

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
& ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Αριθμ. Πρωτοκ. 50

Ημερομηνία 7-7-2004

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΠΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΦΑΣΟΛΙΟΥ ΜΕ ΔΕΙΚΤΕΣ RAPD ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΡΥΛΗ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΕΙ ΤΟΝ ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΙΣΜΟ”



ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΓΙΑΚΟΥΝΤΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΜΑΥΡΟΜΑΤΗΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΙΟΥΝΙΟΣ, 2004



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 3929/1
Ημερ. Εισ.: 28-09-2004
Δωρεά: Συγγραφέας
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΦΠΑΠ
2004
ΓΙΑ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

***“ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΠΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΦΑΣΟΛΙΟΥ ΜΕ
ΔΕΙΚΤΕΣ RAPD ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΠΡΩΤΕΙΝΗ Ρ_vLΗΥ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΕΙ ΤΟΝ ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΙΣΜΟ”***

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΜΑΥΡΟΜΑΤΗΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ : ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΜΑΥΡΟΜΑΤΗΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ.

ΧΡΗΣΤΟΣ ΓΟΥΛΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ.

ΑΒΡΑΑΜ ΧΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ.

ΙΟΥΝΙΟΣ, 2004

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής ήταν το αποτέλεσμα της συνεργασίας ανάμεσα στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας και στο Ινστιτούτο Βιολογίας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών “Δημόκριτος”. Στα πλαίσια αυτής της συνεργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στους επιβλέποντες κ. Αθανάσιο Μαυρομάτη, Λέκτορα Γενετικής φυτών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και κα. Αναστασία Προμπονά, Δρ. Μοριακής Βιολογίας Φυτών και Διευθύντρια του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας φυτών του Ινστιτούτου Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”.

Οι προαναφερθέντες, πέρα από την καθοδήγηση που μου πρόσφεραν, επένδυσαν παράλληλα πολλές ώρες σε συζητήσεις αναφορικά με θέματα που αποσχολούν την σύγχρονη έρευνα στα πεδία της Μοριακής Βιολογίας και της Γενετικής φυτών. Πέρα από τις εργαστηριακές και θεωρητικές γνώσεις που μου μετέδωσαν, κατάφεραν να μου προσδώσουν και την κατάλληλη ψυχολογία που απαιτεί ο εργαστηριακός πάγκος. Δεδομένων των ιδιαιτεροτήτων αλλά και των απαιτήσεων που παρουσίασε το παρόν εκπόνημα, η επιτυχής ολοκλήρωση του θα ήταν αδύνατη χωρίς την καθοδήγηση, στήριξη αλλά και εμπιστοσύνη που μου πρόσφεραν απλόχερα και οι δύο. Επιπροσθέτως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα κ. Αβραάμ Χα, Επίκουρο καθηγητή Λαχανοκομίας για τις συμβουλές του κατά την συγγραφή του εκπονήματος.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Χρήστο Γούλα, Καθηγητή Γενετικής Βελτίωσης φυτών και Διευθυντή του εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης φυτών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη καθοδήγηση και συμβουλές που μου παρείχε σε όλα τα στάδια εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Ο ιδανικός συνδυασμός πολλών ετών εμπειρίας και γνώσεων σε θέματα Γενετικής με την ταπεινότητα του χαρακτήρα του, δεν μπορεί παρά να αποτελέσει φωτεινό παράδειγμα προς μίμηση.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον κ. Κώστα Καλλιμόπουλο για την συνεργασία που υπήρξε αναφορικά με την αξιολόγηση των έντεκα πληθυσμών που ανήκουν στο γένος *Phaseolus*. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Αθανάσιο Καλδή, ο οποίος απομόνωσε και χαρακτήρισε τον PnLHY παράγοντα και Δρ. Αθανάσιο Κορκόβελο για τη πολύτιμη καθοδήγηση αλλά και εργαστηριακή γνώση που μου παρείχαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Τριαντάφυλλο Γκικόπουλο για τη πρόοδο του εργαστηριακού μέρους που παρείχε η κλωνοποίηση του C_1 ενθέματος. Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στη Γεωπόνο, κυρία Μίνα Πανάγου η οποία μου πρόσφερε απλόχερα τη στήριξη και την καθοδήγηση της τα τελευταία δύο χρόνια.

Παράλληλα με την καθοδήγηση, τις γνώσεις αλλά και τη στήριξη που μου παρείχαν οι προαναφερθέντες, στην επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της διατριβής συνέβαλαν καθοριστικά οι γονείς μου. Οι συμβουλές τους, καθώς και η ηθική και συναισθηματική στήριξη που μου παρείχαν από τη πρώτη στιγμή, αποτέλεσαν πολύτιμο όπλο και γι’ αυτό δεν μπορώ παρά να τους αφιερώσω το παρόν εκπόνημα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σήμερα θεωρούμε ότι η ζωή πάνω στον πλανήτη μας, πρωτοεμφανίστηκε πριν από 3 με 4 δισεκατομμύρια χρόνια, σε μια γη που τότε ήταν στη νεαρή ηλικία του 1 με 1,5 δισεκατομμυρίου ετών (*Molecular Biology of the Gene, Fourth Edition*). Με τη πάροδο των χιλιετιών, οι ζωντανοί οργανισμοί που εμφανίστηκαν στον πλανήτη, από ένα αρχικά απλό επίπεδο οργάνωσης εξελίχθηκαν σε ολοένα και πολυπλοκότερα σχήματα.

Βασικό κλειδί για να μπορέσει η ζωή να εξελιχθεί, είναι η προσαρμογή της σε ορισμένες βασικές παραμέτρους του πλανήτη. Έτσι τη βάση πάνω στην οποία οι οργανισμοί δημιούργησαν τη πολυπλοκότητα που παρατηρείται σήμερα, αποτέλεσαν το νερό, το οξυγόνο, τα ανόργανα στοιχεία και η ηλιακή ακτινοβολία, τα βασικά δηλαδή στοιχεία που απαρτίζουν τον κόσμο μας. Η επιτυχία ενός οργανισμού στην επιβίωση είναι άρρικτα συνδεδεμένη με την ικανότητα του να προσαρμόζεται και να εκμεταλλεύεται όσο το δυνατόν καλύτερα τις παραπάνω πηγές του εκάστοτε ενδιαιτήματος. Σε αντίθετη περίπτωση ο οργανισμός θα εξαφανιστεί και άλλοι ανταγωνιστικότεροι θα πάρουν την θέση του.

Εξελικτικά οι ζωικοί οργανισμοί απέκτησαν την ικανότητα να κινούνται. Έτσι τους δώθηκε η δυνατότητα να επιλέγουν το περιβάλλον στο οποίο θα εγκατασταθούν με βασικό κάθε φορά κριτήριο την επιβίωση τους. Επιπροσθέτως ως ετερότροφοι οι ζωικοί οργανισμοί είναι ανεξάρτητοι από τον ήλιο ως προς την ικανοποίηση των μεταβολικών αναγκών τους. Για την επιβίωση των φυτών αντιθέτως, η ηλιακή ακτινοβολία είναι απαραίτητη προκειμένου να ανταπεξέλθουν στις μεταβολικές απαιτήσεις του μεταβολισμού τους. Δέσμοι λοιπόν της ηλιακής ακτινοβολίας για να ικανοποιούν τις ενεργειακές τους απαιτήσεις αλλά και χωρίς την ικανότητα κίνησης, οι φυτικοί οργανισμοί ανέπτυξαν ισχυρούς μηχανισμούς αλληλεπίδρασης με το περιβάλλοντα χώρο που επέτρεψαν τη προσαρμογή.

Ενώ λοιπόν η μορφολογία των ζωικών οργανισμών, προκαθορίζεται ήδη στη διάρκεια της εμβρυακής ανάπτυξης και παραμένει αναλλοίωτη από το περιβάλλον κατά την μετέπειτα εξέλιξη του οργανισμού, ο γενότυπος των φυτών δίνει τη δυνατότητα της εμφάνισης εντελώς διαφορετικού φαινοτύπου ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Τα φυτά λοιπόν απέκτησαν μια μορφολογική και φυσιολογική πλαστικότητα για να μπορούν να ανταπεξέλθουν στις αλλαγές ενός ευμετάβλητου περιβάλλοντος (*Christine A. Beveridge, 2003*). Το μέρος από τη συνολική αυτή πλαστικότητα που οφείλεται στην επίδραση του φωτός, καλείται φωτομορφογένεση.

Για να γίνουν εφικτά τα παραπάνω, οι οργανισμοί έπρεπε να κάνουν ένα ακόμα βήμα. Τόσο λοιπόν τα ζώα όσο και τα φυτά, δημιούργησαν ένα εσωτερικό σύστημα παρακολούθησης και καταγραφής του χρόνου, ένα μηχανισμό που θα τους επέτρεπε να συντονίζουν την δραστηριότητα τους με τη περιστροφή της γης γύρω από τον άξονα της, αποτέλεσμα της οποίας είναι η εναλλαγή μέρας-νύχτας και η απουσία ή όχι ηλιακής ακτινοβολίας. Το φαινόμενο λοιπόν των κίρκαδικών ρυθμών αποτέλεσε ένα εσωτερικό σύστημα καταγραφής του χρόνου από τους οργανισμούς, που στηρίχθηκε στην ύπαρξη ή μη ηλιακού φωτός. Ειδικότερα στα φυτά φαίνεται ότι η καταγραφή του χρόνου αρχίζει πλέον να παίζει ρόλο συντονιστή των φυσιολογικών λειτουργιών τους ή με άλλα λόγια η κίρκαδικότητα αποτελεί το μέσο συντονισμού της φωτομορφογένεσης με τις κυκλικές εναλλαγές μέρας-νύχτας.

Τα φυτά λοιπόν στην αδυναμία κίνησης, ανέπτυξαν πολύπλοκους μηχανισμούς για να παρακολουθούν τις αλλαγές στο περιβάλλον τους. Και όχι μόνο αυτό· μετέτρεψαν την άμεση εξάρτησή τους από το φως σε πλεονέκτημα, καθώς όρισαν την ηλιακή ακτινοβολία ως έναν από τους κύριους ρυθμιστές της φυσιολογίας τους.

Όσα αναφέρθηκαν παραπάνω δικαιολογούν και το ενδιαφέρον που παρουσιάζει η μελέτη του βιολογικού ρολογιού στα φυτά. Εκτεταμένες έρευνες στο μη καλλιεργούμενο είδος *Arabidopsis thaliana* έχουν αποκαλύψει πολλές λεπτομέρειες σχετικά με την μοριακή φύση της κίρκαδικότητας των φυτών· ένα φαινόμενο στο οποίο πρωταγωνιστικό ρόλο φαίνεται ότι έχει η πρωτεΐνη LHY (*Late Elongated Hypocotyl*). Η επέκταση της έρευνας του βιολογικού ρολογιού στο φασόλι, αποκάλυψε ότι ο παράγοντας P_vLHY (*Phaseolus vulgaris Late Elongated Hypocotyl*) κατέχει εξίσου σημαντικό ρόλο με τον ορθόλογο του LHY, στο είδος *Arabidopsis thaliana*.

Η μελέτη της P_vLHY πρωτεΐνης αναμένεται με ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς θα φωτίσει σημαντικές πτυχές από τη δράση του συγκεκριμένου παράγοντα στην εύρυθμη λειτουργία του βιολογικού ρολογιού και μάλιστα σε ένα καλλιεργούμενο είδος το οποίο διαφέρει από το *Arabidopsis thaliana* αναφορικά με την αντίδραση στη φωτοπερίοδο. Η δημιουργία αντισωμάτων με εξειδίκευση έναντι στη πρωτεΐνη P_vLHY, που αποτέλεσε και τον πρώτο στόχο αυτής της διατριβής, αναμένεται να αποκαλύψει πολλές λεπτομέρειες τόσο αναφορικά με τη δράση και ρύθμιση του ίδιου του παράγοντα όσο και σχετικά με αλληλεπιδράσεις αυτού με άλλα στοιχεία του ρολογιού.

Πέρα από τη βασική έρευνα και μελέτη της P_vLHY πρωτεΐνης επιχειρήθηκε να προετοιμαστεί το έδαφος και για μια πιθανή μελλοντική πρακτική εφαρμογή του βιολογικού ρολογιού σε συνθήκες χωραφιού. Έτσι ο σκοπός του δεύτερου μέρους αυτής της διατριβής ήταν η μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων έντεκα φυσικών πληθυσμών του γένους *Phaseolus* (δέκα εκ των οποίων ανήκουν στο κοινό φασόλι του είδους *Phaseolus vulgaris* και ένας εκ των οποίων ανήκει στο φασόλι τύπου γίγαντες του είδους *Phaseolus coccineus*) οι οποίοι προέρχονται από διαφορετικά γεωγραφικά διαμερίσματα της χώρας και συνεπώς και από διαφορετικές συνθήκες φωτοπεριόδου.

Μελλοντικά με τη βοήθεια του αντισώματος έναντι της P_vLHY πρωτεΐνης καθώς και με μοριακούς ανιχνευτές έναντι του P_vLHY μηνύματος θα καταστούν δυνατά τόσο μια φυλογενετική ανάλυση διαφόρων γενοτύπων από ποικίλα γεωγραφικά πλάτη, όσο και η ανίχνευση γενοτύπων που έχουν διαφορετικά κίρκαδικά πρότυπα έκφρασης αναφορικά με τον P_vLHY παράγοντα. Η επιλογή κάποιων από αυτούς με βάση και την αξιολόγηση της αγρονομικής τους συμπεριφοράς σε συνθήκες αγρού, θα οδηγήσει στην δημιουργία νέων ποικιλιών αυξημένης ευρωστίας.

Αθήνα, 2004.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή.....	2
---------------	---

Κεφάλαιο I : Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας

1.1	Ιστορική αναδρομή, ορισμός και έννοια των Κιρκαδικών ρυθμών.....	9
1.2	Η μεγάλη επίδραση του φωτός στην επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης, ώθησε στην δημιουργία του βιολογικού ρολογιού στα φυτά.....	11
1.3	Το βιολογικό ρολόι των φυτών.....	12
1.4	Τα μονοπάτια σηματοδότησης του κεντρικού ταλαντωτή. Ο ρόλος των φωτουπόδοχέων.....	14
1.4.1	Φυτοχρώματα.....	14
1.4.1.1	Δομή της αποπρωτεΐνης των φυτοχρωμάτων.....	16
1.4.1.2	Ενδοκυτταρικός εντοπισμός του φυτοχρώματος.....	18
1.4.2	Κρυπτοχρώματα.....	21
1.4.2.1	Η οικογένεια των Κρυπτοχρωμάτων / Φωτολυασών.....	21
1.4.2.2	Η δομή των κρυπτοχρωμάτων στα φυτά.....	21
1.4.2.3	Η αποικοδόμηση της πρωτεΐνης των Κρυπτοχρωμάτων.....	23
1.4.3	Η συνδυασμένη σηματοδότηση του κεντρικού ταλαντωτή.....	23
1.5	Ο κεντρικός ταλαντωτής του βιολογικού ρολογιού των φυτών.....	26
1.5.1.1	Ο μεταγραφικός παράγοντας TOC1.....	26
1.5.1.2	Δομή και χαρακτηρισμός του TOC1.....	27
1.5.1.3	Η οικογένεια του TOC1 : Το APRRI / TOC1 κοϊντέτο.....	30
1.5.1.4	Ο ZTL (ZEITLUPE) παράγοντας και η αποικοδόμηση της APRRI/TOC1 πρωτεΐνης.....	33
1.5.2	Οι LHY/CCA1 μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν τους μοριακούς λεπτοδείκτες του κιρκαδικού ρολογιού στα φυτά.....	37

1.5.2.1 Ανακάλυψη των CCA1 και LHY μεταγραφικών παραγόντων.....	38
1.5.2.2 Η Myb οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων.....	39
1.5.2.3 Το μεταγραφικό προφίλ των LHY/CCA1 και η επίδραση των μεταλλάξεων τους.....	40
1.5.2.4 Η αμοιβαία ρύθμιση μεταξύ των LHY/CCA1 και TOC1 επιτρέπει την καταγραφή του χρόνου στα φυτά.....	44
1.6 Το μοντέλο ενός λειτουργικού κεντρικού ταλαντωτή στα φυτά.....	48
1.7 Ο ELF3 παράγοντας και ο ρόλος του στον συγχρονισμό της φάσης των κερκαδικών ταλαντώσεων με τα ερεθίσματα του περιβάλλοντος.....	50
1.7.1 Η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός του ELF3 παράγοντα.....	51
1.7.2 Το μεταγραφικό προφίλ του ELF3 παράγοντα και η επίδραση των διαταραχών της δράσης του στον κερκαδικό κύκλο.....	52
1.8 Τα μονοπάτια εξόδου από τον κεντρικό ταλαντωτή και η ορχήστρα της μεταγραφής.....	56
1.9 Γενικά περί αντισωμάτων.....	60
1.10 Γενικά περί πολυμορφισμών και μοριακών δεικτών.....	63

Κεφάλαιο II : Εισαγωγή στο πειραματικό μέρος

2. Σύννοψη.....	65
2.1 Γενικές πληροφορίες.....	65
2.2 Οι οργανοληπτικές ιδιότητες του είδους.....	66
2.3 Η μελέτη του βιολογικού ρολογιού στο φασόλι.....	67

Κεφάλαιο III : Υλικά και μέθοδοι

A. Προετοιμασία με σκοπό την παρασκευή αντισώματος έναντι του PνLHY παράγοντα

3.1 Συνοπτική περιγραφή της διαδικασίας.....	71
Στάδιο I : Έλεγχος της αλληλουχίας της PνLHY πρωτεΐνης για υδρόφιλες περιοχές.....	72

Στάδιο II :Υπογενωμική κλωνοποίηση (Sub-cloning) των υδρόφιλων περιοχών στον προκαρυωτικό φορέα υπερέκφρασης pGEX.....	72
Στάδιο II α : Χαρακτηρισμός του πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης pGEX.....	73
Στάδιο II β : Απομόνωση των C ₁ , C ₂ και C ₁₋₂ περιοχών με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	74
Στάδιο II γ : Απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια κυττάρων E. coli.....	76
Στάδιο II δ : Πέψη του ενθεματικού DNA και των πλασμιδιακών φορέων με τις αντίστοιχες περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	77
Στάδιο II ε : Σύντηξη των ενθεματικών DNA στους πλασμιδιακούς φορείς παρουσία του ενζύμου της λιγάσης.....	80
Στάδιο II στ : Μετασχηματισμός του προκαρυωτικού φορέα υπερέκφρασης με το συντηγμένο χιμαιρικό μόριο.....	81
Στάδιο III : Εύρεση της συνθήκης υπερέκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης.....	83
Στάδιο IV : Υπερέκφραση και παραγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών σε μεγαλύτερη κλίμακα	87
Στάδιο V : Απομόνωση των χιμαιρικών πρωτεϊνών από τον φορέα και παραλαβή των αντιγόνων σε καθαρή μορφή από αυτές.....	89

B. Μοριακή γενετική ανάλυση με δείκτες τύπου RAPD.

3.2 Περιγραφή του γενετικού υλικού.....	91
3.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA.....	91
3.2.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός DNA.....	91
3.2.3 Ανάλυση με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης κατά RAPD.....	92
3.2.4 Ανάλυση των αποτελεσμάτων και κατασκευή των δενδρογράμμων φυλογενετικών σχέσεων.....	93

Κεφάλαιο IV : Αποτελέσματα

4.1.1 Περιγραφή της PnLHY πρωτεΐνης και ομοιότητα με τις LHY/CCA1 πρωτεΐνες.....	97
4.1.2 Έλεγχος υδροπάθειας της πρωτεΐνης PnLHY.....	98

4.1.3	Αλληλούχιση των κλωνοποιημένων C_1 , C_2 και C_{1-2} ενθεμάτων.....	99
4.1.4	Η υπερέκφραση των τριών χιμαιρικών πρωτεϊνών.....	104
4.1.5	Απομόνωση της χιμαιρικής $C1$ χιμαιρικής πρωτεΐνης από την ολική πρωτεΐνη της καλλιέργειας και αποκοπή του GST.....	109
4.1.6	Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των έντεκα πληθυσμών του γένους <i>Phaseolus</i>	113
4.2.2	Η μοριακή ανάλυση του γενόματος έντεκα τοπικών πληθυσμών του γένους <i>Phaseolus</i> κατά το RAPD πρότυπο.....	115
4.3.1	Ομαδοποίηση των έντεκα πληθυσμών με βάση την αγρονομική συμπεριφορά τους.....	118

Κεφάλαιο V : Συζήτηση και συμπεράσματα

5.1	Συμπεράσματα των αποτελεσμάτων αναφορικά με την παραγωγή αντισώματος έναντι του PvLHY παράγοντα.....	121
5.2	Συμπεράσματα αναφορικά με την φυλογενετική ανάλυση των έντεκα πληθυσμών του γένους <i>Phaseolus</i>	123

Κεφάλαιο VI : Προοπτικές

6.1	Προοπτικές που ανοίγει η παρασκευή αντισώματος έναντι του PvLHY παράγοντα.....	127
6.2	Η εφαρμογή της φυλογενετικής ανάλυσης σε μελλοντικά βελτιωτικά σχήματα σε είδη του γένους <i>Phaseolus</i>	128
6.3	Μελλοντικές προοπτικές που προκύπτουν μετά από σύνδεση των αποτελεσμάτων.....	128
	Περίληψη της εργασίας.....	132

Κεφάλαιο VII : Παράρτημα

7.1.1	Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωμικού DNA (CTAB method)	135
7.1.2	Πρωτόκολλο απομόνωσης σε μικρή κλίμακα, πλασμιδιακού DNA (Mini Prep)	136

7.1.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης σε μεγάλη κλίμακα πλασμιδιακού DNA (<i>Large Prep</i>)	136
7.2.1 Πρωτόκολλο επαγωγής της υπερέκφρασης κλωνοποιημένων ενθεμάτων στο <i>pGEX</i> πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης	137
7.2.2 Πρωτόκολλο λύσης της βακτηριακής καλλιέργειας με την συσκευή <i>French Press</i>	138
7.2.3 Πρωτόκολλο δέσμευσης των χιμαιρικών <i>GST</i> πρωτεϊνών σε σφαιρίδια <i>4B</i> γλουταθειόνης	139
7.2.4 Πρωτόκολλο δέσμευσης του <i>GST</i> σε σφαιρίδια σεφαρόζης	139
7.2.5 Πρωτόκολλο αποκοπής του <i>GST</i> με το Παράγοντα <i>Xa</i>	140
7.3.1 Πρωτόκολλο ηλεκτροφορητικής ανάλυσης πρωτεϊνικών δειγμάτων κατά <i>PAGE</i>	140
7.3.2 Πρωτόκολλο μεταφοράς σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης και ανοσοαποτύπωση κατά <i>Western</i>	142
7.3.3 Πρωτόκολλο μετασχηματισμού βακτηριακού στελέχους <i>BL-21</i> της <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA	143
Σύνοψη των κυριότερων αντιδραστηρίων υπό μορφή πινάκων	144
Συνομογραφίες εντός κειμένου	147

Κεφάλαιο VIII : Βιβλιογραφία

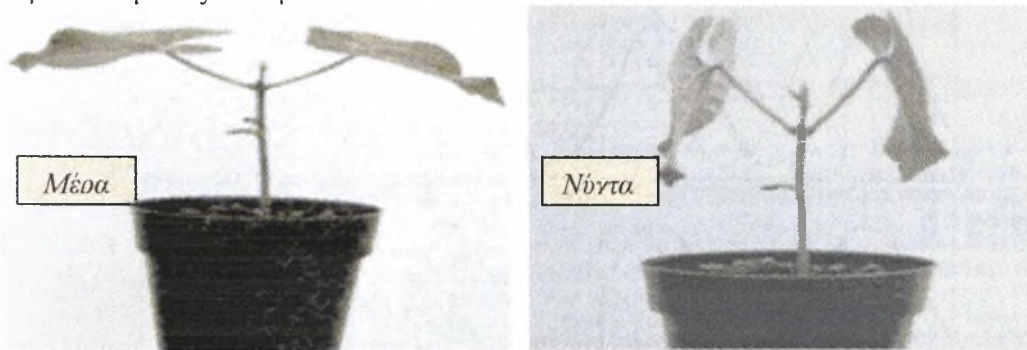
I. Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας

1.1 Ιστορική αναδρομή, ορισμός και έννοια των Κιρκαδικών ρυθμών.

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

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

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



Εικόνα 1.1 : Κιρκαδική κίνηση των φύλλων στο είδος *Phaseolus vulgaris*. Οι κινήσεις αυτές οφείλονται σε μια περιοδική αλλαγή των ιδιοτήτων των μεμβρανών μέσω της μετακίνησης ιόντων K^+ και Ca^{+2} με αποτέλεσμα τις αλλαγές της σπαργής των κυττάρων του μίσχου (Satter, R. L., et al., 1981 και Scott, B. I. H., et al., 1975)
(ΠΗΓΗ : "Introduction to Plant Physiology", William G. Hopkins, Second Edition)

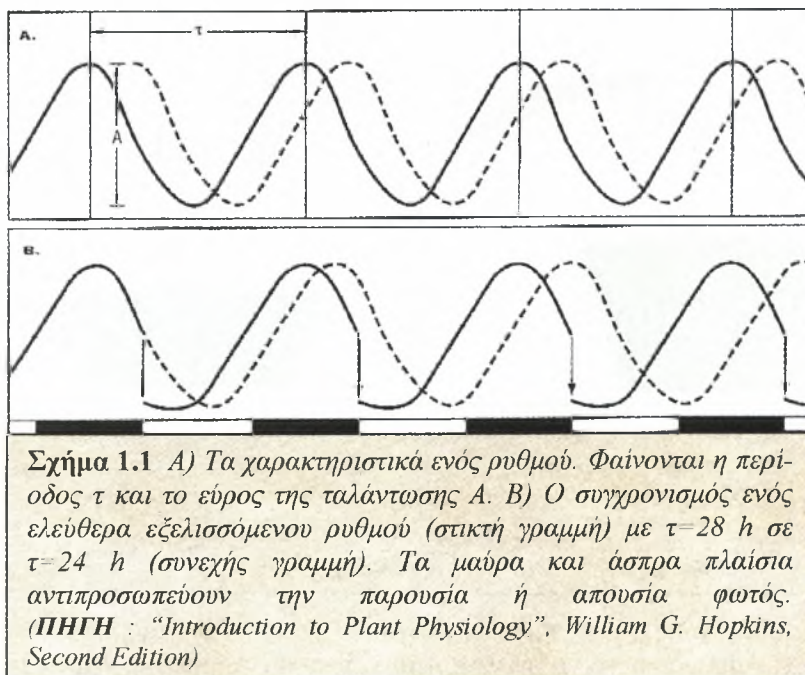
Η ιδιότητα των φυτών να κινούν ρυθμικά τα φύλλα τους, προσέλκυσε το ενδιαφέρον και του πατέρα της Εξέλιξης, του Κάρολου Δαρβίνου. Μετά τις έρευνες του σχετικά με την εξελικτική πορεία των ειδών και τη συγγραφή της "Εξέλιξης των Ειδών (*The Origin of Species*)", ο Δαρβίνος αρχίζει να παρατηρεί τις κινήσεις των φύλλων των φυτών, τις οποίες προσπαθεί να συνδέσει με την εξέλιξη τους. Αποτέλεσμα των πολλαπλών πειραμάτων του, είναι η υπόθεση ότι τα φυτά την νύχτα κλείνουν τα φύλλα τους, προσπαθώντας να ελαττώσουν στο ελάχιστο την εκτεθειμένη στις νυχτερινές θερμοκρασίες επιφάνεια, ενώ την ημέρα τα ανοίγουν για να εκμεταλλευτούν την ηλιακή ακτινοβολία (Εικ. 1.1). Τα συμπεράσματα του περικλείονται στο βιβλίο του "Η Δύναμη της Κίνησης στα Φυτά" (τ.π *The Power of Movement in Plants*).

Στην αυγή του προηγούμενου αιώνα οι Karl Von Frisch και Ingeborg Beling διεξάγουν πειράματα με μέλισσες μετά από τη παρατήρηση ότι το έντομο αυτό επισκέπτεται τα άνθη συγκεκριμένες μόνο ώρες της ημέρας. Ακόμα και στις

περιπτώσεις όπου το νέκταρ αφαιρούνταν με τεχνητό τρόπο από τα άνθη, οι μέλισσες συνέχιζαν να τα επισκέπτονται δρώντας κάτω από τον έλεγχο ενός εσωτερικού ρολογιού, συντονισμένου εξελικτικά με την περιοδική έκκριση του νέκταρος.

Ωστόσο μόλις στα μέσα του 20^{ου} αιώνα γίνεται η πρώτη αναφορά, για την ύπαρξη του βιολογικού ρολογιού στους οργανισμούς, από τους Gustav Kramer και Klaus Hoffmann. Ο τελευταίος ήταν και αυτός που κατέλειξε στο συμπέρασμα ότι οι βιολογικοί ρυθμοί είναι ενδογενείς και ότι το βιολογικό ρολόι συγχρονίζεται από το περιβάλλον. Την ίδια χρονική περίοδο ένας άλλος επιστήμονας, ο Colin Pittendrigh μελετά την επίδραση της θερμοκρασίας στους ρυθμούς στο είδος *Drosophila pseudoobscura*, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η θερμοκρασία (Temperature Compensation) παίζει δευτερεύοντα ρόλο στην εξισορρόπηση των ρυθμών καθώς η μεταβολή της, επηρεάζει ελάχιστα την περίοδο του παρατηρούμενου ρυθμού.

Οι παραπάνω επιστήμονες υπήρξαν οι θεμελιωτές της έρευνας πάνω στα βιολογικά ρολόγια των οργανισμών· μιας έρευνας που θα συνεχιστεί μέχρι το τέλος του περασμένου αιώνα και τις αρχές του νέου. Μόλις την τελευταία δεκαετία όμως, θα αρχίσει να αποκαλύπτεται η μοριακή φύση της κίρκαδικότητας. Ωθηση σε αυτό, θα δώσουν έρευνες που έχουν προηγηθεί την δεκαετία του 1980 κυρίως και αφορούν την σηματοδότηση (signalling) σε μοριακό επίπεδο πολλών λειτουργιών του φυτικού κυττάρου από το φώς.



Ένας ρυθμός αποτελεί την περιγραφή μιας ταλάντωσης σε σχέση με το χρόνο. Η ταλάντωση χαρακτηρίζεται από μέγιστα και ελάχιστα σημεία που εναλλάσσονται καθώς το φαινόμενο εξελίσσεται χρονικά (Σχ. 1.1). Από όλους τους ρυθμούς που παρατηρούνται στη φύση (ετήσιοι-circannual, με περίοδο μικρότερη της μέρας-ultradian, με περίοδο μεγαλύτερη της μέρας-infradian), οι κίρκαδικοί είναι οι μόνοι που η περίοδος τους, αντιστοιχεί σε μια πλήρη περιστροφή της γης γύρω από τον άξονα της. Χαρακτηριστικό λοιπόν των κίρκαδικών ρυθμών, όπως φανερώνει και το όνομα τους (circa-diem, περίπου μια μέρα), είναι το ότι η περίοδος τους είναι παραπλήσια των 24 ωρών.

Οι κερκαδικοί ρυθμοί χαρακτηρίζονται από ένα σύνολο ιδιοτήτων, που τους ξεχωρίζουν ακόμα περισσότερο από τους υπόλοιπους. Έτσι πέρα από την 24ωρη περίοδο ένας κερκαδικός ρυθμός εμφανίζει τα εξής χαρακτηριστικά :

- Ενδογενή διατήρηση κάτω από σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες.
- Περίοδο ανεξάρτητη από τις θερμοκρασιακές εναλλαγές.
Η θερμοκρασία δρα συνεργατικά με την ηλιακή ακτινοβολία στον συντονισμό του ρολογιού.
- Ο συγχρονισμός του ρολογιού (ή αλλιώς αλλαγή φάσης της ταλάντωσης) γίνεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (κύρια από το φώς και δευτερευόντως από την θερμοκρασία)
- Ανεξάρτητα με τον οργανισμό, οι κερκαδικοί ρυθμοί εμφανίζονται σε επίπεδο κυττάρου. Ανάλογα όμως με τον οργανισμό, τα κύτταρα διαφορετικών ιστών μπορεί να εκτελούν διαφορετικές ταλαντώσεις.
- Η ύπαρξη ενός συστήματος καταγραφής του χρόνου δίνει την δυνατότητα στις διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες να συντονίζονται με βάση τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, τόσο σε επίπεδο οργανισμού όσο και σε επίπεδο πληθυσμού (π.χ άνθιση, επικονίαση κλπ).

1.2 Η μεγάλη επίδραση του φωτός στην επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης, ώθησε στην δημιουργία του βιολογικού ρολογιού στα φυτά.

Όμως γιατί η εξέλιξη ώθησε στην δημιουργία ενός τόσο πολύπλοκου, όπως θα φανεί παρακάτω, συστήματος καταγραφής του χρόνου στα φυτά ; Για να δοθεί η απάντηση, θα πρέπει πρώτα να γίνει κατανοητός ο ρόλος του ηλιακού φωτός σαν σηματοδότη του φυτικού κυττάρου.

Είναι γνωστή η επίδραση του φωτός στον μεταβολισμό των φυτών. Η ενέργεια των φωτονίων δεσμεύεται από την χλωροφύλλη και διοχετεύεται κατάλληλα έτσι ώστε να μετατραπεί σε δεσμούς υψηλής ενέργειας στο μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), ενώ παράλληλα με αναγωγή δημιουργείται και το NADPH. Έτσι το κύτταρο αποθηκεύει ενέργεια και αποκτά τη δυνατότητα της ελεγχόμενης απελευθέρωσης της, προς όφελος του μεταβολισμού.

Ωστόσο η επίδραση του φωτός στο φυτικό κύτταρο δεν σταματά εδώ. Ήδη την δεκαετία του 1960 διεξάγονται έρευνες που αποδεικνύουν ότι μέσω του κύριου φωτοϋποδοχέα των φυτών στην περιοχή του ερυθρού-υπέρυθρου φάσματος του φωτός (φυτόχρωμα, Phytochrome), τα επίπεδα ολικού RNA αυξάνονται για 24 ώρες μετά από έκθεση των φυτών σε ακτινοβολία στην περιοχή του ερυθρού (*Jaffe, M. J., 1969*). Περαιτέρω έρευνες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η επίδραση ερυθρού φωτός, αυξάνει την σύνθεση και σχηματισμό των ριβοσωμικών μορίων του RNA σε φυτάρια μουστάρδας (*Thien, W., Schopfer, P., 1982 και 1975 αντίστοιχα*).

Η επίδραση του φυτοχρώματος στη μετάφραση, επιβεβαιώνεται και με άλλες έρευνες. Αποδεικνύεται ότι ριβοσώματα που απομονώθηκαν από χλωρωτικά φυτάρια καλαμποκιού και φασολιού, είναι λιγότερο ικανά να συνθέτουν πεπτιδικές αλυσίδες σε σχέση με τα ριβοσώματα που απομονώθηκαν από φυτά μετά από έκθεση σε χαμηλά επίπεδα ερυθρού φωτός (*Williams, G. R., Novelli, G.D., 1968*). Η αλλαγή στα επίπεδα του πληροφοριακού RNA λόγω του φυτοχρώματος αποδεικνύεται για πρώτη

φορά στο είδος *Lemma gibba*, καθώς με απομόνωση ίσων ποσοτήτων πολυαδενυλιωμένου RNA από χλωρωτικά και πράσινα φυτάρια, διαπιστώθηκε διαφορά στα επίπεδα μετάφρασης, υποδηλώνοντας ότι στα χλωρωτικά φυτά μεταφράζεται τελικά ένα μικρότερο ποσοστό μορίων mRNA σε σχέση με τα φυσιολογικά (Tobin, E.M., Klein, A.O., 1975).

Μεταξύ των mRNA που μεταφράζονται παρουσία φωτός, είναι και η μικρή υπομονάδα (Small Subunit, SSU) της ριβουλόζης 1,5-διφωσφορικής καρβοξυλάσης (Rubisco) αλλά και των πρωτεϊνών-αντένων του φωτοσυλλεκτικού συμπλόκου του φωτοσυστήματος II (Tobin E. M., 1978; Tavladoraki et al., 1989; Triantaphyllopoulos et al., 1993). Μάλιστα στην περίπτωση της Rubisco, η μικρή υπομονάδα κωδικοποιείται από ένα πυρηνικό γονίδιο, το οποίο σχηματίζει στο κυτόπλασμα ένα πρόδρομο πολυπεπτιδίο. Το τελευταίο εισέρχεται στο στρώμα του χλωροπλάστη και τροποποιείται στην τελική μικρή υπομονάδα της Rubisco. Η μεγάλη υπομονάδα (LSU) κωδικοποιείται από χλωροπλαστιδιακά γονίδια και η σύνθεση της ολοπρωτεΐνης γίνεται στο στρώμα των χλωροπλαστών (Chua, N.-H., Schmidt, G.W., 1979 και Ellis, R. J., 1981).

Η επίδραση του φωτός φαίνεται ότι διαδραματίζει θετικό ρόλο στην έκφραση ενός πλήθους άλλων πυρηνικών γονιδίων. Μεταξύ αυτών είναι τα γονίδια που κωδικούουν την φωσφοενολπυρουβική καρβοξυλάση (Sims, T.L., Hague, D.R., 1981) και την ορθοφωσφορική πυρουβική κινάση (Hague, D.R., Uhler, M., Collins, P.D., 1983). Επίσης το χλωροπλαστιδιακό και όχι το κυτοπλασματικό mRNA της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκερυναλδεύδης, αυξάνεται σε 7 διαφορετικά φυτικά είδη παρουσία φωτός (Cerff, R., Kloppstech, K., 1982).

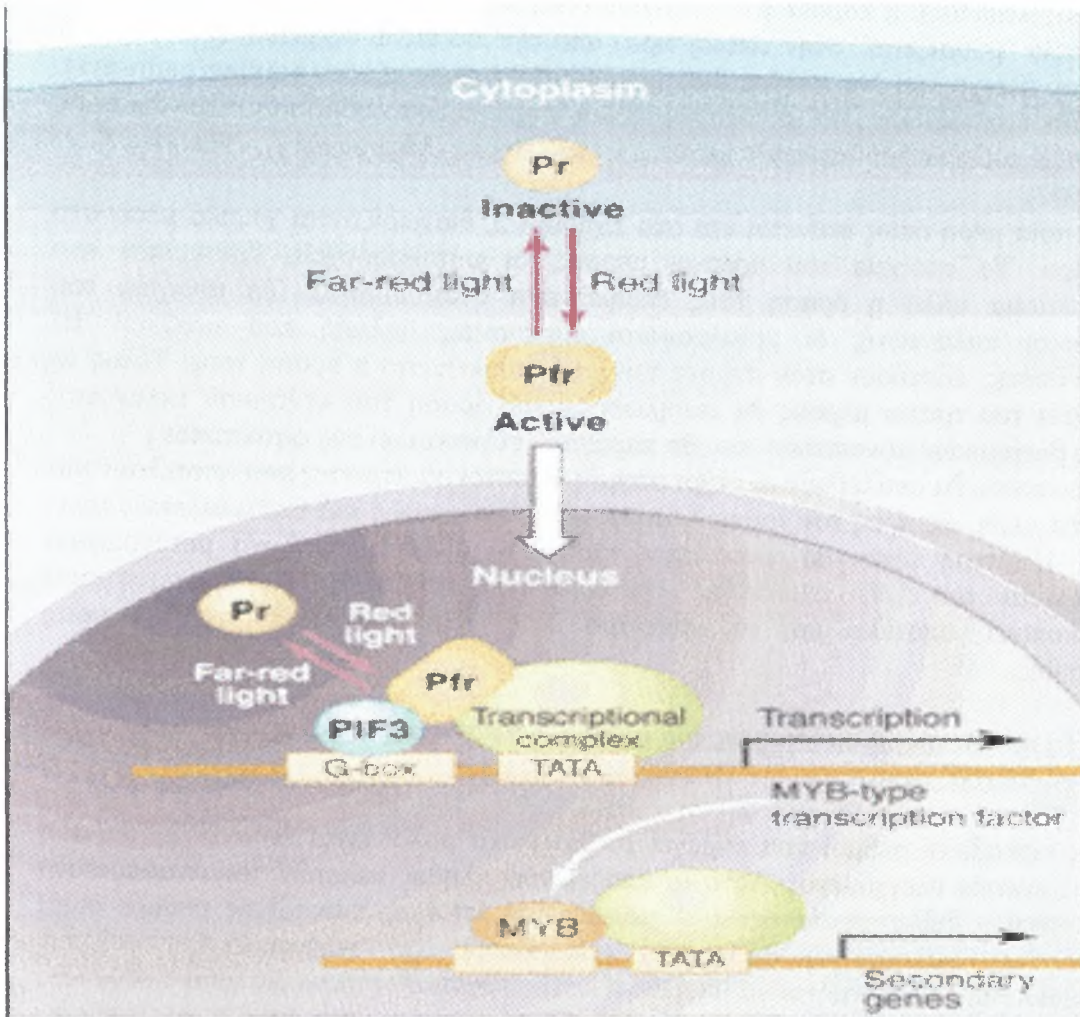
Όμως η επίδραση της ερυθράς ακτινοβολίας μέσω του φυτοχρώματος, δεν είναι πάντα ευνοϊκή για την έκφραση γονιδίων. Δύο παραδείγματα τέτοιων γονιδίων είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την NADPH-πρωτοχλωροφυλλική οξειδοορεδοκτάση στην βρώμη (Apel, K., 1981). Επιπροσθέτως η έκφραση των ίδιων των φωτοϋποδοχέων (φυτοχρώματα) είναι ρυθμική, φανερώνοντας παράλληλα την εξάρτηση από το φως καθώς και την ικανότητα αυτορύθμισης αυτών (Gottmann, K., Schafer, E., 1982).

