
- Το μείγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 42 °C για 50 λεπτά και ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση στους 70 για 15 °C λεπτά.

2.7 RT-qPCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

Οι 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 μέγεθος τους κυμαίνεται από 150 έως 200 ζεύγη βάσεων.

- Η αντίδραση PCR περιλάμβανε το μίγμα της SYBR Green (KAPA SYBR FAST qPCR Kit), τους εξειδικευμένους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 8 μl ο καθένας και 1 μl της μήτρας cDNA.
- Οι αντιδράσεις του ποσοτικού RT-PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα MX3005P της εταιρείας Stratagene.
- Το πρόγραμμα της PCR περιλαμβάνει 3 λεπτά επώαση στους 95 °C και ακολουθούν 35 κύκλοι με 95 °C για 15 λεπτά, 58°C για 20 λεπτά και 72 °C για 11 λεπτά.
- 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 παρουσιάζονταν στις ποσότητες του cDNA.

2.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η στατιστική επεξεργασία 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^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ

Η ανάπτυξη των φυτών *Arabidopsis thaliana* πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες. Αρχικά τα σποράκια αγρίου τύπου (Wild type) καθώς και τα μεταλλαγμένα σποράκια μειωμένης έκφρασης της *AtHesp* (37900) του *Arabidopsis thaliana* έγινε απολύμανση και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MS και σε τρυβλία με υπόστρωμα συγκεντρώσεως NaCl 75 mM και συγκεντρώσεως NaCl 100 mM για να επιτύχουμε τις συνθήκες καταπόνησης σε αλάτι. Τα τρυβλία, όπως προαναφέραμε τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 23 °C και η φωτοπερίοδος ρυθμισμένη σε 12 ώρες ημέρα (8 το πρωί με 8 το απόγευμα) και 12 ώρες νύχτα (8 το απόγευμα με 8 το πρωί). Τα φυτά παρέμειναν στο θάλαμο ανάπτυξης για 22 ημέρες.

Την 7^η, 14^η και 21^η ημέρα πάρθηκαν φωτογραφίες. Από τις φωτογραφίες αυτές μετρήθηκε η βλαστικότητα και το μήκος των ριζών, με σκοπό να συμπεράνουμε εάν η αποαδενυλάση της εσπερίνης παίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών σε συνθήκες αλατότητας. Από τις μετρήσεις αυτές δημιουργήθηκαν ο πίνακας 2 και τα διαγράμματα 1, 2 και 3 με την βοήθεια του υπολογιστικού φύλλου Excel. Στον πίνακα 2 καταγράφονται τα ποσοστά βλαστικότητας των φυτών αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων φυτών, που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα MS, σε υπόστρωμα με NaCl συγκεντρώσεως 75 mM και σε υπόστρωμα με NaCl συγκεντρώσεως 100 mM. Στα διαγράμματα 1, 2 και 3 φαίνονται προέκυψε από τις μετρήσεις του μήκους των ριζών των φυτών στην πρώτη, δεύτερη και τρίτη εβδομάδα ανάπτυξης των φυτών

Από τον πίνακα 2 σύμφωνα με τους μέσους όρους των ποσοστών βλαστικότητας προκύπτει το συμπέρασμα ότι η βλαστικότητα των μεταλλαγμένων φυτών επηρεάζεται λιγότερο από τις συνθήκες αλατότητας. Συγκεκριμένα τα μεταλλαγμένα φυτά ανταποκρίνονται καλύτερα σε συνθήκες μέσης αλατότητας (75 mM NaCl), αφού τα ποσοστά βλαστικότητας μειώνονται ελάχιστα, ενώ όσο η αλατότητα αυξάνεται, τα ποσοστά βλαστικότητας αρχίζουν να μειώνονται σε μεγαλύτερο βαθμό.

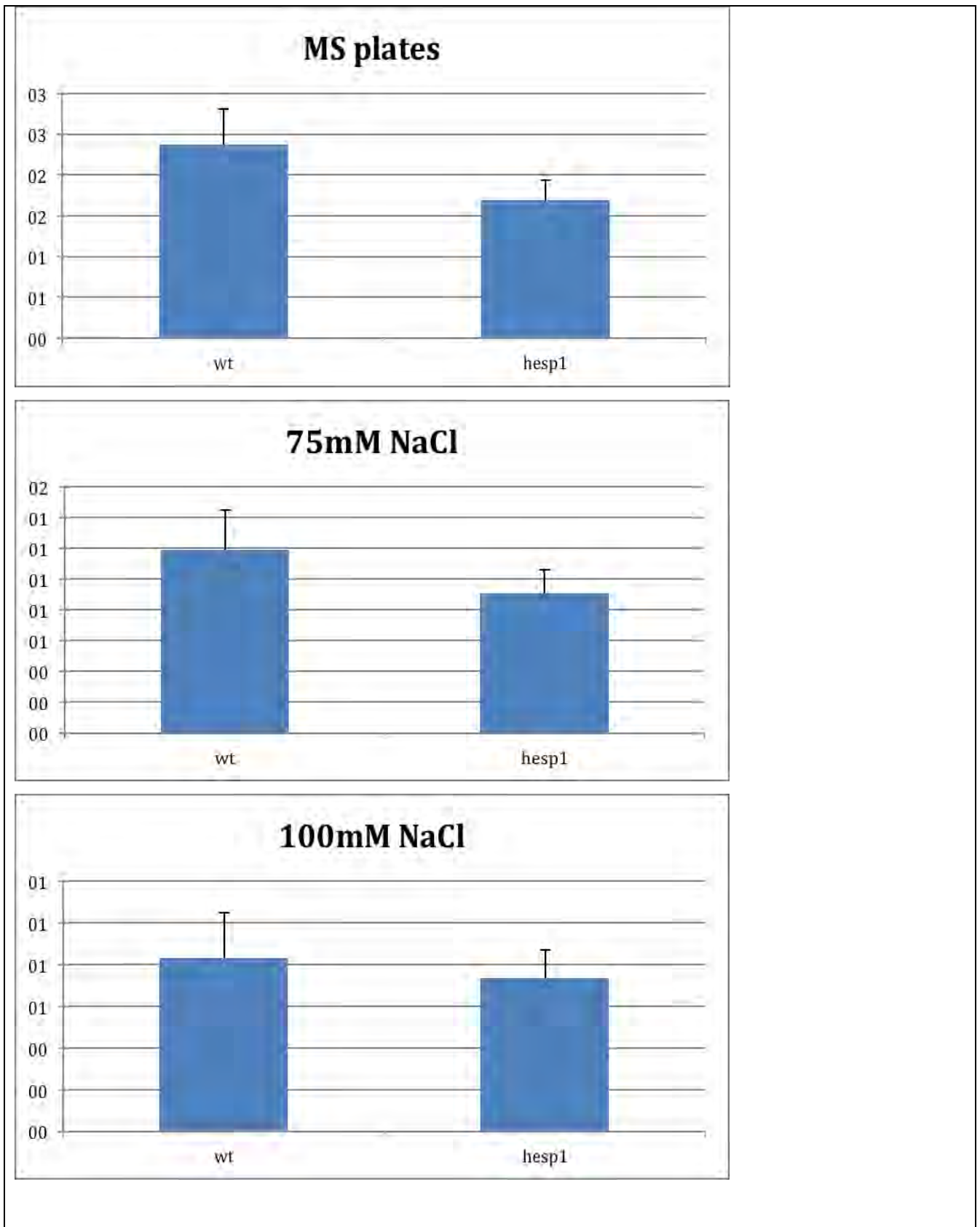
Από το διάγραμμα 1, στο οποίο απεικονίζεται η ανάπτυξη των ριζών στο τέλος της πρώτης εβδομάδας προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα φυτά αγρίου τύπου αναπτύσσονται γρηγορότερα σε σύγκριση με τα φυτά *hesp1*. Όμως από το διάγραμμα 2, στο οποίο απεικονίζεται η ανάπτυξη των ριζών στο τέλος της δεύτερης εβδομάδας προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα φυτά *hesp1* σε συνθήκες αλατότητας 75 mM NaCl και 100 mM NaCl ανταποκρίνονται καλύτερα, αφού τα φυτά αυτά εμφανίζουν μεγαλύτερη αύξηση στο μήκος της ρίζας. Και τέλος από το διάγραμμα 3, στο οποίο απεικονίζεται η ανάπτυξη των ριζών στο τέλος της τρίτης εβδομάδας προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα φυτά *hesp1* σε συνθήκες αλατότητας 75 mM NaCl και 100 mM

NaCl συνεχίζουν να αναπτύσσονται περισσότερο σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου.

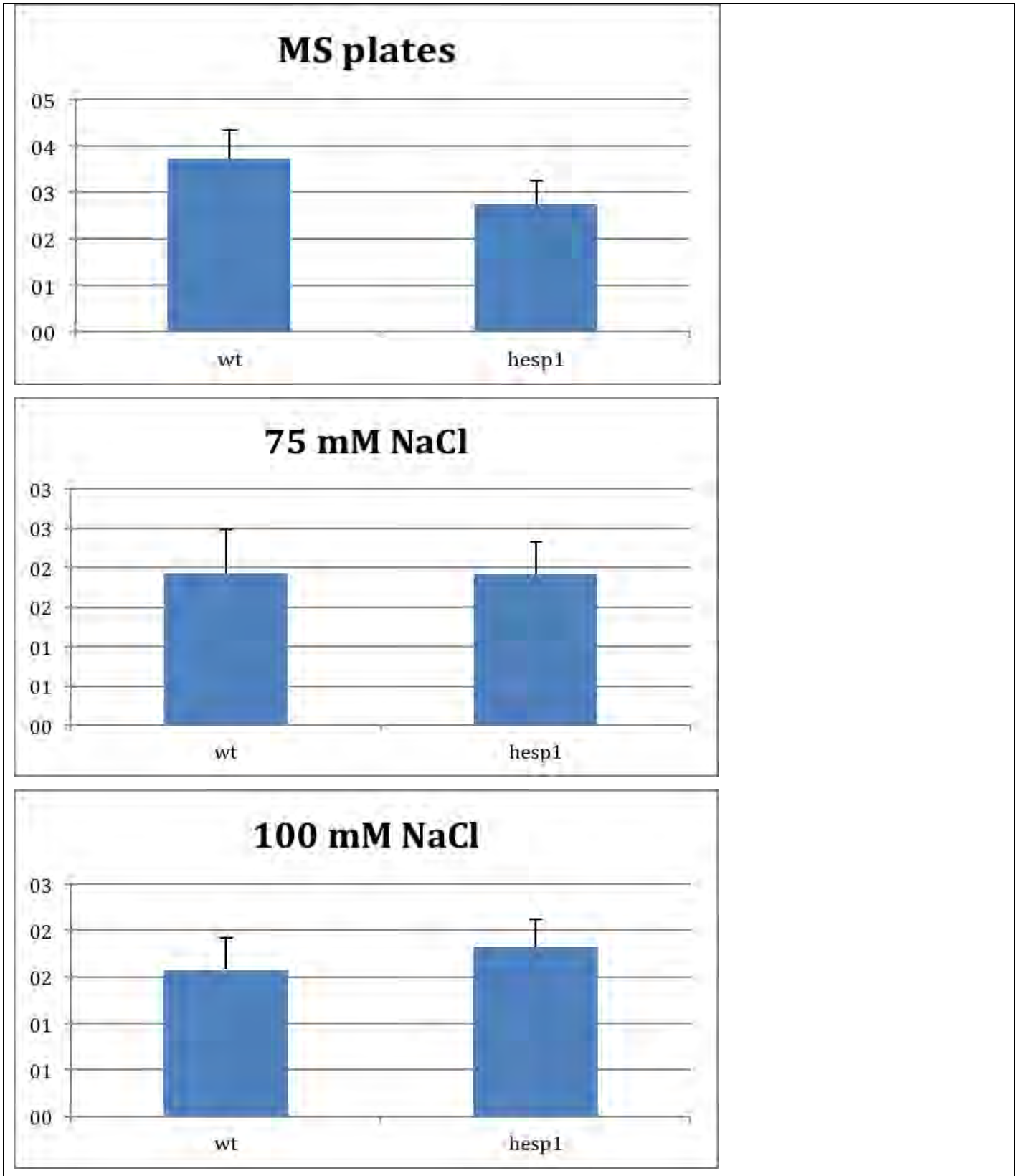
ΠΟΣΟΣΤΑ ΒΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ MS/ΤΡΥΒΑΙΟ	wt	hesp1	ΠΟΣΟΣΤΑ ΒΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ 75 mM NaCl /ΤΡΥΒΑΙΟ	wt	hesp1	ΠΟΣΟΣΤΑ ΒΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ 100 mM NaCl /ΤΡΥΒΑΙΟ	wt	hesp1
	90,91	92,31		86,67	100,00		58,33	91,67
81,82	100,00	66,67	100,00	75,00	83,33			
100,00	100,00	93,75	85,71	83,33	91,67			
100,00	100,00	76,47	93,33	76,92	100,00			
100,00	100,00	80,00	93,75	66,67	100,00			
91,67	100,00	80,00	86,67	83,33	91,67			
93,33	93,75	75,00	92,31	63,64	85,71			
93,33	100,00	86,67	85,71	73,33	100,00			
100,00	100,00	85,71	100,00	75,00	100,00			
100,00	92,86	66,67	92,86	75,00	87,50			
100,00	92,86	76,47	93,33	64,29	93,33			
M.O.	95,55	97,43	M.O.	79,46	93,06	M.O.	66,24	85,41