Ανακεφαλαιώνοντας λοιπόν, διαπιστώνει κανείς ότι η θετική επίδραση του φωτός μέσω του φυτοχρώματος, στην έκφραση πολλών πυρηνικών γονιδίων (μεταξύ των οποίων και των γονιδίων της SSU της Rubisco και των γονιδίων των αντένων του LHC II) και του χλωροπλάστη, ανάγει το φως σε βασικό ρυθμιστή του φυτικού κυττάρου. Παράλληλα φανερώνεται ότι η απουσία φωτός έχει και εκείνη την δική της επίδραση στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Ένα ενδογενές σύστημα καταγραφής του χρόνου στα φυτά, μέσω της εναλλαγής μέρας-νύχτας, είναι πλέον απαραίτητο.

1.3 Το βιολογικό ρολόι των φυτών.

Στη προηγούμενη παράγραφο παρουσιάστηκαν κάποια παραδείγματα που αποδεικνύουν ότι το φως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή ή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης στα φυτά, με σκοπό την καλύτερη προσαρμογή τους μέσω του συντονισμού με τις εναλλαγές μέρας - νύχτας του περιβάλλοντος τους. Ωστόσο προκύπτουν κάποια ερωτήματα αναφορικά με το φαινόμενο των βιολογικών ρολογιών, όπως ποιά είναι ακριβώς η μορφή του βιολογικού ρολογιού; Υπάρχουν διακριτά μέρη που το αποτελούν και αν ναι, ποιά είναι τα στοιχεία τους; Πώς επιτυγχάνεται ο συντονισμός τους και πώς το φυτό αντιλαμβάνεται το χρόνο κάθε στιγμή; Και τελικά πώς καταφέρνει το βιολογικό ρολόι να συντονίσει τις

φυσιολογικές λειτουργίες, όπως το άνοιγμα των στομάτων, τις κινήσεις των φύλλων και των ανθέων, τη παραγωγή φυτοορμονών, την ανάπτυξη της υποκοτύλης και τελικά την άνθιση κ.α. ;



Σχήμα 1.2. Ένα απλουστευμένο μοντέλο της λειτουργίας του βιολογικού ρολογιού στα φυτά, μέσω της σηματοδότησης του κεντρικού ταλαντωτή από το ενεργοποιημένο φυτόχρωμα B (PHYB). Το φυτόχρωμα B παραμένει στο κυτόπλασμα στην ανεργή Pr μορφή του. Με επίδραση ακτινοβολίας στην περιοχή του ερυθρού, το PHYB μεταπίπτει στην βιολογικά ενεργή μορφή του (Pfr) και εισέρχεται στον πυρήνα. Εκεί αλληλεπιδρά με τον bHLH μεταγραφικό παράγοντα PIF3 και το ενεργοποιημένο σύμπλοκο δεσμεύεται στο G-πλαίσιο του υποκινητή των *LHY* και *CCA1* γονιδίων, δύο μεταγραφικών παραγόντων της MYB οικογένειας, ενεργοποιώντας την μεταγραφή τους. Οι *LHY* και *CCA1* πρωτείνες δεσμεύονται με την σειρά τους στον υποκινητή δευτερευόντων (Secondary genes) πρωινών γονιδίων όπως τα *CAB* γονίδια ενεργοποιώντας έτσι την μεταγραφή τους. Παράλληλα οι ίδιοι παράγοντες, δεσμεύονται στον υποκινητή των απογευματινών γονιδίων όπως ο *TOC1* παράγοντας, εμποδίζοντας την έναρξη της μεταγραφής τους. (ΠΗΓΗ : Akira Nagatani, Science 2000).

Όλα αυτά τα ερωτήματα θα απαντηθούν σταδιακά στο βαθμό που είναι γνωστά, μέσα από την περιγραφή της λειτουργίας και της δομής του κερκαδικού ρολογιού των φυτών.

Το βιολογικό ρολόι στα φυτά αποτελείται από τρία διακριτά μέρη (Σχ. 1.2). Το πρώτο μέρος, αποτελούν τα μονοπάτια σηματοδότησης του κεντρικού ταλαντωτή (input pathways), που έχουν ως ρόλο την φωτο- και θερμοεπαγόμενη σηματοδότηση του κεντρικού ταλαντωτή. Το δεύτερο μέρος είναι ο ίδιος ο κεντρικός ταλαντωτής (central oscillator), η καρδιά του ρολογιού ο οποίος συντονίζεται με το περιβάλλον (πιο απλά “ρυθμίζεται” στην τοπική ώρα) από την πιο πάνω σηματοδότηση και έχει υπό τον έλεγχο του ένα πλήθος βιοχημικών μονοπατιών εξόδου (output pathways). Το κάθε ένα από αυτά τα μονοπάτια εξόδου παράγει ένα ρυθμό και ο συνδυασμός τους ανα πάσα στιγμή δίνει τον φαινότυπο του φυτού (Mizoguchi T., Wheatley K. *et al.*, 2002).

Τα τρία μέρη όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.2, διαχωρίζονται χωρικά μέσα στο κύτταρο. Τα στοιχεία του πρώτου μέρους, οι φυτούποδοχείς, βρίσκονται στο κυτόπλασμα αλλά η δράση τους εκδηλώνεται στον πυρήνα. Τα στοιχεία του κεντρικού ταλαντωτή, οι μεταγραφικοί παράγοντες δηλαδή που εκτελούν τις ταλαντώσεις, εδρεύουν στον πυρήνα και εκεί εκδηλώνεται η δράση τους. Τέλος τα στοιχεία του τρίτου μέρους θα εκδηλώσουν την δράση του κεντρικού ταλαντωτή μέσω βιοχημικών μονοπατιών που θα παράγουν συγκεκριμένους φαινότυπους.

Παρακάτω θα αναλυθούν οι μέχρι στιγμής γνωστοί παράγοντες που αποτελούν και τα τρία μέρη, ως προς τον τρόπο λειτουργίας αυτών καθώς και τις αλληλεπιδράσεις τους. Ιδιαίτερη μνεία θα γίνει στον παράγοντα P_vLHY (ομόλογο μεταγραφικό παράγοντα του LHY στο είδος *Phaseolus vulgaris*), αφού η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί, αποτελεί και το επίκεντρο ενός μεγάλου μέρους της παρούσας διατριβής.

1.4 Τα μονοπάτια σηματοδότησης του κεντρικού ταλαντωτή. Ο ρόλος των φωτούποδοχέων.

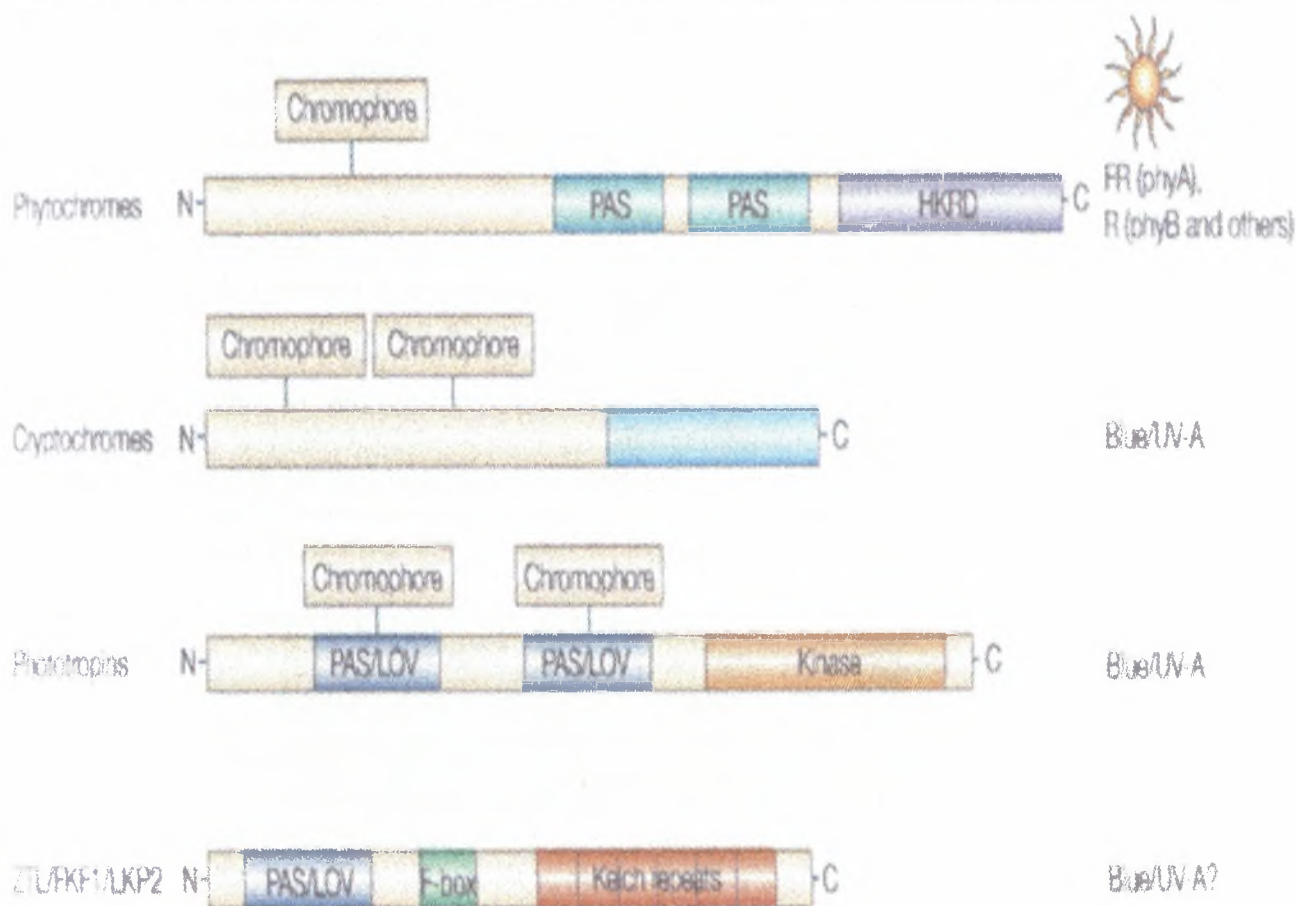
Οι κίρκαδικοί ρυθμοί που παράγει το βιολογικό ρολόι είναι ενδογενείς, δηλαδή είναι γενετικά ελεγχόμενοι. Αυτό το αποδεικνύει πλήθος μελετών που αναφέρονται στην διεθνή βιβλιογραφία και που φανερώνουν ότι ένας κίρκαδικός ρυθμός είναι ικανός να διατηρεί τη φάση της ταλάντωσης του σε σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος. Ωστόσο για να μπορεί να λειτουργήσει σωστά το βιολογικό ρολόι θα πρέπει να έχει ένα μηχανισμό που θα του επιτρέπει να συγχρονίζεται στις περιβαλλοντικές συνθήκες και να αυτορυθμίζεται με βάση αυτές.

Αυτού του είδους την ευελιξία, τη παρέχουν τα μονοπάτια σηματοδότησης του κεντρικού ταλαντωτή (input pathways) καθώς και τα λειτουργικά τους στοιχεία, δηλαδή οι φυτικοί φωτούποδοχείς. Ο ρόλος τους είναι να ρυθμίζουν κάθε αυγή, το βιολογικό ρολόι, συντονίζοντας τη φάση της ταλάντωσης των στοιχείων του κεντρικού ταλαντωτή με τους κύκλους παρουσίας και απουσίας φωτός. Οι κυριότεροι μέχρι σήμερα γνωστοί φωτούποδοχείς των φυτών, ανήκουν στις οικογένειες των φυτοχρωμάτων, των κρυπτοχρωμάτων, των φωτοτροπινών (η ανάλυση των τελευταίων ξεφεύγει από τους στόχους της παρούσης διατριβής) και πιο πρόσφατα των παραγόντων ZTL/FKF1/LKP1 (Σχήμα 1.3). Η τελευταία οικογένεια θα αναλυθεί ξεχωριστά από τους υπόλοιπους φωτούποδοχείς εξαιτίας του ιδιαίτερου ρόλου της.

1.4.1 Φυτοχρώματα.

Τα φυτοχρώματα είναι από τους πιο καλά μελετημένους φωτούποδοχείς των φυτών. Ανακαλύφθηκαν πριν από 50 χρόνια ως οι υπεύθυνοι παράγοντες της άνθισης των φυτών μικρής ημέρας. Ο Borthwick απέδειξε ότι η ακτινοβολία του φωτός στο

ερυθρό μήκος κύματος του, ενεργοποιεί την ανθοφορία και την καρποφορία στο λάχανο.



Σχήμα 1.3 : Δομική ανάλυση των αποπρωτεϊνών των γνωστών φωτοϋποδοχέων στα φυτά καθώς και της περιοχής δέσμευσης του χρωμοφόρου. **Φυτοχρώματα :** Οι PAS περιοχές (*Period circadian protein*, *Ah receptor nuclear translocator protein* και *Single-minded protein*) σηματοδοτούν την έναρξη της μεταγραφής ενός πλήθους γονιδίων μέσω της αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον *bHLH* (*basic Helix Loop Helix*) *PIF3* (*Phytochrome Interacting Factor 3*) παράγοντα, ενώ η *HKRD* (*Histidine-Kinase-Related Domain*) περιοχή θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για την δράση του φυτοχρώματος ως φωτοεξαρτώμενη κινάση. **Κρυπτοχρώματα :** Τα κρυπτοχρώματα είναι φωτοϋποδοχείς του κυανού και υπεριώδους φάσματος του φωτός. Δεσμεύουν δύο ειδών χρωμοφόρα μια φλαβίνη και μια πτερίνη ενώ η σηματοδότηση τους αναστέλεται από τον παράγοντα *COPI* (*Constitutive Photomorphogenic 1*). **Φωτοτροπίνες :** Οι φωτοτροπίνες είναι και αυτές φωτοϋποδοχείς του κυανού/υπεριώδους φάσματος τους φωτός και φαίνεται ότι ο κύριος ρόλος τους είναι να ελέγχουν τις αποκρίσεις της φωτομορφόγνεσης του φυτού. Οι δύο *PAS/LOV* (*Light-Oxygen-Voltage*) περιοχές δεσμεύουν, μετά από απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας, ένα μονονουκλεοτίδιο φλαβίνης (*FMN-Flavin Mononucleotide*) με ομοιοπολικούς δεσμούς κυστεΐνης-*FMN*. Η δέσμευση του χρωμοφόρου προκαλεί δομικές αλλαγές στο μόριο, επάγοντας έτσι την δράση του ως κινάση σερίνης/θρεονίνης από το καρβοξυτελικό άκρο. **ZTL/FKF1/LKP2 :** Οι πιο πρόσφατοι παράγοντες στους οποίους έχει αποδοθεί δράση φωτοϋποδοχέα. Τα μέλη της οικογένειας αυτής παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον εξαιτίας των ιδιοτήτων που τους εξασφαλίζει η παρουσία ενός μοναδικού συνδυασμού δομικών μοτίβων. Η *PAS/LOV* περιοχή δεσμεύει (όπως και στις φωτοτροπίνες) *FMN*. Το *F-box* έχει συνδεθεί με αποικοδόμηση πρωτεϊνών στο πρωτεόσωμα μέσω της ουμπικιτίνης ενώ οι έξη επαναλήψεις της *Kelch* περιοχής μεσολαβούν αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών. (ΠΗΓΗ : Marcelo J. Yanovsky and Steve A. Kay. *Nature Reviews* – April 2003)

ενώ αυτή η επίδραση αναστέλλεται από ακτινοβολία στο υπέρυθρο μήκος κύματος (Borthwick *et al.*, 1952).

Τα φυτοχρώματα ανήκουν σε μια οικογένεια που αριθμεί πέντε μέλη PHYA-E (Sharrock, Quail, 1989). Με βάση την σταθερότητα της πρωτεΐνης, τα πέντε μέλη μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες. Στην I κατηγορία ανήκουν τα φυτοχρώματα που είναι ευαίσθητα και αποικοδομούνται παρουσία έντονου φωτός (PHYA) ενώ στην κατηγορία II ανήκουν τα μη φωτοευαίσθητα φυτοχρώματα (PHYB-E) (Clough and Vierstra, 1997; Quail, 1997).

Όλα τα μέλη είναι φυτοϋποδοχείς του ορατού φάσματος του φωτός (σχήμα 1.4) και ανιχνεύονται σε δύο μορφές. Η πρώτη καλείται μορφή Pr (Phytochrome red form), είναι η ανενεργός μορφή των φυτοχρωμάτων και σε αυτή συντίθεται το μόριο. Η δεύτερη είναι η Pfr (Phytochrome far-red form) και είναι η βιολογικά ενεργή μορφή του φυτοϋποδοχέα (Quail, 1997). Έκθεση στο ερυθρό μήκος κύματος του φωτός (667 nm) έχει ως αποτέλεσμα την μετάπτωση της Pr (667) μορφής στην βιολογικά ενεργή Pfr (730 nm) μορφή που συνοδεύεται τόσο από αλλαγές στη δομή του μορίου όσο και στο μήκος κύματος που απορροφά. Έκθεση σε ακτινοβολία στο υπέρυθρο του φωτός (730 nm) μετατρέπει το φυτόχρωμα από την Pfr ξανά στην βιολογικά ανενεργή Pr μορφή του (Quail, 1997).

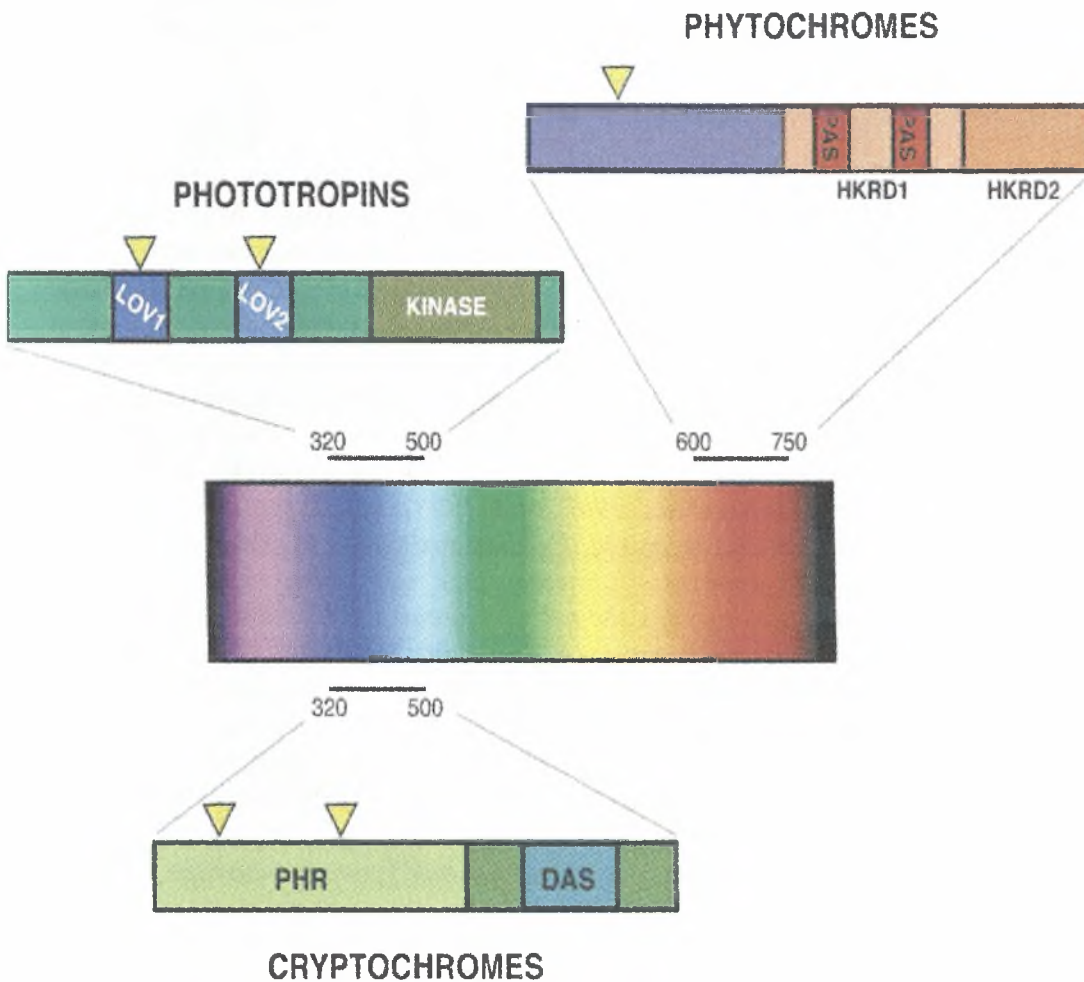
Ωστόσο ανάμεσα στα πέντε μέλη υπάρχει διαφοροποίηση αναφορικά με την ένταση του φωτός που απαιτεί η ενεργοποίησή τους. Έτσι υπάρχουν φυτοχρώματα (PHYB, D, E) που σηματοδοτούν αποκρίσεις σε φως χαμηλής έντασης (Low-Fluence responses-LFRs), φυτοχρώματα (PHYA) που σηματοδοτούν αποκρίσεις σε φως πολύ χαμηλής έντασης (Very Low Fluence responses-VLFRs) και φυτοχρώματα που σηματοδοτούν αποκρίσεις σε φως υψηλής έντασης (High Irradiation responses-HIRs) και απαιτούν υψηλής έντασης ακτινοβολία για μακρύ χρονικό διάστημα (Shinomura *et al.*, 2000; Smith 1990; Nagy και Schaefer 2002; Quail 2002b). Η ανακάλυψη ότι ακόμα και σε προκαρυωτικής φύσης οργανισμούς, υπάρχουν μόρια με ομόλογη δράση αυτής των φυτοχρωμάτων (βακτηριοφυτοχρώματα, Vierstra and Davis 2000) και το γεγονός ότι εκτεταμένη έρευνα σε μερικούς από αυτούς τους παράγοντες απέδειξε την ικανότητα φωσφορυλίωσης παρουσία φωτός στην περιοχή του ερυθρού, ενισχύουν τη θεωρία ότι τα πρόδρομα μόρια των φυτοχρωμάτων στα φυτά ήταν βακτηριακοί παράγοντες που είχαν την ικανότητα να μετατρέπουν φωτεινά ερεθίσματα σε δραστηριότητα κίνησης (Yeh *et al.*, 1997; Vierstra and Davis, 2000; Bhoo *et al.*, 2001).

1.4.1.1 Δομή της αποπρωτεΐνης των φυτοχρωμάτων.

Η αποπρωτεΐνη των φυτοχρωμάτων είναι ένα ομοδιμερές που αποτελείται από δύο υπομονάδες μοριακού βάρους 125 kDa η καθεμία (Quail, 1991). Το καθένα από τα δύο αυτά πεπτιδία ουσιαστικά αποτελείται από δύο υποπεριοχές που η καθεμία αντιπροσωπεύει περίπου το μισό μόριο : η αμινοτελική περιοχή η οποία δεσμεύει ομοιοπολικά ένα παράγοντα που είναι υπεύθυνος για την απορρόφηση του φωτός (χρωμοφόρο) και μια καρβοξυτελική περιοχή που μεσολαβεί για τον διμερισμό του μορίου.

Η καρβοξυτελική περιοχή του μορίου περιέχει δύο PAS μοτίβα (Period circadian protein, Ah receptor nuclear translocator protein και Single-minded protein) τα οποία σηματοδοτούν ένα πλήθος διεργασιών μέσω της αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον bHLH παράγοντα, PIF3 (basic Helix Loop Helix Phytochrome

Interacting Factor 3). Τα φυτοχρώματα θεωρούνται ότι είναι κινάσες με φωτοεξαρτώμενη ικανότητα φωσφορυλίωσης. Η δράση τους αυτή, αποδίδεται στην



Σχήμα 1.4 : Οι κυριότερες οικογένειες φωτοϋποδοχέων στα φυτά και η εξειδίκευσή τους ανάλογα με το μήκος κύματος στο οποίο ενεργοποιούνται. Η οικογένεια των φυτοχρωμάτων αριθμεί 5 μέλη (PHY A-E) που όλα είναι φωτοϋποδοχείς του ορατού φάσματος του φωτός. Τα φυτοχρώματα απαντώνται σε δύο μορφές, την βιολογικά ανενεργή [Pr (667)] που απορροφά στο ερυθρό φάσμα του φωτός και την βιολογικά ενεργή [Pfr (750)] που απορροφά στο υπέρυθρο του ορατού φάσματος του φωτός. Η οικογένεια των κρυπτοχρωμάτων αριθμεί δύο μέλη (CRY 1-2) που και τα δύο είναι φωτοϋποδοχείς του κυανού (500 nm) και υπεριώδους φάσματος του φωτός (UVA ακτινοβολία-320 nm). Οι φωτοτροπίνες είναι και αυτές φωτοϋποδοχείς του κυανού-υπεριώδους φάσματος του φωτός όπως και τα κρυπτοχρώματα και είναι υπεύθυνες κυρίως και τον φωτομορφισμό του φυτού. (ΠΗΓΗ : James A. Sullivan and Xing Wang Deng, 2003)

ύπαρξη μιας περιοχής με δομή παραπλήσια με την κινάση της ιστοιδίνης (Histidine-Kinase-Related-Domain, HKRD) με αποτέλεσμα να μπορούν τα φυτοχρώματα να αυτοφωσφορυλιωθούν αλλά και να φωσφορυλιώσουν άμεσα άλλες πρωτεΐνες όταν βρίσκονται στην βιολογικά ενεργή Pfr μορφή τους, όπως την πρωτεΐνη PKS1 (Phytochrome Kinase Substrate 1), η οποία δρα σαν αρνητικός ρυθμιστικός παράγοντας της δράσης του φυτοχρώματος (Fankhauser C., 1999; Quail, 1997).

1.4.1.2 Ενδοκυτταρικός εντοπισμός του φυτοχρώματος.

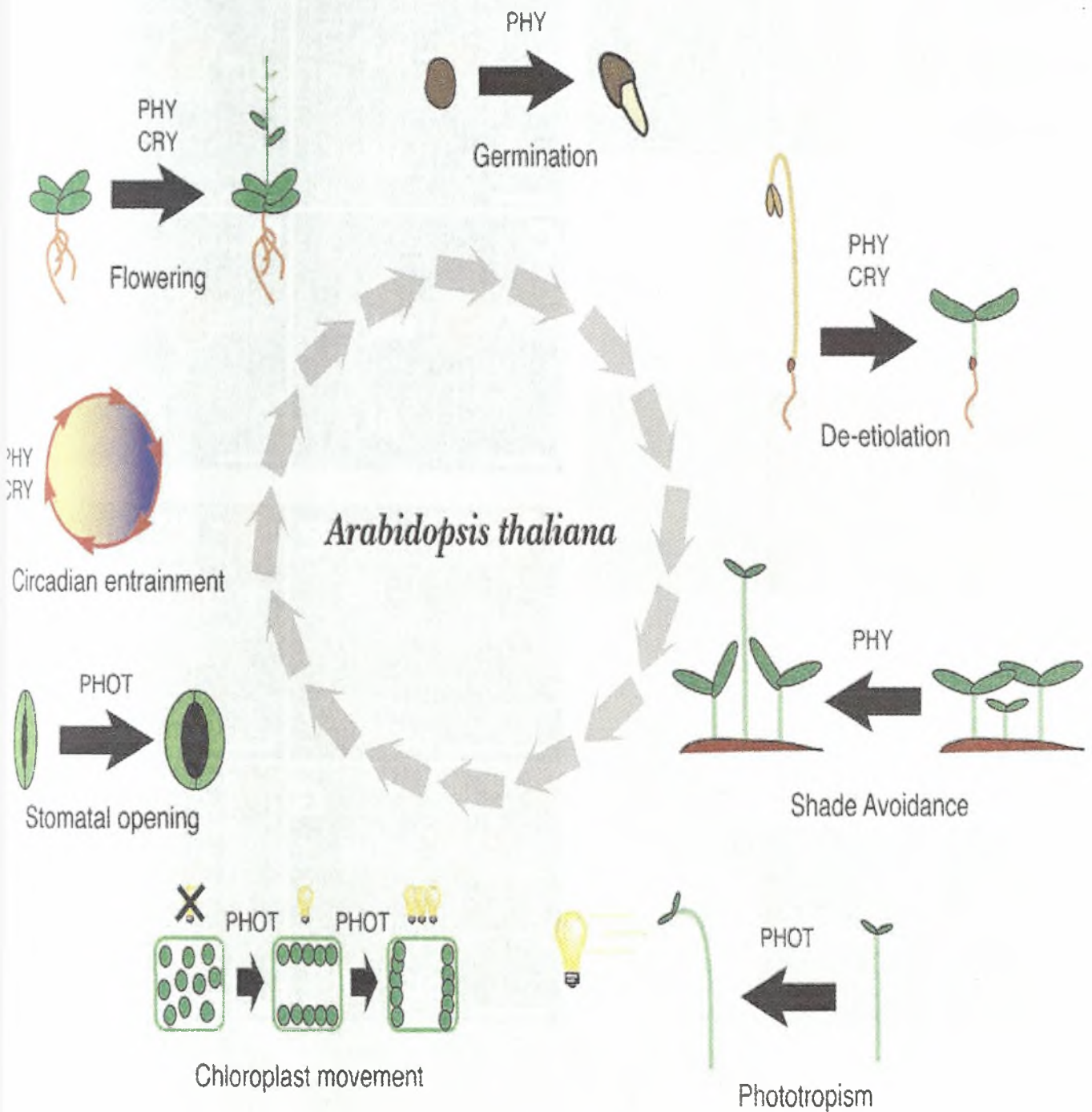
Από την αρχή της ανακάλυψής τους μέχρι και σήμερα, τα φυτοχρώματα θεωρούνται ότι ελέγχουν άμεσα ή έμμεσα ένα πλήθος φυσιολογικών διεργασιών του φυτού, είτε από μόνα τους είτε μέσω συνδυασμένης δράσης με τις υπόλοιπες τάξεις φωτουποδοχέων (κρυπτοχρώματα και φωτοτροπίνες, σχήμα 1.5). Κατά το παρελθόν αναπτύχθηκαν διάφορες θεωρίες που ως σκοπό είχαν να προσεγγίσουν την δράση των μορίων. Παρόλη την διαφαινόμενη σημασία τους για το φυτό, μόλις τα τελευταία χρόνια άρχισε να αποκαλύπτεται η δράση των φωτοχρωμάτων σε μοριακό επίπεδο.

Έτσι αρχικά άλλες θεωρίες ήθελαν να φυτοχρώματα σαν κυτοπλασματικούς μεμβρανικούς υποδοχείς (Hisada et al., Hock et al., 1964), άλλες σαν φωτοελεγχόμενα ένζυμα (Yeh et al., 1997 and 1998) και άλλες σαν απευθείας ρυθμιστικούς παράγοντες της μεταγραφής. Ωστόσο η αλήθεια περιλαμβάνει όλα τα παραπάνω και σήμερα είναι αποδεκτός ο διττός ρόλος των φυτοχρωμάτων τόσο ως μεταγραφικοί παράγοντες του πυρήνα (Martinez-Garcia et al., 2000) όσο και σαν φωτοεπαγόμενες κινάσες του κυτοπλάσματος (Yeh et al., 1997).

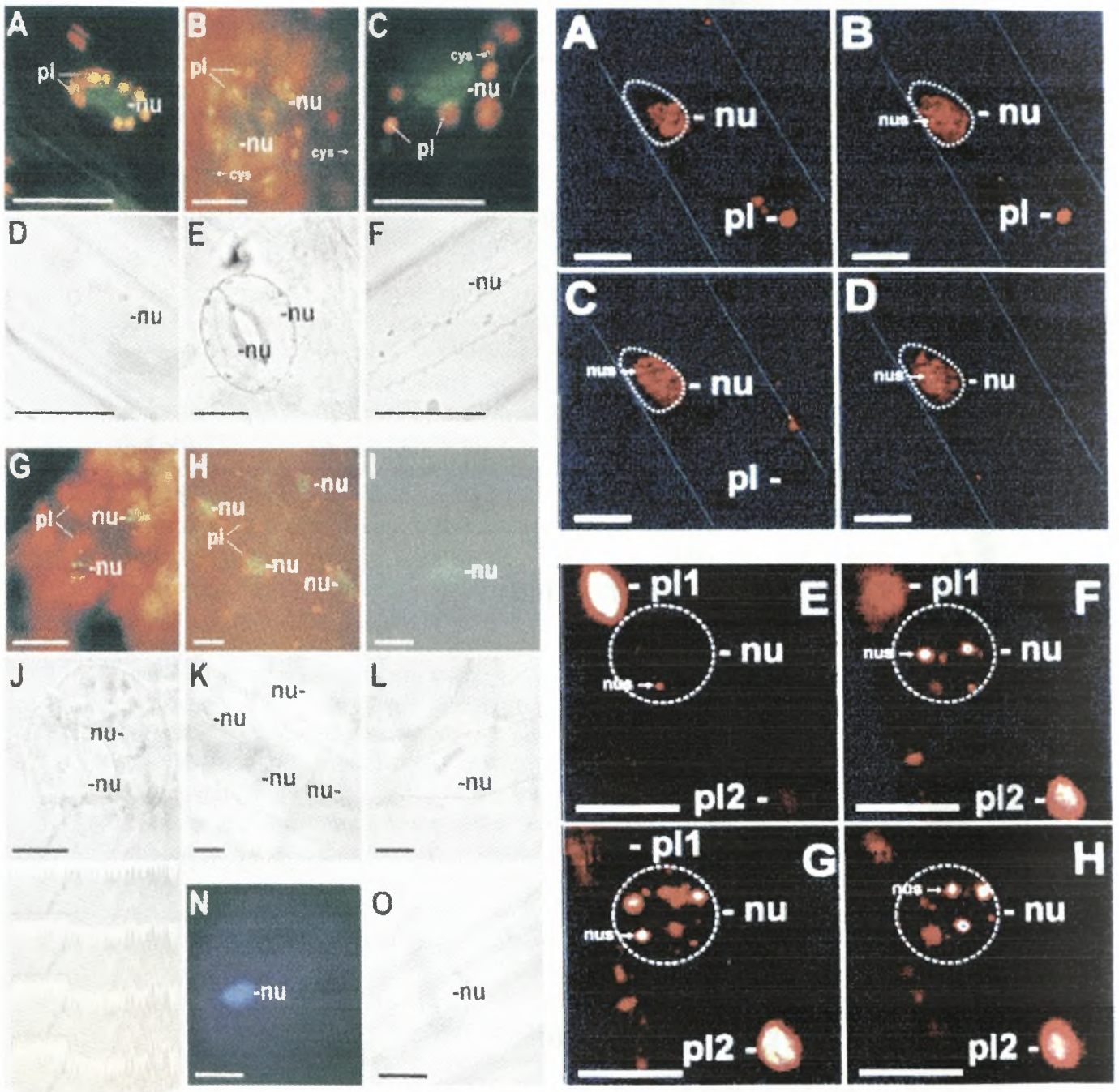
Αυτός ο ρόλος που αποδόθηκε αρχικά στα φυτοχρώματα, γέννησε στη συνέχεια ενδιαφέροντα ερωτηματικά αναφορικά με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες εκδηλώνεται η δράση τους στον πυρήνα. Πειράματα με χιμαιρικές πρωτεΐνες ανάμεσα σε PHYB και την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (Green Fluorescent Protein) σε χλωρωτικά φυτά αλλά και σε φυτά που είχαν δεχτεί ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, έδωσαν τελικά κάποιες απαντήσεις. Αποδείχτηκε λοιπόν, ότι αναφορικά με τα φυτά που δεν είχαν δεχτεί ερυθρά ακτινοβολία, τα PHYA-B:GFP εντοπίζονταν στο κυτόπλασμα, ενώ στα φυτά που είχαν δεχτεί ερυθρά ακτινοβολία, τα PHYA-B:GFP μετανάστευαν στον πυρήνα (Kay S., and Nagatani A., 1999; Kircher S., Kozma-Bognar L., 1999). Οι παραπάνω ερευνητές απέδειξαν ότι το φυτόχρωμα όσο είναι στη βιολογικά ανενεργή μορφή του [Pr(667)] παραμένει διάσπαρτο στο κυτόπλασμα. Μόλις δεχτεί ερυθρά ακτινοβολία, τότε μετατρέπεται στην ενεργό Pfr (750) μορφή του και εισέρχεται στον πυρήνα. Η κινητική της εισαγωγής του φυτοχρώματος A μάλιστα είναι ταχύτερη από την κινητική της εισαγωγής του φυτοχρώματος B και σε αυτό ίσως παίζει ρόλο η αλληλεπίδραση του PHYB με τον παράγοντα PKS1 που ίσως να ρυθμίζει έτσι εν μέρει την μετάβαση του στον πυρήνα (Fankhauser et al. 1999).

Ωστόσο οι παραπάνω μελέτες, απέδειξαν επίσης ότι κατά την παραμονή του στο κυτόπλασμα, το φυτόχρωμα εντοπίζεται διάσπαρτο σε όλο το κύτταρο. Μόλις όμως εισαχθεί στον πυρήνα, τότε σχηματίζει πυρηνικά συσσωματώματα [speckles, (Εικόνα 1.2)]. Τα παραπάνω συμπεράσματα, επιβεβαίωσαν αντίστοιχη συμπεριφορά και για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας και σήμερα δεχόμαστε ότι όλα τα φυτοχρώματα εισάγονται στο πυρήνα μετά από επίδραση ερυθράς ακτινοβολίας και σχηματίζουν πυρηνικά συσσωματώματα. Τα συσσωματώματα αυτά σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδραση του ενεργοποιημένου φυτοχρώματος με τον μεταγραφικό παράγοντα

PIF 3 (Min N., Tepperman J., and Quail P., 1999; Kay S., Nagatani A., 1999; Nagy and Schafer, 2002) και αντιπροσωπεύουν είτε θέσεις έντονης μεταγραφής είτε θέσεις αποικοδόμησης.



Σχήμα 1.5 : Φωτοεπαγόμενες φυσιολογικές διεργασίες στο φυτικό είδος *Arabidopsis thaliana*. Το φως ελέγχει την ανάπτυξη του φυτού καθόλη την διάρκεια του βιολογικού του κύκλου. Τα πολλαπλά φωτοεπαγόμενα αναπτυξιακά μονοπάτια ελέγχονται από τα φυτοχρώματα, τα κρυπτοχρώματα και τις φωτοτροπίνες είτε μέσω συνδυασμένης αλληλεπίδρασης, είτε μέσω μεμονωμένων δράσεων των παραπάνω.
(ΠΗΓΗ : James A. Sullivan and Xing Wang Deng, 2003)



Εικόνα 1.2 Αριστερά: Σχηματισμός των πυρηνικών συσσωματωμάτων (*speckles*) από PHYA:GFP, PHYB:GFP σε διάφορα είδη κυττάρων μετασηματισμένου καπνού, μεγάλωμένο υπό συνθήκες φωτός. A-C και G-I: εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού D-F και J-L: εικόνες από μικροσκόπιο ορατού. A και D : PHYA:GFP σε επιδερμικό κύτταρο, B και E PHYA:GFP σε καταφρακτικό στοματικό κύτταρο, C και F : PHYA:GFP σε κύτταρα τριχώματος, G και J : PHYB:GFP σε καταφρακτικό στοματικό κύτταρο, H και K : PHYB:GFP σε κύτταρα υποκοτυλίου. I και L : PHYB:GFP σε ριζικό τριχίδιο. M, N και O αντίστοιχα : PHYB:GFP σε κύτταρο υποκοτυλίου σε μικροσκόπιο φθορισμού, σημασμένο με DAPI και σε μικροσκόπιο ορατού. Μπάρα = 20 μm.

Δεξιά : A-D : Σάρωση ανα 1,5 μm από κύτταρα τριχώματος που εκφράζουν το PHYA:GFP κατασκεύασμα. E-F : Το ίδιο δείγμα με πριν με την διαφορά ότι τώρα εκφράζεται το PHYB:GFP κατασκεύασμα. Μπάρα = 10 μm. nus : PHYA:GFP, PHYB:GFP, nu : πυρήνας, pi=επιλεγμένα πλαστίδια. (ΠΗΓΗ : Kircher S., Kozma-Bognar L., 1999)

1.4.2 Κρυπτοχρώματα.

Τα κρυπτοχρώματα είναι φωτούποδοχείς που μεσολαβούν τις φωτοεπαγόμενες αποκρίσεις των οργανισμών στην περιοχή του κυανού-υπεριώδους. Τους αποδόθηκε αυτό το όνομα για δύο λόγους. Πρώτα από όλα διότι οι αποκρίσεις στη περιοχή του κυανού-υπεριώδους έγιναν πρώτα αντιληπτές σε μια παλιά ταξινομική ομάδα φυτών, τα Κρυπτόγαμα και αφετέρου διότι οι έρευνες για την μοριακή φύση αυτών των αποκρίσεων ήταν στο σκοτάδι για πολλά χρόνια (Senger, 1980). Με την απομόνωση και χαρακτηρισμό του *CRY1* (*Cryptochrome 1*, [Ahmad and Cashmore, 1998]) στο φυτικό είδος *Arabidopsis thaliana*, κρυπτοχρώματα βρέθηκαν σχεδόν σε κάθε πολυκύτταρο οργανισμό που εξετάστηκε (Lin and Shalitin, 2003).

Τα κρυπτοχρώματα είναι φλαβοπρωτεΐνες (τα χρωμοφόρα τους είναι ένα μονονουκλεοτίδιο φλαβίνης και ένα μονονουκλεοτίδιο πτερίνης) που βρίσκονται τόσο σε φυτά όσο και σε ζώα. Ομοιάζουν με τις DNA φωτολυάσες ωστόσο δεν έχουν την ίδια ενζυμική λειτουργικότητα. Απορροφούν φως σε δύο περιοχές του φωτός, στην περιοχή του υπεριώδους UV-A (320-400 nm) και στην περιοχή του κυανού (400-500 nm, σχήμα 1.4, Gressel, 1979; Senger, 1984). Έτσι φαίνεται ότι στη περιοχή του κυανού-υπεριώδους τα φυτά έχουν δύο φωτούποδοχείς, τις φωτοτροπίνες που μεσολαβούν για τις αποκρίσεις του φωτοτροπισμού και τα κρυπτοχρώματα τα οποία σε συνδυασμό με τα φυτοχρώματα, ελέγχουν ένα πλήθος αναπτυξιακών μονοπατιών μεταξύ των οποίων και την σηματοδότηση του κεντρικού ταλαντωτή (Σχήμα 1.5).

1.4.2.1 Η οικογένεια των Κρυπτοχρωμάτων / Φωτολυασών.

Οι φωτολυάσες είναι φλαβοπρωτεΐνες με μοριακό βάρος 55-65 kD οι οποίες έχουν εντοπιστεί σε ένα εύρος οργανισμών τόσο προκαρυωτικών όσο και ευκαρυωτικών. Ο βιοχημικός τους ρόλος μέσα στο κύτταρο σχετίζεται με την φωτοεξαρτώμενη (στην περιοχή του υπεριώδους/κυανού μήκους φάσματος) επιδιόρθωση βλαβών στην αλληλουχία βάσεων του DNA λόγω έκθεσης των οργανισμών στην μικρού μήκους κύματος UV ακτινοβολία του ηλιακού φωτός (Sancar, 1994, Todo et al., 1993).

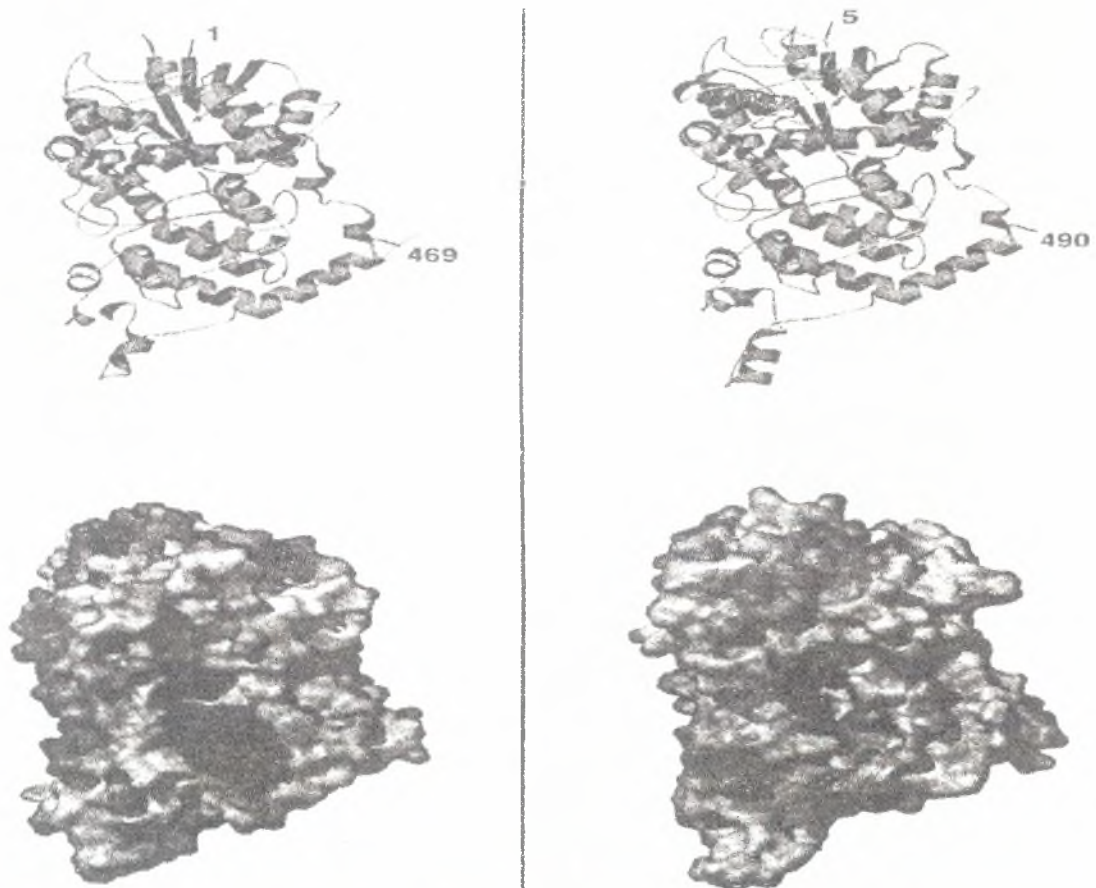
Ανάλογα με το είδος της βλάβης που επιδιορθώνουν, οι φωτολυάσες διακρίνονται στις CPD φωτολυάσες και στις 6-4 φωτολυάσες. Οι CPD φωτολυάσες με κριτήριο τις ομολογίες στην δομή τους, διακρίνονται περαιτέρω στις CPD φωτολυάσες τύπου I, που εντοπίζονται κυρίως στους μονοκύτταρους οργανισμούς, και στις CPD φωτολυάσες τύπου II που εντοπίζονται τόσο σε μονοκύτταρους όσο και σε πολυκύτταρους οργανισμούς (Sancar, 1994). Η οικογένεια των φωτολυασών θεωρείται σήμερα ως ο πρόγονος από τον οποίο προέκυψε η τάξη των κρυπτοχρωμάτων (Σχήμα 1.6).

1.4.2.2 Η δομή των κρυπτοχρωμάτων στα φυτά

Στο είδος *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν δύο ομόλογα κρυπτοχρώματα τα *CRY1* και *CRY2* (Ahmad, 1993; Hoffman, 1996;). Στην τομάτα έχουν βρεθεί τρία ομόλογα κρυπτοχρώματα, τα *CRY1a*, *CRY1b* και *CRY2* με τα *CRY1* (a και b) και *CRY2* να μοιράζονται μεγαλύτερη δομική ομολογία με τα αντίστοιχα *CRY1* και *CRY2* του *Arabidopsis thaliana* παρά μεταξύ τους (Pergotta, 2000).

Το μοριακό βάρος των κρυπτοχρωμάτων είναι 70-80 kD. Η ανάλυση της δομής τους, φανερώνει την ύπαρξη δύο διακριτών περιοχών (Σχήμα 1.3). Η πρώτη περιοχή

(Photolyase-related domain – PHR) εκτείνεται από το αμινοτελικό άκρο του μορίου μέχρι σχεδόν την μέση του και όπως φανερώνει και το όνομα της μοιράζεται μεγάλη δομική ομολογία με τις DNA φωτολυάσες (Lin and Shalitin, 2003). Η ίδια περιοχή δεσμεύει και τα δύο χρωμοφόρα, ένα μόριο φλαβίνης και ένα μόριο πτερίνης (Marcelo J. Yanovsky και Steve Kay, 2003). Το υπόλοιπο του μορίου μέχρι το καρβοξυτελικό άκρο δεν μοιράζεται δομική ομολογία με τις DNA φωτολυάσες και φαίνεται ότι σχετίζεται με τη μετανάστευση του μορίου από το κυτόπλασμα στον πυρήνα και το αντίστροφο καθώς και με αλληλεπιδράσεις με άλλα πρωτεϊνικά μόρια (Chentao Lin και Dror Shalitin, 2003).



Σχήμα 1.6 : Σύγκριση της τεταρτοταγούς στερεοχημικής δομής της απομονωμένης από το *E. coli*, φωτολυάσης όπως φανερώθηκε από ανάλυση ακτίνων X (αριστερά) και ενός υποθετικού μοντέλου του CRY2 από το *Arabidopsis thaliana* με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων του μορίου (δεξιά). (ΠΗΓΗ : Chentao Lin και Dror Shalitin, 2003).

Αναφορικά με τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό των CRY1 και CRY2 στο είδος *Arabidopsis thaliana*, και τα δύο μόρια εντοπίζονται στον πυρήνα και στο κυτόπλασμα (Cashmore et al., 1999; Guo et al., 1999; Kleiner et al., 1999) με το CRY2 να εισέρχεται στον πυρήνα ανεξαρτήτως συνθηκών φωτισμού. Στον αντίποδα το CRY1 εισέρχεται στο πυρήνα σε συνθήκες σκότους αλλά μπορεί να παραμείνει στο κυτόπλασμα σε συνθήκες φωτός. Η χμαιρική πρωτεΐνη GUS-CCT1 ανάμεσα στον παράγοντα GUS (β -Glucuronidase) και στο καρβοξυτελικό άκρο του CRY1 (CRY1 C-terminus) φανέρωσε πυρηνικό εντοπισμό σε κύτταρα ριζικών τριχιδίων από φυτά που παρέμειναν στο σκοτάδι, ενώ σε φυτά που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες φωτισμού, η χμαιρική πρωτεΐνη εντοπίστηκε στο κυτόπλασμα (Yang, 2000). Σε φυτά

που αναπτύχθηκαν στις ίδιες συνθήκες φωτισμού, ανάλυση του πυρηνικού εκχυλίσματος φανέρωσε ότι περιείχε σημαντικές ποσότητες CRY2 (Guo, 1999).

Είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι το NLS μοτίβο (Nuclear Localization Signal motif) που είναι υπεύθυνο για τον πυρηνικό εντοπισμό των κρυπτοχρωμάτων, θα βρίσκεται στην αμινοτελική περιοχή του μορίου αφού αυτή μοιράζεται δομική ομολογία με κατ' εξοχήν πυρηνικά ένζυμα, τις φωτολυάσες. Εν τούτοις η παραπάνω έρευνα σε συνδυασμό με άλλες, έδειξαν ότι το καρβοξυτελικό άκρο από μόνο του είναι ικανό να οδηγήσει το μόριο στον πυρήνα (Cutler *et al.*, 2000; Guo, 1999; Kleiner, 1999; Wang *et al.*, 2001; Yang, 2000).

1.4.2.3 Η αποικοδόμιση της πρωτεΐνης των Κρυπτοχρωμάτων

Στο *Arabidopsis thaliana* η CRY2 πρωτεΐνη αποικοδομείται ταχύτατα με φωτοεξαρτώμενο τρόπο [υπό επίδραση ακτινοβολίας στο φάσμα του υπεριώδους (Guo *et al.*, 1999)]. Πιο συγκεκριμένα αρκούν 15 λεπτά για να ελαττωθούν τα επίπεδα της CRY2 πρωτεΐνης σε ποσοστό 90 % σε χλωρωτικά φυτάρια τα οποία εκτίθενται σε ακτινοβολία στο φάσμα του κυανού σε σύγκριση με φυτά που μεγαλώνουν σε συνεχές σκοτάδι (Shalitin *et al.*, 2002). Τόσο η PHR περιοχή όσο και το καρβοξυτελικό άκρο των κρυπτοχρωμάτων φαίνεται να είναι απαραίτητα για την φωτοεξαρτώμενη αποικοδόμιση της πρωτεΐνης.

Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η μεσολάβηση ακτινοβολίας στο φάσμα του κυανού, οδηγεί το μόριο σε μια στερεοχημική μετατροπή της δομής του στην οποία συμμετέχουν τόσο η PHR περιοχή όσο και το καρβοξυτελικό άκρο του μορίου. Αυτή η μετατροπή στη δομή, κάνει το μόριο δεκτικό σε παράγοντες όπως η ουμπικιτίνη, που σηματοδοτούν πιθανόν την πρωτεόλυση του στο πρωτεόσωμα (Shalitin και Lin, μη δημοσιευμένα δεδομένα).

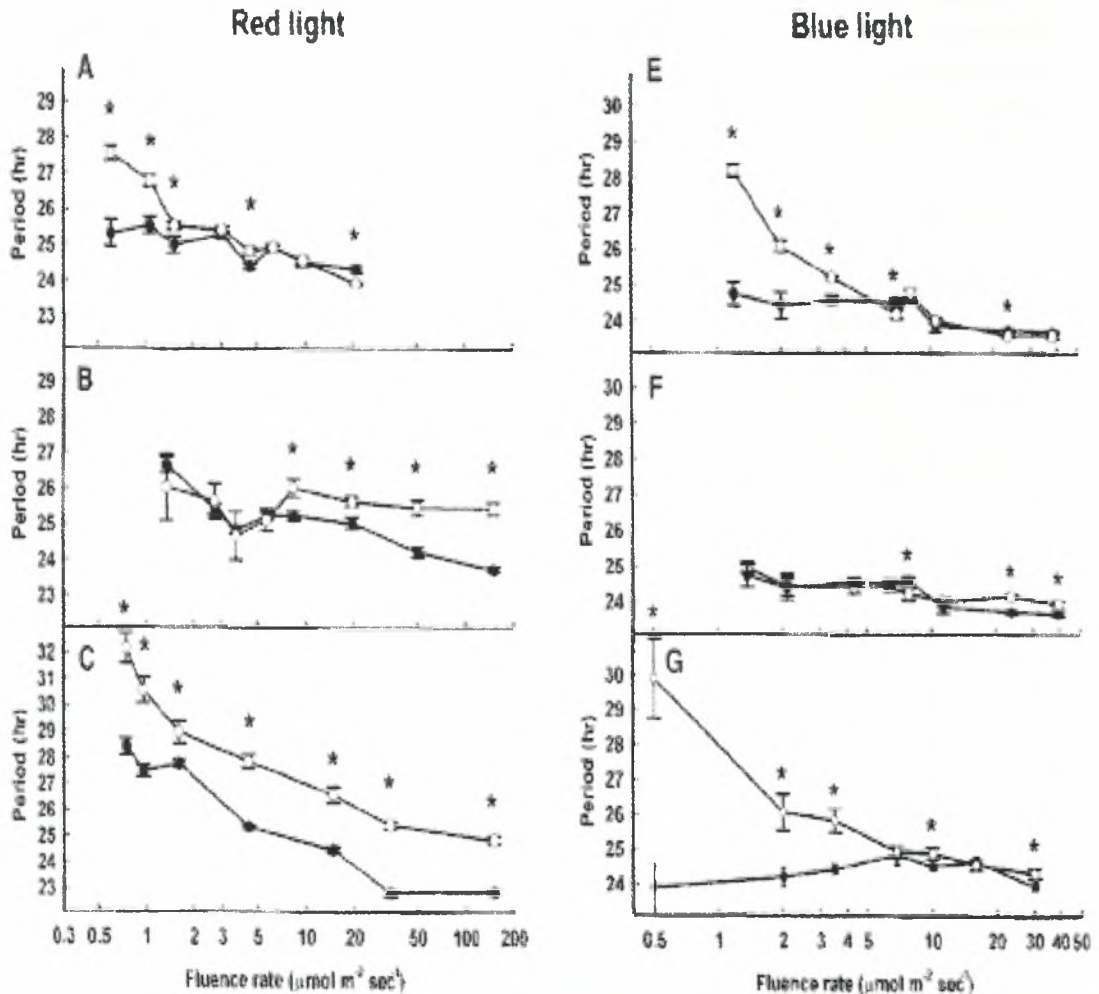
1.4.3 Η συνδυασμένη σηματοδότηση του κεντρικού ταλαντωτή

Όπως και τα φυτοχρώματα, έτσι και τα κρυπτοχρώματα εκδηλώνουν τη δράση τους μέσω ενός δικτύου σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν τον συνδυασμό της δράσης πολλών παραγόντων (φωτοϋποδοχέων και μη). Τόσο ο συνδυασμός όσο και η διακριτή δράση των φωτοϋποδοχέων στη φωτοεξαρτώμενη σηματοδότηση του κεντρικού ταλαντωτή, φανερώνεται με αλλαγές στην περίοδο των κικκαδικών ταλαντώσεων πολλών ρυθμικών γονιδίων κάτω από ποικίλες συνθήκες φωτός (όπως τα CAB γονίδια του φωτοσυλλεκτικού συμπλόκου PSII, σχήμα 1.7)

Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα CRY2 και PHYB αποδείχθηκαν έπειτα από ένα πλήθος ερευνών. Σε *in vitro* πειράματα τόσο με το σύστημα του διπλού υβριδίου σε φορέα ζύμης (Yeast-two Hybrid system) όσο και με συνδυασμένη ανοσοκατακρήμνιση (Coimmunoprecipitation) βρέθηκε ότι στο *Arabidopsis thaliana*, το CRY2 αλληλεπιδρά απευθείας με το PHYB (Mas, 2000). Επιπλέον με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού ενεργειακής μεταφοράς από συντονισμό (Fluorescent Resonance Energy Transfer – FRET) φανερώθηκε μια διαμοριακή μεταφορά ενέργειας ανάμεσα στις χμιαϊκές πρωτεΐνες CRY2-RFP και PHYB-GFP, υποδηλώνοντας έτσι την *in vivo* αλληλεπίδραση τους (Mas, 2000).

Η αποκάλυψη ότι η CRY2-RFP χίμαιρα (αλλά όχι η CRY1-RFP) συνεντοπίζεται στα πυρηνικά συσσωματώματα του PHYB φώτισε ακόμα περισσότερο τις άγνωστες μέχρι πριν πτυχές αυτής της αλληλεπίδρασης. Επιπροσθέτως σε πειράματα στο σύστημα του διπλού υβριδίου στη ζύμη, αποκαλύφθηκε ότι το CRY1 αλληλεπιδρά απευθείας με το PHYA και μάλιστα φωσφορυλιώνεται στο καρβοξυτελικό και όχι

στο αμινοτελικό του άκρο, από το τελευταίο. Ωστόσο το φυτόχρωμα PHYB, αν όντως φωσφορυλιώνει το CRY2, δεν πρέπει να είναι ο μοναδικός παράγοντας φωσφορυλίωσης του διότι κάτω από ποικίλες συνθήκες φωτός το κρυπτόχρωμα φωσφορυλιώνεται και σε μεταλλαγμένα φυτά ως προς το *PHYB*.

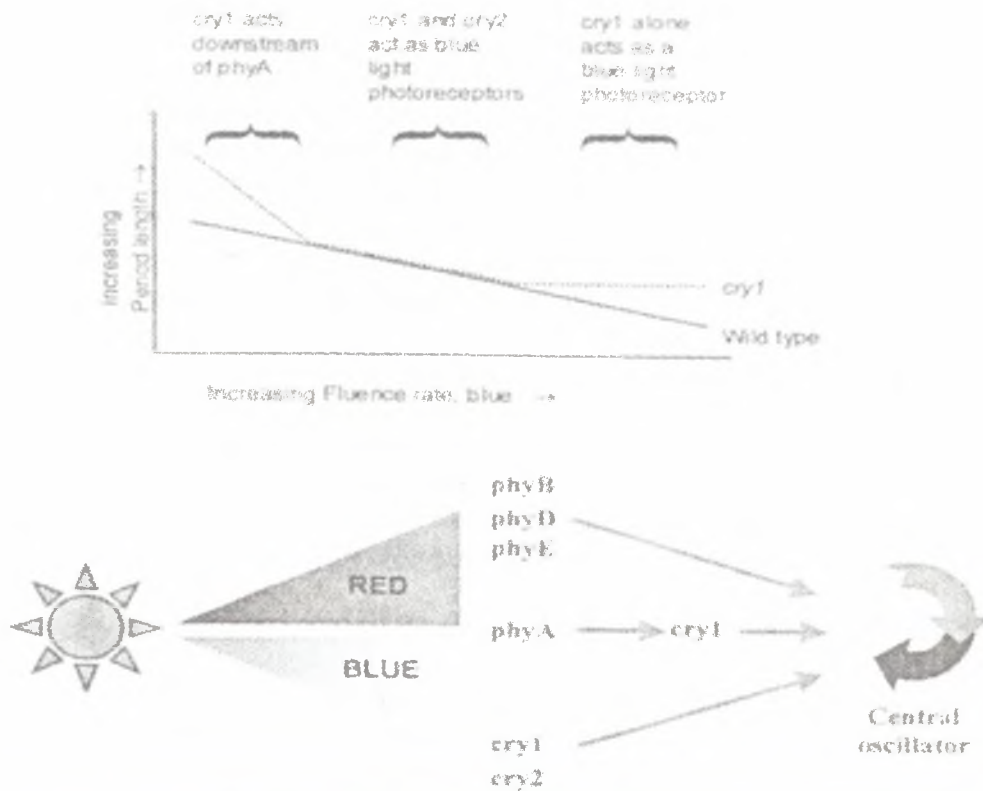


Σχήμα 1.7 : Επίδραση της έντασης και του φάσματος του φωτός στο μήκος της περιόδου των κυκλικών ταλαντώσεων της CAB2::LUC χίμαιρας όπως φανερώθηκε από in vivo μικροσκοπία φθορισμού σε φυτά *Arabidopsis* άγριου τύπου (κλειστός κύκλος) και μεταλλαγμένα ως προς τα μέλη των φυτοχρωμάτων (ανοιχτός κύκλος). (A) Άγριος τύπος και rhyA μετάλλαγμα υπό επίδραση ερυθρού φωτός. (B) Άγριος τύπος και rhyB μετάλλαγμα υπό επίδραση ερυθρού φωτός. (C) Άγριος τύπος και rhyA rhyB διπλό μετάλλαγμα υπό επίδραση ερυθρού φωτός. (E) Άγριος τύπος και rhyA μετάλλαγμα υπό επίδραση κυανού φωτός. (F) Άγριος τύπος και rhyB μετάλλαγμα υπό επίδραση κυανού φωτός. (G) Άγριος τύπος και rhyA rhyB διπλό μετάλλαγμα υπό επίδραση κυανού φωτός (ΠΗΓΗ : Paul F. Devlin και Steve A. Kay, 2000).

Η φωσφορυλίωση του CRY2 φαίνεται πάντως ότι γίνεται και ανεξάρτητα από τη δράση των φυτοχρωμάτων αφενώς διότι λαμβάνει χώρα σε φυτά που περιέχουν μεταλλάξεις σε όλα τα μέλη της οικογένειας και αφετέρου διότι δεν λαμβάνει χώρα υπό καθεστώς ερυθρού φωτός (*Shalitin* και *Lin*, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Συνεπώς τα φυτοχρώματα δεν φαίνεται να είναι οι κύριες κινάσες των κρυπτοχρωμάτων ενώ και άλλοι παράγοντες (όπως η καζεϊνική κινάση) μπορεί να παίζουν αυτό τον ρόλο μέσα στο κύτταρο (*Lin* και *Shalitin*, 2003).

Ωστόσο, τόσο το CRY1 όσο και το PHYB αλληλεπιδρούν και με τα μέλη της οικογένειας ZTL/LKP1/ADO1 όπως φανερώνουν *in vitro* πειράματα με το σύστημα του διπλού υβριδισμένου φορέα της ζύμης αλλά και με άλλες τεχνικές (Pull-Down assays). Όπως θα αναφερθεί πιο διεξοδικά στη συνέχεια, τα μέλη της οικογένειας ZTL/LKPA/ADO1 είναι πρωτεΐνες που περιέχουν ένα PAS μοτίβο, ένα F-box μοτίβο και έξι επαναλήψεις από το Kelch μοτίβο που μεσολαβούν αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες.

Με δεδομένο ότι πειράματα μεταλλάξεων που έγιναν στους ZTL/LKPA/ADO1 παράγοντες οδήγησαν σε αλλαγή των κερκαδικών ρυθμών πολλών μεταγραφικών παραγόντων κάτω από σταθερές συνθήκες φωτισμού, η αλληλεπίδραση των μελών αυτής της οικογένειας με τα PHYB και CRY1 αποτελεί ένα ακόμα μηχανισμό της κερκαδικής ρύθμισης στα φυτά (*Jarillo et al., 2001, Kiyosue et al., 2000, Somers et al., 2000*). Τέλος, συνδυασμένη δράση φαίνεται ότι υπάρχει ανάμεσα στα κρυτοχρώματα και στις φωτοτροπίνες για τον έλεγχο της αναστολής της αύξησης του υποκοτυλίου, μόλις αυτό βλαστήσει και δεχθεί φως στο φάσμα του κυανού. Συγκεκριμένα, η PHOT1 φαίνεται ότι είναι υπεύθυνη για την έναρξη της αναστολής ενώ τα κρυτοχρώματα ελέγχουν τη διατήρησή της (*Folta et al., 2001*).



Σχήμα 1.8 : Η σηματοδότηση του κεντρικού ταλαντωτή στο είδος *Arabidopsis thaliana*. Ανάλογα με την ποιότητα και την ένταση (*fluence rate*) του φωτός, διαφορετικός φωτοϋποδοχέας ή συνδυασμός φωτοϋποδοχέων έχει πρωταγωνιστικό ρόλο στη σηματοδότηση. (ΠΗΓΗ : Paul F. Devlin , 2002).

Το πλέον επικρατέστερο μοντέλο σχετικά με την σηματοδότηση του κεντρικού ταλαντωτή των φυτών από τους φωτοϋποδοχείς έχει ως εξής : οι χαμηλές εντάσεις φωτός στο φάσμα του κυανού αλλά και του ερυθρού, ελέγχονται από το PHYA και το CRY1 ενώ η ιεραρχία του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μονοπατιού θέλει το CRY1 να μεσολαβεί τη δράση του PHYA (Σχήμα 1.8). Σε συνθήκες μεσαίας έντασης

φωτός, το φωτοευαίσθητο φυτόχρωμα A αποικοδομείται και το ρόλο της σηματοδότησης στο φάσμα του ερυθρού, αναλαμβάνουν τα ανθεκτικά φυτόχρωμα (B-E) ενώ τον ρόλο της σηματοδότησης στο φάσμα του κυανού-υπεριώδους αναλαμβάνουν από κοινού τα CRY1 και 2.

Σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτός, το φωτοευαίσθητο CRY2 αποικοδομείται και παύει ο ρόλος του στη σηματοδότηση ενώ το CRY1 είναι πλέον ο κύριος μεσολαβητής της σηματοδότησης στο φάσμα του κυανού-υπεριώδους. Αυτή η πλαστικότητα της σηματοδότησης του κεντρικού ταλαντωτή ανάλογα με την ένταση και την ποιότητα του φωτός, δίνει ευελιξία στο φυτό να αντιλαμβάνεται καλύτερα τις συνθήκες του περιβάλλοντος ρυθμίζοντας την φυσιολογία του αναλόγως. Έτσι εξηγείται εξελικτικά και η ανάπτυξη αυτού του μεγάλου εύρους μορίων που δρουν σαν φωτουπόδοχοι στα φυτά, σε σχέση με άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

1.5 Ο κεντρικός ταλαντωτής του βιολογικού ρολογιού των φυτών

Όπως αναφέρθηκε ήδη, ο κεντρικός ταλαντωτής είναι η καρδιά του ρολογιού σε κάθε οργανισμό. Οι κεντρικοί ταλαντωτές (Central Oscillators) των οργανισμών δεν είναι τίποτα άλλο από αυτορυθμιζόμενους βρόγχους επανατροφοδότησης που αποτελούνται από συγκεκριμένους μεταγραφικούς παραγόντες (Autoregulatory Transcriptional Feedback Loops). Στο κερκαδικό ρολόι των φυτών, οι μεταγραφικοί παράγοντες που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα ότι δρουν στον κεντρικό ταλαντωτή του είδους *Arabidopsis thaliana* είναι οι CCA1 [Circadian Clock Associated 1, (Wang & Tobin, 1998)], LHY [Late Elongated Hypocotyl, (Schaffer et al., 1998)] που αποτελούν τα αρνητικά στοιχεία του βρόγχου και ο APRR1/TOC1 (Arabidopsis Pseudo-Response Regulator 1 / Timing Of Cab Expression 1, Strayer et al., 2000) ή απλά TOC1 παράγοντας, που αποτελεί το θετικό παράγοντα του βρόγχου.

Αναλύσεις κατά Northern ολικών εκχυλισμάτων RNA από φυτά, έδειξαν ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες LHY/CCA1 παρουσιάζουν μέγιστα επίπεδα έκφρασης των mRNA's τους την αυγή, είναι δηλαδή "πρωινά γονίδια" (Wang & Tobin, 1998; Schaffer et al., 1998 αντίστοιχα). Στον αντίποδα αυτού, ο TOC1 μεταγραφικός παράγοντας παρουσιάζει μέγιστο των επιπέδων έκφρασης του mRNA του κατά τη δύση και θεωρείται "απογευματινό γονίδιο" (Strayer et al, 2000).

1.5.1.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας TOC1

Ο παράγοντας TOC1 χαρακτηρίστηκε μεταγενέστερα των LHY/CCA1 παραγόντων, ως στοιχείο του κεντρικού ταλαντωτή στο είδος *Arabidopsis thaliana*. Το TOC1 γονίδιο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από την ερευνητική ομάδα του Steve A. Kay το 2000 σε μια απόπειρα ανίχνευσης γονιδίων που σχετίζονται με το ρολόι των φυτών (Strayer et al., 2000). Το πείραμα τους περιελάμβανε μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια και παρατήρηση του φαινοτύπου των φυτών για αλλαγές στην περιοδική έκφραση γνωστών ρυθμικών γονιδίων όπως τα "πρωινά" CAB γονίδια (από όπου πήρε το όνομα του ο παράγοντας, Timing of CAB Expression 1).

Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι ο φαινότυπος των *toc1*-μεταλλαγμένων φυτών, είχε μια μείωση της περιόδου των CAB γονιδίων (21 έναντι 24,5 ωρών σε φυτά φυσικού τύπου) σε συνθήκες συνεχούς φωτός (LL), όπως φανερώθηκε από την ταλάντωση του γονιδίου της λουσιφεράσης, συντηγμένου στον CAB υποκινητή. Ο συγκεκριμένος φαινότυπος παρατηρήθηκε και σε άλλα ρυθμικά γονίδια (όπως στο "απογευματινό"

γονίδιο *CCR2* / **Cold Circadian Rhythm - RNA-Binding 1**) αλλά όχι σε γονίδια τα οποία ρυθμίζονται απευθείας από το φώς.

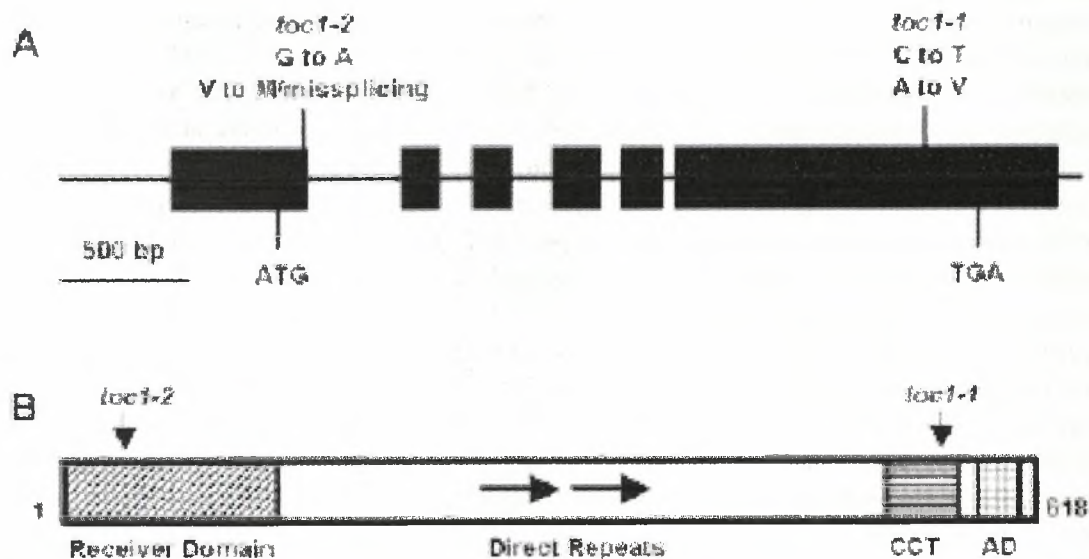
Επιπλέον πειράματα σε φυτά μετασχηματισμένα με την τεχνολογία του αντινοσηματικού RNA ως προς τον *TOC1* παράγοντα (*TOC1* Interference RNA/ RNAi) ελάττωσαν τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης του *TOC1* γονιδίου, με αποτέλεσμα να παρατηρείται σμίκρυνση της περιόδου στο ρυθμό των παραπάνω κερκαδικών γονιδίων (*Alabadi et al., 2003*). Στον αντίποδα αυτών, TMG φυτά (*TOC1* Mini Gene technology) στα οποία αυξήθηκε η γενετική δόση του *TOC1*, παρουσίασαν αύξηση της περιόδου σε ρυθμικά γονίδια (*Alabadi et al., 2003*).

Τα παραπάνω στοιχεία συνεπάγονται τη μεσολάβηση της πρωτεΐνης *TOC1* στην κερκαδική ρύθμιση των γονιδίων μετά την σηματοδότηση του κεντρικού ταλαντωτή από το φώς και γι' αυτό στον παράγοντα *TOC1* δεν αποδίδεται ρόλος φωτούποδοχέα. Σε αντίθετη περίπτωση αλλαγές στην ένταση αλλά και στην ποιότητα (φάσμα) του φωτός θα έδιναν διαφορετικό πρότυπο, ωστόσο η έκφραση των *CAB* γονιδίων σε *toc1*-μεταλλαγμένα φυτά είναι η ίδια, ανεξαρτήτως εξωτερικών συνθηκών (*Somers et al., 1999*). Αυτό σημαίνει ότι παρόλο που ο κεντρικός ταλαντωτής σηματοδοτείται κανονικά από τα μονοπάτια εισόδου, εντούτοις κάποιο στοιχείο του δυσλειτουργεί.

1.5.1.2 Δομή και χαρακτηρισμός του *TOC1*

Ο *TOC1* παράγοντας ανήκει στην *COL* (**Constans-Like**) οικογένεια. Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης περιέχει ένα μοτίβο ίδιο με την περιοχή υποδοχής σήματος που περιέχουν οι ρυθμιστές απόκρισης (**Response Regulators**) των συστημάτων μετάδοσης σήματος δύο παραγόντων (**Two-Component Signal Transduction systems**). Η τυπική λειτουργία αυτού του είδους των συστημάτων μετάδοσης σήματος, περιλαμβάνει σαν πρώτο παράγοντα μια κινάση-δέκτη, που αντιλαμβάνεται αλλαγές στις συνθήκες του περιβάλλοντος και μεταδίδει σήματα με αυτοφωσφορύλιωση ενός συντηρημένου κατάλοιπου ιστιδίνης (*Stock et al., 1991*). Στην συνέχεια αυτή η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται σε μια ασπαραγίνη, η οποία βρίσκεται στην περιοχή υποδοχής ενός ρυθμιστή απόκρισης, με τελικό αποτέλεσμα μια αλλαγή στη μεταγραφή γονιδίων-στόχων μέσω της ενεργοποίησής τους (*Stock et al., 1991*).

Ωστόσο ο παράγοντας *TOC1* έχει μια ιδιαιτερότητα και γι' αυτό χαρακτηρίζεται ως ψευδο-ρυθμιστής απόκρισης (**Pseudo-Response Regulator**). Η ιδιαιτερότητα συνίσταται στο ότι δύο από τρία λειτουργικά κατάλοιπα αμινοξέων στην *TOC1* πρωτεΐνη, έχουν αντικατασταθεί από άλλα αμινοξέα (Σχήμα 1.9). Στο κέντρο του μορίου υπάρχει μια περιοχή που αποτελείται από μια σχεδόν τέλεια επανάληψη μιας αλληλουχίας 47 αμινοξέων με άγνωστη λειτουργικότητα (*Strayer et al., 2000*). Ωστόσο, το χαρακτηριστικό των μελών της *COL* οικογένειας είναι η υψηλή συντήρηση του καρβοξυτελικού άκρου (**CCT motif**) καθώς και η ύπαρξη δύο αμινοτελικών δακτύλων ψευδαργύρου (**Zinc-Finger domains**, απουσιάζουν από τον *TOC1* παράγοντα, *Putterill et al., 1995 & 1997; Robert et al., 1998*). Το **CCT** μοτίβο στην πρωτεΐνη *TOC1* είναι μια περιοχή που αποτελείται από 45 αμινοξέα, πλούσια σε βασικά κατάλοιπα, η οποία περιέχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού [**NLS motif** (*Putterill et al., 1997*)]. Αμέσως μετά το **CCT** μοτίβο, εδρεύει η **AD** περιοχή που είναι πλούσια σε όξινα κατάλοιπα, χαρακτηριστικό γνώρισμα των μεταγραφικών ενεργοποιητών (*Cress et al., 1991*).



Σχήμα 1.9 : Η δομή του *TOC1* μεταγραφικού παράγοντα. (Α) Οργάνωση του *TOC1* γονιδίου. Τα μαύρα πλαίσια περιλαμβάνουν εξόνια ενώ οι ενδιάμεσες περιοχές, εσόνια. Φαίνονται επίσης τα κωδικόνια έναρξης και λήξης της μεταγραφής καθώς και τα σημεία των μεταλλάξεων του γονιδίου. (Β) Προβλεπόμενη δομή της *TOC1* πρωτεΐνης. Τα δύο βέλη σηματοδοτούν την διπλή επανάληψη μιας περιοχής από 47 αμινοξέα. Receiver Domain : Περιοχή Υποδοχής Σήματος., CCT : Constans Constans-like και *TOC1*, AD : Acidic-rich Domain. Φαίνονται και οι περιοχές μεταλλάξης που οδήγησαν στην μερική απώλεια δράσης της πρωτεΐνης. (ΠΗΓΗ : Strayer et al., Science 2000).

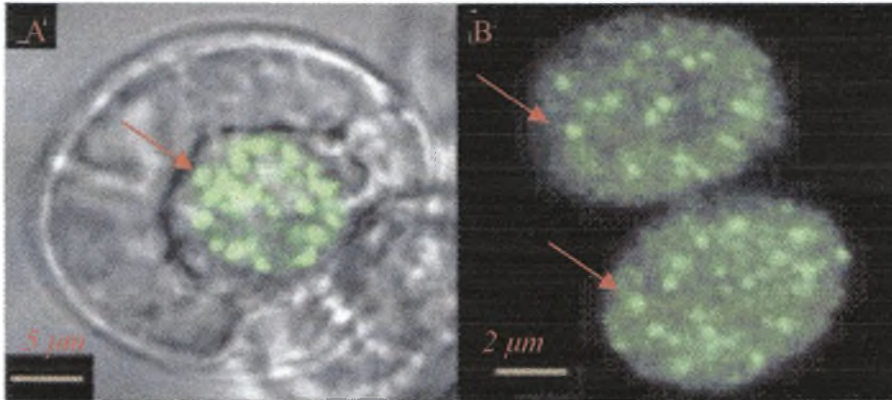
Η ύπαρξη μοτίβου πυρηνικού εντοπισμού υποδηλώνει ότι ο παράγοντας δρα στον πυρήνα. Το ίδιο συμπέρασμα, το επιβεβαίωσε και μικροσκοπία φθορισμού με το χιμαιρικό κατασκευάσμα *TOC1::YFP* (Yellow Fluorescent Protein – Κίτρινη Φθορίζουσα Πρωτεΐνη) η οποία έδειξε ότι σε συνθήκες σκοταδιού, ο παράγοντας εντοπίζεται στον πυρήνα.

Ο πυρηνικός εντοπισμός του παράγοντα δεν φαίνεται να είναι τυχαίος. Τα *TOC1::YFP* χιμαιρικά κατασκευάσματα εντοπίζονταν σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα στον πυρήνα, σχηματίζοντας έτσι πυρηνικά συσσωματώματα (Εικόνα 1.3, Strayer et al., 2000). Ανάλογες πυρηνικές δομές (συσσωματώματα) σχηματίζουν όπως έχει αναφερθεί και τα μέλη της τάξης των φυτοχρωμάτων κατά την είσοδο τους στον πυρήνα και την αλληλεπίδραση τους με τον PIF3 bHLH μεταγραφικό παράγοντα, έπειτα από ενεργοποίηση με υπέρυθρη ακτινοβολία.