Πίνακας 2 : Ποσοστά βλαστικότητας φυτών *wild type* και μεταλλαγμένων φυτών σε MS , 75 mM NaCl και 100 mM NaCl.

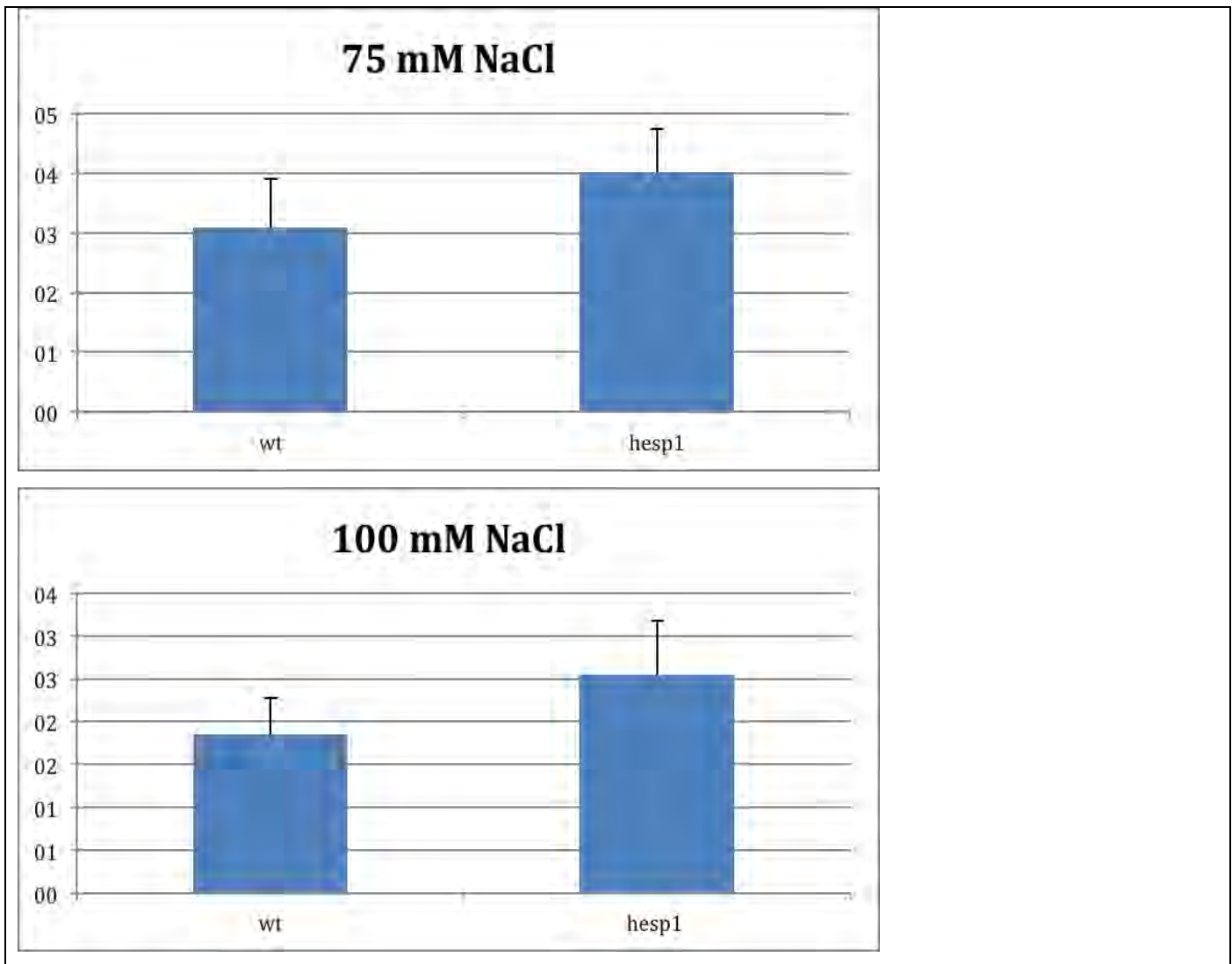
Μετά το πέρας των 21 ημερών πραγματοποιήθηκε την 22^η ημέρα ανάπτυξης δειγματοληψία παρουσία υγρού αζώτου με ιδιαίτερη προσοχή και χωρίς να διακόπτεται η φωτοπερίοδος. Από τα νεαρά φυτά *Arabidopsis thaliana* διαχωρίστηκαν οι ρίζες από το υπέργειο τμήμα και μεταφέρθηκε σε σωλήνες erpendorfs. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε δύο χρονικές στιγμές του 24ώρου και συγκεκριμένα στις 10 το πρωί που αντιστοιχεί σε δύο ώρες μετά το ξημέρωμα και στις 7 το απόγευμα που αντιστοιχεί σε μία ώρα πριν νυχτώσει. Συνολικά για το πείραμα συλλέξαμε 24 δείγματα. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον καταψύκτη στους -80 °C.



Διάγραμμα 1: 1^η εβδομάδα ανάπτυξης ριζών φυτών wt και hesp1 σε MS, 75 mM και 100 mM NaCl.



Διάγραμμα 2: 2^η εβδομάδα ανάπτυξης ριζών φυτών wt και hesp1 σε MS, 75 mM και 100 mM NaCl



Διάγραμμα 3: 3^η εβδομάδα ανάπτυξης ριζών φυτών *wt* και *hesp1* σε MS, 75 mM και 100 mM NaCl

3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Απομονώθηκε RNA από τα 12 δείγματα από φυτά αγρίου τύπου (Wild type) και από τα 12 δείγματα από τα μεταλλαγμένα φυτά μειωμένης έκφρασης της εσπερίνης (*hesp1*) τις ώρες 10:00 και 19:00. Ο έλεγχος της ποιότητας του RNA έγινε κατόπιν ανάλυσης των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης 2% περιεκτικότητα (Εικόνα 3). Η συγκεκριμένη διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές. Κάθε φορά γινόταν ο έλεγχος για 8 δείγματα. (Πίνακας 3).

Το διάλυμα της πήκτης αγαρόζης έγινε ως εξής:

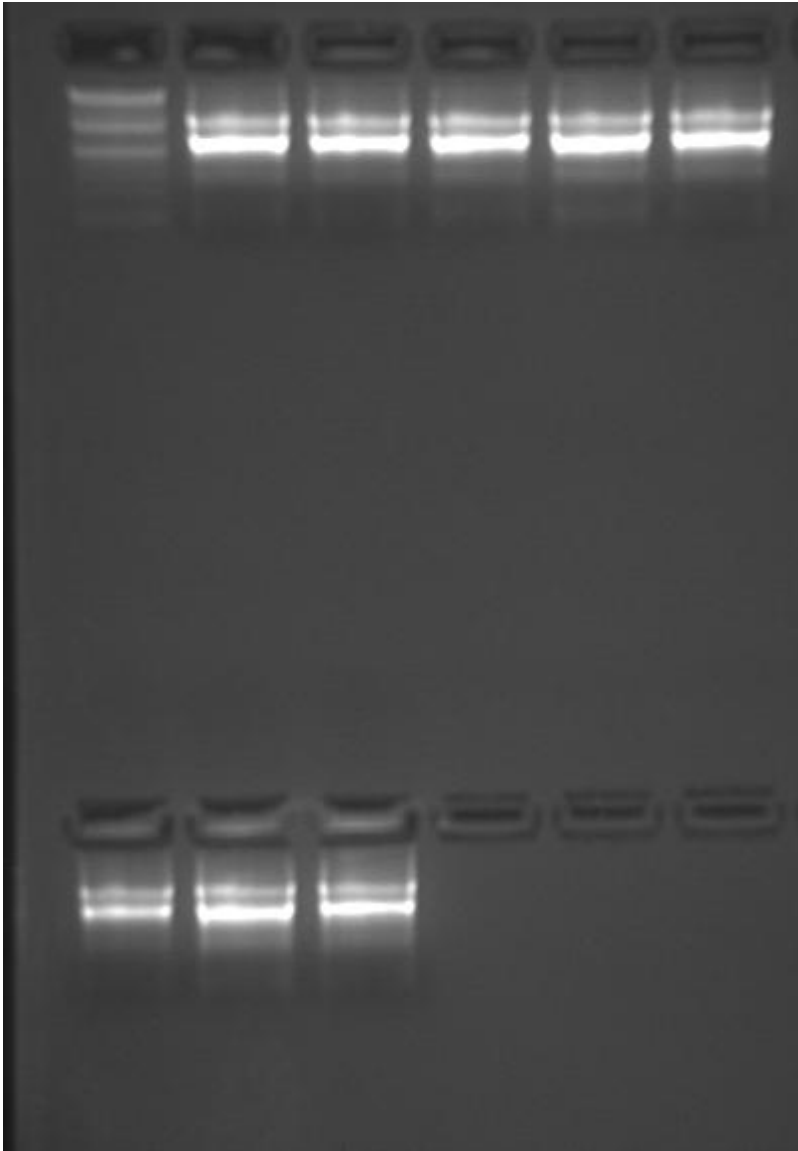
- Σε 70 ml TAE προσθέτουμε 1,4 gr αγαρόζης(περιεκτικότητα 2%). Το μείγμα το βάζουμε στο φούρνο μικροκυμάτων να βράσει και να ομογενοποιηθεί.