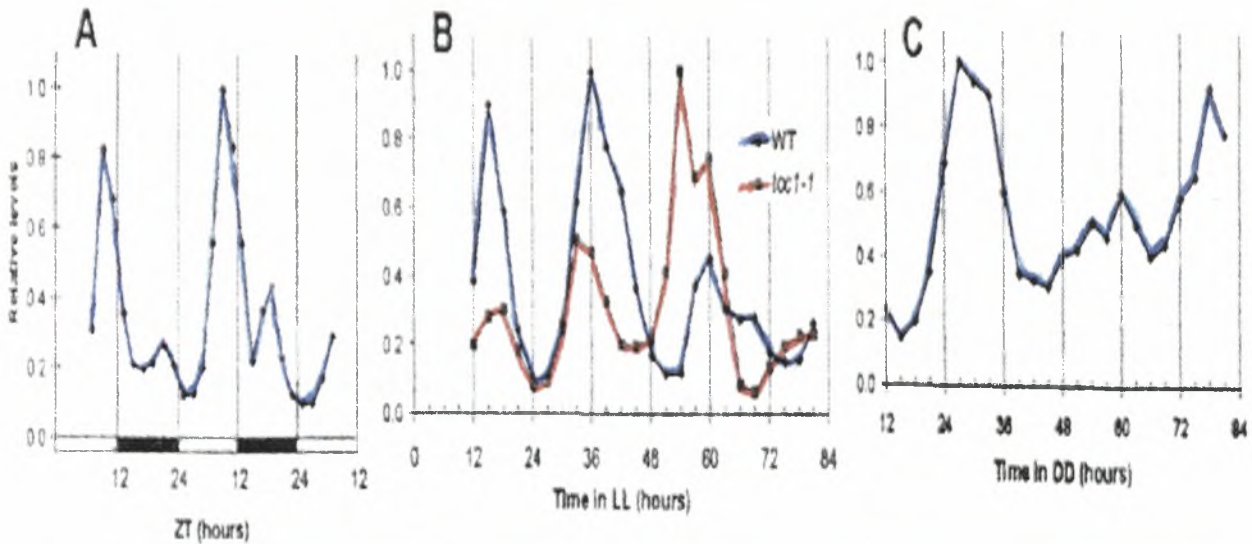
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο *TOC1* παράγοντας είναι ένα “απογευματινό” γονίδιο. Αυτό σημαίνει ότι τα επίπεδα του *TOC1* mRNA σε συνθήκες φωτοπεριόδου (LD) παρουσιάζουν μέγιστο προς το τέλος της ημέρας (Σχήμα 1.10 Α). Ως “απογευματινό” γονίδιο δεν παρουσιάζει το φαινόμενο της οξείας απόκρισης στο φως (acute response, βλ. παρακάτω). Ο ρυθμός του είναι καθαρά ενδογενής καθώς σε συνθήκες συνεχούς φωτός (LL συνθήκες) ο ρυθμός διατηρείται (Σχήμα 1.10 Β).

Η περίοδος των ταλαντώσεων των επιπέδων mRNA του παράγοντα μειώθηκε σε *toc1*-μεταλλαγμένα φυτά, γεγονός που υποδηλώνει ότι η *TOC1* πρωτεΐνη επανατροφοδοτεί την μεταγραφή του *TOC1* γονιδίου [Σχήμα 1.10 Β, (Strayer et al.,

2000)]. Σε σταθερές συνθήκες συνεχούς σκοταδιού (DD) ο ρυθμός μετά το πρώτο 24ωρο φθίνει (Σχήμα 1.10C).



Εικόνα 1.3 : Μικροσκοπία φθορισμού πρωτοπλάστων μετασχηματισμένων με το ένθεμα *YFP::TOC1*. Τα βέλη δείχνουν τα πυρηνικά *TOC1* συσσωματώματα στο πυρήνα του πρωτοπλάστη (A) Εναπόθεση των πυρηνικών συσσωματωμάτων από μικροσκοπία φθορισμού σε πυρήνα πρωτοπλάστων από μικροσκοπία ορατού φάσματος. (B) Μικροσκοπία φθορισμού δύο πυρήνων (ΠΗΓΗ : Strayer et al., Science 2000).



Σχήμα 1.10 : Μεταγραφικό προφίλ του *TOC1* όπως φανέρωσε η ανάλυση κατά Northern σε εκχύλισμα ολικού RNA. (A) Ο ρυθμός της έκφρασης του γονιδίου σε φυτά άγριου τύπου. Τα άσπρα πλαίσια αντιπροσωπεύουν τις ώρες της ημέρας που υπήρχε φως ενώ τα μαύρα, τις ώρες που υπήρχε σκοτάδι. Ο ρυθμός παρουσιάζει μέγιστο κατά τις απογευματινές ώρες, στη συνέχεια φθίνει σταδιακά κατά τη διάρκεια της νύχτας για να παρουσιάσει ελάχιστο τις πρώτες πρωινές ώρες και να ανέβει σταδιακά μέχρι το απόγευμα. (B) Ο ρυθμός της έκφρασης τόσο σε φυτά άγριου τύπου (μπλε γραμμή) όσο και σε *toc1*-μεταλλαγμένα φυτά (κόκκινη γραμμή) υπό συνθήκες συνεχούς φωτισμού (LL). Ενώ ο ρυθμός στα φυτά άγριου τύπου διατηρείται κανονικά, όπως και στην περίπτωση των φυτών υπό περίοδο στα *toc1*-μεταλλαγμένα φυτά η περίοδος του ρυθμού μικραίνει, γεγονός που υποδηλώνει ότι η *TOC1* πρωτεΐνη συμμετέχει στην επανατροφοδότηση της έκφραση του *TOC1* γονιδίου. (C) Ο ρυθμός της έκφρασης του γονιδίου υπό συνθήκες συνεχούς σκοταδιού σε φυτά άγριου τύπου. Απουσία φωτός, ο κεντρικός ταλαντωτής αδυνατεί να συγχρονιστεί και έτσι τα επίπεδα του παράγοντα ταλαντώνονται ενδογενώς για ένα 24ωρο και στη συνέχεια ο ρυθμός φθίνει. (ΠΗΓΗ : Strayer et al., Science 2000).

1.5.1.3 Η οικογένεια του TOC1 : Το APRR1 / TOC1 κοινότετο

Στο είδος *Arabidopsis thaliana* εκτός του παράγοντα *TOC1*, έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί και άλλοι 4 παράγοντες, των οποίων τα δομικά μοτίβα κατατάσσονται στους ψευδορυθμιστές απόκρισης (*Matsushika et al., 2002*). Αυτοί οι παράγοντες μαζί με τον *TOC1* αποτελούν την λεγόμενη τάξη των ψευδορυθμιστών απόκρισης στο είδος *Arabidopsis thaliana*, ή αλλιώς το *APRR1/TOC1* κοινότετο (*Arabidopsis Pseudo Response Regulator*).

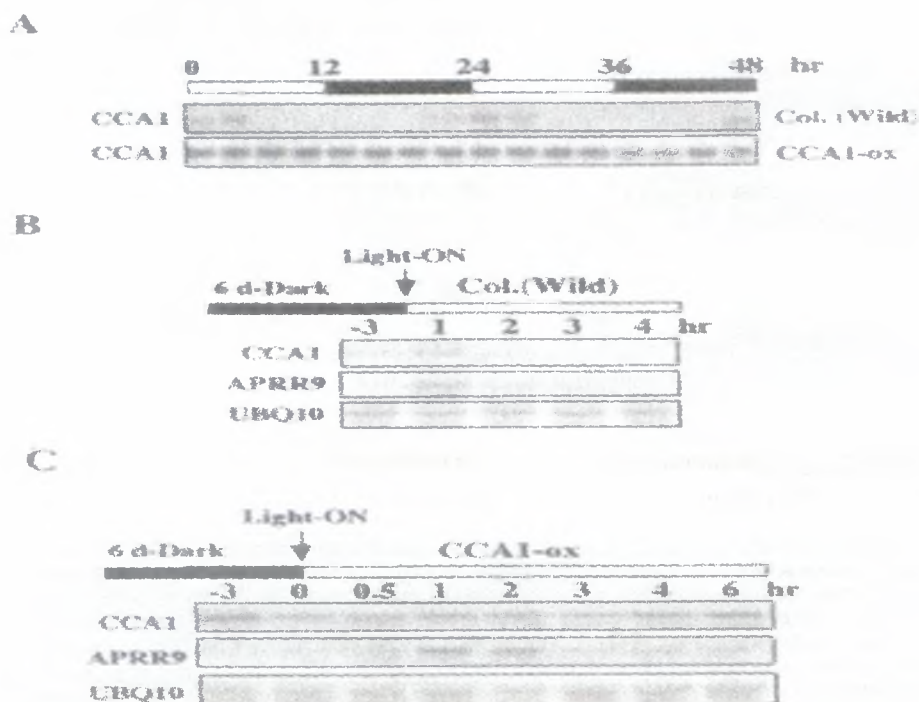
Εκτός του παράγοντα *APRR1/TOC1*, υπάρχουν και οι *APRR3*, *APRR5*, *APRR7* και *APRR9*. Το ξεχωριστό αυτής της τάξης έγκειται στο μεταγραφικό προφίλ των γονιδίων της. Παρόλο που στην ίδια τάξη ανήκει και ο παράγοντας *TOC1*, ένα αποκλειστικά “απογευματινό γονίδιο”, τα υπόλοιπα μέλη δεν μοιράζονται το ίδιο μεταγραφικό προφίλ. Όλα είναι κερκαδικά ρυθμιζόμενα γονίδια και εκτελούν 24ωρες ταλαντώσεις. Ωστόσο αυτές οι ταλαντώσεις είναι συντονισμένες μεταξύ τους. Ο παράγοντας *APRR9* διαφέρει τελείως από τον *APRR1/TOC1*. Η 24ωρη ταλάντωση του mRNA του εμφανίζει μέγιστο τις πρώτες πρωινές ώρες και μάλιστα εμφανίζει το φαινόμενο της οξείας απόκρισης, φαινόμενο συνδεδεμένο όπως αναφέρθηκε με τα πρωινά γονίδια.

Δύο με τρεις ώρες μετά το μέγιστο του ρυθμού του *APRR9*, εμφανίζει μέγιστο ο παράγοντας *APRR7*. Δύο με τρεις ώρες μετά το μέγιστο του ρυθμού του *APRR7* παράγοντα, εμφανίζει μέγιστο ο ρυθμός του παράγοντα *APRR3*. Μετά το πέρας των επομένων δύο με τριών ωρών και μετά το μέγιστο στο ρυθμό του *APRR3* παράγοντα και ενώ η μέρα πλησιάζει προς το σούρουπο, εμφανίζει το μέγιστο ο *APRR1/TOC1* παράγοντας όπως έχει ήδη περιγραφεί (*Matsushika et al., 2002*). Συνεπώς το σχήμα έχει ως εξής : *APRR9* (ξημέρωμα) → *APRR7* (πρωί) → *APRR5* (μεσημέρι) → *APRR3* (απόγευμα) → *APRR1/TOC1* (σούρουπο) (*Matsushika et al., 2000*, σχήμα 1.13 B).

Από τα παραπάνω γεννάται το ερώτημα εάν συνδέεται η διαδοχική αυτή έκφραση των συγκεκριμένων παραγόντων. Με άλλα λόγια αν ο ένας παράγοντας ρυθμίζει την έκφραση του επόμενου. Ένα τέτοιο ενδεχόμενο θα άλλαζε την μέχρι πρόσφατα εικόνα του ρολογιού των φυτών που θέλει τη ρύθμιση της έκφρασης του *TOC1* παράγοντα να είναι ανεξάρτητη από το φως και να εξαρτάται αποκλειστικά από τους *LHY/CCA1* παράγοντες, αφού όπως αναφέρθηκε ήδη τα μεταγραφικά επίπεδα του παράγοντα *APRR9* εμφανίζουν μέγιστο την αυγή και μάλιστα κατά φωτοεπαγώμενο τρόπο.

Σε μια απόπειρα να καθοριστεί το πλαίσιο των αλληλεπιδράσεων των παραγόντων *APRR* με άλλα στοιχεία του ρολογιού, ο Mizuno και οι συνεργάτες του έλεγξαν το μεταγραφικό προφίλ των παραγόντων *APRR* σε φυτά που υπερεκφράζουν το *CCA1*. Όπως θα αναλυθεί παρακάτω, ο ρυθμός του *APRR1/TOC1* παράγοντα σε φυτά που υπερεκφράζουν είτε το *LHY* είτε το *CCA1* γονίδιο, πέφτει ταχύτατα σε μηδενικό επίπεδο ανεξαρτήτως των συνθηκών φωτοπεριόδου (LD ή LL ή DD).

Ο πρώτος παράγοντας που αναλύθηκε ήταν ο *APRR9*. Η ανάλυση κατα Northern σε RNA φυτών φυσικού τύπου έδειξε, ότι το *CCA1* και το *APRR9* γονίδιο έχουν το ίδιο μεταγραφικό προφίλ δηλαδή είναι και τα δύο φωτοεπαγώμενα και το μέγιστο του ρυθμού τους φανερώνεται τις πρώτες πρωινές ώρες σε συνθήκες φωτοπεριόδου (Σχήμα 1.11B). Η ανάλυση κατα Northern σε φυτά που υπερέκφραζαν το *CCA1* και που αναπτύσσονταν σε συνθήκες φωτοπεριόδου, φάνερωσε ότι το μεταγραφικό προφίλ του *APRR9* παράγοντα έμεινε ανεπηρέαστο σε σχέση με το αντίστοιχο στα φυτά φυσικού τύπου, δηλαδή ο παράγοντας έδειξε ρυθμικά επίπεδα στη μεταγραφή του, με το μέγιστο να εμφανίζεται τις πρώτες πρωινές ώρες (Σχήμα 1.11C).

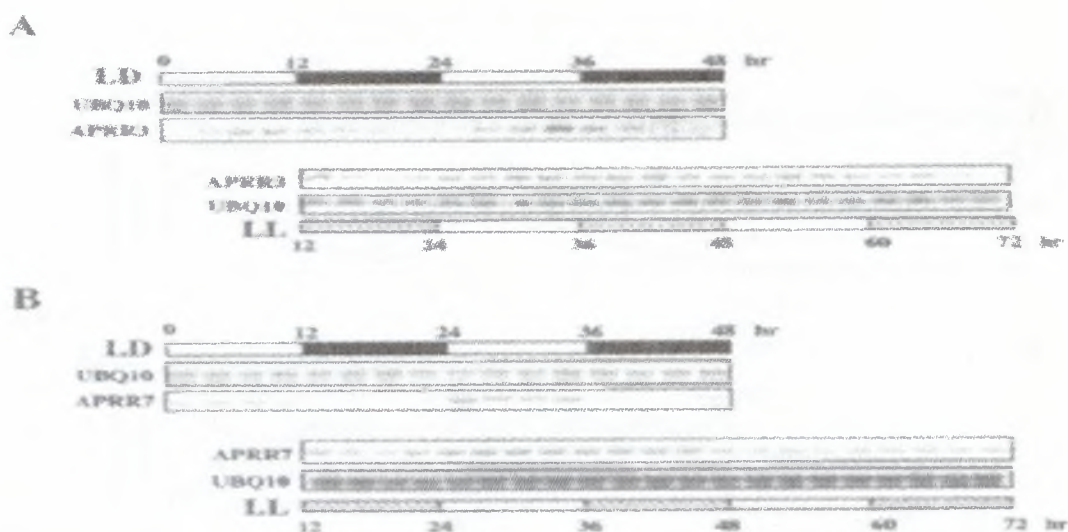


Σχήμα 1.11 : Μεταγραφικό προφίλ του *APRR9* παράγοντα υπό το φάσμα της *CCA1* υπερέκφρασης. (Α) Ανάλυση κατά Northern των επιπέδων έκφρασης του *CCA1* σε φυτά άγριου τύπου (*Col.*) και φυτά που υπερεκφράζουν το *CCA1* (*CCA1-ox*) (Β) Σύγκριση του *CCA1* και *APRR9* μεταγραφικού προφίλ σε φυτά άγριου τύπου. (Γ) Σύγκριση του *CCA1* και *APRR9* μεταγραφικού προφίλ σε φυτά που υπερεκφράζουν το *CCA1* (*CCA1-ox*). Η έκφραση του *APRR9* σε αυτά τα φυτά παραμένει η ίδια, όπως στην περίπτωση των φυτών άγριου τύπου και εξαρτάται από το φως. (ΠΗΓΗ : Matsushika et al., 2002).

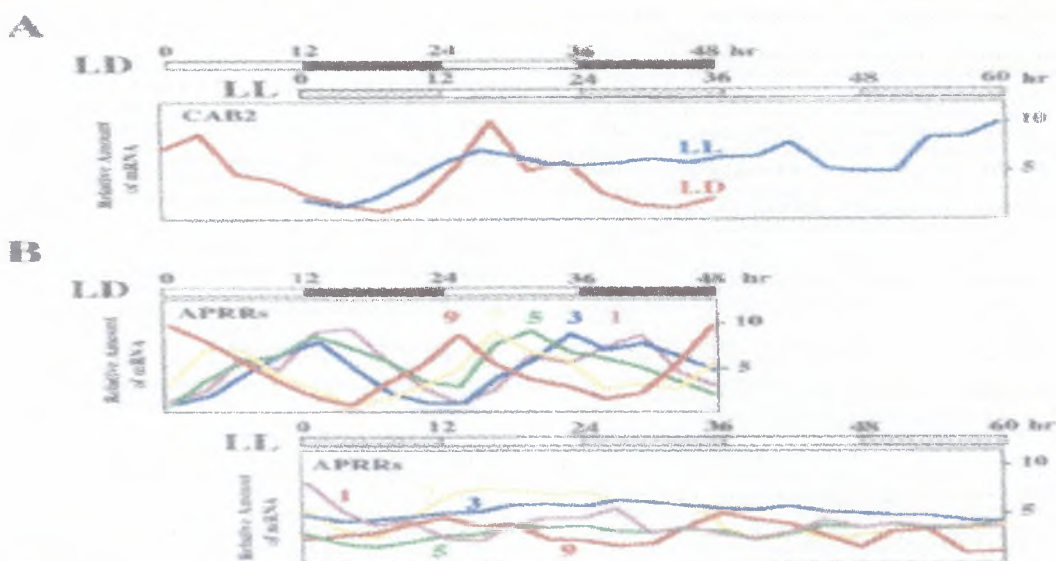
Αντίστοιχα πειράματα στο ίδιο μετάλλαγμα έγιναν και για τους παράγοντες *APRR3* και *APRR7*. Υπενθυμίζεται ότι ο ρυθμός του *APRR3* παράγοντα εμφανίζει μέγιστο 2 ώρες πριν από το μέγιστο του ρυθμού του *APRR1/TOC1* παράγοντα κατά τις απογευματινές ώρες. Η κατα Northern ανάλυση έδειξε ότι σε συνθήκες φωτοπεριόδου (12L : 12D), το μεταγραφικό προφίλ του παράγοντα ήταν το ίδιο με αυτά σε φυτά φυσικού τύπου υπό τις ίδιες συνθήκες (Σχήμα 1.12 Α, Matsushika et al., 2000). Ωστόσο η Northern ανάλυση που έγινε σε φυτά της σειράς που υπερεκφράζει το *CCA1*, σε συνθήκες συνεχούς φωτός έδειξε ότι ο ρυθμός του *APRR3* παράγοντα χάθηκε και η έκφραση παρέμεινε συνεχώς σε σταθερά επίπεδα. Τα ίδια παρατηρήθηκαν και για τον *APRR7* παράγοντα, του οποίου ο ρυθμός παρουσιάζει μέγιστο 4 ώρες πριν τον *APRR3* παράγοντα και 6 ώρες πριν τον *APRR1/TOC1* παράγοντα (Σχήμα 1.12 Β, Matsushika et al., 2000).

Συμπερασματικά λοιπόν, μπορεί να λεχθεί ότι σε συνθήκες φωτοπεριόδου (12L : 12D), η υπερέκφραση του παράγοντα *CCA1* δεν επηρεάζει την φυσιολογική ρυθμική μεταγραφή των *APRR9-APRR3* (Σχήμα 1.13 Β Matsushika et al., 2002) οι οποίοι συνεχίζουν την συντονισμένη ρυθμική τους έκφραση. Αντίθετα η υπερέκφραση του παράγοντα *CCA1* σε συνθήκες συνεχούς φωτός, επηρεάζει δραματικά την έκφραση των μελών του *APRR* κοινιτέτου, μεταβάλλοντας τα σε μη ρυθμικά (Σχήμα 1.13 C, Matsushika et al., 2002). Ο τελευταίος φαινότυπος είναι ίδιος με το φαινότυπο της έκφρασης των *CAB* γονιδίων σε φυτά που υπερεκφράζουν τον παράγοντα *CCA1* υπό συνθήκες συνεχούς φωτός (Σχήμα 1.13 Α, Matsushika et al.,

2002). Συνεπώς προκύπτει ότι η ρυθμική έκφραση του *APRR* κοιντέτου είναι φωτοεξαρτώμενη λόγω του παράγοντα *APRR9*, ενώ παράλληλα στη ρύθμιση της συμμετέχει και ο παράγοντας *CCA1*.



Σχήμα 1.12 : Μεταγραφικό προφίλ των *APRR* σε συνθήκες συνεχούς φωτός (*LL*) και υπό το φάσμα της *CCA1* υπερέκφρασης. (**A**) Μεταγραφικό προφίλ του *APRR3* σε φωτοπερίοδο (πάνω) και συνεχές φως (κάτω). (**B**) Μεταγραφικό προφίλ του *APRR7* σε φωτοπερίοδο (πάνω) και συνεχές φως (κάτω). Και στα δύο γονίδια παρατηρείται απώλεια του ρυθμού, με συνεχή επίπεδα έκφρασης όταν το *CCA1* υπερεκφράζεται και τα φυτά αναπτύσσονται υπό συνθήκες συνεχούς φωτός, σε αντίθεση με τις συνθήκες φωτοπεριόδου, όπου η υπερέκφραση του *CCA1* δεν επηρεάζει την ταλάντωση των *APRR* 3 και 7. (**ΠΗΓΗ :** Matsushika et al., 2002).



Σχήμα 1.13 : Το μεταγραφικό προφίλ των *CAB* γονιδίων και του *APRR* κοιντέτου σε συνθήκες φωτοπεριόδου και συνεχούς φωτός υπό την επίδραση της *CCA1* υπερέκφρασης (**A**) Μεταγραφικό προφίλ των *CAB* γονιδίων σε φωτοπερίοδο (κόκκινη καμπύλη) και συνεχές φως (μπλέ καμπύλη). (**B**) Μεταγραφικό προφίλ του *APRR* κοιντέτου σε συνθήκες φωτοπεριόδου (πάνω) και συνεχούς φωτός (κάτω) σε *CCA1-ox* φυτά. Στην δευτέρα περίπτωση ο ρυθμός φθίνει. (**ΠΗΓΗ :** Matsushika et al., 2002).

1.5.1.4 Ο ZTL (ZEITLUPE) παράγοντας και η αποικοδόμηση της APRRI/TOC1 πρωτεΐνης

Στην ενότητα των φυτικών φωτούποδοχέων (1.4), έγινε μια σύντομη παραπομπή στην οικογένεια *ZTL/FKF1/LKP2* και στον παράγοντα *ZTL* (ZEITLUPE). Όπως αναφέρθηκε, η *ZTL* πρωτεΐνη συνδυάζει μοναδικά μοτίβα που της δίνουν ένα ξεχωριστό ρόλο μέσα στο κύτταρο (Σχήμα 1.3). Πρώτα από όλα, στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, εδρεύει ένα PAS/LOV μοτίβο. Αυτό το μοτίβο είναι υπεύθυνο για τη δέσμευση με ομοιοπολικούς δεσμούς του χρωμοφόρου του συγκεκριμένου φωτούποδοχέα, ενός μονονουκλεοτιδίου φλαβίνης (FMN). Μεταλλάξεις σε αυτή την περιοχή της πρωτεΐνης έδειξαν σοβαρές αλλαγές σε κερκαδικούς ρυθμούς κατά φωτοεξαρτώμενη τρόπο, που πιθανότητα σχετίζονται με την αδυναμία του μορίου να προσελκύσει το απαραίτητο χρωμοφόρο για την φωτοεξαρτώμενη λειτουργία του (Somers et al., 2000).

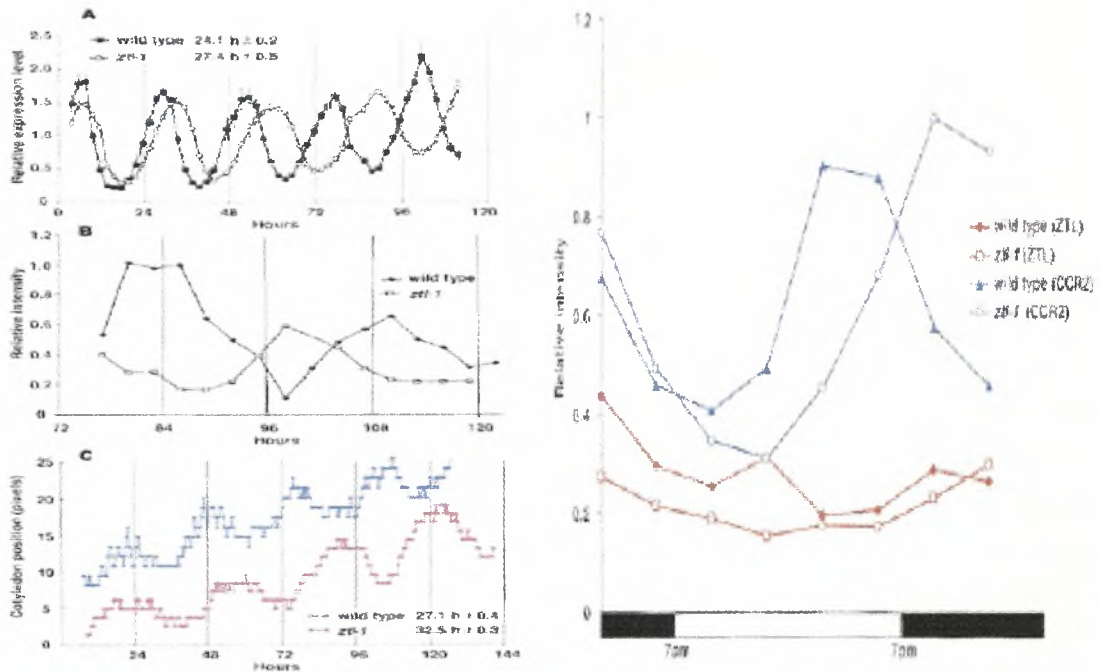
Το δεύτερο πολύ ενδιαφέρον μοτίβο του συγκεκριμένου παράγοντα, βρίσκεται περίπου στο μεσαίο τμήμα της *ZTL* πρωτεΐνης και λέγεται F-πλαίσιο. Το F-πλαίσιο είναι κοινό σε πρωτεΐνες που μεσολαβούν σηματοδότηση άλλων πρωτεϊνών με ουρά πολυουμπικιτίνης. Τα πρωτεϊνικά μόρια που σημαίνονται κατ' αυτόν τον τρόπο, οδηγούνται στο πρωτεόσωμα για αποικοδόμηση. Τέλος στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου, εδρεύει μια περιοχή που συνίσταται από έξη επαναλήψεις του μοτίβου Kelch. Το μοτίβο Kelch έχει συνδεθεί με αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (Somers et al., 2000).

Ο παράγοντας απομονώθηκε, όπως και πολλοί άλλοι, με βάση αλλαγές που προκαλούσαν μεταλλάξεις του, στην περίοδο των ταλαντώσεων γνωστών ρυθμικών γονιδίων. Ο Somers και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν ως γονίδιο αναφοράς, το γονίδιο της λουσιφεράσης, συντηγμένο στον υποκινητή *CAB* (Σχήμα 1.14 A). Στα φυτά φυσικού τύπου, το mRNA του παραπάνω γονιδίου αναφοράς, εκτελεί κερκαδικές ταλαντώσεις με περίοδο 24,1 ωρών και μέγιστο κατά τις πρώτες υποκειμενικές (subjective) πρωινές ώρες σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού. Από τα *CAB::LUC* μετασηματισμένα φυτά απομονώθηκε με την τεχνική της μεταλλαξιγένεσης, μια γονιδιακή θέση που εδρεύει στο χρωμόσωμα 5 και του οποίου η μετάλλαξη, αυξάνει την περίοδο της ταλάντωσης του *CAB::LUC* σε 27,4 ώρες έναντι 24,1 του φυσικού τύπου υπό συνεχές φως. Αυτή η γονιδιακή θέση ονομάστηκε *ZTL* (ZEITLUPE, Somers et al., 2000). Η επιμήκυνση της φωτοπεριόδου παρατηρήθηκε και σε “απογευματινά γονίδια” (όπως το *CCR2*, Σχήμα 1.14B) αλλά και στις κινήσεις των κοτυληδόνων (Σχήμα 1.14C). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η έκφραση του ίδιου του *ZTL* παράγοντα δεν είναι ρυθμική (Σχήμα 1.14D).

Η πρώτη σύνδεση του *ZTL* με τον *APRR1/TOC1* παράγοντα έγινε όταν ο Kay και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι η χρήση του συστήματος του διπλού υβριδίου σε φορέα ζύμης που συνέκφραζε το *TOC1* και το *ZTL* γονίδιο, φανέρωσε μια ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αντίστοιχων πρωτεϊνών (Mas et al., 2003). Επιπλέον παρατηρήθηκε, ότι *TOC1-RNAi* (RNA Interference technology) σειρές με *ztl-1*-μεταλλαγμένο φαινότυπο που συνεπάγεται ολική απώλεια δράσης της *ZTL* πρωτεΐνης υπό συνεχές φως (LL συνθήκες), εμφάνισαν ίδιο φαινότυπο (σμίκρυνση της περιόδου του *CAB::LUC* κατασκευάσματος κατά 3-4 ώρες σε σχέση με φυτά φυσικού τύπου) με *TOC1-RNAi* σειρές που είχαν λειτουργική *ZTL* πρωτεΐνη. Αυτό συνεπάγεται ότι για να εκδηλώσει την δράση του ο *ZTL* παράγοντας, απαιτεί λειτουργική *TOC1* πρωτεΐνη (Mas et al., 2003).

Σε αντίθεση, TMG φυτά (Mini Gene technology) με το υπόβαθρο της *ztl-1*-μετάλλαξης, εμφάνισαν μεγαλύτερες περιόδους και ασθενέστερη ρυθμικότητα ως

προς το *CAB::LUC* κατασκευάσμα σε σχέση με απλά *ztl-1*-μεταλλαγμένα ή TMG φυτά. Συνεπώς ο φαινότυπος που εκδηλώνει πλεονάζουσα ποσότητα TOC1 πρωτεΐνης στην περίοδο άλλων ρυθμικών γονιδίων, ενισχύθηκε από την απουσία δράσης του ZTL παράγοντα (Mas et al., 2003).

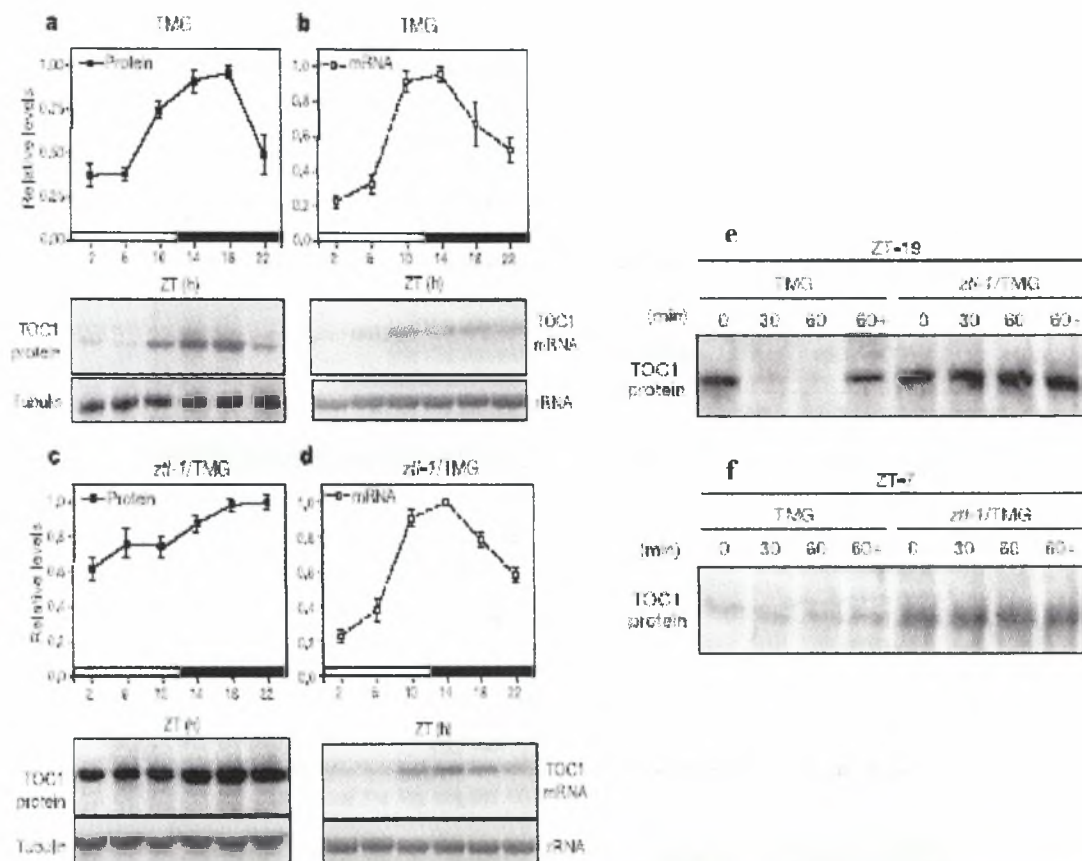


Σχήμα 1.14 : Οι μεταλλάξεις στο ZTL γονίδιο επηρεάζουν την κυρκαδική έκφραση υπό συνθήκες συνεχούς φωτός. (A) Στα *ztl*-μεταλλαγμένα φυτά, η περίοδος του ρυθμού του *CAB::LUC* κατασκευάσματος είναι μεγαλύτερη (27.4 h) σε σχέση με την περίοδο του ίδιου ρυθμού σε φυτά άγριου τύπου (24.1 h). (B) Αντίστοιχη επιμύκηση της περιόδου λαμβάνει χώρα και σε απογευματινά γονίδια όπως το *CCR2*. (C) Η *ztl* μετάλλαξη επηρεάζει και τον ρυθμό της κίνησης των κοτυληδόνων σε σχέση με τον αντίστοιχο ρυθμό σε φυτά άγριου τύπου. (D) Το μεταγραφικό προφίλ του ZTL παράγοντα αντιθέτως δεν είναι ρυθμικό (κόκκινη γραμμή) τόσο σε φυτά άγριου τύπου όσο και σε *ztl1*-μεταλλαγμένα φυτά, σε αντίθεση με το απογευματινό γονίδιο *CCR2* όπου σε φυτά άγριου τύπου εμφανίζεται τυπική περιοδική ταλάντωση ενώ σε *ztl1*-μεταλλαγμένα φυτά, η περίοδος της ταλάντωσης του επιμηκώνεται. Τα μαύρα πλαίσια αντιπροσωπεύουν τις ώρες διάρκειας της νύχτας και τα άσπρα τις ώρες διάρκειας της μέρας. (ΠΗΓΗ : Somers et al., 2000).

Επιπροσθέτως ανάλυση σε TMG φυτά υπό συνθήκες φωτοπεριόδου (12 ώρες φώς / 12 ώρες σκοτάδι) έδειξαν ότι ο ρυθμός της TOC1 πρωτεΐνης ακολουθούσε τον ρυθμό του *TOC1* mRNA με μια μικρή υστέρηση που απαιτούσε η σύνθεση της πρωτεΐνης [Σχήμα 1.15 A και B, (Mas et al., 2003)]. Αξιοσημείωτο ωστόσο ήταν, ότι TMG φυτά, υπό το φάσμα της *ztl-1*-μετάλλαξης παρουσίασαν απώλεια του ρυθμού της TOC1 πρωτεΐνης υπό συνθήκες φωτοπεριόδου, αλλά ο ρυθμός του *TOC1* mRNA διατηρήθηκε αναλλοίωτος (Σχήμα 1.15 C και D, (Mas et al., 2003)). Συνεπώς συμπεραίνεται ότι ο ZTL παράγοντας συμμετέχει σε έναν μετά-μεταφραστικό μηχανισμό ρύθμισης του *TOC1* γονιδίου.

Το επόμενο που διαπίστωσε ο Kay και οι συνεργάτες του ήταν ότι η αποικοδόμηση της TOC1 πρωτεΐνης λαμβάνει χώρα σε κάποια συγκεκριμένη φάση της *TOC1* ταλάντωσης. *In vitro* πειράματα που περιελάμβαναν δείγματα από το μέγιστο (ZT-19) και από το ελάχιστο (ZT-7) του *TOC1* ρυθμού σε TMG φυτά, με και χωρίς την *ztl-1*-μετάλλαξη, έδειξαν ότι παρουσία λειτουργικής ZTL πρωτεΐνης, στο μέγιστο του

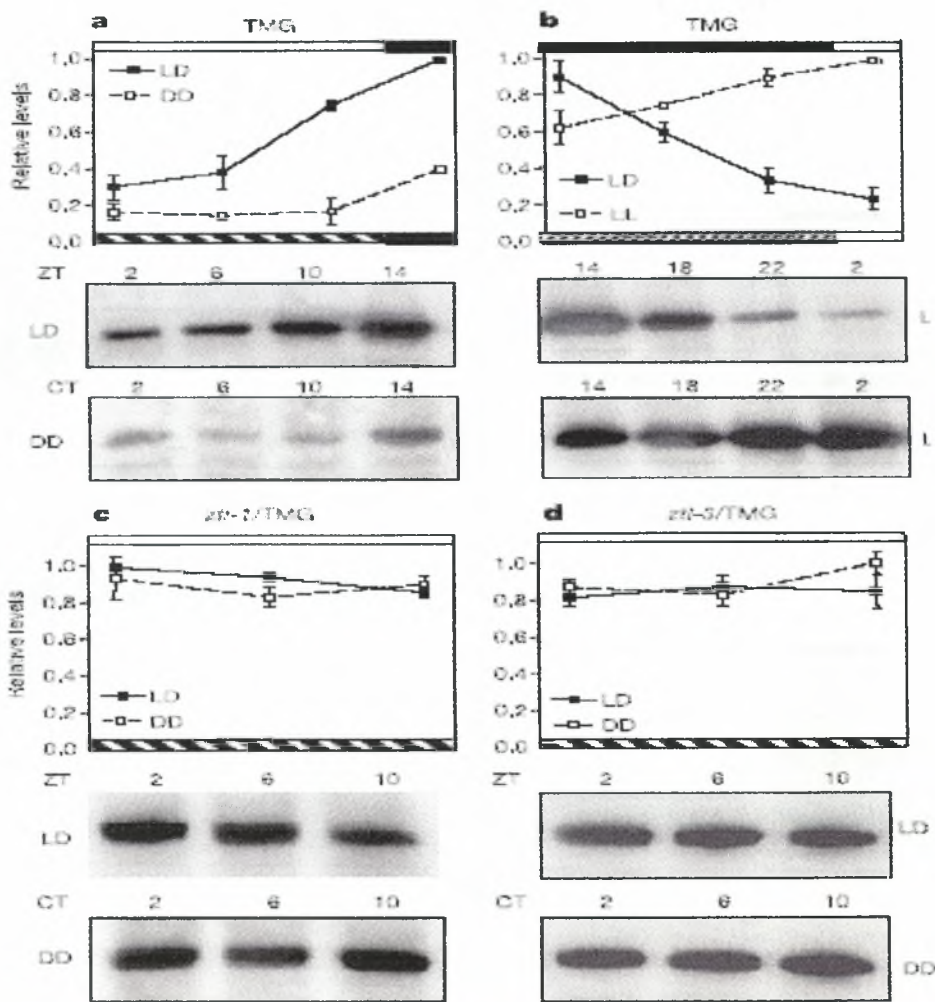
ρυθμού, η TOC1 πρωτεΐνη αποικοδομείται ταχύτατα μέσα σε 30 λεπτά (Σχήμα 1.15 A, *Mas et al., 2003*). Καταστολή της αποικοδόμησης έγινε με προσθήκη αναστολέων του πρωτεοσώματος, επιβεβαιώνοντας την συμμετοχή του τελευταίου στην ZTL-εξαρτώμενη αποικοδόμηση της TOC1 πρωτεΐνης. Στα δείγματα από τα *ztl-1*-μεταλλαγμένα φυτά, αντίθετως τα επίπεδα της TOC1 πρωτεΐνης στο μέγιστο του ρυθμού διατηρήθηκαν αναλοίωτα (Σχήμα 1.15 E, *Mas et al., 2003*). Στο ελάχιστο του ρυθμού δεν σημειώθηκε διαφορά στα επίπεδα της πρωτεΐνης σε κανένα τύπο φυτού (Σχήμα 1.15 F, *Mas et al., 2003*).



Σχήμα 1.15 : Ο ρυθμός του TOC1 mRNA και της TOC1 πρωτεΐνης υπό συνθήκες φωτοπεριόδου. (A και B) Ο ρυθμός του TOC1 mRNA και της TOC1 πρωτεΐνης παραμένει φυσιολογικός σε TMG φυτά, με τα επίπεδα του mRNA να σημειώνουν μέγιστο στο τέλος της ημέρας και τα επίπεδα της πρωτεΐνης να εμφανίζουν μια υστέρηση των 2-3 ωρών. (C και D) Υπό το φάσμα της *ztl-1*-μετάλλαξης, ο ρυθμός της TOC1 πρωτεΐνης φθίνει διατηρώντας συνεχώς μέγιστο, ενώ του TOC1 mRNA παραμένει αναλοίωτος, υποδηλώνοντας την συμμετοχή του ZTL σε ένα μετα-μεταφραστικό μηχανισμό. (E) Στο μέγιστο του TOC1 ρυθμού (ZT-19), η αποικοδόμηση λαμβάνει χώρα ταχύτατα παρουσία λειτουργικού ZTL παράγοντα σε αντίθεση με την απουσία αυτού. (F) Στο ελάχιστο του TOC1 ρυθμού δεν παρατηρείται αποικοδόμηση σε κανένα τύπο δείγματος. Τα άσπρα και μαύρα πλαίσια υποδηλώνουν μέρα και νύχτα αντίστοιχα. (ΠΗΓΗ : *Mas et al., 2003*).

Τέλος διαπιστώθηκε ότι η αποικοδόμηση της TOC1 πρωτεΐνης από τον ZTL παράγοντα είναι σκοτοεξαρτώμενη καθώς συμβαίνει απουσία φωτός. Οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν τα επίπεδα της TOC1 πρωτεΐνης σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού (LL) και σκότους (DD) μετά από παραμονή και συντονισμό του ρυθμού σε συνθήκες φωτοπεριόδου (LD). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, η παρουσία του

λειτουργικού *ZTL* παράγοντα απώλεσε τον ρυθμό της TOC1 πρωτεΐνης, κρατώντας συνεχώς χαμηλά τα επίπεδα της υπό συνθήκες συνεχούς σκοταδιού, σε σχέση με τα δείγματα που παρέμειναν στη φωτοπερίοδο (Σχήμα 1.16 A, Mas et al., 2003). Το αντίθετο συνέβη στα δείγματα που παρέμειναν σε συνεχές φως, παρουσία του *ZTL* παράγοντα καθώς λόγω του φωτός ο *ZTL* παράγοντας δεν αποικοδόμησε την TOC1 πρωτεΐνη με αποτέλεσμα να διατηρούνται τα επίπεδα της συνεχώς υψηλά (Σχήμα 1.16 B, Mas et al., 2003). Σε *ztl-1*-μεταλλαγμένα φυτά, η απώλεια δράσης του *ZTL* παράγοντα οδήγησε σε απώλεια του ρυθμού της TOC1 πρωτεΐνης διατηρώντας τα επίπεδα της υψηλά, ανεξαρτήτως συνθηκών (Σχήμα 1.16 C και D, Mas et al., 2003).



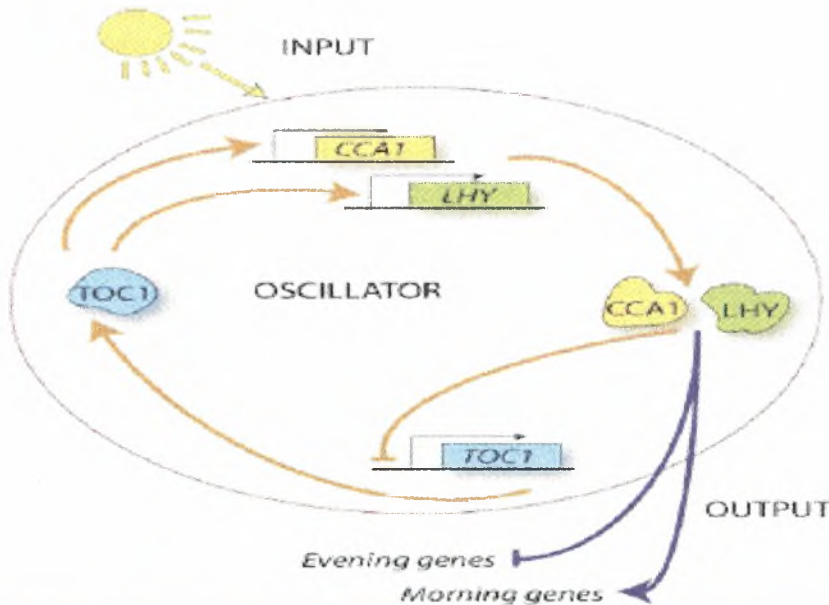
Σχήμα 1.16 : Η επαγόμενη από το σκοτάδι, δράση του *ZTL* παράγοντα. (a) Η παρουσία λειτουργικού *ZTL* υπό συνθήκες συνεχούς σκότους, αποικοδομεί την TOC1 πρωτεΐνη και καταργεί τον ρυθμό της διατηρώντας την σε μηδαμινά επίπεδα, σε αντίθεση με την ύπαρξη φωτοπεριόδου. (b) Αν και ο *ZTL* παράγοντας είναι λειτουργικός, η συνεχής ύπαρξη φωτός τον εμποδίζει να εκδηλώσει την δράση του με αποτέλεσμα να καταργείται ο ρυθμός της TOC1 πρωτεΐνης και τα επίπεδα της να διατηρούνται συνεχώς υψηλά. (c και d) Η απουσία λειτουργικού *ZTL* παράγοντα, διατηρεί τα επίπεδα της TOC1 πρωτεΐνης συνεχώς υψηλά, καταργώντας τον ρυθμό της, ανεξαρτήτως εξωτερικών συνθηκών. (ΠΗΓΗ : Mas et al., 2003)

Από τα παραπάνω συμπεράσματα, ο Kay και οι συνεργάτες του, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο *ZTL* παράγοντας σημαίνει την TOC1 πρωτεΐνη με ουρά πολυ-ομπικιτίνης, οδηγώντας την προς αποικοδόμηση στο πρωτεόσωμα, κάτω από

συνθήκες σκότους. Έτσι λοιπόν εκτός της σημασίας του στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών μέσω φωσφορυλιώσεων (φωτοεξαρτώμενες κινάσες : φυτοχρώματα), το φως φαίνεται ότι ελέγχει με άμεσο τρόπο και την αποικοδόμιση στοιχείων του ρολογιού.

1.5.2 Οι LHY/CCA1 μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν τους μοριακούς λεπτοδείκτες του κερκαδικού ρολογιού στα φυτά

Αν ο κεντρικός ταλαντωτής είναι η καρδιά του ρολογιού, τότε οι μεταγραφικοί παράγοντες LHY/CCA1 σίγουρα είναι οι μοριακοί του λεπτοδείκτες. Παρόλο που είναι δύο διαφορετικά μόρια, αναφέρονται μαζί επειδή παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες τόσο στη δομή τους όσο και στη λειτουργία τους στον κεντρικό ταλαντωτή. Οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες μαζί με τον TOC1 δημιουργούν όπως αναφέρθηκε, ένα αυτορυθμιζόμενο βρόγχο επανατροφοδότησης (Σχήμα 1.17), ένα μηχανισμό που φαίνεται ότι αποτελεί το μοντέλο της φύσης για τον κεντρικό ταλαντωτή του κερκαδικού ρολογιού, αφού σε όλους το οργανισμούς που έχει μελετηθεί το κερκαδικό ρολόι, οι κεντρικοί ταλαντωτές στηρίζουν τη λειτουργία τους σε παρόμοιους βρόγχους επανατροφοδότησης.



Σχήμα 1.17 : Μοντέλο του κεντρικού ταλαντωτή στο κερκαδικό ρολόι των φυτών. Το φως (ερυθρό και κυανό φάσμα) ελέγχει την έκφραση των πρωινών MYB-μεταγραφικών παραγόντων LHY και CCA1. Οι LHY/CCA1 πρωτεΐνες καταστέλλουν την έκφραση των απογευματινών γονιδίων και ενεργοποιούν την έκφραση πρωινών γονιδίων. Μέσα στα γονίδια που καταστέλλονται από τα LHY/CCA1 στοιχεία, είναι και ο TOC1 παράγοντας. Στο τέλος της ημέρας, τα επίπεδα των LHY/CCA1 πρωτεϊνών ελαχιστοποιούνται και επιτρέπουν την έναρξη της μεταγραφής του TOC1 παράγοντα. Το μέγιστο του TOC1 ρυθμού λαμβάνει χώρα το σούρουπο και ενεργοποιεί ένα πλήθος από νυχτερινά γονίδια, επιτρέποντας στο φυτό να προετοιμαστεί για την νύχτα. (ΠΗΓΗ : Green και Tobin., 2003).

Οι LHY/CCA1 μεταγραφικοί παράγοντες δρουν ως τα αρνητικά στοιχεία, ενώ ο TOC1 παράγοντας δρά ως θετικό στοιχείο μέσα στο βρόγχο. Με τις συνδυασμένες τους ταλαντώσεις κατά την διάρκεια ενός κερκαδικού κύκλου (24 h), αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούν κάποια γονίδια και αποσιωπούν την έκφραση άλλων, ανάλογα με την ώρα της ημέρας (Σχ. 1.17).

1.5.2.1 Ανακόλυση των CCA1 και LHY μεταγραφικών παραγόντων

Ο LHY (Late Elongated Hypocotyl) MYB-μεταγραφικός παράγοντας απομονώθηκε το 1998 από το εργαστήριο του G. Coupland, σε μια προσπάθεια ανίχνευσης γονιδίων που σχετίζονται με τον φωτοπεριοδικό έλεγχο της άνθισης στο είδος *Arabidopsis thaliana* (Schaffer et al., 1998). Το συγκεκριμένο είδος είναι φυτό μεγάλης φωτοπεριόδου συνεπώς ο φυσικός τύπος ανθίζει νωρίτερα σε φωτοπερίοδο μακράς ημέρας (16 ώρες) από ότι σε φωτοπερίοδο μικρής ημέρας (10 ώρες φώς). Για να μπορεί όμως το φυτό να μετρά τη διάρκεια της ημέρας, χρησιμοποιεί το κίρκαδικό ρολόι σαν σύστημα καταγραφής του χρόνου (Bunning 1936). Από τα παραπάνω συνεπάγεται ότι εάν παράγοντες του κίρκαδικού ρολογιού δυσλειτουργούν, δίνουν και μεταλλαγμένους ανθικούς φαινότυπους, διότι το φυτό αδυνατεί να μετρήσει σωστά την ώρα με βάση τις συνθήκες του περιβάλλοντος του.

Η ερευνητική ομάδα του παραπάνω εργαστηρίου, απομόνωσε μεταλλαγμένα φυτά τα οποία δεν παρουσίαζαν ευαισθησία ως προς την άνθιση κάτω από διαφορετικές φωτοπεριόδους, με αποτέλεσμα να ανθίζουν αργά τόσο σε συνθήκες μικρής ημέρας όσο και σε συνθήκες μεγάλης μέρας. Αργοπορημένη άνθιση συνεπάγεται ότι ευνοείται το βλαστικό στάδιο του φυτού έναντι του αναπαραγωγικού και γι' αυτό το λόγο ο φαινότυπος αυτών των φυτών εκτός από την καθυστερημένη άνθιση περιλαμβάνει και επιμήκυνση της υποκοτύλης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα έναντι των φυτών φυσικού τύπου (LHY – Late Elongated Hypocotyl). Η lhy μετάλλαξη οφείλεται στην υπερέκφραση του LHY λόγω της εισαγωγής ενός μεταθετού στοιχείου που περιείχε τον 35S υποκινητή του ιού του μωσαϊκού του κουνουπιδιού (CMV-Cauliflower Mosaic Virus, Schaffer et al., 1998).

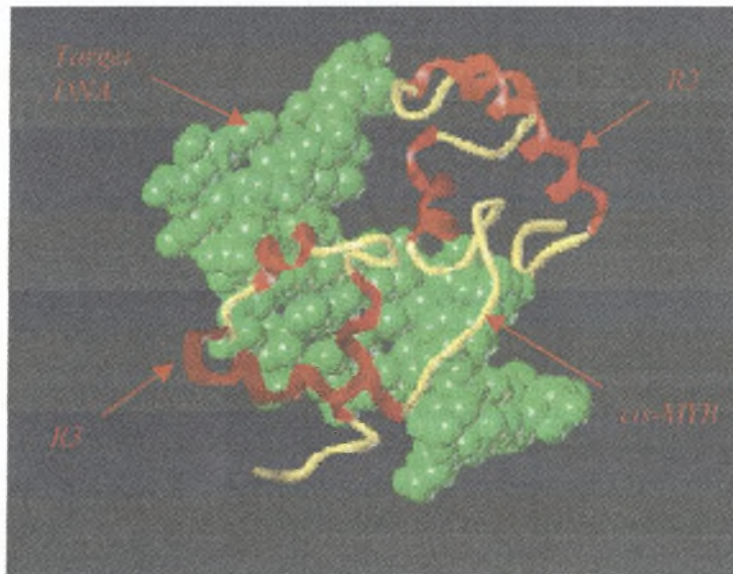
Με βάση τον φαινότυπο του φυτού αλλά και τη θεωρία του Bunning, τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του G. Coupland υπέθεσαν ότι ο LHY γονιδιακός τόπος συσχετιζόταν με τη μέτρηση του μήκους της ημέρας και ότι τα μεταλλαγμένα αυτά φυτά είχαν ένα δυσλειτουργικό κίρκαδικό ρολόι. Πράγματι, όπως φανέρωσε η μικροσκοπία φθορισμού φυτών που μετασηματίστηκαν με το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης, υπό τον έλεγχο των υποκινητών γνωστών κίρκαδικών γονιδίων, η lhy μετάλλαξη προκαλούσε αρρυθμία στις κίρκαδικές κινήσεις των φύλλων και καταστολή των κίρκαδικών ταλαντώσεων πολλών “πρωινών” (CAB) και “απογευματινών” (CCR2) γονιδίων ανεξαρτήτως εξωτερικών συνθηκών (Schaffer et al., 1998). Συνεπώς ο LHY παράγοντας αναγνωρίστηκε ως στοιχείο του κεντρικού ταλαντωτή και όχι σαν στοιχείο της σηματοδότησης αυτού από το φως, καθώς τα αποτελέσματα της μετάλλαξης του ήταν ανεξάρτητα των εξωτερικών συνθηκών (βλ. TOC1).

Η πρώτη σύνδεση του CCA1 μεταγραφικού παράγοντα με το κίρκαδικό ρολόι των φυτών, έγινε το 1997. Οι Tobin και Wang, ερευνούσαν τον έλεγχο της έκφραση των πρωτεϊνών-αντένων του φωτοσυλλεκτικού συμπλόκου (Light Harvesting Complex –lhy) του φωτοσυστήματος II από τα φυτοχρώματα (αναφέρονται ως Chlorophyll a/b Binding proteins – CAB, Wang et al., 1997). Στην προσπάθεια τους αυτή, οι συγκεκριμένοι ερευνητές αναγνώρισαν ένα στοιχείο του CAB υποκινητή στο είδος *Arabidopsis*, που σχετίζεται με αποκρίσεις στο φυτόχρωμα. Από έναν έλεγχο κατά Southern-Western σε βιβλιοθήκη έκφρασης, οι ίδιοι ερευνητές απομόνωσαν το 1998 ένα συγγενικό παράγοντα με το παραπάνω στοιχείο του lhy υποκινητή, ο οποίος ανήκει και αυτός στην Myb οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων (όπως και ο LHY παράγοντας, Schaffer et al., 1998) και στον οποίο δόθηκε το όνομα CCA1 (Circadian Clock Associated 1, Wang et al., 1997). Η υπερέκφραση του CCA1 έχει

ως αποτέλεσμα ένα καθυστερημένο φαινότυπο αναφορικά με την άνθιση, ανεξαρτήτως εξωτερικών συνθηκών (όπως και στην περίπτωση του LHY) ενώ η υπερέκφραση αυτή κατέστειλε ισχυρά και τα επίπεδα της ενδογενούς CCA1 πρωτεΐνης, φανερώνοντας την ύπαρξη ενός αυτορυθμιζόμενου βρόγχου αρνητικής επανατροφοδότησης στη ρύθμιση της έκφρασης του CCA1 (Wang *et al.*, 1998), το οποίο έχει παρατηρηθεί και κατά την LHY υπερέκφραση στα επίπεδα της ενδογενούς LHY πρωτεΐνης (Schaffer *et al.*, 1998). Η στενή σύνδεση των δύο αυτών μεταγραφικών παραγόντων έγινε όταν παρατηρήθηκε ότι υπερέκφραση του ενός, καταστέλλει τα επίπεδα της ενδογενούς πρωτεΐνης του άλλου και αντιστρόφως, φανερώνοντας έτσι ότι και οι δύο ρυθμίζονται από τον ίδιο βρόγχο αρνητικής επανατροφοδότησης κατά αμοιβαίο τρόπο.

1.5.2.2 Η Myb οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων

Όπως αναφέρθηκε ήδη, οι δύο παράγοντες ανήκουν στην **Myb** οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων. Η εν λόγω οικογένεια απαριθμεί πολλά μέλη τα οποία ανιχνεύονται διάσπαρτα σε ένα εύρος οργανισμών από διαφορετικά βασίλεια (από τους μύκητες και τα φυτά μέχρι τον άνθρωπο !). Χαρακτηριστικό όλων των μελών της Myb οικογένειας είναι η συντήρηση του Myb μοτίβου που μεσολαβεί στην πρόσδεση του DNA. Το πρώτο γονίδιο της οικογένειας ανιχνεύτηκε στον άνθρωπο και συνδέθηκε με μια παλιά μορφή λευχαιμίας (**Myeloblastosis** / μυελοβλάστωση). Στα φυτά εκτός από τους LHY/CCA1 μεταγραφικούς παράγοντες, έχουν αναγνωριστεί και άλλα μέλη της οικογένειας με το *Arabidopsis thaliana* να απαριθμεί περισσότερα από 100 μέλη.



Εικόνα 1.4 : Ψηφιακή απεικόνιση ενός μοντέλου πρόσδεσης του *c-Myb* γονιδίου των θηλαστικών, στο DNA-στόχο του. Διακρίνονται οι R2 και R3 περιοχές.

Συνήθως μια Myb πρωτεΐνη περιέχει στο αμινοτελικό άκρο της δύο ή τρία Myb μοτίβα. Συνήθως στα ζώα, οι Myb πρωτεΐνες περιέχουν τρία Myb μοτίβα που χαρακτηρίζονται ως R1, R2, R3 ενώ στα φυτικά μέλη της οικογένειας εντοπίζονται συνήθως δύο Myb μοτίβα, τα R2, R3 (Εικόνα 1.4). Με βάση τα παραπάνω οι LHY/CCA1 μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν δύο μάλλον ασυνήθιστα μέλη της

οικογένειας καθώς οι πρωτεΐνες τους αριθμούν μόνο ένα Myb μοτίβο. Οι Myb περιοχές αποτελούνται από 52 αμινοξέα και αναφορικά με την στερεοχημική τους διαμόρφωση, σχηματίζουν μια τρισδιάστατη δομή α-έλικας / στροφής / α-έλικας.

Στα R2-R3 μέλη και τα δύο μοτίβα συμμετέχουν στην πρόσδεση στον νουκλεοτιδικό πυρήνα αναγνώρισης με την c-έλικα του R3 μοτίβου να παίζει πρωταγωνιστικό και την c-έλικα του R2 μοτίβου συμπληρωματικό ρόλο στην αναγνώριση. Πιθανότατα η πρόσδεση των LHY/CCA1 να γίνεται με διαφορετικό τρόπο και να ακολουθεί τον τρόπο σύνδεσης των bHLH-μεταγραφικών παραγόντων με την μια έλικα να τοποθετείται κάθετα στη μεγάλη αύλακα του DNA και την δεύτερη έλικα να τοποθετείται κάθετα στην πρώτη και να αλληλελεπιδρά με τη μεταγραφική μηχανή.

Αναφορικά με τη λειτουργικότητα των Myb πρωτεϊνών με ένα μοτίβο στα φυτά, έχουν αποδοθεί ρόλοι όπως η διαφοροποίηση των επιδερμικών κυττάρων, η συμμετοχή στα βιολογικά ρολόγια (LHY/CCA1) αλλά και η πρόσδεση στα τελομερή των χρωμοσωμάτων. Τέλος οι περισσότεροι MYB παράγοντες είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές με την περιοχή ενεργοποίησης να εδρεύει προς το καρβοξυτελικό άκρο σε σχέση με το μοτίβο πρόσδεσης που εδρεύει όπως αναφέρθηκε, στο αμινοτελικό άκρο.

1.5.2.3 Το μεταγραφικό προφίλ των LHY/CCA1 και η επίδραση των μεταλλάξεων τους

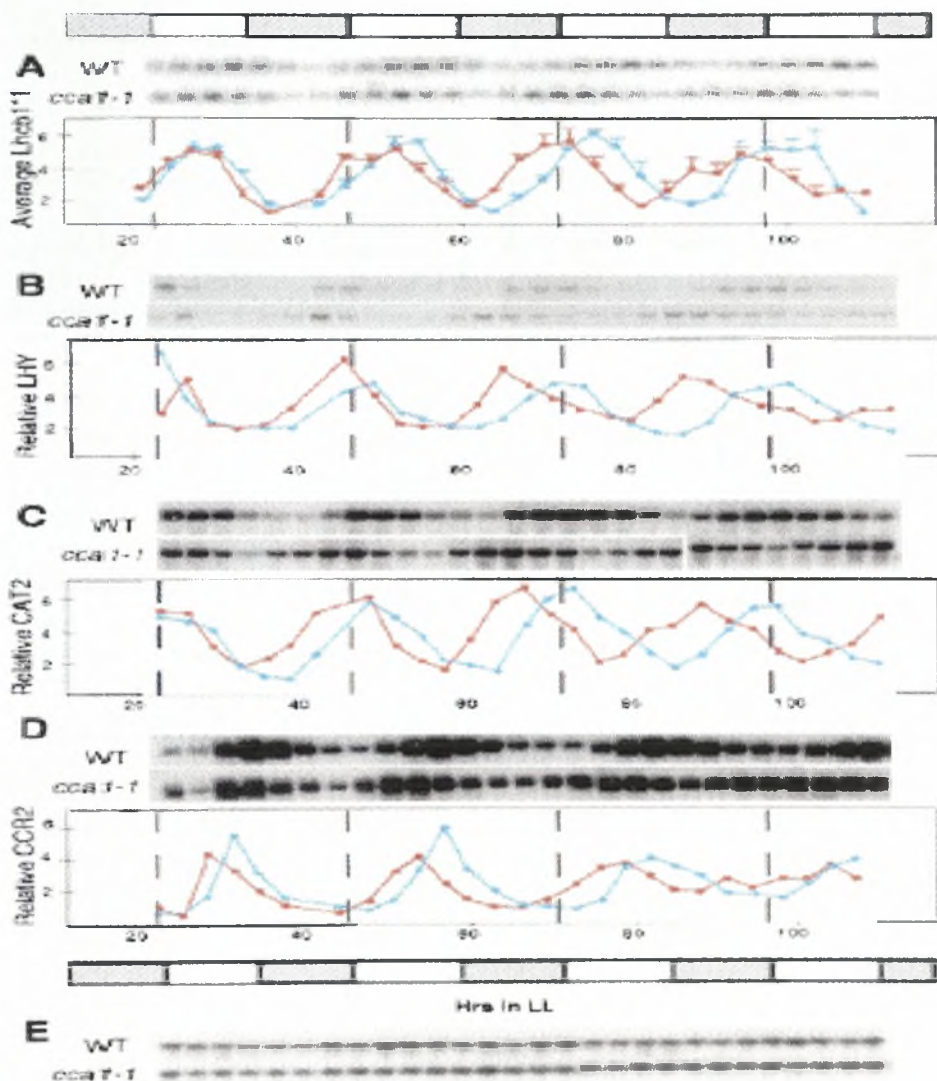
Συνοψίζοντας τα όσα έχουν αναφερθεί παραπάνω αναφορικά με την ταυτότητα των δύο MYB-παραγόντων, τόσο το LHY όσο και το CCA1 γονίδιο είναι “πρωινά”. Αυτό σημαίνει ότι σε φυτά *Arabidopsis* φυσικού τύπου, η 24ωρη ταλάντωση των επιπέδων mRNA τους παρουσιάζει μέγιστο την αυγή. Στη συνέχεια τα επίπεδα των LHY/CCA1 mRNA αρχίζουν να φθίνουν μέσα στην ημέρα και παρουσιάζουν τελικά ελάχιστο κατά τις απογευματινές ώρες. Ακολούθως τα επίπεδα μεταγραφής των δύο παραγόντων αρχίζουν και πάλι να αυξάνονται κατά την διάρκεια της νύχτας, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό ως *πρόβλεψη του φωτός (Light Anticipation)*, για να κορυφωθούν και πάλι την αυγή.

Σε χλωρωτικά φυτάρια, στα οποία τα επίπεδα των LHY/CCA1 είναι μηδαμινά, αρκεί ελάχιστη έκθεση του φωτός για να επάγει την έκφραση των δύο παραγόντων ρυθμίζοντας έτσι το κερκαδικό ρολόι στην ώρα “μηδέν” και ξεκινώντας τους κύκλους των ταλαντώσεων. Το φαινόμενο αυτό είναι χαρακτηριστικό των πρωινών ρυθμικών γονιδίων και αποκαλείται *οξεία απόκριση (Acute Response)* στο φως. Σημειώνεται ότι η ώρα “μηδέν” σηματοδοτεί την έναρξη των ρυθμών όλων των κερκαδικών γονιδίων, πρωινών και απογευματινών (π.χ TOC1), με την διαφορά ότι τα απογευματινά γονίδια δεν παρουσιάζουν το φαινόμενο της *οξείας απόκρισης*.

Αναφορικά με τον κερκαδικό φαινότυπο όταν τα LHY/CCA1 στοιχεία υπερεκφράζονται, έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα μεταγραφής τόσο του ενδογενούς LHY όσο και του CCA1, καταστέλλονται. Επιπλέον η υπερέκφραση αυτή καταστέλλει και τα επίπεδα μεταγραφής του TOC1. Αυτά τα στοιχεία συμφωνούν με το μοντέλο που θέλει τις LHY/CCA1 πρωτεΐνες να αυτορυθμίζονται αλλά και να καταστέλλουν την έκφραση του TOC1 (Wang και Tobin, 1998; Fowler et al., 1999; Matsushika et al., 2002). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, σε φυτά που έχουν υποστεί μεταλλάξεις απώλειας δράσης είτε του CCA1 είτε του LHY, παρατηρείται σμίκρυνση της περιόδου ταλάντωσης πολλών ρυθμικών γονιδίων, τόσο “πρωινών” (CAB ή CAT, Green και Tobin, 1999) όσο και “απογευματινών” (ELF3 ή CCR2, Strayer et al., 2000). Το ενδιαφέρον είναι ότι, εάν ένα εκ των LHY/CCA1 υποστεί την απώλεια δράσης λόγω μεταλλαξιογένεσης, οι κερκαδικοί ρυθμοί διατηρούνται, απλά η περίοδος

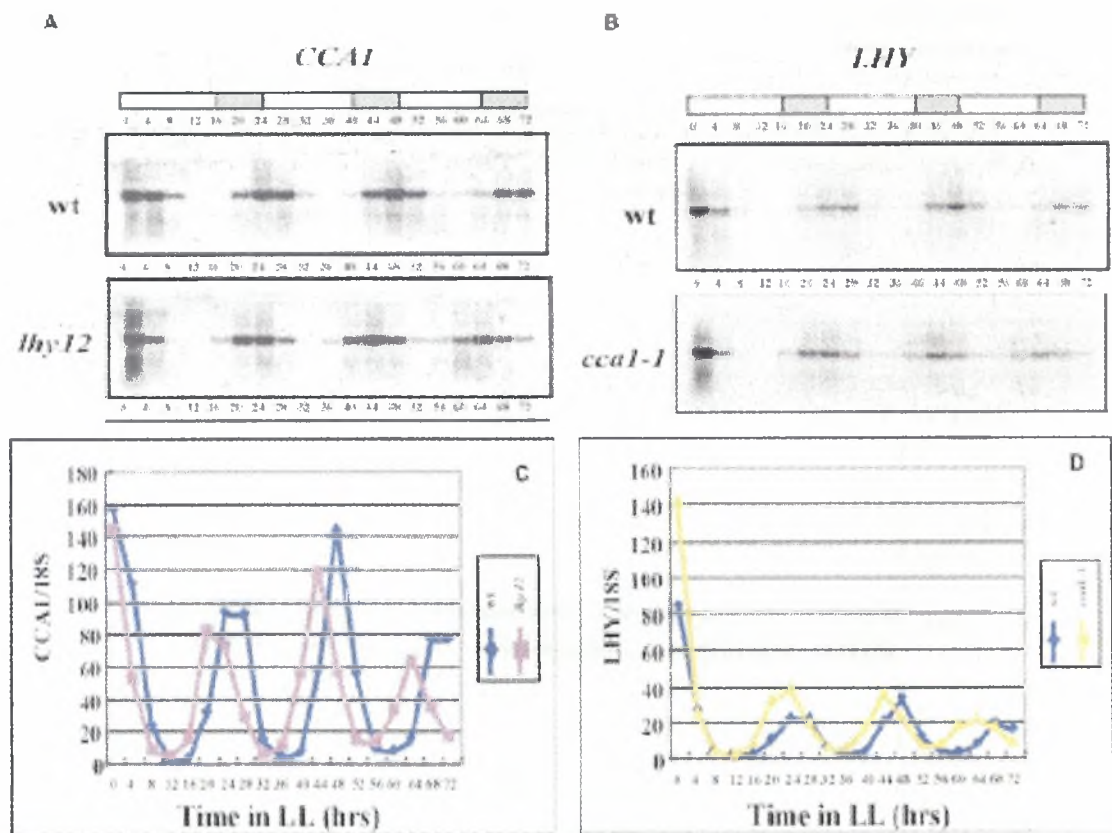
της ταλάντωσης είναι πιο μικρή, δηλαδή το ρολόι “τρέχει” πιο γρήγορα. Αυτό επιβεβαιώνει τη θεωρία ότι η δράση των *LHY/CCA1* αλληλοσυμπληρώνεται και κανένα από τα δύο δεν θεωρείται αποκλειστικό για την ομαλή λειτουργία του κεντρικού ταλαντωτή, αφού η δράση του ενός, καλύπτει τις απώλειες του άλλου (Green και Tobin, 2003).

Πιο συγκεκριμένα, φυτά μετασχηματισμένα με τη βοήθεια της RNAi τεχνολογίας ως προς το *LHY*, έδειξαν μια σμίκρυνση της περιόδου της ταλάντωσης κατά 2 με 3 ώρες στην διάρκεια του πρώτου κύκλου σε σχέση με φυτά άγριου τύπου (Alabadi *et al.*, 2002). Την ίδια σμίκρυνση στην περίοδο της ταλάντωσης έδειξαν και φυτά με απώλεια δράσης του *CCA1* παράγοντα υπό συνθήκες συνεχούς φωτός [Σχήμα 1.18 (Green και Tobin, 1999)]. Μάλιστα στον τέταρτο κύκλο, η σμίκρυνση της φωτοπεριόδου έφτασε και τις 12 ώρες, με συνέπεια μια καθολική αλλαγή φάσης (Green και Tobin, 1999).



Σχήμα 1.18 : Κιρκαδικές ταλαντώσεις ρυθμικών γονιδίων, υπό το καθεστώς της *cca1-1* μετάλλαξης. Η περίοδος της ταλάντωσης τόσο πρωινών [(A) *CAB*. (B) *LHY* (C) *CAT*] όσο και απογευματινών [(D) *CCR2*] μικραίνει κατά 2-3 τρεις ώρες σε σχέση με τις αντίστοιχες παρατηρήσεις σε φυτά φυσικού τύπου. Η ποσοτικοποίηση έγινε με βάση τα επίπεδα έκφρασης του *UBQ10* (E) μη ρυθμικού γονιδίου. (ΠΗΓΗ : Green και Tobin., 1999).

Αυτό που αποδείχθηκε ως πλέον ενδιαφέρον ήταν ο έλεγχος του φαινότυπου σε φυτά με απώλεια δράσης και των δύο παραγόντων (*lhy cca1-1 double mutants*). Τα εργαστήρια των G. Coupland και S. Kay προχώρησαν, ανεξάρτητα στην παραγωγή τέτοιων φυτών κατά την χρονική περίοδο του 2002. Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη ερευνητική ομάδα χρησιμοποίησε EMS μεταλλαξίγνεση και μέσω αυτογονιμοποιήσεων και επαναδιασταυρώσεων των απογόνων, κατέφερε να απομονώσει τρεις γενότυπους (*lhy-11*, *lhy-12*, *lhy-13*) των οποίων ο φαινότυπος παρουσιάζοταν με μη λειτουργικό LHY γονίδιο (*lhy-loss of function mutants*, Mizoguchi T., Wheatley K., 2002), ενώ η δεύτερη ερευνητική ομάδα χρησιμοποίησε την τεχνολογία της παρεμβολής στο RNA (RNAi) ως προς το LHY γονιδιακό τόπο (Alabadi et al., 2002).



Σχήμα 1.19 : Το μεταγραφικό προφίλ των LHY και CCA1 σε *cca1-1* και *lhy-12* μεταλλαγμένους γενότυπους αντίστοιχα, υπό συνθήκες συνεχούς φωτός. (A) Ανάλυση κατά Northern ως προς το ενδογενές CCA1 σε *lhy-12* μεταλλαγμένα φυτά και φυτά άγριου τύπου, υπό συνεχές φώς. (B) Ανάλυση κατά Northern ως προς το ενδογενές LHY σε *cca1-1* μεταλλαγμένα φυτά και φυτά άγριου τύπου, υπό συνεχές φώς. (C) Τα αποτελέσματα του Northern της περίπτωσης (A) δείχνουν ότι η περίοδος της CCA1 ταλάντωσης μικραίνει κατά 2 ώρες υπό την επίδραση της *lhy-12* μετάλλαξης. (D) Τα αποτελέσματα του Northern της περίπτωσης (B) δείχνουν ότι η περίοδος της LHY ταλάντωσης μικραίνει κατά 2 ώρες υπό την επίδραση της *cca1-1* μετάλλαξης. (ΠΗΓΗ : Mizoguchi T., Wheatley K., 2002).

Οι τρεις αυτοί μεταλλαγμένοι γενότυποι ως προς το LHY αναλύθηκαν κατά Northern από την πρώτη ερευνητική ομάδα, για να διαπιστωθεί η επίδραση τους στο CCA1 ρυθμό υπό συνθήκες συνεχούς φωτισμού (Σχήμα 1.19 A). Η ανάλυση έδειξε ότι, η LHY μετάλλαξη μικραίνει κατά 2 ώρες τη περίοδο του ρυθμού του ενδογενούς CCA1 σε σχέση με φυτά φυσικού τύπου (Σχήμα 1.19 C). Ο ανθικός φαινότυπος είτε

των *lhy-12*, είτε των *cca1-1* μεταλλαγμένων φυτών, σε συνθήκες μεγάλης μέρας ήταν ο ίδιος σε σχέση με φυτά άγριου τύπου. Ωστόσο και οι δύο μεταλλάξεις οδήγησαν σε πρωιμότερη άνθιση σε φωτοπερίοδο μικρής μέρας σε σχέση με φυτά άγριου τύπου (Εικόνα 1.5, Mizoguchi T., Wheatley K., 2002). Οι παρατηρήσεις αυτές ήταν ίδιες με τις παρατηρήσεις της επίδρασης της *cca1-1* μετάλλαξης στα επίπεδα μεταγραφής του ενδογενούς LHY (Σχήμα 1.19 B, D) και επιβεβαιώνει το ότι η μεταγραφή του καθενός εκ των δύο αυτών παραγόντων ελέγχεται και από τον άλλο.

Με βάση τους παραπάνω μεταλλαγμένους γενότυπους, κατασκευάστηκε μέσω διασταυρώσεων και απογονικού ελέγχου, ο διπλός *lhy cca1-1* μεταλλαγμένος γενότυπος. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση της διπλής αυτής μετάλλαξης στους ρυθμούς πολλών πρωινών γονιδίων υπό συνθήκες συνεχούς φωτός (Σχήμα 1.20).

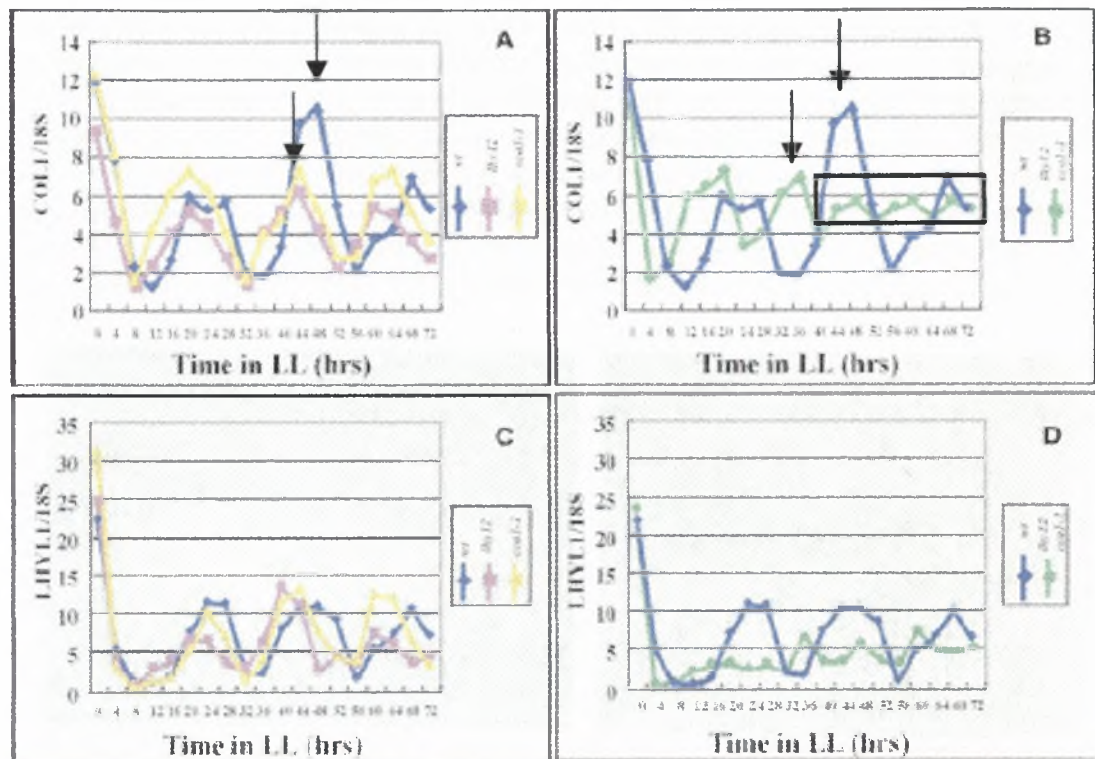


Εικόνα 1.5 : Επίδραση των *lhy-11*, *lhy-12*, *lhy-13* μεταλλάξεων στον ανθικό φαινότυπο. (A) Υπό συνθήκες μεγάλης μέρας, οι *lhy* μεταλλαγμένοι γενότυποι ανθίζουν όπως και ο άγριος τύπος (*wt*). (B) Υπό συνθήκες μικρής μέρας όμως η *lhy* μετάλλαξη προκαλεί πρωιμότερη άνθιση σε σχέση με φυτά άγριου τύπου (*wt*). Τα βέλη δείχνουν το ανθικό στέλεχος των *lhy* μεταλλαγμένων φυτών. Το *lhy-1* δείγμα ήταν αρχικά γενότυπος με απώλεια δράσης του *lhy*, στο οποίο έγινε αποκατάσταση της λειτουργίας του συγκεκριμένου παράγοντα και χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας μαζί με τα φυτά του άγριου τύπου. (ΠΗΓΗ : Mizoguchi T., Wheatley K., 2002).

Ειδικότερα, στη περίπτωση απλών *lhy* ή *cca1* μεταλλάξεων τόσο το “πρωινό γονίδιο” COL1 (CONSTANS-Like 1) όσο και το επίσης “πρωινό γονίδιο” At5g17300, φανέρωσαν μια σμίκρυνση της περιόδου ταλάντωσης των mRNA τους κατά 2 ώρες υπό συνθήκες συνεχούς φωτός, σε σχέση με φυτά φυσικού τύπου. Ωστόσο η ταλάντωση συνέχισε να εξελίσσεται κανονικά ακόμα και μετά από 3 κύκλους, υποδηλώνοντας ότι η απώλεια δράσης του ενός εκ των LHY/CCA1 αντικαθίσταται από τη δράση του άλλου ή και ενδεχομένως άλλων παραγόντων. Στη περίπτωση της διπλής *lhy cca1-1* μετάλλαξης ωστόσο, η σμίκρυνση στην περίοδο της ταλάντωσης που παρατηρήθηκε, όχι μόνο ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τις απλές *lhy* και *cca1-1* μεταλλάξεις αλλά ο ρυθμός χάθηκε εντελώς μετά από 2 κύκλους.