Διπλωματική εργασία Κατσιφού Ειρήνη

- Στη συνέχεια αφού το κρυώσουμε κάτω από τη βρύση, προσθέτουμε 3 μl βρωμιούχο αιθίδιο και το αφήνουμε να πείξει για 30 λεπτά στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Αφού πείξει τοποθετούμε στη συσκευή στο 1^ο πηγαδάκι το ladder(1 μl) και στα υπόλοιπα 8 πηγαδάκια, από 5 μl κάθε δείγματος και αφήνουμε για ένα τέταρτο σε συνεχή τάση 100 V.
- Μετά την παρέλευση του ενός τέταρτου βλέπουμε εάν υπάρχει RNA και συγκεκριμένα mRNA. Αυτό το καταλαβαίνουμε εάν στα δείγματά μας ξεχωρίζουν 2 μπάντες σε κάθε δείγμα (Εικόνα 3)

Δείγματα 1 ^{ης} ομάδας	Δείγματα 2 ^{ης} ομάδας	Δείγματα 3 ^{ης} ομάδας
control,wt, 10:00, φύλλα	75 mM NaCl, wt ,10:00, φύλλα	100 mM NaCl, wt ,10:00, φύλλα
control, wt, 10:00, ρίζες	75 mM NaCl , wt, 10:00, ρίζες	100 mM NaCl , wt, 10:00, ρίζες
control, wt, 19:00, φύλλα	75 mM NaCl, wt, 19:00, φύλλα	100 mM NaCl, wt, 19:00, φύλλα
control, wt , 19:00, ρίζες	75 mM NaCl, wt , 19:00, ρίζες	100 mM NaCl, wt , 19:00, ρίζες
control, hesp1, 10:00 , φύλλα	75 mM NaCl, hesp1, 10:00, φύλλα	100 mM NaCl, hesp1, 10:00, φύλλα
control ,hesp1, 10:00, ρίζες	75 mM NaCl , hesp1, 10:00, ρίζες	100 mM NaCl , hesp1, 10:00, ρίζες
control, hesp1, 19:00, φύλλα	75 mM NaCl, hesp1, 19:00, φύλλα	100 mM NaCl, hesp1, 19:00, φύλλα
control, hesp1, 19:00, ρίζες	75 mM NaCl, hesp1, 19:00, ρίζες	100 mM NaCl, hesp1, 19:00, ρίζες

Πίνακας 3



Εικόνα 3: Στην πάνω σειρά παρατηρούμε το μάρτυρα μοριακών βαρών, τα τέσσερα δείγματα αγρίου τύπου και ένα μεταλλαγμένο ξεκινώντας από αριστερά προς τα δεξιά με το wt 10:00 φύλλα, wt 10:00 ρίζες, wt 19:00 φύλλα, wt 19:00 ρίζες, καθώς και το 37900 10:00 φύλλα. Στην κάτω σειρά ακολουθούν τα 37900 10:00 ρίζες, 37900 19:00 φύλλα και 37900 19:00 ρίζες.

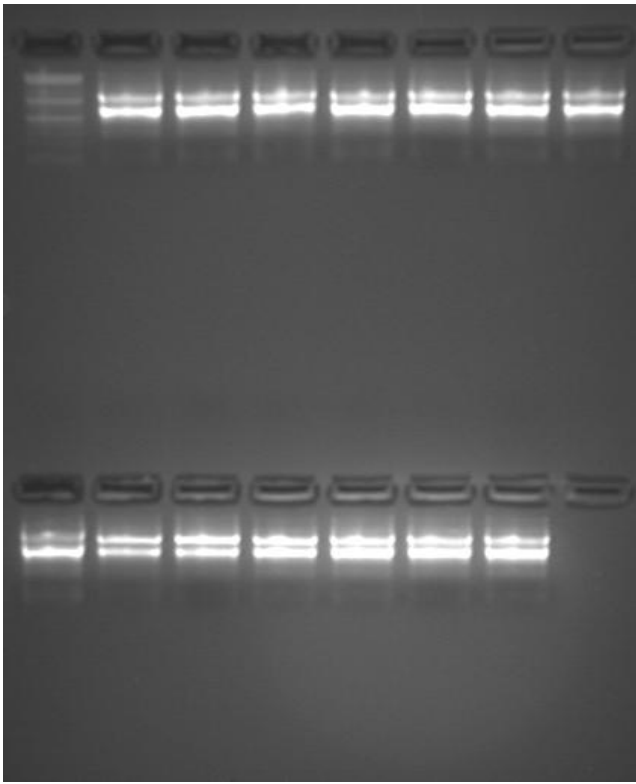
3.3 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Μετά την απομόνωση RNA ακολούθησε η αντίδραση DNάσης ώστε τοιχόν υπολείμματα DNA που έχουν απομείνει στο δείγμα μας να καθαριστούν πλήρως. Η αντίδραση DNάσης πραγματοποιήθηκε για 50 λεπτά στους 37 °C. Τα υλικά που χρησιμοποιήσαμε για 8 δείγματα ήταν:

- RNA 3,5 μl από κάθε δείγμα.
- Διάλυμα Buffer 1 μl (συνολικά 9 μl)
- DNase 1 μl(συνολικά 9 μl)

- RNASE OUT 0,5 μl(συνολικά 4,5μl)
- H₂O 4 μl (συνολικά 36 μl)

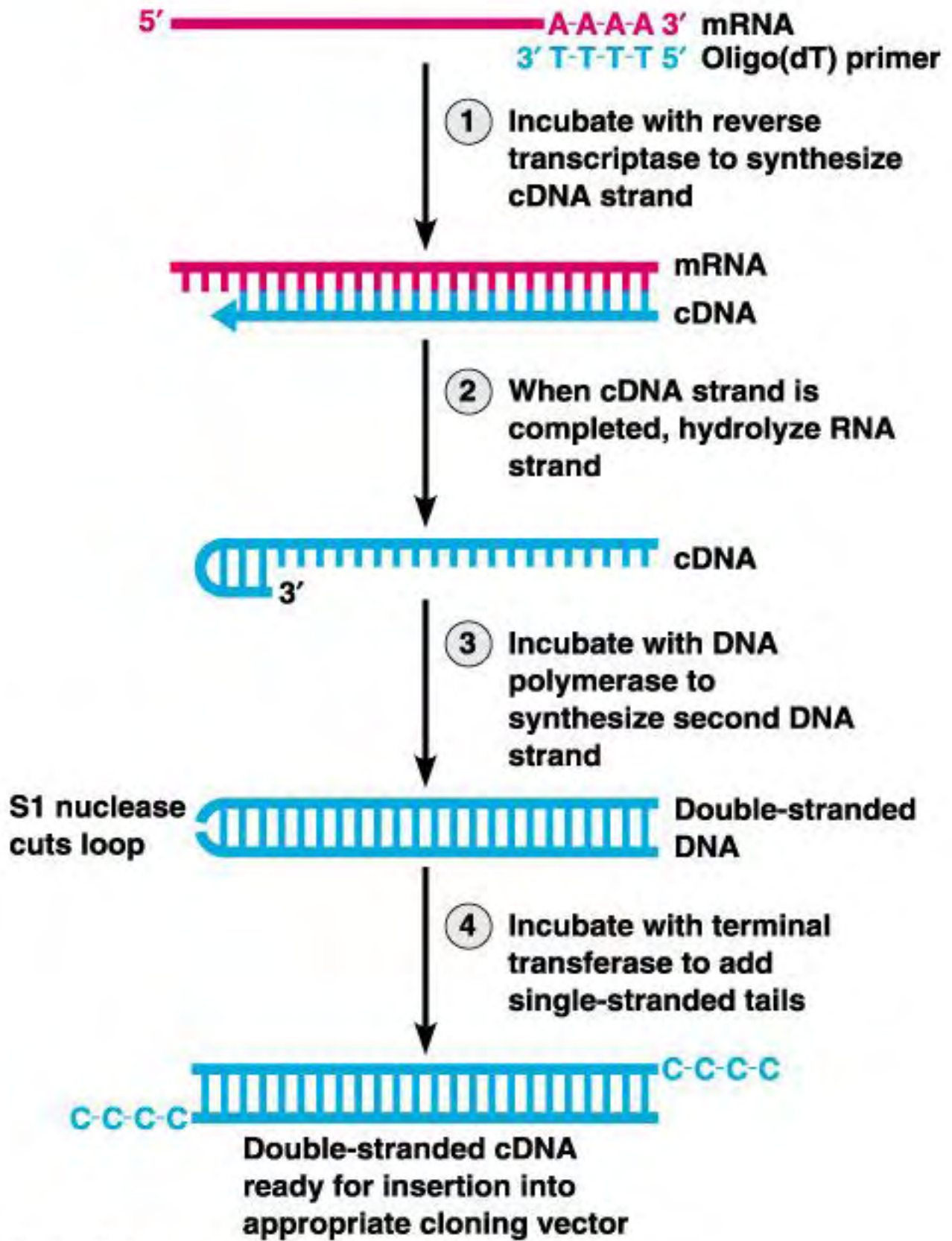
Ο έλεγχος της ύπαρξης υπολειμμάτων DNA στα δείγματα RNA ακόμη και μετά την αντίδραση Dnάσης, πραγματοποιήθηκε με αντίδραση PCR. Στην αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών που ενισχύει ένα τμήμα περίπου 90 bp της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου της ουβικιτίνης. Η ουβικιτίνη αποτελεί 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 πήκτη αγαρόζης 1,2 %, όπου διακρίνονταν 2 μπάρες σε κάθε δείγμα (Εικόνα 4).



Εικόνα 4 :Στην πάνω σειρά και στο πρώτο πηγαδάκι από αριστερά προς τα δεξιά τοποθετήσαμε το θετικό μάρτυρα που έχει 1 μl cDNA από άλλο φυτό, ακολουθούν τα 7 δείγματα και στην κάτω γραμμή τοποθετήσαμε άλλα 7 δείγματα από αριστερά προς τα δεξιά και στο τέλος τον αρνητικό μάρτυρα που είναι 1 μl H₂O

3.4 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

Το RNA των δειγμάτων μας που έχει απομονωθεί μετατρέπεται σε DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας



©Addison Wesley Longman, Inc.

Εικόνα 5: Τμηματική αναπαράσταση cDNA σύνθεσης.

την αντίδραση της cDNA σύνθεσης. Στην διαδικασία αυτή μετέχει η αντίστροφη μεταγραφάση, 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 τη μορφή δίκλωνου DNA(Εικόνα 5)

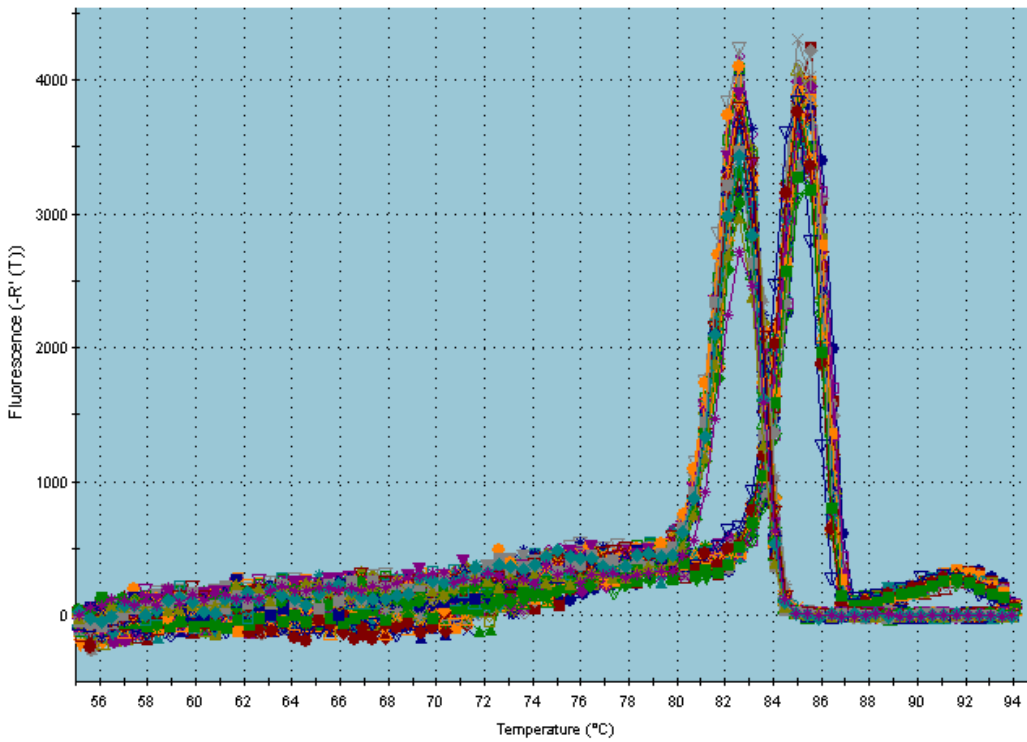
3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΕΣΠΕΡΙΝΗΣ

Μετά τη σύνθεση του cDNA από τα δείγματα μας ακολούθησε η μελέτη έκφρασης του γονιδίου σε αυτά. Για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της εσπερίνης 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.