Τα παραπάνω συνεπάγονται ότι ακόμα και με απώλεια των LHY/CCA1, ο κεντρικός ταλαντωτής είναι ικανός να συνεχίσει να εκτελεί ταλαντώσεις, ίσως εξαιτίας κάποιων δευτερευόντων παραγόντων που δρουν σαν στοιχεία του και στη σκιά των LHY/CCA1. Ωστόσο αυτοί οι υποτιθέμενοι παράγοντες, αν όντως υπάρχουν, δεν είναι ικανοί να διατηρήσουν το ρυθμό υπό συνεχείς συνθήκες και έτσι αυτός φθίνει μετά από 2 κύκλους (Mizoguchi T., Wheatley K., 2002). Αντίστοιχες παρατηρήσεις έγιναν και από τη μελέτη των ταλαντώσεων απογευματινών γονιδίων υπό το πρίσμα των *lhy*, *cca1-1* και *lhy/cca1-1* μεταλλάξεων (Σχήμα 1.21). Η

ερευνητική ομάδα του S. Kay κατέλειξε και εκείνη σε αντίστοιχα συμπεράσματα για την δράση των *LHY/CCA1*)



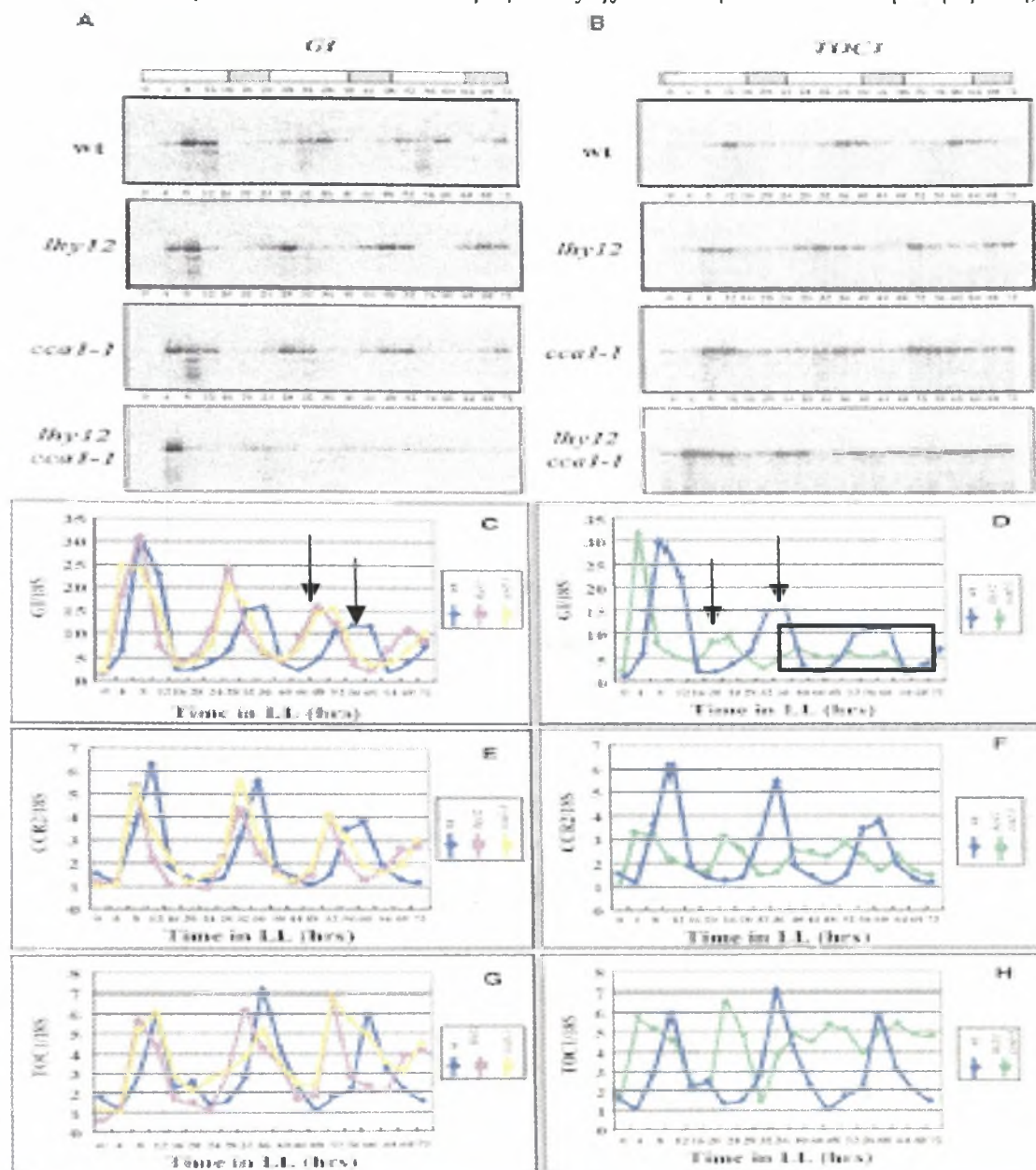
Σχήμα 1.20 :Το μεταγραφικό προφίλ πολλών πρωινών γονιδίων υπό το φάσμα της *lhy cca1-1* διπλής μετάλλαξης σε συνθήκες συνεχούς φωτός. (A) Η απλή μετάλλαξη είτε στο *LHY* (μώβ γραμμή) είτε στο *CCA1* (κίτρινη γραμμή) προκαλεί σμίκρυνση της περιόδου της ταλάντωσης των mRNA στο *COL 1* (*Constans-Like 1*) πρωινό γονίδιο σε σχέση με φυτά άγριου τύπου (μπλέ καμπύλη). (B) Η επίδραση της διπλής *lhy cca1-1* μετάλλαξης (πράσινη καμπύλη) προκαλεί και εδώ σμίκρυνση της περιόδου ταλάντωσης σε σχέση με φυτά άγριου τύπου (μπλέ καμπύλη). Σε αντίθεση όμως με τις απλές *lhy* και *cca1-1* μεταλλάξεις, η σμίκρυνση στη φωτοπερίοδο είναι μεγαλύτερη και ο ρυθμός φθίνει τελείως μετά από 2 κύκλους. (C, D) Τα ίδια με παραπάνω ως προς το *At5g17300* (*LHYL1*) πρωινό γονίδιο. (ΠΗΓΗ : Mizoguchi T., Wheatley K., 2002).

1.5.2.4 Η αμοιβαία ρύθμιση μεταξύ των *LHY/CCA1* και *TOC1* επιτρέπει την καταγραφή του χρόνου στα φυτά

Στις προηγούμενες ενότητες έγινε μια εισαγωγή στα στοιχεία του κεντρικού ταλαντωτή (*LHY/CCA1* και *TOC1*) με περιγραφή του μεταγραφικού προφίλ τους τόσο σε φυτά άγριου τύπου όσο και σε φυτά στα οποία οι συγκεκριμένοι παράγοντες είτε υπερεκφράζονταν είτε εμφάνιζαν ολική ή μερική απώλεια δράσης λόγω μεταλλάξεων. Αναφέρθηκε επίσης ότι οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες των φυτών, δημιουργούν ένα σύστημα αμοιβαίας ρύθμισης της μεταγραφής, ένα αυτορυθμιζόμενο βρόγχο ανάδρασης που αποτελεί και την καρδιά κάθε ρολογιού ανεξαρτήτως οργανισμού (φυσικά σε άλλους οργανισμούς ο κεντρικός ταλαντωτής αποτελείται από διαφορετικά των *LHY/CCA1* και *TOC1* στοιχεία).

Πώς όμως συνδέονται τα δύο “πρωινά γονίδια” (*LHY/CCA1*) με το “απογευματινό” (*TOC1*) και πώς εξασφαλίζεται η αμοιβαία ρύθμιση της μεταγραφής τους που συνεπάγεται την εύρυθμη λειτουργία του κεντρικού ταλαντωτή ; Όπως είδαμε και

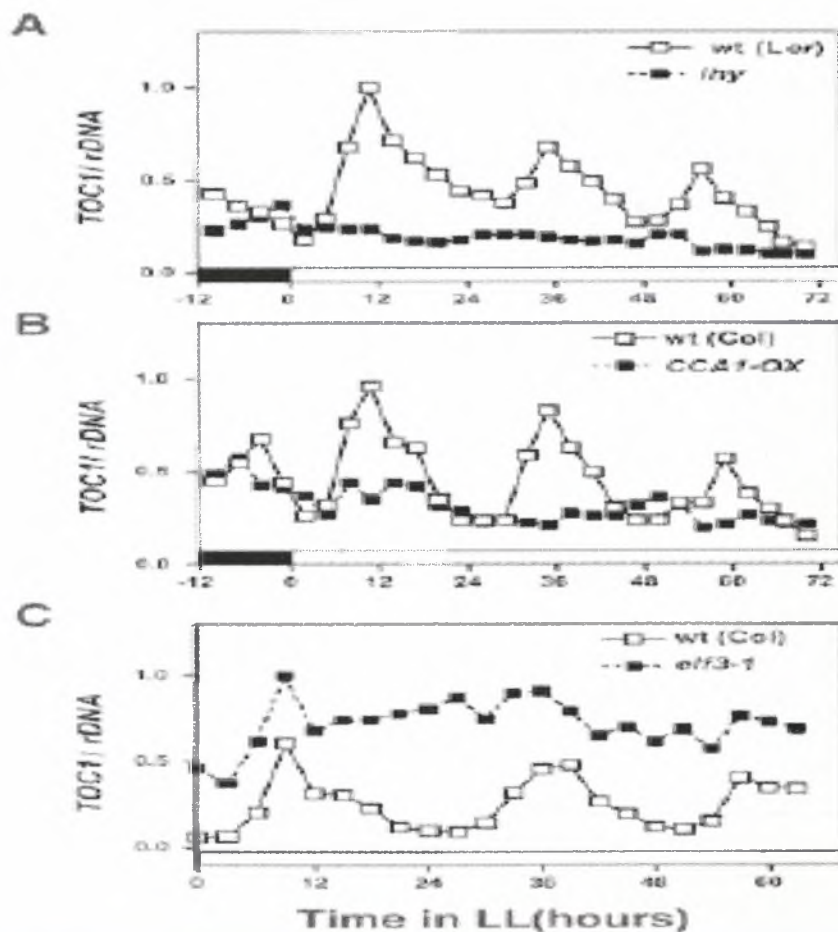
παραπάνω, τόσο οι ομοιότητες στη δομή όσο και στο μεταγραφικό προφίλ, θέλουν τα *LHY/CCA1* γονίδια να σχετίζονται στενά. Μάλιστα, όπως απέδειξε η έρευνα πολλών ερευνητικών ομάδων, οι δύο αυτοί παράγοντες έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενη δράση,



Σχήμα 1.21 : Το μεταγραφικό προφίλ πολλών απογευματινών γονιδίων υπό το φάσμα της *lhy cca1-1* διπλής μετάλλαξης σε συνθήκες συνεχούς φωτός. (A) Ανάλυση κατά Northern του *GI* (*GIGANTEA*) απογευματινού γονιδίου, υπό το φάσμα των *lhy-12*, *cca1-1* και *lhy cca1-1* μεταλλάξεων. (B) Τα ίδια όπως και στο (A), ως προς το *TOC1* απογευματινό γονίδιο. (C) Η απλή μετάλλαξη είτε στο *LHY* (μώβ γραμμή) είτε στο *CCA1* (κίτρινη γραμμή) προκαλεί σμίκρυνση της περιόδου της ταλάντωσης των mRNA στο *GI* (*GIGANTEA*) απογευματινό γονίδιο σε σχέση με φυτά άγριου τύπου (μπλέ καμπύλη). (D) Η επίδραση της διπλής *lhy cca1-1* μετάλλαξης (πράσινη καμπύλη) προκαλεί και εδώ σμίκρυνση της περιόδου ταλάντωσης σε σχέση με φυτά άγριου τύπου (μπλέ καμπύλη). Σε αντίθεση όμως με τις απλές *lhy* και *cca1-1* μεταλλάξεις, η σμίκρυνση στη φωτοπερίοδο είναι μεγαλύτερη και ο ρυθμός φθίνει τελείως μετά από 2 κύκλους. (E, F και G, H) Τα ίδια με (C, D) ως προς τα *CCR2* και *TOC1* απογευματινά γονίδια αντιστοίχως. (ΠΗΓΗ : Mizoguchi T., Wheatley K., 2002).

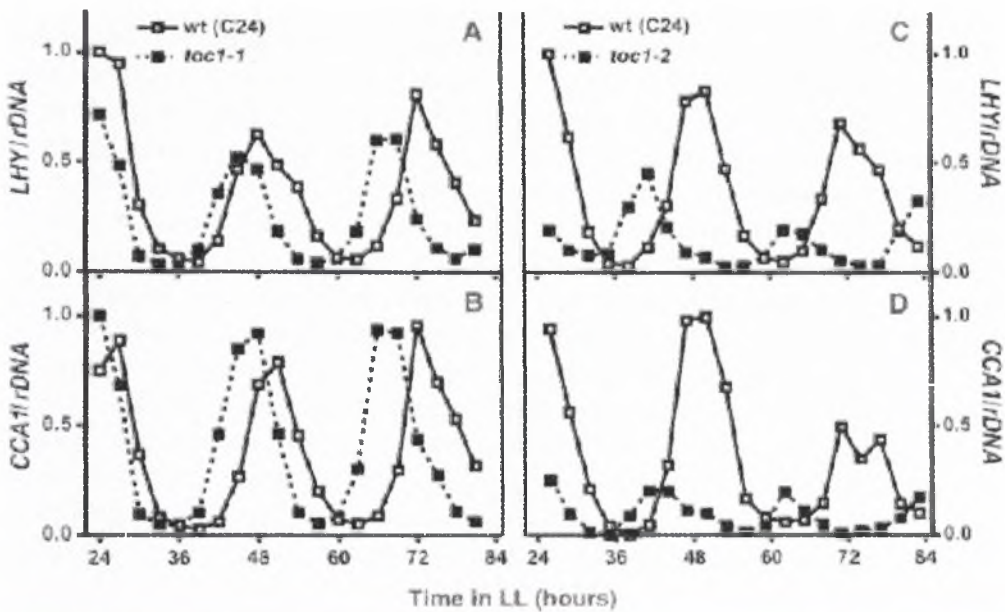
με το ένα να αποτελεί εφεδρία σε περίπτωση απώλειας του άλλου, αλλά και τα δύο να είναι απαραίτητα για ένα φυσιολογικό ταλαντωτή (*Green και Tobin., 1999; Mizoguchi T., Wheatley K., 2002; Alabadi et al., 2002*).

Η σύνδεση του *TOC1* με τους *LHY/CCA1* έγινε από την ερευνητική ομάδα του S. Kay, μέσω της μελέτης της έκφρασης του πρώτου σε φυτά τα οποία υπερέκφραζαν είτε το *LHY* (*lhy* φυτά) είτε το *CCA1* (*CCA1-ox* φυτά) κάτω από τον έλεγχο του 35S CaMV υποκινητή. Σε φυτά που υπερέκφραζαν τόσο το *LHY* όσο και το *CCA1*, ο ρυθμός του *TOC1* διαταράχθηκε σε αντίθεση με φυτά φυσικού τύπου που παρουσίασαν έντονη ρυθμικότητα στα επίπεδα μεταγραφής του *TOC1* [Σχήμα 1.22, (*Alabadi et al., 2001*)]. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαίωσε το ότι οι *LHY/CCA1* παράγοντες, ρυθμίζουν την έκφραση του *TOC1* γονιδίου. Η ρύθμιση της *TOC1* μεταγραφής από τους *LHY/CCA1* έχει χαρακτήρα καταστολής αφού η υπερέκφραση και των δύο συνεπάγεται συνεχή και χαμηλά επίπεδα του *TOC1*. Γι' αυτό και οι μεταγραφικοί παράγοντες *LHY/CCA1* αναφέρονται συχνά και ως αρνητικά στοιχεία του βρόγχου.



Σχήμα 1.22 : Το μεταγραφικό προφίλ του *TOC1* σε φυτά άγριου τύπου αλλά και υπό το καθεστώς της *LHY/CCA1* μετάλλαξης, σε συνθήκες συνεχούς φωτός. (Α) Σύγκριση του μεταγραφικού προφίλ του *TOC1* σε *lhy* φυτά και φυτά άγριου τύπου. (Β) Σύγκριση του μεταγραφικού προφίλ του *TOC1* σε *CCA1-ox* φυτά και φυτά άγριου τύπου. (Γ) Σύγκριση του μεταγραφικού προφίλ του *TOC1* σε *elf3-1* φυτά με απώλεια δράσης του *ELF3* παράγοντα και φυτά άγριου τύπου. Στις δύο πρώτες περιπτώσεις, η *TOC1* ταλάντωση φθίνει και το mRNA του παράγοντα παραμένει σε χαμηλά και συνεχή επίπεδα. Στην τρίτη περίπτωση η ταλάντωση του *TOC1* φθίνει επίσης, αλλά παραμένει σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτά των (Α) και (Β). (ΠΗΓΗ : *Alabadi et al., 2001*).

Ωστόσο απευθείας ρύθμιση της μεταγραφής του TOC1 από τους LHY/CCA1 μεταγραφικούς παράγοντες, σημαίνει ότι οι τελευταίοι αναγνωρίζουν και δεσμεύονται πάνω σε κάποια μοτίβα του TOC1 υποκινητή. Η ερευνητική ομάδα του S. Kay σε πειράματα με απαλοιφές από το κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής (ATG) έως και την -2340 αλληλουχία μέσα στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή, έδειξε ότι η αλληλουχία από -834 έως -620 περιείχε το στοιχείο ρύθμισης της TOC1 μεταγραφής από τους LHY/CCA1, αφού ελλείμματα σε αυτή την περιοχή οδηγούσαν σε απώλεια της TOC1 ταλάντωσης. Πειράματα διαφορικής μετανάστευσης σε πηκτή αгарόζης (gel shift mobility assay) φανέρωσαν τελικά ότι η αλληλουχία -734 έως -687 περιείχε το μοτίβο πρόσδεσης των LHY/CCA1 στον TOC1 υποκινητή (Alabadi et al., 2001).



Σχήμα 1.23 : Το μεταγραφικό προφίλ των LHY/CCA1 υπό την επίδραση των μεταλλάξεων στα TOC1 αλληλόμορφα. (A) Η περίοδος της ταλάντωσης του LHY γίνεται μικρότερη σε *toc1-1* μεταλλαγμένα φυτά σε σχέση με φυτά άγριου τύπου. (B) Η ταλάντωση του LHY φθίνει και τα επίπεδα μεταγραφής του παράγοντα μειώνονται σημαντικά ως αποτέλεσμα της *toc1-2* μετάλλαξης. (C) και (D) Ομοίως με (A) και (B) για το CCA1. Τα κλειστά τετράγωνα αντιπροσωπεύουν τα TOC1 μεταλλαγμένα φυτά και τα ανοιχτά τετράγωνα αντιπροσωπεύουν τα φυτά άγριου τύπου. (ΠΗΓΗ : Alabadi et al., 2001).

Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών βάσεων αυτής της περιοχής αναγνώρισε το AAAATATCT μοτίβο που ονομάστηκε “εσπερινό” στοιχείο (EE-Evening Element), λόγω της παρουσίας του και σε άλλα 31 “απογευματινά γονίδια” στο είδος *Arabidopsis thaliana*. *In vitro* πειράματα επιβεβαίωσαν την πρόσδεση των LHY/CCA1 σε αυτό το στοιχείο και σήμερα είναι αποδεκτό ότι οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες, ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση του TOC1, με απευθείας πρόσδεση στο EE του υποκινητή του (Alabadi et al., 2001).

Για να εξακριβωθεί το κατά πόσο το παραπάνω σχήμα ρύθμισης της μεταγραφής είναι αμοιβαίο, παρατηρήθηκε το μεταγραφικό προφίλ των LHY/CCA1 σε φυτά που είχαν υποστεί μεταλλάξεις σε δύο TOC1 αλληλόμορφα (*toc1-1* και *toc1-2*) που έχουν αναγνωριστεί στο *Arabidopsis*. Στα *toc1-1* μεταλλαγμένα φυτά η περίοδος της ταλάντωσης των LHY/CCA1 ήταν μικρότερη, ενώ σε *toc1-2* μεταλλαγμένα φυτά η

ταλάντωση του TOC1 διαταράχθηκε με αποτέλεσμα τα επίπεδα μεταγραφής τους σχεδόν να εκμηδενισθούν (Σχήμα 1.23, *Alabadi et al., 2001*).

Η διαφορετική επίδραση στην ταλάντωση των *LHY/CCA1* που παρατηρήθηκε ως αποτέλεσμα των μεταλλάξεων στα TOC1 αλληλόμορφα, υποδηλώνει και τη διαφορετική φύση τους (*Alabadi et al., 2001*). Τα παραπάνω συντελούν στο ότι ο TOC1 παράγοντας συμμετέχει και αυτός με την σειρά του στη ρύθμιση της μεταγραφής των *LHY/CCA1*. Αυτό ενισχύεται και από ορισμένα χαρακτηριστικά του TOC1 όπως για παράδειγμα ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός του στον πυρήνα, όπου σχηματίζει πυρηνικά συσσωματώματα [πιθανές θέσεις μεταγραφής ή/και αποικοδόμησης (Εικόνα 1.3)], η παρουσία μιας πλούσιας σε όξινα αμινοξικά κατάλοιπα περιοχής στο καρβοξυτελικό άκρο της TOC1 πρωτεΐνης που είναι κοινή σε πολλούς τύπους ευκαρυωτικών μεταγραφικών ενεργοποιητών, καθώς και ομοιότητα της με την πρωτεΐνη CONSTANS στην οποία έχει αποδοθεί ο ρόλος μεταγραφικού ενεργοποιητή (*Strayer et al., 2000; Singh, 1998; Samach et al., 2000*).

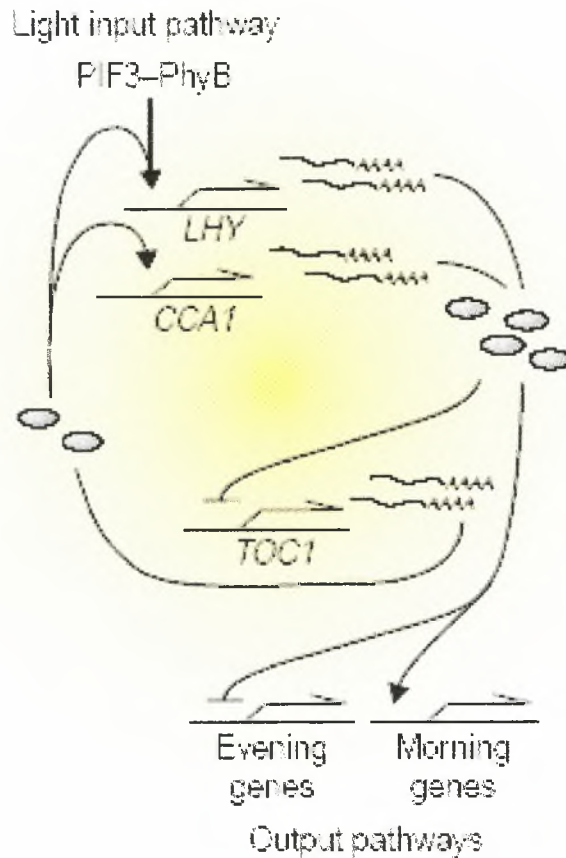
Συνοψίζοντας λοιπόν, ο TOC1 μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζεται αρνητικά από τις *LHY/CCA1* πρωτεΐνες (αρνητικά στοιχεία του κεντρικού ταλαντωτή) μέσω της πρόσδεσης τους στο εσπερινό στοιχείο (EE) του υποκινητή του. Στον αντίποδα αυτού, η TOC1 πρωτεΐνη (θετικό στοιχείο του κεντρικού ταλαντωτή) επάγει την έκφραση των *LHY/CCA1* γονιδίων. Ετσι κλείνει και αυτορυθμίζεται ο βρόγχος επανατροφοδότησης του κεντρικού ταλαντωτή. Το πρωινό στοιχείο (AAAAATCT) εντοπίζεται στους υποκινητές όλων των ρυθμικών γονιδίων που παρουσιάζουν μέγιστα επίπεδα έκφρασης την αυγή. Αυτό το στοιχείο αναγνωρίζουν οι *LHY/CCA1* παράγοντες και μέσω της πρόσδεσης τους σε αυτό, αυξάνουν την συγγένεια του υποκινητή του πρωινού γονιδίου με την μεταγραφική μηχανή επιτρέποντας έτσι την έναρξη της μεταγραφής του (*Wang et al., 1997*). Η αλληλουχία του πρωινού στοιχείου (AAAAATCT) είναι παρόμοια με την αλληλουχία του εσπερινού στοιχείου (AAAAATATCT) με μόνη διαφορά, την προσθήκη μιας θυμίνης. Και όμως η ελάχιστη αυτή διαφορά, επαρκεί για να καθορίσει το εάν ένα γονίδιο θα εκφραστεί την αυγή ή το σούρουπο.

1.6 Το μοντέλο ενός λειτουργικού κεντρικού ταλαντωτή στα φυτά

Με βάση λοιπόν όλα τα παραπάνω, είμαστε πλέον σε θέση να δώσουμε μια απλουστευμένη περιγραφή της μέχρι σήμερα γνωστής λειτουργίας του κεντρικού ταλαντωτή (Σχήμα 1.24). Την αυγή λοιπόν, ανάλογα με το φάσμα και την ένταση του φωτός, οι τάξεις των φωτοϋποδοχέων στα φυτά συνεργάζονται και συλλαμβάνουν το φως. Τα χρωμοφόρα των φωτοϋποδοχέων ενεργοποιούνται από την απορρόφηση φωτονίων και προκαλούν μια στερεοχημική αλλαγή στη δομή της αποπρωτεΐνης. Τα φυτοχρώματα ενεργοποιημένα πλέον, εισέρχονται στον πυρήνα όπου και αλληλεπιδρούν, δημιουργώντας σύμπλοκα με τον bHLH *PIF3* μεταγραφικό παράγοντα. Το ενεργοποιημένο *PHY(pfr) – PIF3* σύμπλοκο εμφανίζει μια αυξημένη στερεοχημική συγγένεια με το AAAAAATCT πρωινό στοιχείο που εδρεύει στον υποκινητή των *LHY/CCA1*, ενεργοποιώντας άμεσα τη μεταγραφή τους και εκδηλώνοντας έτσι το φαινόμενο της οξείας απόκρισης (*Acute Response*).

Ωστόσο κατά τη διάρκεια της νύχτας, τα υψηλά επίπεδα της TOC1 πρωτεΐνης, άρχισαν ήδη να ενεργοποιούν την μεταγραφή των *LHY* και *CCA1* γονιδίων. Κατά την αυγή, τα επίπεδα της TOC1 πρωτεΐνης έχουν σχεδόν εκμηδενιστεί από την σκοτο-εξαρτώμενη αποικοδόμηση του *ZTL* παράγοντα ενώ τα ήδη αυξημένα επίπεδα του mRNA των *LHY/CCA1* κορυφώνονται με την οξεία απόκριση των δύο παραγόντων

στο φως της αυγής. Έτσι καταστέλεται η περαιτέρω μεταγραφή του *TOC1* γονιδίου και το ρολόι συντονίζεται στην νέα μέρα που έχει ξεκινήσει.



Σχήμα 1.24 Ένα απλουστευμένο μοντέλο της αμοιβαίας ρύθμισης σε επίπεδο μεταγραφής των *LHY*, *CCA1* και *TOC1* μεταγραφικών παραγόντων, που εξασφαλίζει την ομαλή λειτουργία του κεντρικού ταλαντωτή (ΠΗΓΗ : Hayama και Coupland, 2003).

Κατά τη διάρκεια της ημέρας, οι *LHY/CCA1* πρωτεΐνες ενεργοποιούν διάφορα “πρωινά γονίδια” μέσω της πρόσδεσης τους στο *AAAAATCT* μοτίβο που εδρεύει στον υποκινητή τους ενώ καταστέλουν την μεταγραφή πλήθους “απογευματινών γονιδίων” μέσω της πρόσδεσης τους στο *AAAATATCT* μοτίβο του υποκινητή τους. Παράλληλα έχει αρχίσει η ρυθμική μεταγραφή του *APRR* κουϊντέτου, μεταγραφή που ξεκίνησε πρώτος ο φωτοεπαγώμενος, πρωινός *APRR9* παράγοντας την αυγή.

Παράλληλα, τα επίπεδα του *LHY* και *CCA1* mRNA λόγω της μειωμένης επαγωγής τους από τον ενεργοποιητή τους (*TOC1* πρωτεΐνη), αρχίζουν σταδιακά να τείνουν προς την ελάχιστη τιμή τους το απόγευμα, με αντίστοιχη ελάττωση των *LHY/CCA1* πρωτεϊνών. Το απόγευμα με σύμμαχο τόσο το φως που καταστέλλει την δράση του *ZTL* σηματοδότη της αποικοδόμησης της *TOC1* πρωτεΐνης, όσο και τα σταδιακά φθίνοντα επίπεδα των μεταγραφικών καταστολέων του (*LHY/CCA1*), αλλά και με πιθανή την συμμετοχή της *APRR3* πρωτεΐνης που τότε είναι μέγιστη, τα επίπεδα μεταγραφής του *TOC1* διαρκώς αυξάνονται για να κορυφωθούν κατά τη δύση.

Στη διάρκεια της νύχτας, η *TOC1* πρωτεΐνη αρχίζει σταδιακά να ενεργοποιεί την έκφραση των *LHY/CCA1* με τα επίπεδα των τελευταίων να αυξάνονται σταδιακά.

Ωστόσο το σκοτάδι θα ενεργοποιήσει τη πρωτεΐνη ZTL, η οποία θα αρχίσει να σηματοδοτεί την αποικοδόμηση της TOC1 πρωτεΐνης. Παράλληλα, όσο περνά η νύχτα τόσο τα επίπεδα μεταγραφής των *LHY/CCA1* θα αρχίζουν να αυξάνονται εκδηλώνοντας την αυγή την ενδογενή *πρόβλεψη του φωτός (Light Anticipation)* των δύο γονιδίων, με αντίστοιχη αύξηση των *LHY/CCA1* πρωτεϊνών. Τότε οι τελευταίες θα αρχίζουν να καταστέλλουν την μεταγραφή του *TOC1* γονιδίου ενώ τα μέγιστα επίπεδα των *LHY/CCA1* και τα ελάχιστα επίπεδα του *TOC1* θα σηματοδοτήσουν την έναρξη ενός νέου κύκλου.

1.7 Ο *ELF3* παράγοντας και ο ρόλος του στον συγχρονισμό της φάσης των κίρκαδικών ταλαντώσεων με τα ερεθίσματα του περιβάλλοντος.

Στις προηγούμενες παραγράφους, έγινε μια σύντομη αναφορά στους μοριακούς λεπτοδείκτες του βιολογικού ρολογιού των φυτών, τους μεταγραφικούς παράγοντες *LHY/CCA1* και *TOC1 (APRR1)*. Είδαμε πως η αμοιβαία ρύθμιση της μεταγραφής τους κατά την διάρκεια του 24 ώρου, δημιουργεί τις κίρκαδικές ταλαντώσεις των ίδιων των στοιχείων του κεντρικού ταλαντωτή και πως οι ίδιοι μεταγραφικοί παράγοντες τελικά ρυθμίζουν την περιοδική έκφραση ενός πλήθους ρυθμικών γονιδίων μέσω της αναγνώρισης και πρόσδεσης τους σε συγκεκριμένα μοτίβα των υποκινητών τους. Επιπλέον είδαμε ότι το φως κατέχει εξέχουσας σημασίας ρόλο για την ομαλή λειτουργία του βιολογικού ρολογιού καθώς μέσω των φωτουποδοχέων, σηματοδοτεί το κεντρικό ταλαντωτή.

Μιλήσαμε επίσης για δύο φαινόμενα που παρουσιάζουν τα φωτοεπαγόμενα γονίδια, το φαινόμενο της *οξείας απόκρισης (Acute Response)* στο φως που αποτελεί τον καρπό της άμεσης επίδρασης των εξωτερικών παραγόντων στη φωτοεπαγόμενη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων καθώς και το φαινόμενο της *πρόβλεψης του φωτός (Light Anticipation)* που φανερώνει τον ενδογενή έλεγχο των κίρκαδικών ταλαντώσεων. Τα δύο αυτά φαινόμενα που εμφανίζουν τα φωτοεπαγόμενα γονίδια αλληλοσυμπληρώνουν το ένα το άλλο, φανερώνοντας ότι οι κίρκαδικές ταλαντώσεις δεν είναι φαινόμενο αυστηρά υπό τον έλεγχο του πυρήνα (ενδογενής ρύθμιση) ή υπό τον έλεγχο του κυτοπλάσματος (φωτουποδοχείς) αλλά είναι μάλλον το προϊόν της συνδυασμένης δράσης και των δύο, παρέχοντας στο φυτό τη μέγιστη δυνατή ευελιξία στην καταγραφή του χρόνου.

Ωστόσο για να είναι λειτουργικό το βιολογικό ρολόι, θα πρέπει η ευελιξία του να είναι ελεγχόμενη. Τα μηχανικά ρολόγια διαθέτουν ειδικό μηχανισμό για να ρυθμίζονται στην τοπική ώρα. Δεν αρκεί λοιπόν απλά ένα ρολόι να λειτουργεί σωστά, πρέπει να λειτουργεί και στην σωστή ώρα ! Για παράδειγμα ας υποθέσουμε την ύπαρξη ενός φυτού με ένα λειτουργικό κεντρικό ταλαντωτή αλλά με απουσία ενός μηχανισμού ρύθμισης αυτού. Τι θα γινόταν κατά τη διάρκεια μιας καταιγίδας κατά τις νυχτερινές ώρες ; Ή τι θα γινόταν αν αυτό το φυτό βρισκόταν σε κάποιο σημείο κοντά στην εθνική οδό, που φωτίζεται ολονυχτίς ;

Οι επαναλαμβανόμενες λάμπεις από τους κεραυνούς και τις ασπράπες, ή το φως της λάμπας στην ενθική (παρόλο που είναι διαφορετικής έντασης και μήκους κύματος από το φυσικό φως) θα προκαλούσαν μοιραία την εμφάνιση οξείας απόκρισης στους μεταγραφικούς παράγοντες *LHY/CCA1* πολύ νωρίτερα από την αυγή. Συνεπώς ο κεντρικός ταλαντωτής θα ρυθμιζόταν εσφαλμένα σε μια “νέα” τοπική ώρα με αρνητικές συνέπειες για τη φυσιολογία του φυτού. Για παράδειγμα, αντί το φυτό να επιδιώκει να αυξηθεί επιμηκύνοντας τα κύτταρα του τις πρώτες ώρες της νύχτας, θα επενδύει ασκόπως μόρια ATP για να συνθέσει την SSU της RUBISCO καθώς και τις LHC πρωτεΐνες.

Συνεπώς η πρόνοια της εξέλιξης των φυτών θα πρέπει να έχει δημιουργήσει ένα μηχανισμό που θα μπλοκάρει τη σηματοδότηση του κεντρικού ταλαντωτή από το φως, σε συγκεκριμένες στιγμές της κirkκαδικής ταλάντωσης, ασκώντας έτσι μια ενδογενή επιλογή στα φωτεινά ερεθίσματα του περιβάλλοντος που θα θέσουν το ρολόι σε νέα φάση. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό στην διεθνή βιβλιογραφία ως το *φαινόμενο gating (gating effect)* ενώ ο κύριος παράγοντας που το ελέγχει στα φυτά είναι ο *ELF3* παράγοντας.

1.7.1 Η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός του *ELF3* παράγοντα.

Άλλη μια απόδειξη για το πόσο στενά συσχετίζεται η φυσιολογία της άνθισης με το κirkκαδικό ρολόι, αποτελεί και ο τρόπος με τον οποίο ανακαλύφθηκε ο *ELF3* παράγοντας. Ο Meeks και οι συνεργάτες του σε μια προσπάθεια να ανιχνεύσουν γονιδιακές θέσεις που σχετίζονται με τον έλεγχο της άνθισης, απομόνωσαν τον παράγοντα *ELF3*. Μεταλλάξεις του εν λόγω γονιδίου σε φυτά του μακροήμερου είδους *Arabidopsis thaliana*, φανέρωσαν έναν ανθικό φαινότυπο ο οποίος ήταν πρώιμος τόσο σε συνθήκες μεγάλης όσο και σε συνθήκες μικρής μέρας (Zagotta et al., 1992; Zagotta et al., 1996). Η πειραματική επιβεβαίωση ότι ο εν λόγω παράγοντας σχετίζεται άμεσα με το ρολόι, ήρθε από την παρατήρηση ότι γνωστοί κirkκαδικοί ρυθμοί όπως οι κινήσεις φύλλων και οι ταλαντώσεις των CAB γονιδίων, έφθιναν υπό το καθεστώς της μετάλλαξης στον *ELF3* γονιδιακό τόπο (Hicks et al., 1996; Reed et al., 2000).

Η αρρυθμία που παρατηρείται στις ταλαντώσεις γνωστών κirkκαδικών γονιδίων, είναι ένα φαινόμενο που όπως έχουμε δει, λαμβάνει χώρα όταν ο κεντρικός ταλαντωτής του ρολογιού είναι δυσλειτουργικός. Συνεπώς κάποιος θα μπορούσε να υποθέσει ότι ο *ELF3* παράγοντας είναι ένα στοιχείο του κεντρικού ταλαντωτή όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες *LHY/CCA1* και *TOC1*. Ωστόσο υπάρχει μια λεπτομέρεια που βεβαιώνει για το αντίθετο. Τόσο η μετάλλαξη στο *elf3-1* αλληλόμορφο του παράγοντα όσο και η μετάλλαξη στο *elf3-7* αλληλόμορφο αυτού, διαταράσσουν τον φαινότυπο των κirkκαδικών ταλαντώσεων προκαλώντας αρρυθμία, μόνο υπό συνθήκες συνεχούς φωτός (Hicks et al., 1996; Reed et al., 2000). Σε συνεχές σκοτάδι έχει παρατηρηθεί κirkκαδική ρυθμικότητα σε φυτά μεταλλαγμένα ως προς τα *ELF3* αλληλόμορφα (Hicks et al., 1996). Η *ELF3* πρωτεΐνη έχει χαρακτηριστεί ως μια καινοφανής πρωτεΐνη η οποία δεν μοιράζεται δομική ομολογία με άλλες γνωστές πρωτεΐνες. Η *elf3-1* μετάλλαξη λαμβάνει χώρα στο τρίτο από τα τέσσερα εξόνια του γονιδίου (Hicks et al., 2001) με αποτέλεσμα να απουσιάζει εντελώς τόσο η *ELF3* πρωτεΐνη όσο και το μεταγράφημα της σε *elf3-1* μεταλλαγμένα φυτά.

Για να γίνει κατανοητός ακριβώς ο ρόλος του *ELF3* στο κirkκαδικό ρολόι, θα προηγηθεί μια σύντομη αναφορά για το πως μελετάται μια αλλαγή φάσης μιας κirkκαδικής ταλάντωσης στο είδος *Arabidopsis thaliana*. Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε φυτά φυσικού τύπου του συγκεκριμένου είδους, η φωτοεπαγόμενη σηματοδότηση του κεντρικού ταλαντωτή εξαρτάται τόσο από την ποιότητα (μήκος κύματος) όσο και από την ένταση του φωτεινού ερεθίσματος. Υπό το καθεστώς των συνθηκών συνεχούς φωτός ισχύει ότι η διάρκεια της περιόδου ενός ελεύθερα εξελισσόμενου κirkκαδικού ρυθμού είναι αντιστρόφως ανάλογη της έντασης του φωτός, δηλαδή υψηλή ένταση συνεχούς φωτός, προκαλεί σμίκρυνση της περιόδου του ρυθμού ενώ χαμηλής εντάσεως φωτισμός, επιμηκύνει την περίοδο. Τα παραπάνω διατυπώθηκαν από τον Aschoff το 1979 και αποτελούν ένα βασικό κανόνα της χρονοβιολογίας. Με βάση τον κανόνα Aschoff μπορούν να κατασκευαστούν τυπικές καμπύλες απόκρισης

στην ένταση του φωτός (**FRC** – Fluence rate **R**esponse **C**urves) σε διάφορα μήκη κύματος και εντάσεις φωτός.

Επιπλέον αν και το φως αποτελεί ένα ισχυρό χρονοδότη (*Zeitgeber*) του κεντρικού ταλαντωτή αποτελώντας έτσι ένα ισχυρό ερέθισμα αλλαγής της φάσης των κερκαδικών ταλαντώσεων, η απόκριση του κεντρικού ταλαντωτή με αποτέλεσμα την αλλαγή φάσης των κερκαδικών ρυθμών, δεν είναι η ίδια καθόλη την διάρκεια της ημέρας. Με άλλα λόγια η επίδραση ενός φωτεινού παλμού σε διάφορες φάσεις ενός κερκαδικού κύκλου, μπορεί να αλλάξει την φάση της ταλάντωσης με αποτέλεσμα να παρατηρείται επιτάχυνση ή επιβράδυνση αυτής (*Johnson, 1992*). Συνεπώς η κατασκευή καμπύλων απόκρισης στην ένταση φωτός (**Phase Response Curves** – **PRC**) αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στην μελέτη αλλαγής φάσης των κερκαδικών ταλαντώσεων.