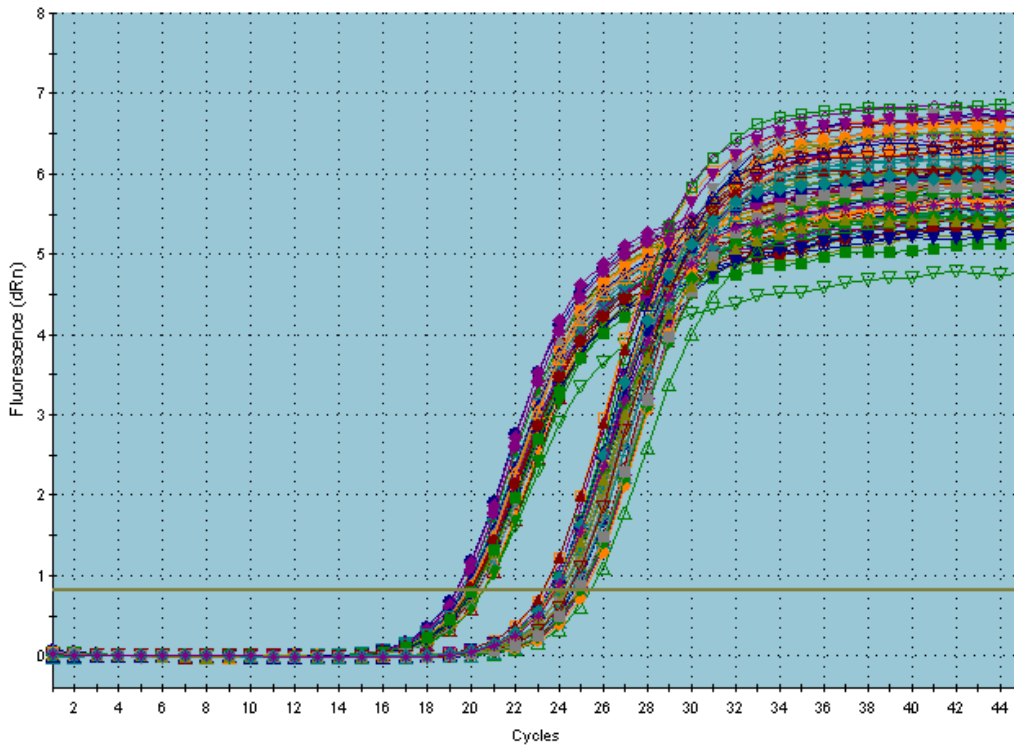
Η έκφραση του γονιδίου της Εσπερίνης μελετήθηκε τόσο στα δείγματα από τα φυτά αγρίου τύπου όσο και στα μεταλλαγμένα φυτά με μειωμένη την έκφραση της εσπερίνης. Εκτός από το γονίδιο της εσπερίνης μελετήθηκε και η έκφραση των γονιδίων adh-2, grp-7 και oxt6-1, που είναι καταγεγραμμένα και αυτά ως νυχτερινά γονίδια. Ταυτόχρονα με τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω γονιδίων, μετρήθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης ενός γονιδίου του *Arabidopsis thaliana* που κωδικοποιεί για ουβικιτίνη. Το γονίδιο της ουβικιτίνης αποτελεί εσωτερικό μάρτυρα καθώς τα επίπεδα έκφρασης 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.

Οι εικόνες 7, 9, 11 και 13 δείχνουν τις καμπύλες ενίσχυσης που προέκυψαν από την ενίσχυση των γονιδίων adh-2, hesp, grp-7 και oxt6-1 αντίστοιχα σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς. Στις καμπύλες φαίνεται η αύξηση του φθορισμού της SYBR®Green με την αύξηση του αριθμού των κύκλων της PCR.

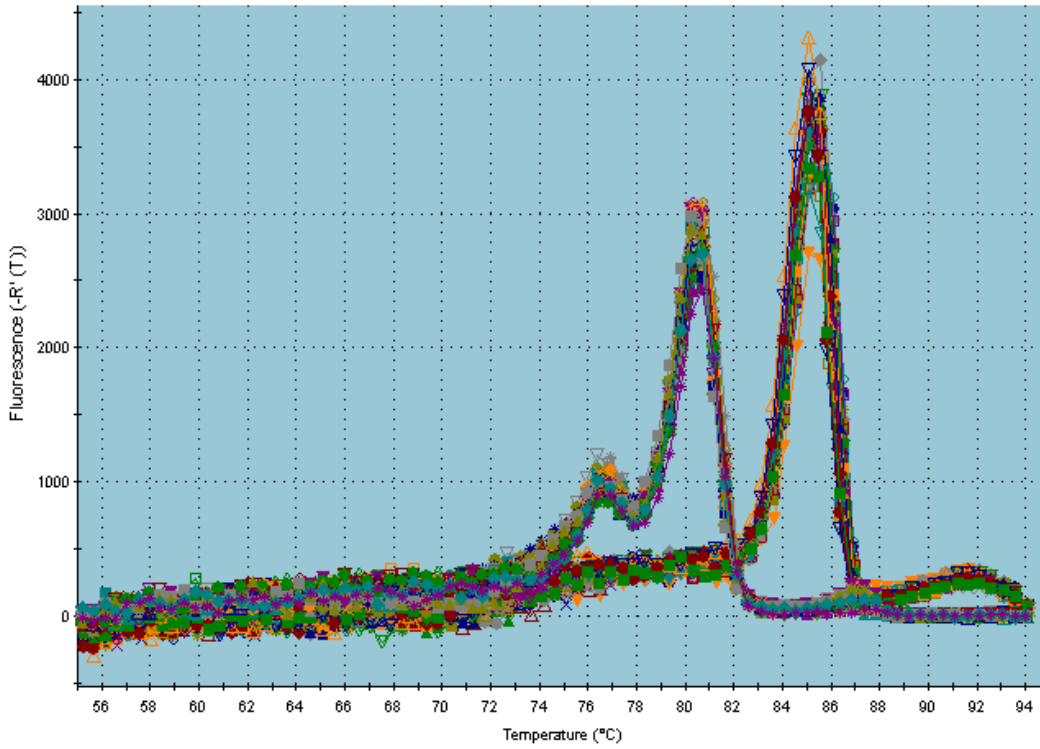
Η εξειδίκευση των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση qRT-PCR ελέγχθηκε για κάθε ζεύγος (γονίδιο ελέγχου με γονίδιο αναφοράς) από τις καμπύλες αποδιάταξης(Εικόνες 6, 8,10, και 12)



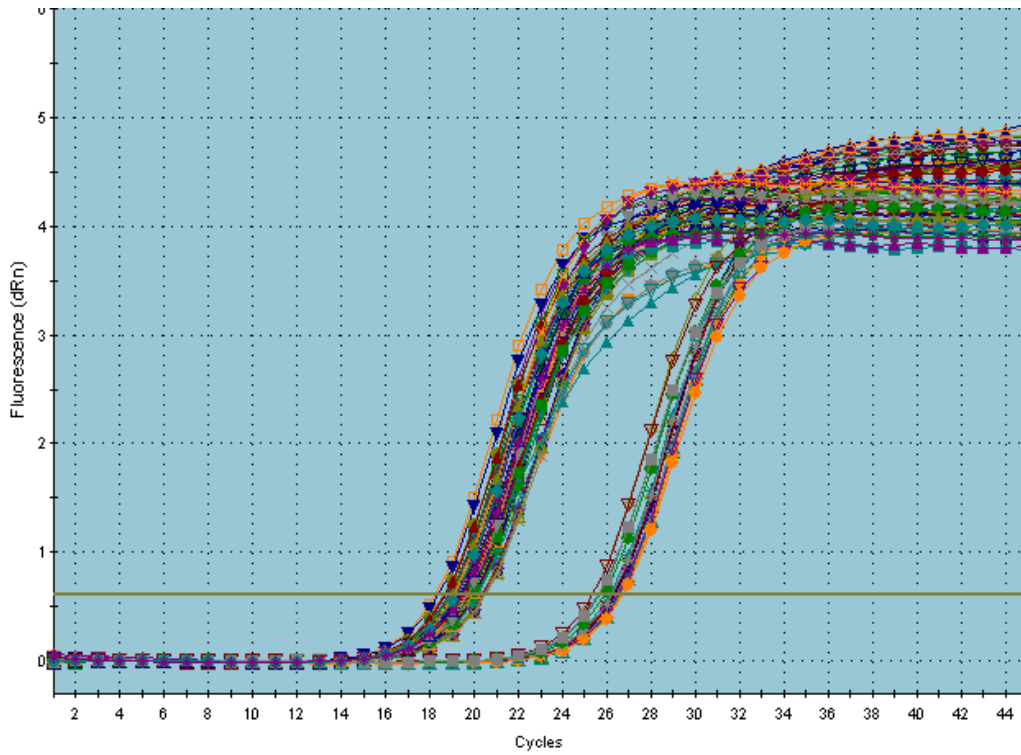
Εικόνα 6: Καμπύλη αποδιάταξης της qRT-PCR για γονίδιο *adh2*



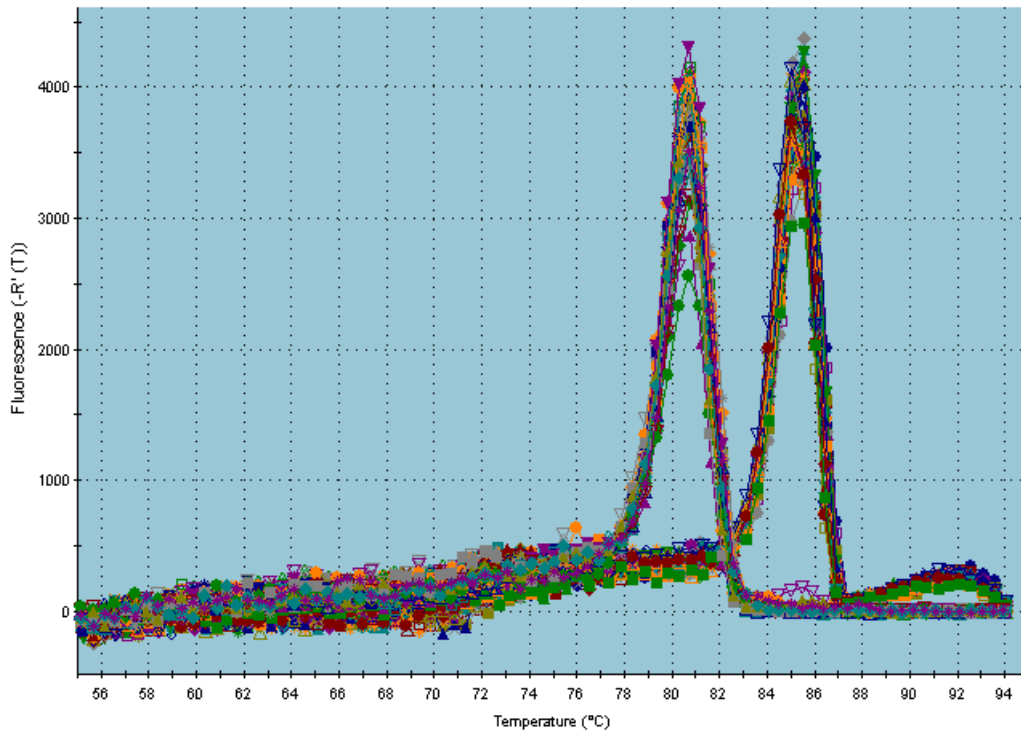
Εικόνα 7: Καμπύλη ενίσχυσης της qRT-PCR για γονίδιο *adh2*



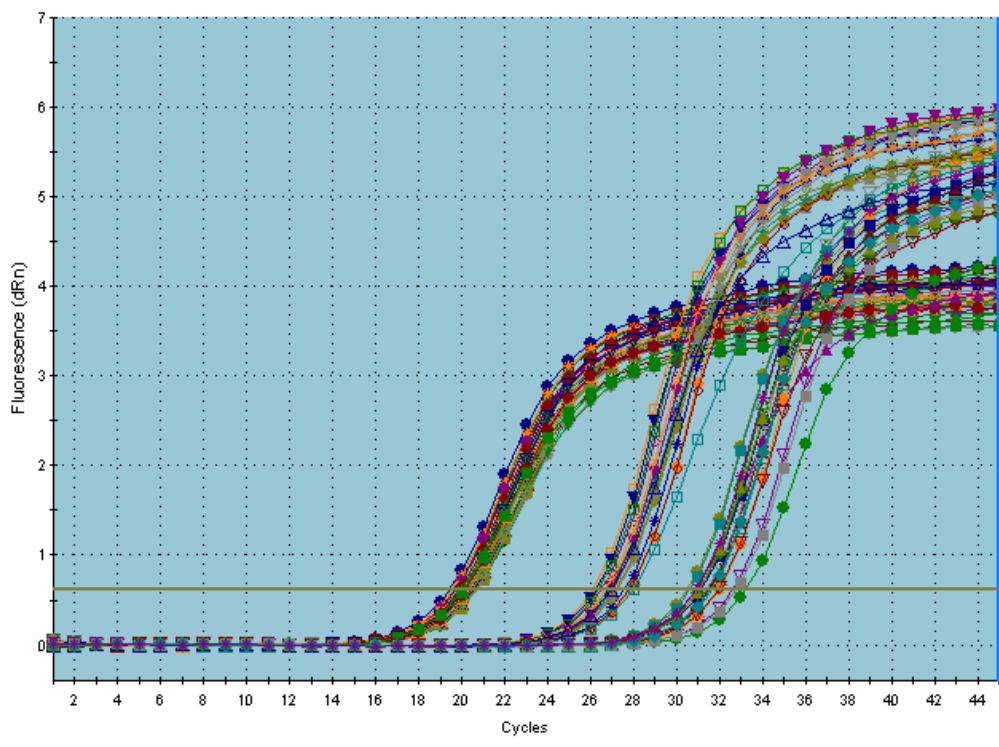
Εικόνα 8: Καμπύλη αποδιάταξης της qRT-PCR για γονίδιο *hesp 1*



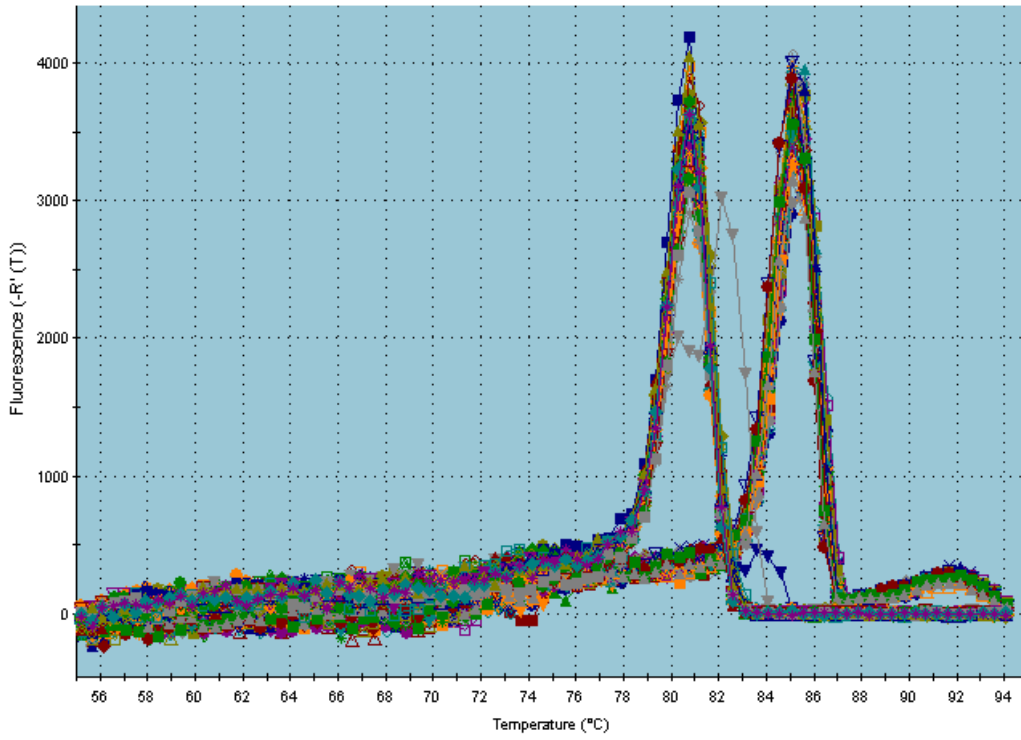
Εικόνα 9: Καμπύλη ενίσχυσης της qRT-PCR για γονίδιο *hesp 1*



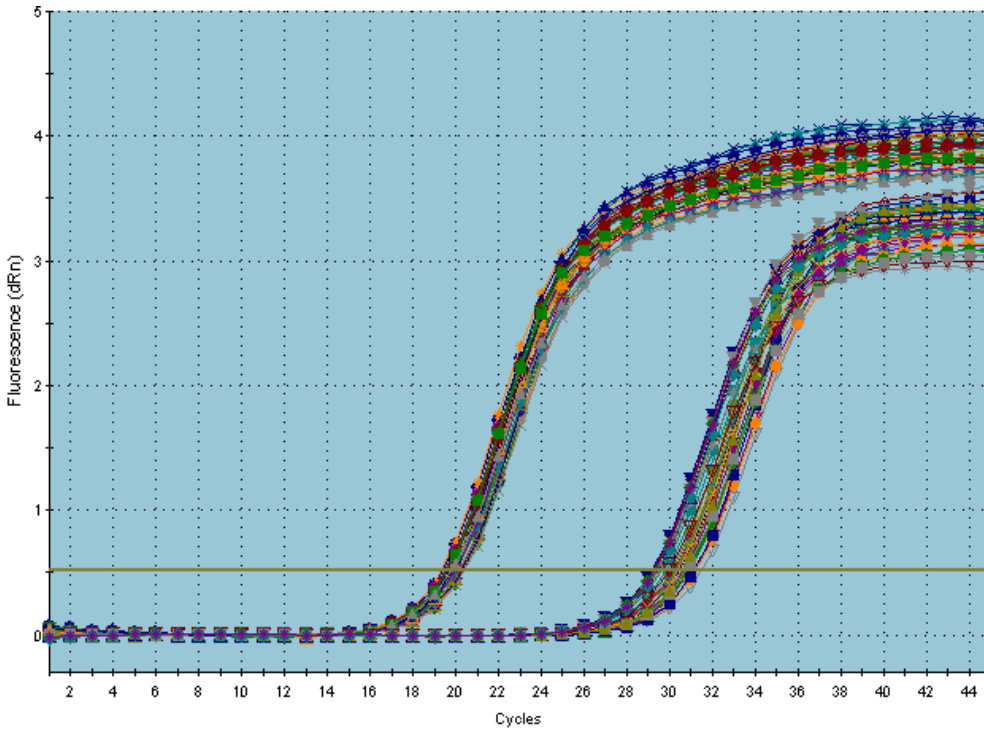
Εικόνα 10: Καμπύλη αποδιάταξης της *qRT-PCR* για γονίδιο *grp 7*



Εικόνα 11: Καμπύλη ενίσχυσης της *qRT-PCR* για γονίδιο *grp 7*



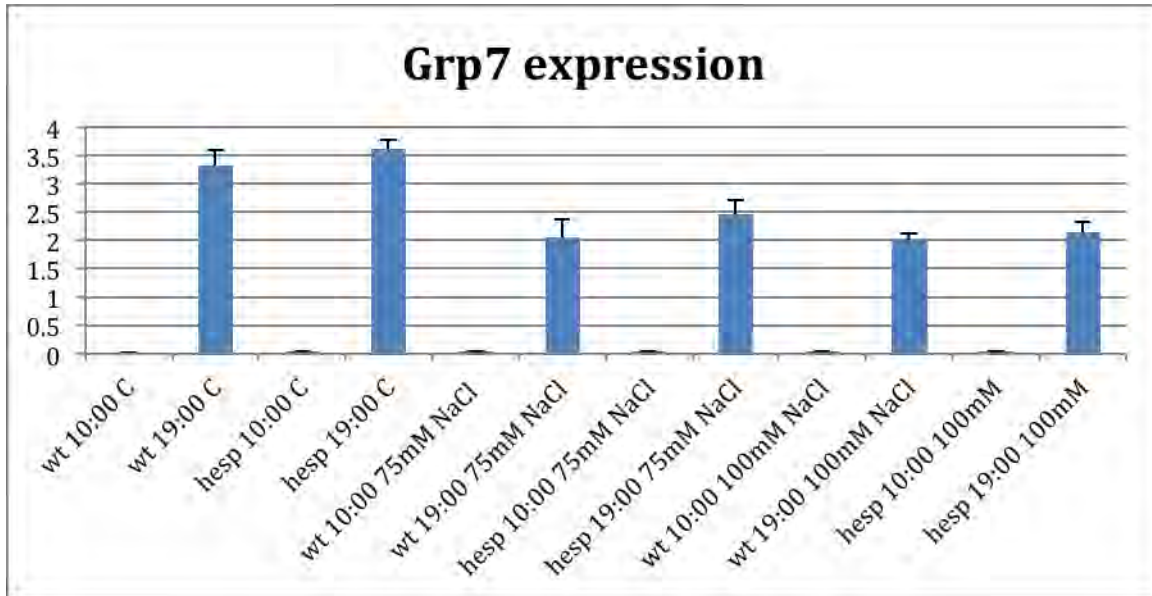
Εικόνα 12: Καμπύλη αποδιάταξης της qRT-PCR για γονίδιο *oxt6-1*



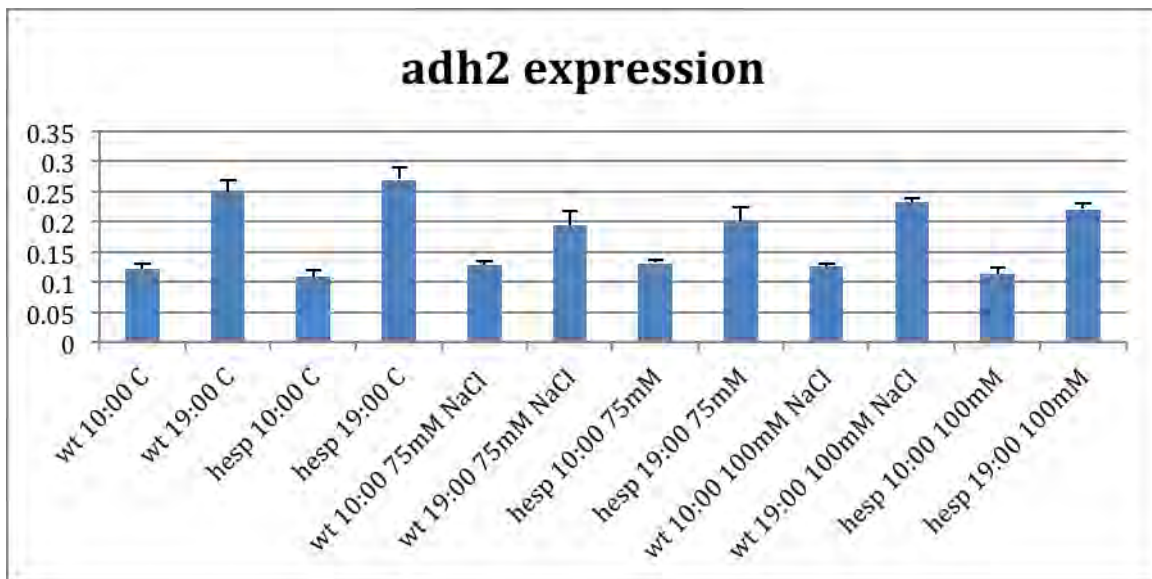
Εικόνα 13: Καμπύλη ενίσχυσης της qRT-PCR για γονίδιο *oxt6-1*