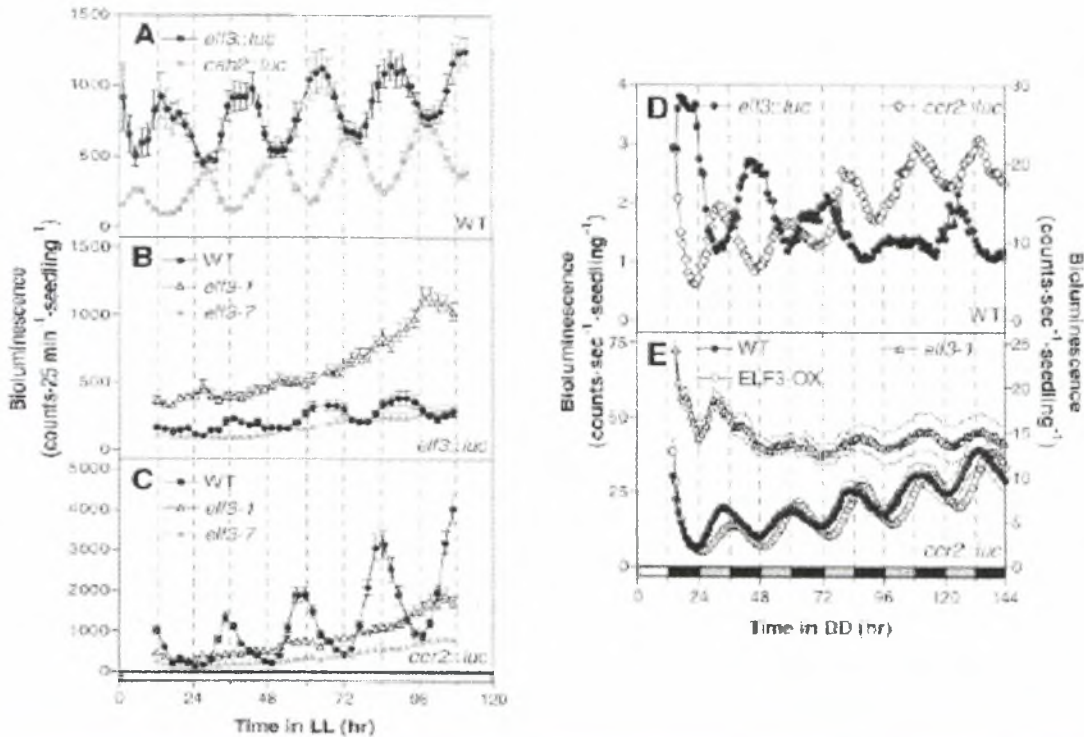
Το μειονέκτημα τους όμως είναι ότι για να γίνουν εφικτές τέτοιου είδους μελέτες, πρέπει να υπάρχει ένα γονίδιο αναφοράς που θα παρουσιάζει ισχυρές κερκαδικές ταλαντώσεις σε συνθήκες συνεχούς σκότους, για να μπορέσει να δεχτεί τους φωτεινούς παλμούς. Δυστυχώς στο *Arabidopsis* οι περισσότεροι κερκαδικοί ρυθμοί φθίνουν μετά από ένα το πολύ δύο κερκαδικούς κύκλους σε συνθήκες συνεχούς σκότους. Έτσι σήμερα η μελέτη των αλλαγών φάσης γίνεται με συνδυασμό τόσο των καμπυλών απόκρισης όσο και του γονιδίου της λουσιφεράσης, συντηγμένου στον υποκινητή του *CCR2* απογευματινού γονιδίου που παρουσιάζει έντονη κερκαδική ταλάντωση τόσο σε LL συνθήκες όσο και σε DD (*Strayer et al., 2000*).

1.7.2 Το μεταγραφικό προφίλ του *ELF3* παράγοντα και η επίδραση των διαταραχών της δράσης του στον κερκαδικό κύκλο.

Ο Covington και οι συνεργάτες του μελέτησαν διεξοδικά τον *ELF3* παράγοντα. Με χρήση τόσο του *ELF3* όσο και του *CCR2* υποκινητή, ως γονιδίων αναφοράς έπειτα από σύντηξη στο γονίδιο της λουσιφεράσης, μελέτησαν το μεταγραφικό προφίλ του ενδογενούς *ELF3* καθώς και τα επίπεδα του *CCR2* απογευματινού γονιδίου τόσο σε φυτά άγριου τύπου όσο και σε φυτά που βρίσκονταν υπό το καθεστώς της *ELF3* μετάλλαξης (Σχήμα 1.25, *Covington et al., 2001*). Από αυτή την έρευνα φανερώθηκε ότι σε φυτά φυσικού τύπου ο *ELF3* παράγοντας είναι ρυθμικός και μάλιστα πρόκειται για ένα απογευματινό γονίδιο αφού η φάση του είναι αντίθετη από αυτή των “πρωινών” CAB γονιδίων. Η επίδραση του παράγοντα στον ρυθμό της *CCR2* ταλάντωσης, εξαρτώταν από τις συνθήκες φωτός καθώς σε συνθήκες συνεχούς φωτός, ο *CCR2* ρυθμός έφθινε λόγω της *ELF3* μετάλλαξης ενώ σε συνθήκες συνεχούς σκότους εξελισσόταν το ίδιο όπως και σε φυτά άγριου τύπου ανεξαρτήτως από την ποσότητα της λειτουργικής *ELF3* πρωτεΐνης (Σχήμα 1.25 C).

Αυτό που σχετίζει άμεσα τον *ELF3* με την ρύθμιση της αλλαγής φάσης των κερκαδικών ταλαντώσεων είναι η παρατήρηση ότι η απώλεια δράσης του έχει ως αποτέλεσμα την υπερευαισθησία των μεταλλαγμένων φυτών ως προς την εμφάνιση της οξείας απόκρισης των CAB γονιδίων στο φως μέσω της σηματοδότησης των φυτοχρωμάτων (*Anderson et al., 1997*). Μια τέτοια παρατήρηση συνεπάγεται ότι ο *ELF3* παράγοντας ίσως ανταγωνίζεται την επαγωγή από το φως των φωτορυθμιζόμενων γονιδίων του ρολογιού με αποτέλεσμα να αποσβένει έτσι πιθανές αλλαγές φάσης του κερκαδικού κύκλου. Το φαινόμενο προσομοιάζεται με μια θύρα όπου σε ορισμένες φάσεις του κερκαδικού κύκλου παραμένει κλειστή (η σηματοδότηση του κεντρικού ταλαντωτή από το φως μπλοκάρεται από τον παράγοντα) ενώ κατά την διάρκεια άλλων ανοιχτή (η σηματοδότηση επιτρέπεται από τον παράγοντα).

Σε αυτή την περίπτωση, φυτά που υπερεκφράζουν τον *ELF3* παράγοντα (*ELF3-OX* φυτά) θα πρέπει να παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στην επαγωγή από το φως, των *CAB* γονιδίων. Έτσι σε χλωρωτικά φυτά με απώλεια δράσης του *ELF3*, η επίδραση φωτεινών παλμών στο μήκος κύματος του ερυθρού για δύο λεπτά είχε ως

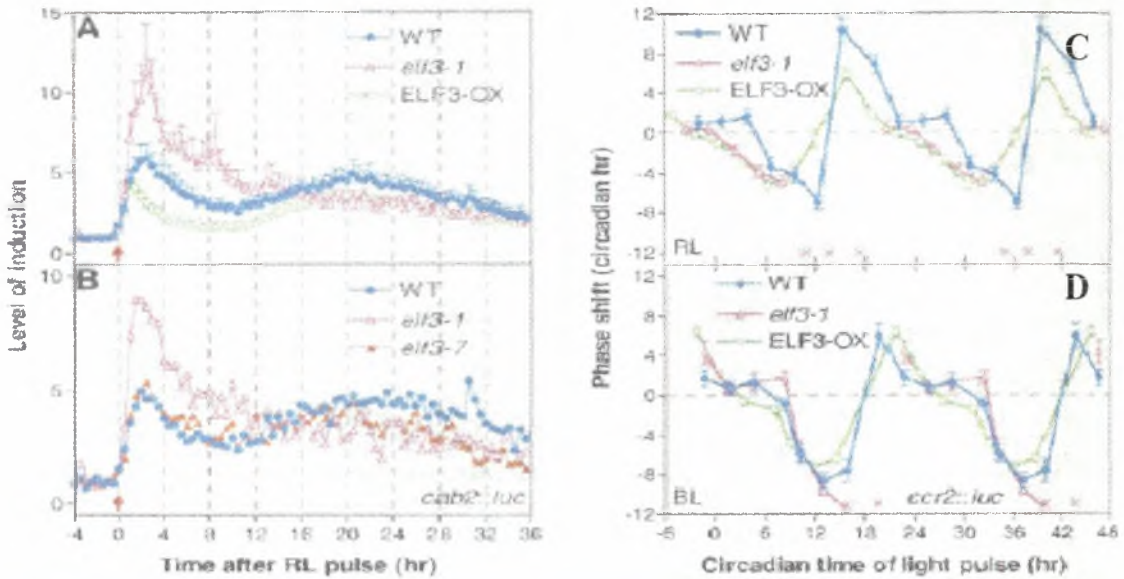


Σχήμα 1.25 : Το μεταγραφικό προφίλ του *ELF3* παράγοντα. (A) Σε φυτά άγριου τύπου και υπό συνεχή φως, το *ELF3* μεταγράφημα εκτελεί κिरκαδικές ταλαντώσεις σε αντίθετη φάση από αυτή των *CAB* γονιδίων. (B) Τόσο η *elf3-1* όσο και η *elf3-7* μεταλλάξη προκαλούν αρρυθμία στα ενδογενή επίπεδα του *ELF3* παράγοντα σε συνεχή φως, σε σχέση με φυτά άγριου τύπου. (C) Η επίδραση των παραπάνω μεταλλάξεων επίσης προκαλεί αρρυθμία και σε άλλα κिरκαδικά γονίδια όπως το *CCR2* υπό συνθήκες συνεχούς φωτός. (D) Σε συνθήκες συνεχούς σκοταδιού η έκφραση τόσο του *ELF3* όσο και του *CCR2* παραμένει ρυθμική σε φυτά άγριου τύπου. (E) Ο κिरκαδικός ρυθμός του *CCR2* γονιδίου παραμένει ανεπηρέαστος τόσο σε φυτά που δεν εκφράζουν λειτουργική *ELF3* πρωτεΐνη (*elf3-1* φυτά) όσο και σε φυτά που υπερεκφράζουν τον *ELF3* παράγοντα υπό συνθήκες συνεχούς σκοταδιού, φανερώνοντας έτσι ότι ο παράγοντας σχετίζεται με τη παρεμπόδιση της δράσης (gating) του φωτός σε συγκεκριμένες φάσεις ενός κिरκαδικού κύκλου. (ΠΗΓΗ : Covington et al., 2001)

αποτελεσμα την αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της λουσιφεράσης συντηγμένου στον υποκινητή των *CAB* γονιδίων, κατά δώδεκα φορές σε σχέση με τα χλωρωτικά επίπεδα πριν τον παλμό. Σε φυτά φυσικού τύπου η αύξηση αυτή ήταν έξι φορές ενώ σε φυτά που υπερέκφραζαν τον *ELF3* παράγοντα και θα έπρεπε να είναι λιγότερα ευαίσθητα σε φωτεινά σήματα, ο παλμός οδήγησε σε επίπεδα mRNA τέσσερις φορές υψηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα πριν τον παλμό (Σχήμα 1.26 A και B). Αυτή η διαφορά όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντική, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη αύξηση σε φυτά φυσικού τύπου.

Επιπλέον ο ρυθμός απόσβεσης των υψηλών επιπέδων της λουσιφεράσης σε αυτά τα φυτά ήταν διαφορετικός, φανερώνοντας μια διαφορετική κινητική επίτευξης του μεγίστου του mRNA ανάλογα με την ποσότητα του λειτουργικού *ELF3* παράγοντα. Έτσι παρόλο που στα *elf3* μεταλλαγμένα φυτά και στα φυτά φυσικού τύπου, τα

CAB::luc επίπεδα mRNA συνέχισαν να αυξάνονται επί τρεις ώρες, στα φυτά που υπερέκφραζαν τον *ELF3*, το μέγιστο επιτεύχθηκε 1 ώρα νωρίτερα, ενώ η απόσβεση των επιπέδων σε αυτή την περίπτωση ήταν ταχύτερη και οδήγησε σε μια μεγαλύτερη ελάχιστη τιμή σε σχέση με τα άλλα δύο είδη φυτών (*elf3* μεταλλαγμένα και άγριου τύπου). Η οξεία απόκριση του CAB υποκινητή στην παρουσία φωτός και στις τρεις περιπτώσεις, οδήγησε σε έναρξη κερκαδικών ταλαντώσεων στη συνέχεια.



Σχήμα 1.26 : Ο ρόλος του *ELF3* στην οξεία απόκριση και στην αλλαγή φάσης των κερκαδικών ρυθμών. (A) Η οξεία απόκριση του *CAB::luc* γονιδίου αναφοράς ήταν δώδεκα φορές μεγαλύτερη σε *elf3-1* μεταλλαγμένα φυτά μετά από επίδραση φωτεινού παλμού στην περιοχή του ερυθρού, σε σχέση με τα επίπεδα του mRNA πριν το παλμό. Η αύξηση στα φυτά άγριου τύπου ήταν έξι φορές ενώ στα φυτά που υπερέκφραζαν το *ELF3* παράγοντα (*ELF3-OX*) η αύξηση ήταν τέσσερις φορές. (B) Η μετάλλαξη τόσο στο *elf3-1* όσο και στο *elf3-7* αλληλόμορφο, οδήγησε στην εμφάνιση οξείας απόκρισης. (C) Καμπύλη απόκρισης στο φως και αλλαγή φάσης της *CCR2::luc* ταλάντωσης έπειτα από επίδραση φωτεινών παλμών στην περιοχή του ερυθρού σε *elf3-1* μεταλλαγμένα, *ELF3-OX* και άγριου τύπου φυτά. (D) Ομοίως με πριν με την διαφορά ότι ο παλμός είναι στην περιοχή του κυανού. Τα κόκκινα βέλη υποδηλώνουν την στιγμή εφαρμογής του παλμού, τα κόκκινα "x" το σημείο του ρυθμού όπου προκαλείται η αρρυθμία, ενώ αρνητικές τιμές στα C και D διαγράμματα υποδηλώνουν αλλαγή φάσης λόγω επιβράδυνσης του ρυθμού, ενώ οι θετικές τιμές αλλαγή φάσης λόγω επιτάχυνσης του ρυθμού (ΠΗΓΗ : Covington et al., 2001).

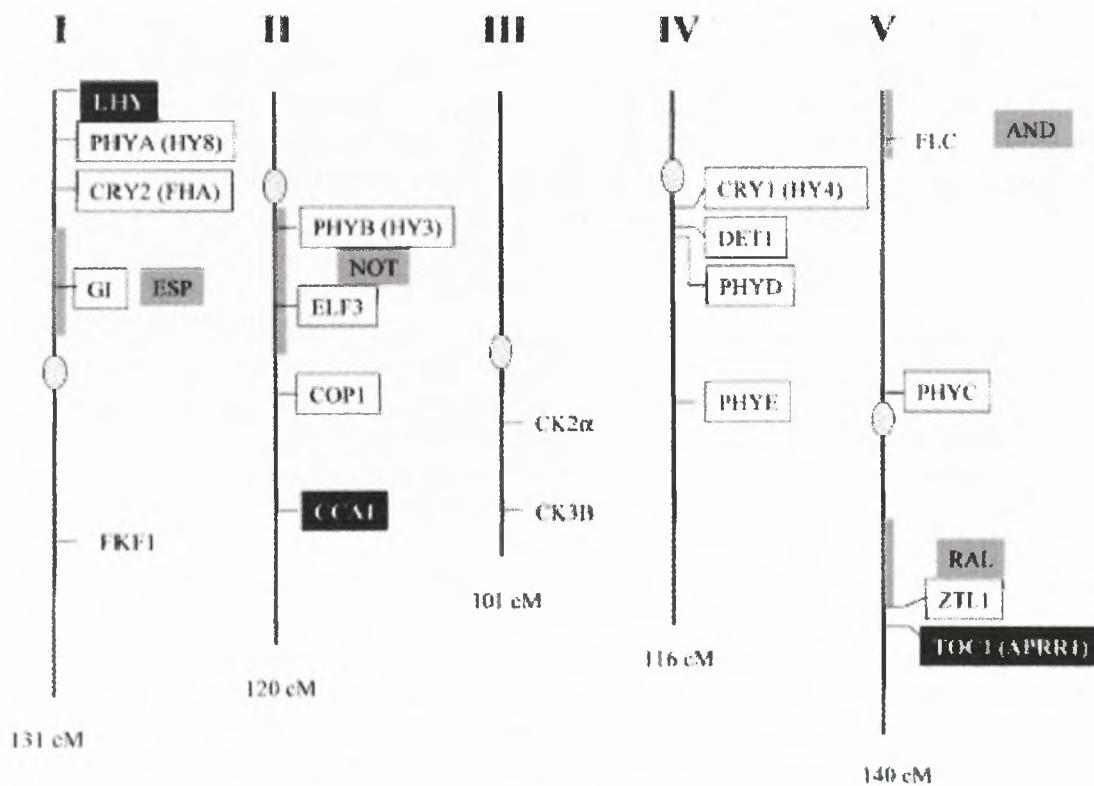
Η ανάλυση των καμπύλων απόκρισης στο φως τόσο στην περιοχή του ερυθρού όσο και στην περιοχή του κυανού, αναφορικά με την ταλάντωση του *CCR2::luc* κατασκευάσματος, έδειξε ότι σε φυτά φυσικού τύπου οι φωτεινοί παλμοί την υποκειμενική αυγή (Subjective Dawn) συντέλεσαν σε μικρή επιμήκυνση της περιόδου του ρυθμού (επιτάχυνση της ταλάντωσης). Αργότερα κατά την διάρκεια της υποκειμενικής ημέρας (μετά το CT6), οι φωτεινοί παλμοί οδήγησαν σε καθυστέρηση του ρυθμού που αυξανόταν όσο ο παλμός ήταν προς την δύση. Το μέγιστο της αλλαγής φάσης παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της νύχτας, όπου οι μεγάλες καθυστερήσεις στο ρυθμό έγιναν πρόωρη φάση, που έφθινε όσο πλησίαζε η αυγή, ενώ τότε επέστρεψε και η μικρή επιτάχυνση του ρυθμού που είχε παρατηρηθεί κατά τις πρωινές ώρες.

Στα φυτά που υπερέκφραζαν τον *ELF3* παράγοντα, οι αλλαγές φάσης έγιναν με τον ίδιο τρόπο αλλά ήταν μικρότερης έντασης από αυτές που παρατηρήθηκαν στα φυτά

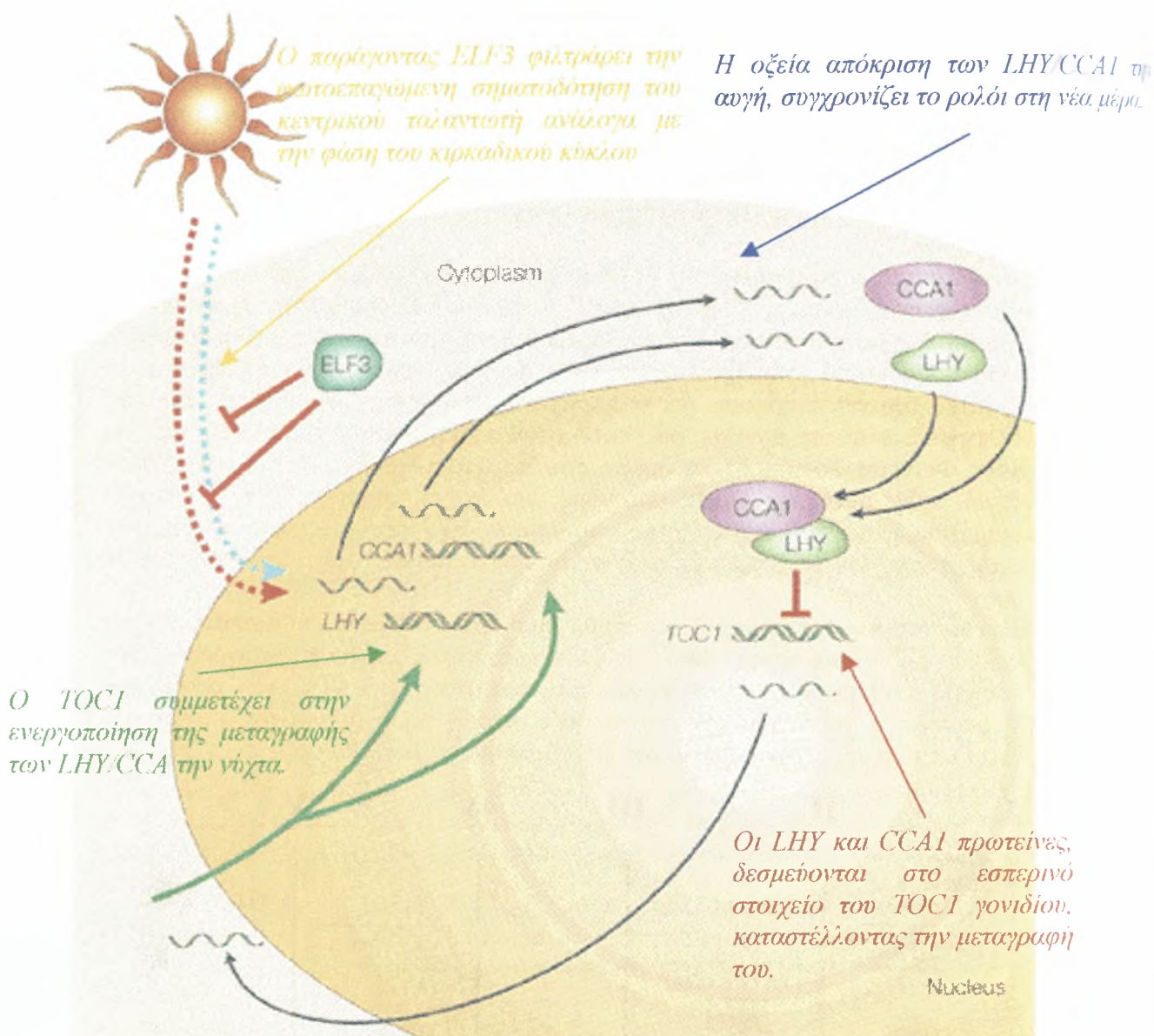
φυσικού τύπου. Το ενδιαφέρον ήταν στα φυτά που είχαν υποστεί μεταλλάξεις που οδήγησαν στην απώλεια της *ELF3* λειτουργικής πρωτεΐνης. Αυτά τα φυτά παρουσίασαν τις ίδιες αλλαγές φάσης κατά την διάρκεια της ημέρας με τα *ELF3-OX* και τα φυσικού τύπου φυτά. Ωστόσο κατά την διάρκεια της νύχτας οι φωτεινοί παλμοί που εφαρμόστηκαν οδήγησαν την ταλάντωση σε αρρυθμία, φανερώνοντας τον ρόλο που έχει ο *ELF3* παράγοντας ως φρουρός των κερκαδικών ταλαντώσεων έναντι της εσφαλμένης σηματοδότησης του κεντρικού ταλαντωτή από το φως (Σχήμα 1.26 C και D).

Συνοψίζοντας, ο φαινότυπος της *ELF3* μετάλλαξης εμφανίζεται μόνο σε συνθήκες συνεχούς φωτός. Συνεπώς η δράση του *ELF3* παράγοντα τοποθετείται πριν από τον κεντρικό ταλαντωτή, στα μονοπάτια σηματοδότησης του από τους φωτούποδοχείς. Ωστόσο πόσο κοντά εντοπίζεται αυτή στον κεντρικό ταλαντωτή; Ο Kay και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι ο παραπάνω φαινότυπος εκφράζεται στα *elf3* μεταλλαγμένα φυτά σε συνεχές φως τόσο στην περιοχή του ερυθρού όσο και του κυανού. Φαίνεται λοιπόν ότι η δράση του παράγοντα εκδηλώνεται κοντά στον κεντρικό ταλαντωτή και είναι υπεύθυνη για το φιλτράρισμα των φωτεινών ερεθισμάτων μέσω του περιορισμού της ευαισθησίας στο φως των μονοπατιών σηματοδότησης του κεντρικού ταλαντωτή, σε συγκεκριμένες φάσεις του κερκαδικού κύκλου.

Εδώ κλείνει και η περιγραφή των σημαντικότερων στοιχείων που αποτελούν το κερκαδικό ρολόι στα φυτά. Μια απλουστευμένη αλλά πλήρης περιγραφή ενός κερκαδικού κύκλου σε μοριακό επίπεδο φαίνεται στο σχήμα 1.28 ενώ στο σχήμα 1.27 φαίνεται η χαρτογράφηση του σπουδαιότερων παραγόντων του κερκαδικού ρολογιού στα πέντε χρωμοσώματα του είδους *Arabidopsis thaliana*.



Σχήμα 1.27 :Χρωμοσωμική χαρτογράφηση των κυριότερων στοιχείων του κερκαδικού ρολογιού στο είδος *Arabidopsis thaliana* (ΠΗΓΗ : Roden και Carré, 2001).



Σχήμα 1.28 : Το μοντέλο του κεντρικού ταλαντωτή στο είδος *Arabidopsis thaliana*. Αναφέρονται οι σημαντικότεροι παράγοντες που συμμετέχουν καθώς και ο ρόλος του καθενός κατά την διάρκεια ενός πλήρους κιρκαδικού κύκλου. Οι κυματοειδείς γραμμές συμβολίζουν κιρκαδικό ρυθμό.

1.8 Τα μονοπάτια εξόδου από τον κεντρικό ταλαντωτή και η ορχήστρα της μεταγραφής.

Στην αρχή αυτής της ενότητας έγινε μια αναφορά σε κάποια ρυθμικά γονίδια που ήταν γνωστά προτού αρχίσει να διαλευκάνεται η μοριακή φύση του κιρκαδικού ρολογιού στα φυτά. Όσο όμως αποκαλύπτονταν στα μάτια των ερευνητών τα στοιχεία που αποτελούν το βιολογικό ρολόι σε μοριακό επίπεδο, άρχισε να γίνεται μια προσέγγιση του τρόπου με τον οποίο οι κιρκαδικές ταλαντώσεις εναρμονίζουν την φυσιολογία του φυτού στο σύνολό της με τους φυσικούς κύκλους εναλλαγής φωτός-σκότους. Το τελευταίο διακριτό μέρος ενός βιολογικού ρολογιού είναι το

σύνολο των μονοπατιών εξόδου του κεντρικού ταλαντωτή. Με άλλα λόγια είναι το σύνολο των γονιδίων των οποίων η έκφραση ακολουθεί το κίρκαδικό πρότυπο.

Μια από τις πληρέστερες μελέτες σχετικά με το εύρος των γονιδίων που εμφανίζουν ρυθμικά επίπεδα έκφρασης, είναι αυτή του Kay και των συνεργατών του (Harmer *et al.*, 2000). Με χρήση υψηλής πυκνότητας νουκλεοτιδικών μικροσυστοιχιών μπόρεσαν να ανιχνεύσουν το γένωμα του *Arabidopsis thaliana* για γονίδια που εμφανίζουν κίρκαδική ρύθμιση της έκφρασης τους. Από τα 8000 και πλέον γονίδια που έλεγξαν, το 6 % περίπου βρέθηκε ότι αντιστοιχεί σε ρυθμικά γονίδια, αντιπροσωπεύοντας ένα αριθμό περίπου 452 γονιδίων. Από αυτά το 28 % αντιπροσωπεύει γονίδια στα οποία δεν έχει αποδοθεί μέχρι σήμερα κάποιος λειτουργικός ρόλος, ενώ είκοσι από τα υπόλοιπα αντιστοιχούν σε ήδη γνωστά γονίδια που σχετίζονται στενά με το ρολόι (Harmer *et al.*, 2000).

Η πρώτη και κυριότερη ίσως κατηγορία ρυθμικών γονιδίων που ανακαλύφθηκαν, σχετίζεται με τη προετοιμασία του φυτού να δεχθεί τόσο το φώς της αυγής όσο και τις χαμηλές θερμοκρασίες της νύχτας. Έτσι μια μεγάλη ομάδα ρυθμικών γονιδίων βρέθηκε να ελέγχει τις φωτοσυλλεκτικές ιδιότητες των πρωτεϊνικών συμπλόκων των φωτοσυστημάτων I και II. Πιο συγκεκριμένα τα μεταγραφήματα τεσσάρων φωτοσυλλεκτικών πρωτεϊνών του PS I (LHCA – Light Harvesting Complex A) και επτά του PS II (LHCB – Light Harvesting Complex B) βρέθηκαν να είναι ρυθμικά. Ο ρόλος των φωτοσυλλεκτικών πρωτεϊνικών συμπλόκων είναι να δεσμεύονται πάνω στα μόρια των χλωροφυλλών και να διοχετεύουν στα ενεργά κέντρα των φωτοσυστημάτων την ενέργεια των φωτονίων. Επιπλέον η έκφραση ενός ενζύμου (*PMC IX – Protoporphyrin IX Magnesium Chelatase*) που συνδέεται με την σύνθεση των χλωροφυλλών, βρέθηκε να είναι ρυθμικό όπως επίσης και επτά γονίδια του ενεργού κέντρου του φωτοσυστήματος I και τρία του ενεργού κέντρου του φωτοσυστήματος II. Η έκφραση αυτών των 22 γονιδίων που σχετίζονται στενά με τη φωτοσύνθεση βρέθηκε ότι συντονίζεται πολύ στενά καθώς όλα εμφανίζουν μέγιστα επίπεδα μεταγραφής κοντά στο μεσημέρι (Harmer *et al.*, 2000).

Μια άλλη ομάδα γονιδίων των οποίων τα μεταγραφήματα εμφανίζουν κίρκαδικές ταλαντώσεις, είναι αυτά των φωτοϋποδοχέων όπως έχει ήδη αναφερθεί. Τόσο το γονίδιο του φωτοχρώματος B όσο και αυτά των κρυπτοχρωμάτων 1 και 2 καθώς και μιας φωτοτροπίνης (*NPH1*) βρέθηκαν να είναι κίρκαδικά ρυθμιζόμενα. Επίσης γονίδια που συμμετέχουν στα φωτοεξαρτώμενα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως τα *SPA1* και *RPT2* είναι και αυτά ρυθμικά. Ο κίρκαδικός έλεγχος της έκφρασης των φωτοϋποδοχέων από τον κεντρικό ταλαντωτή, ο οποίος δέχεται την σηματοδότηση τους, αποτελούν άλλο ένα μέσο προστασίας του (εκτός του παράγοντα *ELF3*) από εσφαλμένη σηματοδότηση και συγχρονισμό του ρολογιού σε εσφαλμένη φάση.

Το φυτό μέσω της κίρκαδικής ρύθμισης μπορεί να συντονίσει την παραγωγή χρωστικών που θα προστατέψουν τα φωτοευαίσθητα μόρια από το έντονο φως. Είκοσι τρία γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις των βιοχημικών μονοπατιών βιοσύνθεσης των φαινυλ-προπανοειδών βρίσκονται υπο τον κίρκαδικό έλεγχο με το μέγιστο του επιπέδου mRNA του καθενός να εντοπίζεται λίγο πριν την αυγή (Harmer *et al.*, 2000). Το εν λόγω βιοσυνθετικό μονοπάτι συνθέτει ένα πλήθος δευτερογενών μεταβολίτων πολλοί από τους οποίους αποτελούν φίλτρα προστασίας έναντι του έντονου φωτός, αφού απορροφούν μήκη κύματος στην περιοχή του κυανού-υπεριώδους (Shirley, 1996). Στην συντονισμένη ρύθμισή τους φαίνεται ότι συμμετέχουν μεταγραφικοί παράγοντες της MYB οικογένειας, όπως ο παράγοντας *PAP1*, η υπερέκφραση του οποίου προκαλεί υπερπαραγωγή ανθοκυανίνης και λιγνίνης ως ένα μέσο προστασίας του φυτού στο φως.

Στον αντίποδα των ρυθμικών γονιδίων που εμφανίζουν μέγιστο την αυγή, βρίσκονται αυτά που ελέγχονται από το κερκαδικό ρολόι με τέτοιο τρόπο ώστε να εκφράζουν μέγιστα επίπεδα mRNA λίγο πριν ή κατά τη δύση. Τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα έναντι των καταπονήσεων λόγω ψύχους (χαμηλές νυχτερινές θερμοκρασίες) αποτελούν μια κύρια ομάδα τέτοιων γονιδίων. Δύο γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στις τροποποιήσεις των λιπιδίων καθώς και μια ομάδα γονιδίων που σχετίζονται με εμφάνιση ανθεκτικότητας στο ψύχος και την έλλειψη νερού βρέθηκαν να εκφράζονται ρυθμικά με μέγιστο την αυγή (*Shinozaki et al., 2000*). Ο μεταγραφικός παράγοντας *DREB1a/CBF3* ο οποίος προσδένεται στους υποκινητές ενός πλήθους από αυτά τα γονίδια ανθεκτικότητας στο ψύχος, βρέθηκε να είναι και αυτός ρυθμικά εκφραζόμενος με μέγιστο κατά το μέσο της ημέρας.

Αλλά και ο συντονισμός των βιοχημικών μονοπατιών αφομοίωσης του άνθρακα, του αζώτου και του θείου, βρέθηκε να είναι υπό τον έλεγχο του κεντρικού ταλαντωτή. Τα προϊόντα της φωτοσυνθετικής αφομοίωσης κατά τη διάρκεια της ημέρας, διοχετεύονται στην συνέχεια σε διάφορους αποταμιευτικούς ιστούς του φυτού. Έξι γονίδια που κωδικεύουν ένζυμα που συμμετέχουν τόσο στο μονοπάτι της γλυκόλυσης όσο και στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών βρέθηκαν να είναι ρυθμικά με τα επίπεδα έκφρασης να μεγιστοποιούνται προς το τέλος της ημέρας. Τα δύο αυτά βιοχημικά μονοπάτια αποτελούν κύριες οδούς παραγωγής μορίων τριφωσφορικής αδενοσίνης μέσα στο κύτταρο, αλλά επιπλέον είναι υπεύθυνα για την σύνθεση πολλών αμινοξέων.

Συγχρόνως βρέθηκε να μεγιστοποιείται και η έκφραση ενός γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την σύνθεση μιας μορφής σακχάρων που μπορεί να μεταφερθεί μέσω του φλοιώματος από τα φύλλα σε άλλους αποταμιευτικούς ιστούς του φυτού όπως η ρίζα. Τέσσερα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν μεταφορείς της εξόζης βρέθηκαν να εκφράζονται επίσης ρυθμικά με μέγιστο κατά τη δύση του ηλίου. Αυτοί οι μεταφορείς φαίνεται ότι συμμετέχουν στη μεταφορά των σακχάρων είτε μέσω του φλοιώματος είτε ενδοκυτταρικά στα διάφορα οργανίδια. Μια ομάδα γονιδίων που ελέγχουν τον σχηματισμό ή τη διάσπαση του αμύλου, βρέθηκε να είναι υπο κερκαδική ρύθμιση, με μέγιστα επίπεδα μεταγραφής κατά τη διάρκεια της νύχτας. Έτσι μετά την σύνθεση νέων σακχάρων κατά την ημέρα, αυτά προς το τέλος της μετακινούνται σε διάφορους αποταμιευτικούς ιστούς και στην συνέχεια πολυμερίζονται για να δώσουν άμυλο κατά τη διάρκεια της νύχτας, με το κερκαδικό ρολόι να συντονίζει όλες αυτές τις βιοχημικές μετατροπές, συντελώντας έτσι στην ομοιόσταση του άνθρακα μέσα στους ιστούς του φυτού (*Harmer et al., 2000*).

Η αφομίωση ανόργανων στοιχείων όπως το άζωτο και το θείο, αποτελούν μερικά από τα βιοχημικά μονοπάτια που καταναλώνουν σημαντικά ποσά ενέργειας. Εννέα γονίδια που συμμετέχουν στα μονοπάτια αφομοίωσης του αζώτου βρέθηκαν να είναι ρυθμικά με μέγιστο έκφρασης την αυγή, ενώ το γονίδιο της συνθάσης της ασπαραγίνης (*ASN1*) βρέθηκε να είναι ρυθμικό με μέγιστο έκφρασης κατά την δύση, εξαιτίας του ότι η σύνθεση αυτού του αμινοξέος ευνοείται σε συνθήκες χαμηλών ενεργειακών εισροών για το κύτταρο. Επιπλέον πέντε γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό και την αφομοίωση του θείου στα φυτικά κύτταρα βρέθηκαν να είναι ρυθμικά με μέγιστα επίπεδα έκφρασης κατά τη διάρκεια της νύχτας και προς το τέλος αυτής.

Ωστόσο το εύρος κυριαρχίας του κεντρικού ταλαντωτή στη φυσιολογία του φυτού δεν σταματά εδώ. Η επίδραση του είναι περισσότερο από οπουδήποτε άλλου εμφανής στον έλεγχο των αναπτυξιακών προγραμμάτων του φυτού. Πέρα λοιπόν από τους γνωστούς και σταθερά συντηρημένους ανάμεσα σε πολλά και εντελώς διαφορετικά

εξελικτικά φυτικά είδη, κίρκαδικούς ρυθμούς της κίνησης των φύλλων που προστατεύουν το φυτό από τις χαμηλές θερμοκρασίες της νύχτας, ενώ του επιτρέπουν την ημέρα να εκμεταλλεύεται στο μέγιστο δυνατό βαθμό τη προσπίπτουσα ηλιακή ακτινοβολία για φωτοσύνθεση, το βιολογικό ρολόι ελέγχει και την μετάβαση του φυτού από το βλαστικό στο αναπαραγωγικό στάδιο, ως απόκριση στις αλλαγές τόσο της φωτοπεριόδου όσο και της θερμοκρασίας ανάμεσα στις εποχές (Εικόνα 1.6). Η ανάλυση του τρόπου με το οποίο επιτυγχάνεται αυτή η μετάβαση και ελέγχεται από το ρολόι διεφεύγει του σκοπού αυτής της εισαγωγής καθώς πρόκειται για ένα θέμα αρκετά πολύπλοκο. Ωστόσο η άνθιση ελέγχεται εκτός από το κίρκαδικό ρολόι, από ένα άλλο αυτόνομο μονοπάτι καθώς και από σηματοδότηση φυτοορμονών με κύριες τις γιβεριλλίνες, ενώ το φαινόμενο της εαρινοποίησης σε μοριακό επίπεδο σχετίζεται στενά με το κίρκαδικό ρολόι.

Ωστόσο και κατά την διάρκεια της βλαστικής φάσης του βιολογικού κύκλου του φυτού, το κίρκαδικό ρολόι ελέγχει πολλά αναπτυξιακά προγράμματα. Έτσι η περιοδική κίνηση των κοτυληδόνων αλλά και η αύξηση της υποκοτύλης, σχετίζονται με την κίρκαδική επιμήκυνση των φυτικών κυττάρων. Η επιμήκυνση αυτή εντοπίζεται λίγο πριν τη δύση έως και νωρίς τη νύχτα, ενώ δεν λαμβάνει χώρα από τα μέσα της νύχτας έως και την αυγή (*Dowson-Day και Millar, 1999*). Κανονικά το συμπαγές κυτταρικό τοίχωμα θα έπρεπε να εμποδίζει τέτοιου είδους επιμήκυνση ωστόσο ανιχνεύτηκαν πολλοί παράγοντες που ελέγχουν τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος και που βρέθηκαν να είναι ρυθμικοί με μέγιστα επίπεδα έκφρασης κατά τη δύση.

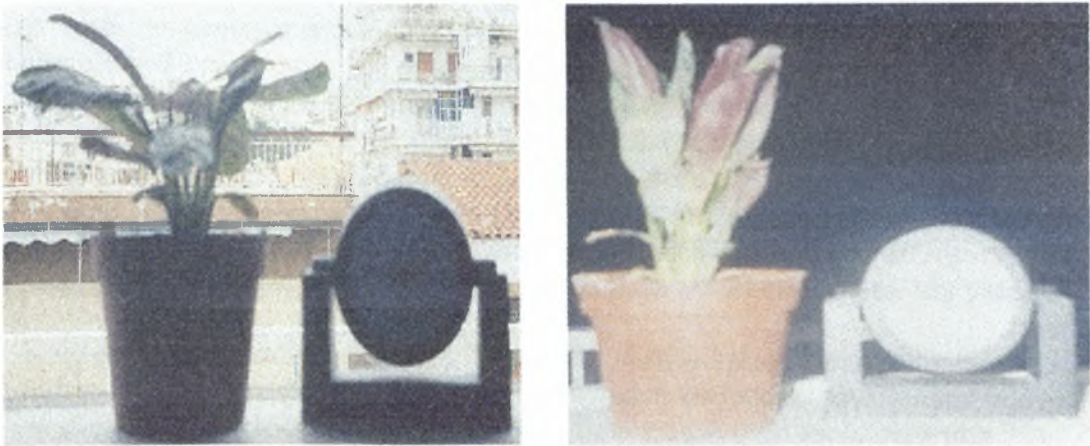
Επιπρόσθετα οι μεταφορείς αυξινών *PIN3* και *PIN7* βρέθηκαν να είναι ρυθμικοί. Η μεταφορά της αυξίνης μπορεί να ενεργοποιεί κατάλληλα τις εξπανσίνες, μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν τη διεύρυνση του κυτταρικού τοιχώματος. Μάλιστα, ένα εκ αυτών των ενζύμων βρέθηκε ότι εκτελεί κίρκαδικές ταλαντώσεις. Ενίσχυση της δράσης των εξπανσινών προσφέρουν ένζυμα υδρόλυσης των στοιχείων του κυτταρικού τοιχώματος όπως οι κυτταρινάσες και οι πηκτινάσες, μια εκ των οποίων βρέθηκε να είναι και αυτή κίρκαδικά ρυθμιζόμενη. Επιπλέον η επιμήκυνση του κυτταρικού τοιχώματος συνοδεύεται και από είσοδο νερού μέσα στο κύτταρο, διεργασία που ελέγχουν οι διακαναλικές ακουαπορίνες. Μια ακουαπορίνη (*δ-Tonoplast Integral Protein – δ-TIP*) βρέθηκε να είναι ρυθμική με αποτέλεσμα να συντονίζεται το μέγιστο της έκφρασης του μεταγραφήματός της με τα παραπάνω γονίδια επιτρέποντας το χαλάρωμα του κυτταρικού τοιχώματος και την επιμήκυνση του φυτικού κυττάρου κατά τη δύση του ηλίου.