Για να ελέγξουμε αν το γονίδιο της Εσπερίνης παίζει ρόλο στην συμπεριφορά των φυτών, όταν καταπονούνται από αλάτι μελετήσαμε την έκφραση του γονιδίου σε 2 χρονικές στιγμές της ημέρας και για φυτά αγρίου τύπου, άλλα και για μεταλλαγμένα φυτά μειωμένης έκφρασης της εσπερίνης που αναπτύχθηκαν σε 3 υποστρώματα: υπόστρωμα MS, υπόστρωμα περιεκτικότητας 75 μM NaCl και υπόστρωμα περιεκτικότητας 100 μM NaCl (Εικόνα 16). Για τα μεταλλαγμένα φυτά στην εικόνα 16 παρουσιάζεται ότι τα επίπεδα έκφρασης της εσπερίνης μειώνονται και στις 2 χρονικές στιγμές της ημέρας καθώς επίσης και στα τρία υποστρώματα ανάπτυξης. Δηλαδή στο μετάλλαγμα παρουσιάζεται απορρύθμιση του κερκαδικού ρολογιού, αφού μειώνεται η έκφραση της εσπερίνης και στις 2 χρονικές στιγμές της ημέρας, με αποτέλεσμα να επιβεβαιώνεται το αποτέλεσμα προηγούμενου πειράματος που πραγματοποίησε ο αποφοίτος Γκέβρος Ιωάννης στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (2011). Όμως στην εικόνα 16 παρουσιάζονται και τα επίπεδα έκφρασης της Εσπερίνης για τα φυτά αγρίου τύπου τις 2 χρονικές στιγμές σε MS υπόστρωμα που λειτουργούν ως μάρτυρες σε σχέση με τα φυτά που αναπτύσσονται στα υποστρώματα 75 mM NaCl και 100 mM NaCl. Τα επίπεδα έκφρασης της εσπερίνης μειώνονται στατιστικώς σημαντικά για τη χρονική στιγμή 19:00 και στα 2 υποστρώματα 75 mM NaCl και 100 mM NaCl σε σύγκριση με το μάρτυρα, ενώ παρατηρήθηκε μια μη στατιστικώς σημαντική μείωση της έκφρασης στη χρονική στιγμή 10:00.

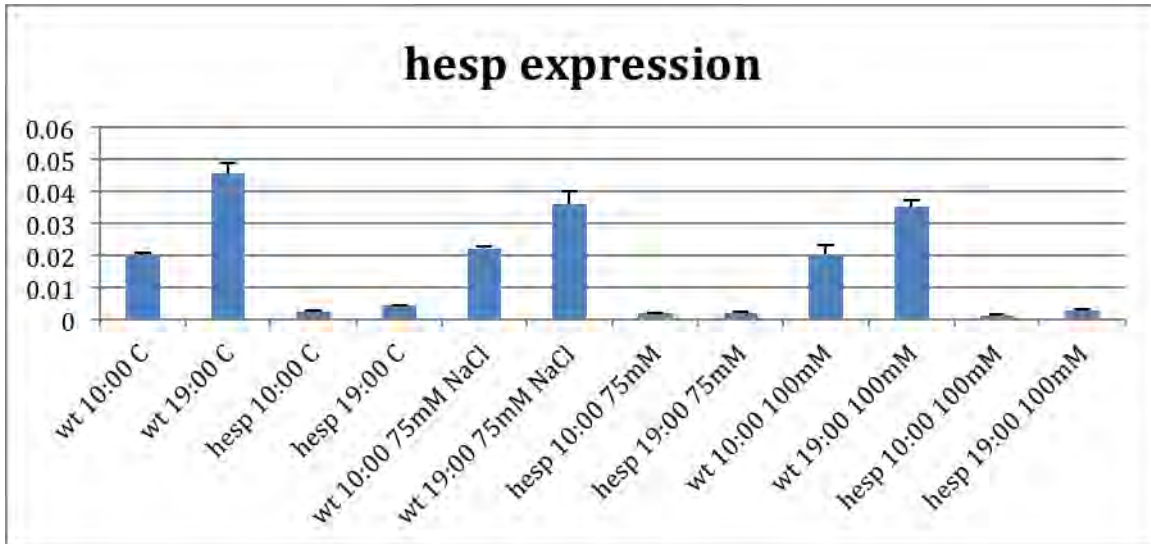
Για να δόθει μια εξήγηση σχετικά με τη συμπεριφορά των μεταλλαγμένων φυτών ως προς την έκφραση της εσπερίνης, ελέγξαμε τρία ακόμη νυχτερινά γονίδια που είναι τα εξής: adh-2, grp-7 και oxt6-1. Για την έκφραση του γονιδίου adh-2 (Εικόνα 15) παρατηρούμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου δεν διαφέρουν μεταξύ των φυτών αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων φυτών. Αυτό που παρατηρούμε είναι μια μείωση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ του υποστρώματος MS και των υποστρωμάτων 75 mM NaCl και 100 mM NaCl. Όσο αφορά την έκφραση του γονιδίου grp-7 (Εικόνα 14), παρατηρούμε ότι το επίπεδο έκφρασης σε όλα τα δείγματα που ελείφθησαν τη χρονική στιγμή 10:00 είναι πολύ χαμηλά. Επιπλέον η έκφραση του γονιδίου παρουσιάζει μια αύξηση στα μεταλλαγμένα φυτά σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου, αλλά μία μείωση της έκφρασης στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε μέση και υψηλή αλατότητα σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα MS. Τέλος για την έκφραση του γονιδίου oxt6-1 (Εικόνα 17) παρατηρούμε ότι εμφανίζει μία ομοιομορφία ως προς τα επίπεδα έκφραση του μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών χωρίς να παρουσιάζεται διαφορά στην έκφραση του μεταξύ φυτών αγρίου τύπου και φυτών mutants. Διαφορά στην έκφραση του γονιδίου εμφανίζεται μόνο όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες αλατότητας, που παρατηρείται μια μείωση της έκφρασης στα υποστρώματα 75 mM NaCl και 100 mM NaCl.



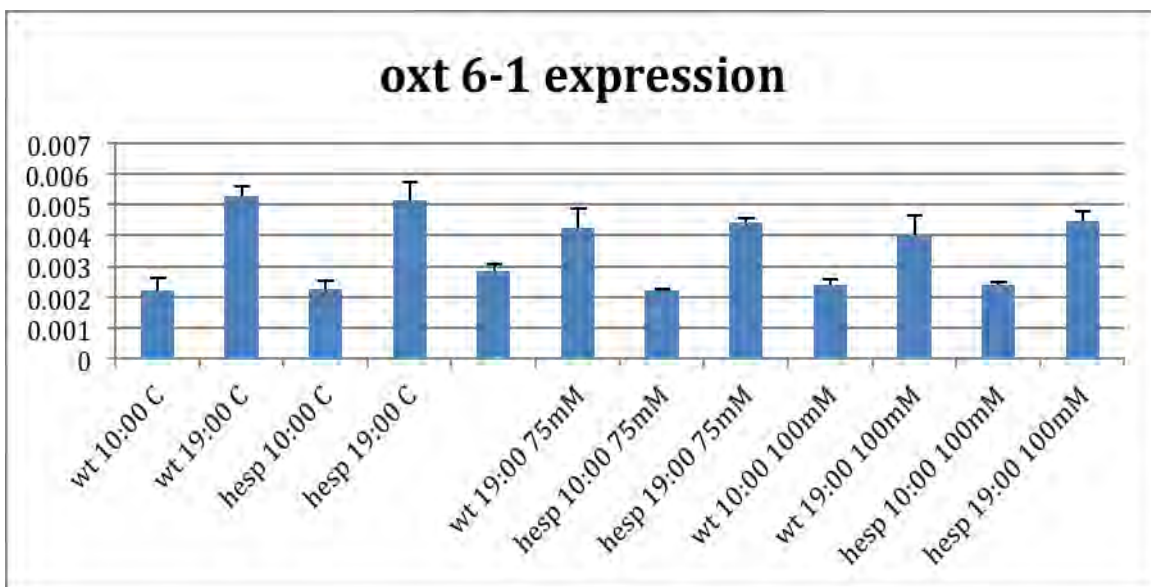
Εικόνα 14: Σχετική έκφραση του γονιδίου *grp 7* στα φυτά αγρίου τύπου και σε φυτά *hesp1* σε 2 χρονικές στιγμές της ημέρας 10:00 και 19:00 και σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης(control) και σε συνθήκες ανάπτυξης μέσης αλατότητας (75 μM NaCl) και υψηλής αλατότητας (100 μM NaCl). Τα επίπεδα έκφρασης του *grp 7* έχουν κανονικοποιηθεί με βάση την έκφραση του γονιδίου της ουβικιτίνης. Οι μπάρες δείχνουν μέσους όρους με τυπικό σφάλμα (3 επαναλήψεων).



Εικόνα 15: Σχετική έκφραση του γονιδίου *adh2* στα φυτά αγρίου τύπου και σε φυτά *hesp1* σε 2 χρονικές στιγμές της ημέρας 10:00 και 19:00 και σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης(control) και σε συνθήκες ανάπτυξης μέσης αλατότητας (75 μM NaCl) και υψηλής αλατότητας (100 μM NaCl). Τα επίπεδα έκφρασης του *adh2* έχουν κανονικοποιηθεί με βάση την έκφραση του γονιδίου της ουβικιτίνης. Οι μπάρες δείχνουν μέσους όρους με τυπικό σφάλμα (3 επαναλήψεων).



Εικόνα 16: Σχετική έκφραση του γονιδίου της εσπερίνης στα φυτά αγρίου τύπου και σε φυτά *hesp1* σε 2 χρονικές στιγμές της ημέρας 10:00 και 19:00 και σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης (control) και σε συνθήκες ανάπτυξης μέσης αλατότητας (75 μM NaCl) και υψηλής αλατότητας (100 μM NaCl). Τα επίπεδα έκφρασης της εσπερίνης έχουν κανονικοποιηθεί με βάση την έκφραση του γονιδίου της ουβικιτίνης. Οι μπάρες δείχνουν μέσους όρους με τυπικό σφάλμα (3 επαναλήψεων).



Εικόνα 17: Σχετική έκφραση του γονιδίου *oxl6-1* στα φυτά αγρίου τύπου και σε φυτά *hesp1* σε 2 χρονικές στιγμές της ημέρας 10:00 και 19:00 και σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης (control) και σε συνθήκες ανάπτυξης μέσης αλατότητας (75 μM NaCl) και υψηλής αλατότητας (100 μM NaCl). Τα επίπεδα έκφρασης του *oxl6-1* έχουν κανονικοποιηθεί με βάση την έκφραση του γονιδίου της ουβικιτίνης. Οι μπάρες δείχνουν μέσους όρους με τυπικό σφάλμα (3 επαναλήψεων).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γονίδιο της AtHesp βρέθηκε σε προηγούμενη εργασία ότι ελέγχεται από τον κερκάδιο ρυθμό και παρουσιάζει αυξημένη έκφραση τις βραδινές ώρες. Στο *Arabidopsis thaliana* έχουν δημοσιευτεί μελέτες για γονίδια που κωδικοποιούν για αποαδελυνάσες και συγκεκριμένα έχουν μελετηθεί τα γονίδια AtPARN[18] και AtCAF1a και AtCAF2b[15]. Για κάνα όμως από αυτά δεν έχει αναφερθεί να παρουσιάζουν έκφραση που να επηρεάζεται από τον κερκάδιο ρυθμό. Πρόσφατη μελέτη έχει αποδείξει μια εξελικτική δραστηριότητα στη βράχυνση της πολύ (A) ουράς στα φυτά και προτείνει ότι η αποαδενυλίωση είναι ένας μηχανισμός που εμπλέκεται στην ρύθμιση του κερκάδιου ρυθμού[1]

Το γονίδιο ανήκει σε μια κατηγορία αποαδενυλασών που δεν έχει μελετηθεί αν λαμβάνει κάποιο ρόλο και πως ανταποκρίνεται στην καταπόνηση των φυτών από αλατι. Γενικότερα δεν έχει βεθεί πως η αποαδενυλίωση συνδέεται με την καταπόνηση των φυτών σε άλας.

Αρχικά, για να διαπιστώσουμε αν η έκφραση του γονιδίου επηρεάζεται από την αυξημένη αλατότητα, μελετήσαμε την έκφραση του σε φυτά αγρίου τύπου και σε μεταλλαγμένα φυτά Hesp1(37900), που εμφάνιζαν το γονίδιο της εσπερίνης με μειωμένη έκφραση, που μεγάλωσαν σε θάλαμο ανάπτυξης για 22 ημέρες με φωτοπερίοδο ρυθμισμένη σε 12 ώρες ημέρα(8 το πρωί με 8 το απόγευμα) και 12 ώρες νύχτα (8 το απόγευμα με 8 το πρωί) και σταθερή θερμοκρασία 23^ο C . Η ανάπτυξη των φυτών έγινε σε τρία διαφορετικά υποστρώματα: σε υπόστρωμα MS, σε υπόστρωμα περιεκτικότητας 75 mM NaCl και περιεκτικότητας 100 mM NaCl. Στο τέλος της 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} εβδομάδας ανάπτυξης πάρθηκαν φωτογραφίες. Οι φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκαν, έτσι ώστε να υπολογιστούν τα ποσοστά βλαστικότητας καθώς και ο ρυθμός ανάπτυξης των φυτών. Έτσι σύμφωνα με μετρήσεις που έγιναν, το γενικό συμπέρασμα είναι ότι η βλαστικότητα των μεταλλαγμένων φυτών επηρεάζεται λιγότερο από τις συνθήκες αλατότητας. Συγκεκριμένα τα μεταλλαγμένα φυτά ανταποκρίνονται καλύτερα σε συνθήκες μέσης αλατότητας (75 mM NaCl), αφού τα ποσοστά βλαστικότητας μειώνονται ελάχιστα, ενώ όσο η αλατότητα αυξάνεται, τα ποσοστά βλαστικότητας αρχίζουν να μειώνονται σε μεγαλύτερο βαθμό.

Όσο αφορά την ανάπτυξη των ριζών στο τέλος της πρώτης εβδομάδας προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα φυτά αγρίου τύπου αναπτύσσονται γρηγορότερα σε σύγκριση με τα φυτά hesp1. Όμως στη συνέχεια σύμφωνα με την ανάπτυξη των ριζών καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα στο φυτά hesp1 σε συνθήκες αλατότητας 75 mM NaCl και 100 mM NaCl ανταποκρίνονται καλύτερα, αφού τα φυτά αυτά αναπτύσσονται περισσότερο σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου.

Εν συνεχεία για να μελετήσουμε περαιτέρω την έκφραση του γονιδίου στις συνθήκες αλατότητας την

22^η ημέρα πάρθηκαν δείγματα τόσο ριζών, όσο και φύλλων σε 2 χρονικές στιγμές της ημέρας. Συνολικά πάρθηκαν 12 δείγματα στις 10:00 το πρωί και 12 δείγματα στις 19:00 το απόγευμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης της εσπερίνης στα μεταλλαγμένα φυτά μειωμένης έκφρασης της Εσπερίνης παρουσιάζουν πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης, τόσο το πρωί, όσο και το απόγευμα, σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου. Δηλαδή στο μετάλλαγμα παρουσιάζεται απορρύθμιση του κερκαδικού ρολογιού, αφού μειώνεται η έκφραση της εσπερίνης και στα 3 υποστρώματα ανάπτυξης των φυτών και στις 2 χρονικές στιγμές. Όμως στα φυτά αγρίου τύπου παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης της Εσπερίνης κατά τις απογευματινές ώρες, όταν αναπτύχθηκαν στα υποστρώματα 75 mM NaCl και 100 mM NaCl.

Για να δόθει μια εξήγηση σχετικά με τη συμπεριφορά των μεταλλαγμένων φυτών ως προς την έκφραση της εσπερίνης, ελέγξαμε τρία ακόμη νυχτερινά γονίδια που είναι τα εξής: *adh-2*, *grp-7* και *oxt6-1*. Για την έκφραση του γονιδίου *adh-2* παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου δεν διαφέρουν μεταξύ των φυτών αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων φυτών. Αυτό που παρατηρούμε είναι μια μείωση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ του υποστρώματος MS και των υποστρωμάτων 75 mM NaCl και 100 mM NaCl. Όσο αφορά την έκφραση του γονιδίου *grp-7* παρατηρήσαμε ότι το επίπεδο έκφρασης σε όλα τα δείγματα που ελείφθησαν τη χρονική στιγμή 10:00 είναι πολύ χαμηλά. Επιπλέον η έκφραση του γονιδίου παρουσιάζει μια αύξηση στα μεταλλαγμένα φυτά σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου, αλλά μία μείωση της έκφρασης στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε μέση και υψηλή αλατότητα σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα MS. Τέλος για την έκφραση του γονιδίου *oxt6-1* παρατηρήθηκε ότι εμφανίζει μία ομοιομορφία ως προς τα επίπεδα έκφραση του μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών χωρίς να παρουσιάζεται διαφορά στην έκφραση του μεταξύ φυτών αγρίου τύπου και φυτών mutants. Διαφορά στην έκφραση του γονιδίου εμφανίζεται μόνο όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες αλατότητας, που παρατηρείται μια μείωση της έκφρασης στα υποστρώματα 75 mM NaCl και 100 mM NaCl.

Απο τα αποτελέσματα καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι η αλατότητα συνδέεται άμεσα με τον κερκάδιο ρυθμό επιδρώντας στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που ακολουθούν τον κερκάδιο ρυθμό, αφού η έκφραση και των τεσσάρων γονιδίων δε έμεινε ανεπηρέαστη από την αλατότητα. Το γεγονός όμως ότι αποαδενυλάση *AtHesp* επηρεάζει και το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών, που αναπτύσσονται σε συνθήκες αλατότητας προσδίδοντας ένα είδος ανθεκτικότητας στα μεταλλαγμένα φυτά μειωμένης έκφρασης της Εσπερίνης, αποτελεί μια πρόκληση για το μέλλον να διερευνηθεί το πως δημιουργείται αυτή η ανθεκτικότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. C. Delis, et al. **AtHESPERIN: a novel regulator of circadian rhythm with poly(A)- degrading activity in plants.** RNA biology, vol 13(2016), pp 68-82
2. Viswanathan P, Chen J, Chiang YC, Denis CL. **Identification of multiple RNA features that influence CCR4 deadenylation activity.** J Biol. Chem. 2003 278:14949-55
3. Martinez J, Ren YG, Thuresson AC, Hellman U, Astrom J, Vitranen A. **A 54- kDa fragment of the Poly(A) specific ribonuclease is an oligomeric , processive, and cap- interacting Poly(A) specific 3' exonuclease.** J Biol. Chem. 2000, 275: 24222-30
4. Korner CG, Wahle E. **Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)- specific 3' exoribonuclease.** J Biol. Chem. 1997, 272: 10448-56
5. Goldstrohm AC, Wickens M., **Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control,** Nat Rev Mol Cell Biol 2008, 9:337-44
6. Balatsos NA, Maragozidis P, Anastasakis D, Stathopoulos C. **Modulation of poly(A) specific ribonuclease (PARN): current knowledge and perspectives.** Curr Med Chem 2012, 19:4838-49
7. Yan YB. **Delaadenytion: enzymes, regulation and functional implications.** Wiley Interdiscip Rev RNA 2014, 5: 421-43.
8. Vitranen A, Henriksson N, Nilsson P, Nissbeck M. **Poly(A)- specific ribonuclease (PARN): an allosterically regulated, processive and mRNA cap- interacting deadenylase.** Crit Rev Biochem Mol Biol 2013, 48:192-209
9. Wu M, Reuter M, Lilie H, Wahle E, Song H. **Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN.** Embo J 2005, 24: 4082-93
10. He GJ, Yan YB. **Depletion of poly(A)-specific ribonuclease(PARN) triggered by the R3H domain.** Biochemica et biophysica acta 2014, 1844:2077-85
11. Zhang LN, Yan YB . **Depletion of poly(A)-specific ribonuclease(PARN) inhibits proliferation of human gastric cancer cells by blocking cell cycle progression.** Biochim Biophys Acta 2015:1853:522-34
12. Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, Shyu AB. **Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian turnover.** Nat Struct Mol Biol 2005, 12:1054-63
13. Kornmann B, Schaad O, Bujard H, Takahashi JS, Schibler U. **System- driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a contitionally active liver clock.** PLoS Biol 2007
14. Liang W, Li C, Liu F, Jiang H, Li S, Sun J, Wu X., **The Arabidopsis homologs of CCR4- associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses.** Cell Res 2009, 19:307-16
15. Walley JW, Kelley DR, Nestorova G, Hirschberg DL, Dehesh K. **Arabidopsis deadenylases AtCAF1a and AtCAF1b play overlapping and distinct roles in mediating environmental stress responses.** Plant Physiol 2010; 152:866-75; PMID:19955262; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.149005>
16. Walley JW, Kelley DR, Savchenko T, Dehesh K., **Investigating the function of CAF1 deadenylases during plant stress responses.** Plant Signal Behav 2010, 5:802-5
17. Sarowar S, Oh HW, Cho HS, Baek KH, Seong ES, Joung YH, Choi GJ, et al, **Capsicum annuum CCR4-associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response.** Plant J 2007, 51: 792-802
18. Reverdatto SV, Dutko JA, Chekanova JA, Hamilton DA, Belostotsky DA., **mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants.** Rna 2004, 10:1200-14.
19. Doherty Cj, Kay SA., **Circadian Control of Global Gene Expression Patterns.** Annual review of genetics. 2010, 44:419-44

20. Lai AG, Doherty Cj, Mueller- Roeber B, Kay SA, Schippers JHM, Dijkwel PP. **Circadian Clock-Associated 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses.** Proc Natl Acad Sci 2012, 109:17129-34
21. Farre EM , Harmer SL, Harmon FG, Yanovsky MJ, Kay SA. **Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the Arabidopsis circadian clock .**Curr Biol 2005, 15:47-54.
22. Liu T, Carlsson J, Takeuchi T, Newton L., **Direct regulation of abiotic responses by the Arabidopsis circadian clock component PRR7.** Plant J 2013, 76:101-14
23. Nakamichi N, Kusano M, Fukushima A, Kita M, Ito S, Yamashino T, Saito K., Sakakibara H, Mizuno T., **Transcript profiling of an Arabidopsis PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response.** Plant Cell Physiol 2009, 50:447-62
24. D. Bell-Pedersen, et al. **Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms.** Nat. Rev. Genet., 6 (2005), pp. 544–556
25. H. Wijnen, M.W. **Young Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms.** Annu. Rev. Genet., 40 (2006), pp. 409–448
26. A.N. Dodd, et al. **Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage.** Science, 309 (2005), pp. 630–633
27. R.M. Green, et al. **Circadian rhythms confer a higher level of fitness to Arabidopsis plants.** Plant Physiol., 129 (2002), pp. 576–584
28. Y. Ouyang, et al. **Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95 (1998), pp. 8660–8664
29. Hamilton, E.E. and Kay, S.A. (2008) **Snap Shot: circadian clock proteins.** Cell 135, 361–368
30. S.L. Harmer , **The circadian system in higher plants.** Annu. Rev. Plant Biol., 60 (2009), pp. 357–377
31. H. Wijnen, et al. **Control of daily transcript oscillations in Drosophila by light and the circadian clock** PLoS Genet., 2 (2006), pp 39
32. D. Alabadi, et al. **Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock** Science, 293 (2001), pp. 880–883
33. R. Schaffer, et al. **The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering** Cell, 93 (1998), pp. 1219–1229
34. C. Strayer, et al. **Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog** Science, 289 (2000), pp. 768–771
35. Z.Y. Wang, E.M. Tobin **Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression** Cell, 93 (1998), pp. 1207–1217
36. S.L. Harmer, S.A. Kay **Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in Arabidopsis** Plant Cell, 17 (2005), pp. 1926–1940
37. S.X. Lu, et al. **CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL function synergistically in the circadian clock of Arabidopsis** Plant Physiol., 150 (2009), pp. 834–843
38. E. Yakir, et al. **Posttranslational regulation of CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 in the circadian oscillator of Arabidopsis** Plant Physiol., 150 (2009), pp. 844–857
39. S. Makino, et al. **The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of Arabidopsis thaliana: I. Characterization with APRR1-overexpressing plants** Plant Cell Physiol., 43 (2002), pp. 58–69
40. Locke, J.C. et al. (2005) **Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis.** Mol. Syst. Biol. 1, 2005.
41. M.N. Zeilinger, et al. **A novel computational model of the circadian clock in Arabidopsis that incorporates PRR7 and PRR9** Mol. Syst. Biol., 2 (2006), p. 58
42. P. Cubas, et al. **The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development** Plant J., 18 (1999), pp. 215–222
43. J.L. Pruneda-Paz, et al. **A functional genomics approach reveals CHE as a component of the Arabidopsis circadian clock** Science, 323 (2009), pp. 1481–1485

44. Chen C-YA, Shyu A-B. **Protein segregase meddles in remodeling of mRNA-protein complexes.** *Genes Dev* 2013; 27:980-984
45. Pavlopoulou A, Vlachakis D, Balatsos NAA, Kossida S. **A comprehensive phylogenetic analysis of deadenylases.** *Evol Bioinforma Online* 2013; 9:491-7
46. Goldstrohm AC, Wickens M. **Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:337-44; PMID:18334997; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2370>
47. Thore S, Mauxion F, Seraphin B, Suck D. **X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex.** *EMBO Rep* 2003; 4:1150-5; PMID:14618157; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400020>
48. Wahle E, Winkler GS. **RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes.** *Biochim Biophys Acta* 2013; 1829:561-70; PMID:23337855; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.01.003>
49. Chiba Y, Green PJ. **mRNA Degradation Machinery in Plants.** *J Plant Biol* 2009; 52:114-24; <http://dx.doi.org/10.1007/s12374-009-9021-2>
50. Walley JW, Kelley DR, Nestorova G, Hirschberg DL, Dehesh K. **Arabidopsis deadenylases AtCAF1a and AtCAF1b play overlapping and distinct roles in mediating environmental stress responses.** *Plant Physiol* 2010; 152:866-75; PMID:19955262; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.149005>
51. Li Y, Kiledjian M. **Regulation of mRNA decapping.** *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2010; 1:253-65; PMID:21935889; <http://dx.doi.org/10.1002/wrna.15>
52. Steiger M, Carr-Schmid A, Schwartz DC, Kiledjian M, Parker R. **Analysis of recombinant yeast decapping enzyme.** *RNA N Y N* 2003; 9:231-8; <http://dx.doi.org/10.1261/rna.2151403>
53. Dunckley T, Parker R. **The DCP2 protein is required for mRNA decapping in Saccharomyces cerevisiae and contains a functional MutT motif.** *EMBO J* 1999; 18:5411-22; PMID:10508173; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.19.5411>
54. Gavin A-C, Böösche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon A-M, Cruciat C-M, et al. **Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes.** *Nature* 2002; 415:141-7; PMID:11805826; <http://dx.doi.org/10.1038/415141a>
55. She M, Decker CJ, Svergun DI, Round A, Chen N, Muhlrud D, Parker R, Song H. **Structural basis of dcp2 recognition and activation by dcp1.** *Mol Cell* 2008; 29:337-49; PMID:18280239; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.01.00>
56. Ling SHM, Qamra R, Song H. **Structural and functional insights into eukaryotic mRNA decapping.** *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2011; 2:193-208; PMID:21957006; <http://dx.doi.org/10.1002/wrna.44>
57. Collier J, Parker R. **Eukaryotic mRNA decapping.** *Annu Rev Biochem* 2004; 73:861-90; PMID:15189161; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074032>
58. Franks TM, Lykke-Andersen J. **The control of mRNA decapping and P-body formation.** *Mol Cell* 2008; 32:605-15; PMID:19061636; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.001>
59. Xu J, Yang J-Y, Niu Q-W, Chua N-H. **Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development.** *Plant Cell* 2006; 18:3386-98; PMID:17158604; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.106.047605>
60. Xu J, Chua N-H. **Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development.** *Plant Cell* 2009; 21:3270-9; PMID:19855049; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.109.070078>
61. Abbasi N, Park Y-I, Choi S-B. **RNA deadenylation and decay in plants.** *J Plant Biol* 2013; 56:198-207; <http://dx.doi.org/10.1007/s12374-013-0201-8>
62. Kastenmayer JP, Green PJ. **Novel features of the XRN-family in Arabidopsis: evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13985-90; PMID:11106401; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.25.13985>
63. Rymarquis LA, Souret FF, Green PJ. **Evidence that XRN4, an Arabidopsis homolog of exoribonuclease XRN1, preferentially impacts transcripts with certain sequences or in particular functional categories.** *RNA N Y N* 2011; 17:501-11; <http://dx.doi.org/10.1261/rna.2467911>

64. Chekanova JA, Shaw RJ, Wills MA, Belostotsky DA. **Poly(A) tail-dependent exonuclease AtRrp41p from *Arabidopsis thaliana* rescues 5.8 S rRNA processing and mRNA decay defects of the yeast ski6 mutant and is found in an exosome-sized complex in plant and yeast cells.** J Biol Chem 2000; 275:33158-66; PMID:10930416; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M005493200>
65. Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG: **Adaptations to environmental stresses.** Plant Cell 7: 1099–1111 (1995)
66. DuPont FM: **Salt-induced changes in ion transport: regulation of primary pumps and secondary transporters.** In: Cooke DT, Clarkson DT (eds) Transport and Receptor Proteins of Plant Membranes, pp. 91–100. Plenum Press, New York (1992)
67. Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM: **Ion homeostasis in NaCl stress environments.** Plant Physiol 109: 735–742 (1995)
68. Binzel ML, Hess FD, Bressan RA, Hasegawa PM: **Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells.** Plant Physiol 86: 607–614 (1988).
69. Garbarino J, DuPont FM: **Rapid induction of Na⁺ /H⁺ exchange activity in barley root tonoplast.** Plant Physiol 89: 1–4 (1989).
70. Delauney AJ, Verma DPS: **Proline biosynthesis and osmoregulation in plants.** Plant J 4: 215–223 (1993).
71. Hanson AD, Rathinasabapathi B, Rivoal J, Burnet M, Dillon MO, Gage DA: **Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance.** Proc Natl Acad Sci USA 91: 306–310 (1994).
72. Gossett DR, Banks SW, Millhollon EP, Lucas MC: **Antioxidant response to NaCl stress in a control and an NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine sulfoximine, and exogenous glutathione.** Plant Physiol 112: 803–809 (1996).
73. Singha S, Choudhuri MA: **Effect of salinity (NaCl) stress on H₂O₂ metabolism in *Vigna* and *Oryza* seedlings.** Biochem Physiol Pflanz 186: 69–74 (1990)
74. Berkelman T, Houtchens KA, DuPont FM: **Two cDNA clones encoding isoforms of the B subunit of the vacuolar ATPase from barley roots.** Plant Physiol 104: 287–288 (1994).
75. Müller-Rober B, Ellenberg J, Provart N, Willmitzer L, Busch H, Becker D, Dietrich P, Hoth S, Heidrich R: **Cloning and electrophysiological analysis of KST, an inward rectifying K⁺ channel expressed in potato guard cells.** EMBO J 14: 2409–2416 (1995).
76. Schachtman DP, Schroeder JI: **Structure and transport mechanism of a high affinity potassium uptake transporter from higher plants.** Nature 370: 655–658 (1994).
77. Delauney AJ, Verma DPS: **Proline biosynthesis and osmoregulation in plants.** Plant J 4: 215–223 (1993).
78. Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H: **A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast.** Nature 369: 242–245 (1994).
79. Morgan BA, Bouquin N, Johnston LH: **Two-component signaltransduction systems in budding yeast MAP a different pathway.** Trends Cell Biol 5: 453–457 (1995).
80. Maeda T, Takekawa M, Saito H: **Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor.** Science 269: 554–558 (1995).
81. Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H: **Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD-SSK1 ‘two-component osmosensor’.** Cell 86: 865–875 (1996).
82. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ: **A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells.** Science 265: 808–811 (1994).
83. Nakamura T, Liu Y, Hirata D, Namba H, Harada S-I, Hirokawa T, Miyakawa T: **Protein phosphatase type 2B (calcineurin)- mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions.** EMBO J 12: 4063–4071 (1993).

84. Wieland J, Nitsche AM, Strayle J, Steiner H, Rudolph HK: **The PMR2 gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane.** EMBO J 14: 3870–3882 (1995).
85. Skriver K, Mundy J: **Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress.** Plant Cell 2: 503–512 (1990).
86. Walton DC: **Biochemistry and physiology of abscisic acid.** Annu Rev Plant Physiol 31: 453–489 (1980).
87. Leung J, Bouvier-Durand M, Morris P-C, Guerrier D, Chedford F, Giraudat J: **Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase.** Science 264: 1448–1452 (1994).
88. Leung J, Merlot S, Giraudat J: **The Arabidopsis abscisic acid insensitive 2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction.** Plant Cell 9: 759–771 (1997).
89. Hwang I, Goodman HM: **An Arabidopsis thaliana root-specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl.** Plant J 8: 37–43 (1995).
90. Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, **Shinozaki K: A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in Arabidopsis thaliana.** Proc Natl Acad Sci USA 93: 765–769 (1996).
91. Popping B, Gibbison T, Watson MD: **The Pisum sativum MAP kinase homologue (PsMAPK) rescues the Saccharomyces cerevisiae hog1 deletion mutant under conditions of high osmotic stress.** Plant Mol Biol 31, 355–363 (1996).
92. Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W, Barker PJ, Huskisson NS, Hirt H: **Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought.** Proc Natl Acad Sci USA 93: 11274–11279 (1996).
93. Hyun Jung Jang, Kyeong Tae Pih, Shine Gene Kang, Jeong Hwa Lim, Jing Bo Jin, Hai Lan Piao and Inhwan Hwang, **Molecular cloning of a novel Ca²⁺ -binding protein that is induced by NaCl stress,** Plant Molecular Biology 37: 839–847, 1998.