Μετά το χαλάρωμα του κυτταρικού τοιχώματος και την επιμήκυνση του κυττάρου, είναι απαραίτητο να ενισχυθεί το νέο κυτταρικό τοίχωμα με τα δομικά μόρια που το αποτελούν. Δύο γονίδια της οικογένειας *AtCsIG*, που κωδικεύουν συνθάσες της κυτταρίνης, βρέθηκαν με μέγιστα επίπεδα έκφρασης κοντά στην αυγή, ενώ ένα γονίδιο που συμμετέχει στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ραμνόζης, ενός πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος, βρέθηκε να εκφράζει μέγιστα επίπεδα mRNA εκείνη την ώρα (*Cosgrove, 1997*). Τα μεταγραφήματα και των τριών αυτών γονιδίων εκφράζονται σε μέγιστα επίπεδα κοντά την αυγή, μετά δηλαδή την επιμήκυνση του κυττάρου (*Harmer et al., 2000*).

Σε ανάλυση που έγινε στις 5' μη μεταφραζόμενες περιοχές των 452 ρυθμικών γονιδίων με σκοπό να μελετηθούν τα ρυθμιστικά τους στοιχεία, βρέθηκε ότι το εσπερινό στοιχείο *AAAATATCT* ήταν παρόν στον υποκινητή τριάντα ενός εξ αυτών σε μία ή περισσότερες επαναλήψεις. Τριάντα από τα τριάντα ένα αυτά γονίδια φανέρωσαν απόλυτη ταύτιση στη ρύθμιση της μεταγραφής τους, με μέγιστο αυτής να

παρουσιάζεται κατά την δύση, επιβεβαιώνοντας έτσι τον πρωταγωνιστικό ρόλο του εσπερινού στοιχείου στην ρύθμιση των “απογευματινών” και “νυχτερινών” γονιδίων.

Πολλά από τα γονίδια που βρέθηκαν να είναι ρυθμικά στην έρευνα του Harmer και των συνεργατών του, αντιστοιχούν σε κινάσες και φωσφατάσες και αναμφισβήτητα διαδραματίζουν σπουδαίο ρυθμιστικό ρόλο στην ενεργοποίηση άλλων ενζύμων. Φαίνεται λοιπόν ότι πολλά γονίδια του φυτού, αποτελούν μια απόλυτα συντονισμένη ορχήστρα και συνδυάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε τα γονιδιακά πρόγραμμα τους (ή σε πιο ελεύθερη μετάφραση η “μελωδία” που παράγουν) να είναι αυστηρά εναρμονισμένη με τους ημερήσιους κύκλους εναλλαγής φωτός και σκοταδιού. Το κερκαδικό ρολόι σε μια τέτοια ορχήστρα δεν θα μπορούσε παρά να έχει τον ρόλο του μαέστρου, που αφουγκράζεται το εξωτερικό περιβάλλον (ακροατές) και συντονίζει την ορχήστρα.



Εικόνα 1.6 : Κιρκαδική κίνηση φύλλων στο φυτικό είδος *Calathea amabilis*. Αριστερά φαίνονται τα φύλλα του φυτού να είναι κατεβασμένα στις εννέα το πρωί. Ακριβώς δώδεκα ώρες μετά, στις εννέα το βράδυ, το φυτό έχει ανεβάσει τα φύλλα του για να τα προστατέψει από τις χαμηλές θερμοκρασίες της νύχτας (Προσωπική παρατήρηση, το φυτό *Calathea* ήταν μια ευγενική προσφορά του καθηγητή Α. Παππά)

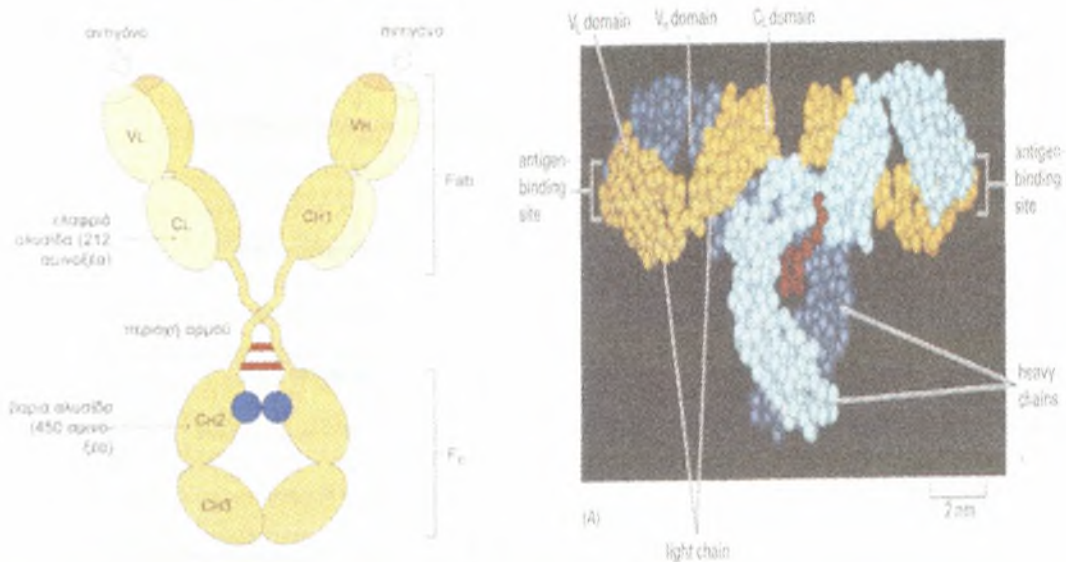
1.9 Στοιχεία Μοριακής Ανοσολογίας

Προτού αναφερθούν τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του PnLHY αντισώματος, κρίνεται σκόπιμο να παρατεθούν μερικά στοιχεία Μοριακής Ανοσολογίας για την πληρέστερη κατανόηση του πειραματικού μέρους από τον αναγνώστη.

Τα αντισώματα (ανοσοσφαιρίνες – Immunoglobulins / Ig) είναι πρωτεϊνικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη δημιουργία ενός προστατευτικού δικτύου έναντι εισβολέων όπως ιοί, πρωτόζωα, ξένες πρωτεΐνες, σάκχαρα, νουκλεϊνικά οξέα κ.α των ζωικών οργανισμών. Τα αντισώματα εντοπίζονται κυρίως στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων αλλά και ελεύθερα στο αίμα ενώ η αποστολή τους είναι να αναγνωρίζουν τα ξένα μόρια (αντιγόνα) και να συμπλέκονται με αυτά σηματοδοτώντας έτσι την καταστροφή τους από άλλους παράγοντες του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η δομή των αντισωμάτων περιλαμβάνει δύο πρωτεϊνικές υπομονάδες, τις αποκαλούμενες βαρείες και ελαφριές αλυσίδες, κάθε μια από τις οποίες σχηματίζει ένα ομοδιμερές. Η τελική στερεοχημική δομή του μορίου είναι σχήματος “Υ” και σε

αυτή συμβάλλουν ενδομοριακές και διαμοριακές δισουλφιδικές γέφυρες (Σχ. 1.29 A, Immunology, Fifth Edition). Οι βαριές και ελαφριές αλυσίδες των αντισωμάτων κωδικοποιούνται χωριστά, από γονίδια των B λεμφοκυττάρων σε μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει τόσο ανασυνδυασμούς ειδικών θέσεων σε επίπεδο DNA όσο και αποκοπή ενδονίων σε επίπεδο RNA.



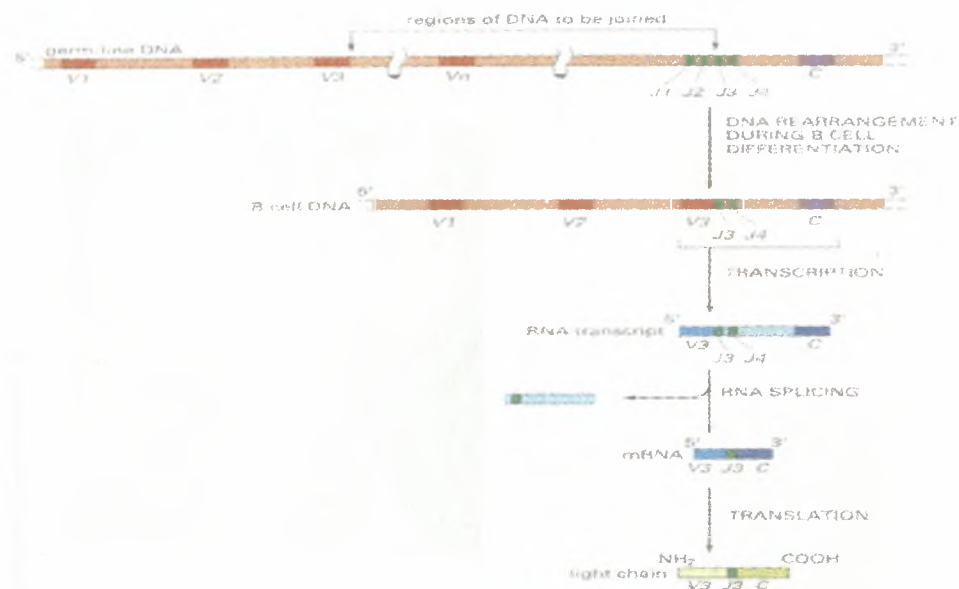
Σχήμα 1.29 A. Η δομή της ανοσοσφαιρίνης τύπου G. **Αριστερά:** Σχεδιάγραμμα που φανερώνει την δομή του μορίου. **Δεξιά:** Μοντέλο πλήρωσης χώρου μιας ανοσοσφαιρίνης τύπου G. Διακρίνονται οι ελαφριές και οι βαριές αλυσίδες του μορίου καθώς και οι περιοχές αναγνώρισης του αντιγόνου. (ΠΗΓΗ: Immunology, Fifth Edition; Molecular Biology of the Cell, Third Edition)

Τα γονίδια των ελαφριών αλυσίδων των αντισωμάτων περιέχουν τις περιοχές L, V, J και C και ανάλογα με την διάταξη αυτών πάνω στο γονίδιο, διακρίνονται σε δύο τύπους, τις κ και λ τύπου ελαφριές αλυσίδες (Γούναρης 2000). Αρχικά ανάμεσα στις παραπάνω περιοχές μπορεί να μεσολαβούν εκατοντάδες έως και χιλιάδες ζεύγη βάσεων. Η συνένωση επιλεγμένων κάθε φορά περιοχών V και J γίνεται με ανασυνδυασμό ειδικής θέσης. Στη συνέχεια αυτές μεταγράφονται μαζί με δύο περιοχές L και C. Η αποκοπή ενδονίων σε επίπεδο μεταγραφήματος πλέον, ενώνει τις περιοχές L, VJ και C (Γούναρης, 2000; Molecular Biology of the Cell, Third Edition; Molecular Biology of the Gene Fourth Edition, 1999).

Ανάλογη δομή έχουν και τα γονίδια των βαρέων αλυσίδων των αντισωμάτων με την διαφορά ότι προστίθεται μια ακόμα περιοχή, η περιοχή D. Αρχικά συνενώνονται οι περιοχές V και D και στη συνέχεια D και J με ανασυνδυασμό ειδικών θέσεων (επίπεδο DNA). Στη συνέχεια το γονίδιο μεταγράφεται και ακολουθεί η συνένωση των περιοχών L, V/D/J και L/V/D/J, C με αποκοπή ενδονίων (Γούναρης 2000; Molecular Biology of the Cell, Third Edition; Molecular Biology of the Gene, Fourth Edition).

Η περιοχή L (Leader) οδηγεί και ενσωματώνει το αντίσωμα στην κυτοπλασματική μεμβράνη και στη συνέχεια αποκόπτεται από το μόριο. Πρωταγωνιστικό ρόλο στην αναγνώριση του αντιγόνου από το αντίσωμα, διαδραματίζουν οι περιοχές CDR1, CDR2 και κύρια η περιοχή CDR3 της πρωτεΐνης που κωδικοποιούνται από τις περιοχές V, J (και D στις βαριές αλυσίδες) των αντίστοιχων γονιδίων και αποτελούν τη λεγόμενη μεταβλητή περιοχή των αντισωμάτων (Variable domain).

Συμπληρωματικό ρόλο στην αναγνώριση παίζει και η σταθερή περιοχή (Constant Domain) των αντισωμάτων που κωδικοποιείται από την περιοχή C των γονιδίων (Σχ. 1.29 B, *Molecular Biology of the Cell, Third Edition*).



Σχήμα 1.29 Β Οργάνωση των γονιδίων ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών. Φαίνεται η ένωση μιας περιοχής V με μια περιοχή J μέσω ανασυνδυασμού ειδικής θέσης. Ακολουθεί μεταγραφή του γονιδίου και ένωση την περιοχής VJ με μια περιοχή C με αποκοπή ενδονίων που οδηγεί στο ώριμο μόριο RNA το οποίο τελικά μεταφράζεται στη πρωτεϊνική ελαφριά αλυσίδα. (ΠΗΓΗ : *Molecular Biology of the Cell, Third Edition*)

Η ύπαρξη πολλών και διαφορετικών περιοχών V, J και D στα αντίστοιχα γονίδια των βαρέων και ελαφριών αλυσίδων καθώς και η προσθήκη βάσεων κατά τον ανασυνδυασμό ανάμεσα στις περιοχές V και J δημιουργεί μεγάλη παραλλακτικότητα με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η αναγνώριση χιλιάδων αντιγόνων (Γούναρης, 2000). Επιπροσθέτως η ύπαρξη και επιλογή πολλών διαφορετικών περιοχών C οδηγεί στη σύνθεση πολλών ειδών αντισωμάτων (IgA, IgM, IgG, IgE) με τα IgG να είναι τα σημαντικότερα και αφθονότερα. Οι αλλαγές εντοπίζονται σε διαφορές στη θέση και το πλήθος των δισουλφιδικών δεσμών της σταθερής περιοχής των βαρέων αλυσίδων (Γούναρης 2000).

Τα αντισώματα ανάλογα με την εξειδίκευσή τους ως προς την αναγνώριση του παθογόνου, διακρίνονται σε μονοκλωνικά και πολυκλωνικά, με τα πρώτα να παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση. Τα μονοκλωνικά παράγονται σε ποντίκια ενώ τα πολυκλωνικά περιλαμβάνουν φορείς ανοσοποίησης όπως, κατσίκες και κουνέλια. Ανάλογα με το πειραματόζωο από το οποίο απομονώθηκε το πρώτο αντίσωμα, απομονώνεται και ένα δεύτερο (αντι- αντίσωμα) που αναγνωρίζει το πρώτο. Έτσι έχουμε τους εξής τύπους αντι- αντισωμάτων : anti-mouse, anti-goat, anti-rabbit κ.ο.κ. Πάνω στο αντι- αντίσωμα προσδένεται κατάλληλα ένα μόριο-δείκτης (συνήθως η αλκαλική φωσφατάση). Έτσι το πρώτο αντίσωμα ανιχνεύει το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει, το αντι- αντίσωμα του το αναγνωρίζει και προσδένεται σχηματίζοντας τριπλό σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος-αντιαντισώματος, ενώ το μόριο-δείκτης που φέρει το τελευταίο, δίνει σήμα υπό κατάλληλες συνθήκες κάνοντας δυνατή την ανίχνευση έτσι του αντιγόνου.

1.11 Γενικά περί πολυμορφισμών και μοριακών δεικτών.

Η μοριακή φυλογενετική ανάλυση στο γένος *Phaseolus* βασίστηκε στην ύπαρξη πολυμορφικών αλληλουχιών στο γένωμα των έντεκα πληθυσμών. Ως πολυμορφική ορίζεται η αλληλουχία DNA η οποία μπορεί να απουσιάζει από κάποιους γενότυπους ενώ να είναι παρόν σε κάποιους άλλους. Οι πολυμορφικές αλληλουχίες οφείλονται στις διαφορές του γενώματος που παρουσιάζουν μη συγγενικοί γενότυποι. Ωστόσο πολυμορφισμούς εμφανίζουν και συγγενικοί γενότυποι κυρίως λόγω μεταλλάξεων όπως χρωμοσωμικές ελλείψεις, αναστροφές και μετατοπίσεις. Με βάση λοιπόν την αναλογία πολυμορφικών αλληλουχιών στο μοριακό πρότυπο διαφόρων γενότυπων είναι εφικτή η *in silico* σύγκριση τους με αποτέλεσμα την κατασκευή ποικίλων μητρών ομοιότητας (DICE, JACCARD). Στη συνέχεια διάφοροι αλγόριθμοι (UPGMA, NEIBORJOIN) συγκρίνουν τον βαθμό ομοιότητας των μητρών που θα προκύψουν με αποτέλεσμα να καθοριστεί ο βαθμός συγγένειας των γενότυπων και να καταταχθούν έτσι τα μέλη ενός πληθυσμού με βάση αυτόν.

Από την ποικιλία των μοριακών δεικτών που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια (RFLP's, AFLP's, RAPD's, SSR's, SNP's κ.α) επιλέχθηκε ο μοριακός δείκτης τύπου RAPD (Rapid Amplified Polymorphic DNA – Τυχαία Πολλαπλασιαζόμενο Πολυμορφικό DNA). Με το συγκεκριμένο μοριακό δείκτη γίνεται εφικτός ο ταχύς έλεγχος μεγάλου ποσοστού του γενώματος και σχετικά ανέξοδα καθώς οι απαιτήσεις της μεθόδου σε υλικοτεχνική υποδομή δεν είναι μεγάλες (δεν απαιτείται ειδικός απομονωμένος χώρος για χρήση ραδιενέργειας και ειδικό πρόγραμμα διαχείρισης των αποβλήτων αυτής όπως στην περίπτωση των AFLP's, δεν απαιτούνται αντιδράσεις αποκοπής γενωμικού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες όπως στην περίπτωση των RFLP's και δεν απαιτείται η κατασκευή μεγάλων πηκτών πολυακρυλαμίδης, γνωστών ως sequencing gels, όπως στην περίπτωση των SSR's). Επιπλέον υπάρχει θεωρητικά ανεξάντλητη ποικιλία RAPD μοριακών δεικτών καθώς η ακολουθία τους επιλέγεται τυχαία από ηλεκτρονικούς υπολογιστές.

Το σοβαρότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μικρή επαναληψιμότητα που εμφανίζουν τα αποτελέσματα λόγω της τυχαίας επιλογής των πολυμορφικών περιοχών κατά την διάρκεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης καθώς και ο ημικυρίαρχος τύπος του συγκεκριμένου μοριακού δείκτη. Η πρώτο μειονέκτημα μπορεί να ξεπεραστεί τόσο με την εφαρμογή πολλών επαναλήψεων και επιλογή των ισχυρά πολυμορφικών περιοχών όσο και με τον συνδυασμό των δεδομένων της RAPD ανάλυσης με δεδομένα από την ανάλυση και άλλων μοριακών δεικτών. Το δεύτερο μειονέκτημα σχετίζεται με την χαμηλή επαναληψιμότητα που εμφανίζουν οι RAPD μοριακοί δείκτες και μπορεί να ξεπεραστεί με την αναβάθμιση τους στους κυρίαρχους μοριακούς δείκτες τύπου SCAR's. Η αναβάθμιση των RAPD σε SCAR μοριακούς δείκτες προβλέπει την κλωνοποίηση και εν συνεχεία αλληλούχιση των ισχυρά πολυμορφικών περιοχών του RAPD προτύπου. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης θα χρησιμοποιηθούν έτσι ώστε να κατασκευαστούν εξειδικευμένοι ως προς τις πολυμορφικές αλληλουχίες εκκινητές οι οποίοι στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν σε νέες αντιδράσεις PCR.

II. Εισαγωγή στο πειραματικό μέρος

2. Σύνοψη

Όπως φάνηκε και από την αναλυτική παρουσίαση που προηγήθηκε, το βιολογικό ρολόι στα φυτά κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο στη προσαρμοστικότητα των φυτών καθώς τους προσδίδει ευρωστία μέσω της πρόβλεψης των 24 ωρών εναλλαγών φωτός – σκοταδιού και του συντονισμού των φυσιολογικών προγραμμάτων του σε αυτές. Επιπροσθέτως ο μεταγραφικός παράγοντας *LHY* στο είδος *Arabidopsis thaliana* αποδείχθηκε ότι κατέχει σημαντικότατο ρόλο στην καρδιά του βιολογικού ρολογιού, ως ένα είδος μοριακού λεπτοδείκτη που εκτελεί ταλαντώσεις (χτύπους του λεπτοδείκτη) σε μεταγραφικό επίπεδο, επιτρέποντας έτσι την καταγραφή του χρόνου στα φυτά και ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας παράλληλα, πλήθος ρυθμικών γονιδίων ανάλογα με τη φάση του κερκαδικού κύκλου. Συνεπώς η επέκταση της έρευνας του ρολογιού και σε καλλιεργούμενα είδη φαίνεται να έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Έτσι η παρασκευή ενός αντισώματος ειδικού ως προς την πρωτεΐνη, που κωδικοποιεί το P_vLHY γονίδιο του φασολιού (*Phaseolus vulgaris Late Elongated Hyocotyl*), ορθόλογο του *LHY* μεταγραφικού παράγοντα στο είδος *Arabidopsis thaliana*, θα ήταν χρήσιμη στην κατανόηση των σχετικών μηχανισμών.

Παρόλο που ο *LHY* μεταγραφικός παράγοντας ήταν από τα πρώτα στοιχεία του κεντρικού ταλαντωτή των φυτών που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν, ακόμα και για το είδος *Arabidopsis thaliana* υπάρχει περιορισμένος αριθμός δημοσιευμένων ερευνών που να έχουν ως επίκεντρο την μετάφραση του. Επιπλέον εκκρεμούν ακόμα πολλά ερωτήματα σχετικά με αλληλεπιδράσεις της P_vLHY πρωτεΐνης με άλλα στοιχεία στον πυρήνα (*cis* και *trans* ρυθμιστικά στοιχεία άλλων γονιδιακών θέσεων) ενώ είναι άγνωστοι τυχόν μεταφραστικοί μηχανισμοί ελέγχου αυτής (π.χ αποικοδόμιση στο πρωτεόσωμα) οι οποίοι μπορεί να αποδεικτούν εξίσου σημαντικοί με την κερκαδική ρυθμικότητα της *LHY* μεταγραφής (όπως διαπιστώθηκε για παράδειγμα σχετικά με την σκοτοεξαρτώμενη πρωτεόλυση του *TOC1* παράγοντα). Το αντίσωμα θα συμβάλλει στη διαλεύκανση όλων των παραπάνω και μάλιστα σε ένα φυτό που αφενός είναι καλλιεργούμενο και αφετέρου μόλις πρόσφατα άρχισε η μελέτη της μοριακής φύσης των κερκαδικών ρυθμών (*Kaldis et al., 2003*) σε αυτό, δίνοντας έτσι μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την συμμετοχή του παράγοντα στο κερκαδικό ρολόι των φυτών.

2.1 Γενικές πληροφορίες

Όπως αναφέρθηκε ήδη στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής διατριβής, το φασόλι προσεγγίστηκε από δύο διαφορετικές σκοπιές. Το είδος *Phaseolus* ως οργανισμός συγκεντρώνει στοιχεία που τον καθιστούν πολύ ενδιαφέρον τόσο για τη μελέτη της λειτουργίας του κεντρικού ταλαντωτή, όσο και για τη γενετική βελτίωση του είδους ως αποτέλεσμα του συνδυασμού στοιχείων από τη μοριακή γενετική ανάλυση και την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων καθώς και από τη μεθοδολογία αξιολόγησης στον αγρό.

Ως καλλιέργεια, το κοινό φασόλι αποτελεί από πολύ παλιά εθνικό προϊόν αν και το γεωγραφικό κέντρο της καταγωγής του δεν είναι η Ευρώπη αλλά η κεντρική Αμερική στην οποία το φασόλι καλλιεργείται εδώ και δέκα χιλιάδες χρόνια. Τα εξαιρετικά φυσικοχημικά συστατικά του φασολιού το ανέδειξαν σε ένα προϊόν εξαιρετικής θρεπτικής αξίας · ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των δύσκολων ετών της Κατοχής στον Β' Παγκοσμίο Πόλεμο, το φασόλι αποτελεί μια προσβάσιμη πηγή πρωτεΐνης για τον κατεχόμενο Έλληνα.

Σήμερα το φασόλι είναι το όσπριο με τη μεγαλύτερη οικονομική σημασία στην Ελλάδα και καλλιεργείται τόσο για τους χλωρούς καρπούς του (λοβοί) όσο και για τα ξηρά σπέρματα του. Η καλλιέργεια του φασολιού ξεκίνησε τον 16 αιώνα στη χώρα μας και η καλλιέργεια του σήμερα με στόχο την παραγωγή ξηρών φασολιών, αντιπροσωπεύει το 50 % της έκτασης που καταλαμβάνουν συνολικά τα καλλιεργούμενα όσπρια (150.000 στρέμματα) ενώ επιπλέον άλλα 100.000 στρέμματα καλλιεργούνται για παραγωγή χλωρών λοβών (Γαλανοπούλου, 2002).

Όσον αφορά τη μορφολογία του φυτού, υπάρχουν διάφοροι τύποι φασολιών (αναρριχώμενοι, νάνοι, ημινάνοι) οι οποίοι διαθέτουν μια ποικιλία μεγέθους και χρωματισμών των σπόρων (λευκοί, με μαύρα στίγματα κ.ο.κ). Γενικά οι νέες ποικιλίες λόγω της προσαρμογής τους στην εκμηχανισμένη καλλιέργεια είναι αυτές που προτιμώνται. Η βλαστική περίοδος του είδους είναι 120-130 ημέρες για τη παραγωγή του ξηρού καρπού ενώ η βλάστηση του σπόρου του φασολιού απαιτεί θερμοκρασίες άνω των 9-12 °C. Τέλος αναφορικά με το φωτοπεριοδικό έλεγχο της άνθισης, το κοινό φασόλι χαρακτηρίζεται ως ουδέτερο (Γαλανοπούλου, 2002).

Σχετικά με το είδος των καλλιεργούμενων ποικιλιών, η αυτογονιμοποιούμενη στρατηγική εγγενούς πολλαπλασιασμού που ακολουθεί το *Phaseolus vulgaris* οδήγησε ως επί το πλείστον, στη δημιουργία καθαρών σειρών χωρίς να αποκλείονται και τα υβρίδια. Χαρακτηριστικά όπως η βραστικότητα του σπόρου, η ανθεκτικότητα σε εχθρούς και ασθένειες καθώς και σε αβιοτικές καταπονήσεις είναι οι κύριοι βελτιωτικοί στόχοι σήμερα. Αναφορικά με το σταυρογονιμοποιούμενο είδος *Phaseolus coccineus*, η κύρια μορφή ποικιλιών είναι πληθυσμοί στενής ή ευρύτερης γενετικής βάσης χωρίς να αποκλείονται και τα υβρίδια.

2.2 Οι οργανοληπτικές ιδιότητες του είδους

Οι απαιτήσεις της σημερινής εποχής έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην σύγχρονη διατροφή η οποία χαρακτηρίζεται ως μη ισορροπημένη τόσο από γιατρούς όσο και από διαιτολόγους. Έτσι η παχυσαρκία εμφανίζεται ως μια μάστιγα που απειλεί τους πληθυσμούς των ανεπτυγμένων κρατών. Η παχυσαρκία συνοδεύεται από παθήσεις όπως αρτηριοσκλήρυνση και καρδιοπάθειες κυρίως λόγω του αυξημένου περιεχόμενου σε λιπαρά των τροφών που συνιστούν οι σύγχρονες διατροφικές συνήθειες των λαών της Δύσης.

Στο φασόλι συγκεντρώνονται πολλά στοιχεία που θωρακίζουν τον οργανισμό από πολλές μάστιγες της σύγχρονης εποχής. Ο καρπός του φασολιού έχει υψηλή περιεκτικότητα τόσο σε φυτικές πρωτεΐνες (25 %) όσο και στο σπάνιο αμινοξύ λυσίνη, με αποτέλεσμα να θεωρείται μαζί με την σόγια ως υποκατάστατο κρέατος ενώ από πολύ παλιά του έχει αποδοθεί ο χαρακτηρισμός “το κρέας του φτωχού” (Γαλανοπούλου, 2002). Δεδομένου ότι η παραγωγή της σόγιας στις Ηνωμένες Πολιτείες (30.000.000 εκτάρια το 2001 σύμφωνα με το Αμερικανικό Υπουργείο Γεωργίας), καλύπτει σχεδόν καθολικά τη παγκόσμια ζήτηση αλλά και με βάση το γεγονός ότι το 68 % αυτών (20.400.000 εκτάρια) προέρχονται από γενετική τροποποίηση, αποδεικνύει ότι υπάρχουν σημαντικά περιθώρια στο φασόλι ώστε να αποτελέσει μια εναλλακτική πηγή φυτικών πρωτεϊνών καλύπτοντας έτσι μέρος των αναγκών σε φυτικές πρωτεΐνες των καταναλωτών που αντιτίθενται στα συγκεκριμένα προϊόντα.

Το υψηλό πρωτεϊνικό φορτίο του φασολιού, συνοδεύεται από άλλο ένα στοιχείο εξαιρετικής διατροφικής αξίας, τη χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπη. Έτσι ο συνδυασμός υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη και στο αμινοξύ λυσίνη, μαζί με το χαμηλό φορτίο λιπών, ενισχύει τον οργανισμό παρέχοντας του δομικά στοιχεία και

ελαττώνοντας παράλληλα τα επίπεδα της βλαβερής χοληστερίνης στο αίμα, περιορίζει την πιθανότητα εμφάνισης αρτηριοσκλήρυνσης και λοιπών καρδιοπαθειών. Συνεπώς το φασόλι αποτελεί ένα φυτικό είδος το οποίο μπορεί να συμπεριληφθεί στη διατροφή τόσο των καρδιοπαθών, όσο και των ατόμων που απλά θέλουν να αδυνατίσουν ενώ παράλληλα αποτελεί μια εξαιρετική πηγή πρωτεΐνης για χορτοφάγους.

Η περιεκτικότητα του καρπού σε υδατάνθρακες ανέρχεται στο 66 % ενώ το σύνολο των ανόργανων αλάτων με κύριους εκπρόσωπους το φώσφορο, το σίδηρο και το ασβέστιο αποτελεί το 4 % της ξηρής ουσίας του σπόρου (Γαλιανοπούλου, 2002). Σχετικά με την ύπαρξη βιταμινών ο καρπός του φασολιού είναι κύρια πηγή των βιταμινών Α, που οφελεί την όραση, και Κ που συντελεί στη θρόμβωση των αιμοπετάλων που οδηγεί σε πήξη του αίματος σε περιπτώσεις αιμορραγίας.

Τέλος πολύ σημαντική ιδιότητα του καρπού του φασολιού είναι η υψηλή περιεκτικότητα του σε φυτικές ίνες. Οι φυτικές ίνες έχουν διαφημιστεί πολύ από τη σύγχρονη διαιτολογία με αποτέλεσμα οι διαιτολόγοι σήμερα αξιολογώντας αποτελέσματα ιατρικών ερευνών, να προτείνουν μια διατροφή πλούσια σε φυτικές ίνες για την φυσιολογική λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος του ανθρώπινου οργανισμού. Έτσι αποφεύγονται παθήσεις του εντέρου και ιδιαίτερα ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Τα παραπάνω στοιχεία καθώς και το έως τώρα κενό της απουσίας ιδιαίτερων βελτιωτικών προγραμμάτων στο φασόλι αφήνουν πολλά περιθώρια για μελλοντική βελτίωση του είδους και καθιστούν την καλλιέργεια πολύ ελκυστική για περαιτέρω εξάπλωση.

2.3 Η μελέτη του βιολογικού ρολογιού στο φασόλι.

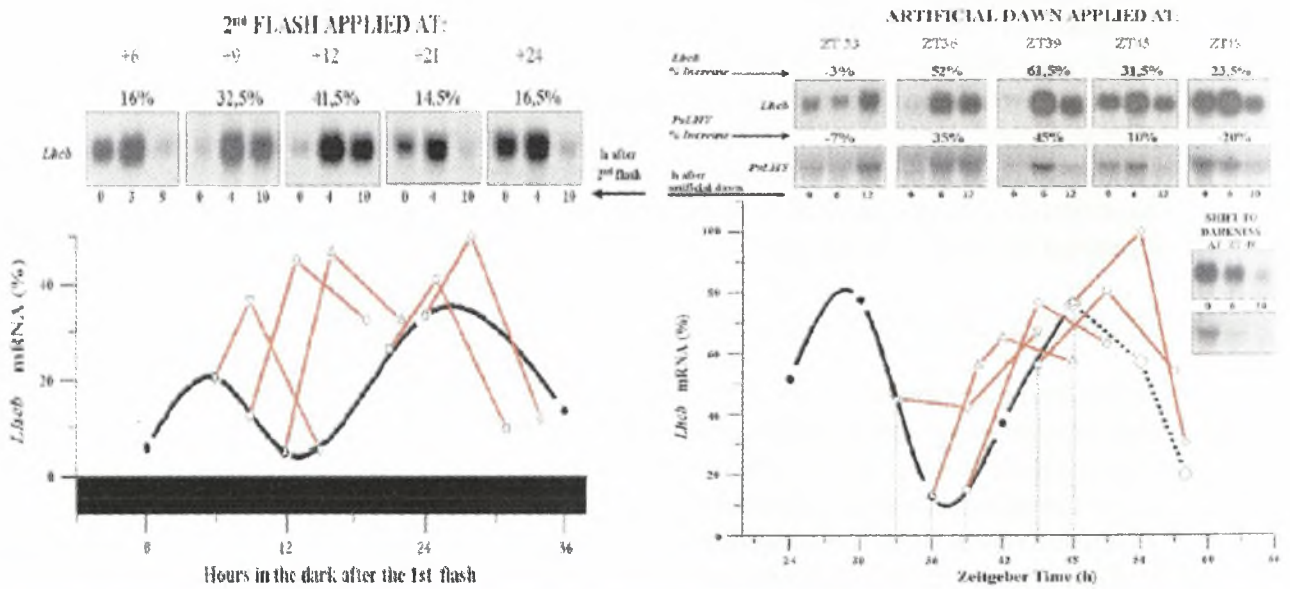
Στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών του Ινστιτούτου Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος” απομονώθηκε ένα cDNA από το είδος *Phaseolus vulgaris* (cv. *Red Kidney*) που αντιστοιχεί στη γονιδιακή θέση PnLHY και που κωδικοποιεί τον ορθόλογο μεταγραφικό παράγοντα του LHY στο είδος *Arabidopsis thaliana*. Το προϊόν αυτού του γονιδίου είναι μεταγραφικός παράγοντας των *Lhcb* γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες-αντένες του φωτοσυλλεκτικού συμπλόκου του Φωτοσυστήματος II (LHC II), οι οποίες ρυθμίζονται μέσω της δράσης του PnLHY, από το βιολογικό ρολόι. Το εν λόγω γονίδιο, από το οποίο προέκυψε το cDNA, συμμετέχει συνεπώς στη ρύθμιση του φωτοπεριοδικού κύκλου στο *Phaseolus vulgaris* ως υποψήφιο στοιχείο του κεντρικού ταλαντωτή (Kaldis et al., 2003).

Συνοψίζοντας λοιπόν, στο είδος *Arabidopsis thaliana* η εφαρμογή φωτεινών παλμών όταν γίνει σε φάση του κερκαδικού κύκλου που η “θύρα” είναι κλειστή και που αντιστοιχεί σε ελάχιστα επίπεδα έκφρασης ενός φωτοεπαγόμενου γονιδίου, η σηματοδότηση από το φως αναχαιτίζεται και διατηρείται ο ενδογενής έλεγχος της έκφρασης τους, ενώ αν συμβεί κατά την διάρκεια της φάσης του κερκαδικού κύκλου που συνεπάγεται μέγιστα επίπεδα μεταγραφής του παράγοντα τότε η “θύρα” είναι ανοιχτή και αυξάνει περαιτέρω τη μεταγραφή του εν λόγω παράγοντα μέσω της εκδήλωσης της οξείας απόκρισης, ενισχύοντας έτσι την δράση του.

Από τη μελέτη και το χαρακτηρισμό του PnLHY παράγοντα στο φασόλι, αποκαλύφθηκε ότι τα δύο είδη (*Phaseolus vulgaris* και *Arabidopsis thaliana*) ακολουθούν διαφορετικές στρατηγικές αναφορικά με την απόκριση στο φως. Σε πρώτη φάση επιβεβαιώθηκε ότι το μεταγραφικό πρότυπο του PnLHY παράγοντα είναι το ίδιο με εκείνο του ορθόλογου του LHY στο είδος *Arabidopsis thaliana*. Δηλαδή πρόκειται για ένα φωτοεπαγόμενο γονίδιο το οποίο, σε χλωρωτικά φυτάρια παρουσιάζει το φαινόμενο της οξείας απόκρισης παρουσία φωτός και βρίσκεται υπό

κίρκαδικό έλεγχο με μέγιστο κατά την αυγή και ελάχιστο κατά την δύση. Επιπλέον στο φασόλι, τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα αυξάνονται κατά την διάρκεια της νύχτας, εκδηλώνοντας έτσι το φαινόμενο της πρόβλεψης του φωτός (Kaldis et al., 2003).

Ωστόσο αυτό που διαφοροποιεί ουσιαστικά τα δύο είδη είναι η φάση του κίρκαδικού κύκλου στην οποία αναχαιτίζεται η σηματοδότηση από το φως. Έτσι, αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι εάν εφαρμοστεί ένας φωτεινός παλμός σε χλωρωτικά φυτά φασολιού δίνοντας το εύνασμα για την έναρξη ενός ρυθμού στα επίπεδα έκφρασης του *PvLHY* και το φυτό δεχθεί δεύτερο φωτεινό παλμό όταν ο προϋπάρχον ρυθμός βρίσκεται στο ελάχιστο, τότε η “θύρα” είναι ανοιχτή και το φωτεινό ερέθισμα σηματοδοτεί το κεντρικό ταλαντωτή εκδηλώνοντας έντονη οξεία απόκριση που θα αυξήσει τα επίπεδα έκφρασης και μάλιστα με τρόπο ανάλογο με το πόσο κοντά στο ελάχιστο ήταν ο ρυθμός πριν το φυτό να δεχθεί το δεύτερο φωτεινό παλμό (Σχ. 2.1, Kaldis et al., 2003).



Εικόνα 2.1 : Αλλαγή φάσης του προϋπάρχοντος ρυθμού των *LhcB* γονιδίων σε χλωρωτικά και πράσινα φυτά του είδους *Phaseolus vulgaris*. **Αριστερά :** Χλωρωτικά φυτά φασολιού έχουν συντονιστεί αρχικά από την επίδραση ενός φωτεινού παλμού άσπρου φωτός. Στη συνέχεια ακολουθούν φωτεινοί παλμοί 6, 9, 12, 21 και 24 ώρες μετά τον πρώτο παλμό. **Δεξιά :** Πράσινα φυτά φασολιού στα οποία ο ρυθμός των *LhcB* γονιδίων έχει συντονιστεί αρχικά σε φωτοπερίοδο, δέχονται φωτεινούς παλμούς (Τεχνητό ξημέρωμα – Artificial Dawn) σε διάφορες φάσεις του προϋπάρχοντος ρυθμού (ZT : 33, 36, 39, 45, 48). Τα ποσοστά φανερώνουν αντίστοιχη αύξηση ή μείωση των επιπέδων του *LhcB* μηνύματος λόγω της επίδρασης των δευτερευόντων φωτεινών παλμών. Οι μαύρες καμπύλες υποδηλώνουν τον προϋπάρχοντα ρυθμό ενώ οι πορτοκαλί γραμμές την οξεία απόκριση που παρατηρήθηκε λόγω της επίδρασης των νέων φωτεινών παλμων. (ΠΗΓΗ : Kaldis et al., 2003).

Αντιθέτως αν ο προϋπάρχον ρυθμός βρίσκεται στο μέγιστο τότε η “θύρα” είναι λιγότερο ανοιχτή και ο ρυθμός παραμένει ενδογενής χωρίς να παρατηρείται ιδιαίτερη αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του *PvLHY*. Υπενθυμίζεται ότι το είδος *Arabidopsis thaliana* είναι μακροήμερο και το είδος *Phaseolus vulgaris* ουδέτερο φυτό αναφορικά με την αντίδραση ως προς τη φωτοπερίοδο. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από την εφαρμογή φωτεινών ερεθισμάτων σε πράσινα φυτά φασολιού ήδη συντονισμένα σε προϋπάρχοντα ρυθμό (Σχ. 2.1, Kaldis et al., 2003).

Τέλος παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στα δύο είδη και ως προς την ταχύτητα επίτευξης του μεγίστου μετά τον δεύτερο παλμό καθώς το φασόλι εμφανίζει πιο αργή κινητική σε σχέση με το είδος *Arabidopsis thaliana* (6 και 2 ώρες αντίστοιχα για την επίτευξη του μεγίστου μετά το δεύτερο παλμό) ενώ η κινητική επαναφοράς σε νέο ελάχιστο και στα δύο είδη παραμένει ίδια (Σχ. 2.1, *Kaldis et al., 2003*). Τα παραπάνω συνηγορούν στο ότι το είδος *Phaseolus vulgaris* λόγω και της σημασίας του ως καλλιεργούμενο φυτό, παρουσιάζει ενδιαφέρον ως προς την μελέτη του κερκαδικού του ρολογιού.

III. Υλικά και μέθοδοι

-- Α. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ PvlLHY ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ --

3.1 Συνοπτική περιγραφή της διαδικασίας

Το πρώτο βήμα για τη παρασκευή ενός αντισώματος είναι η κατασκευή του αντίστοιχου αντιγόνου που αυτό θα αναγνωρίζει. Εφόσον επιλεγεί η μορφή του αντιγόνου, θα πρέπει να κλωνοποιηθεί σε ένα κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης και στη συνέχεια ο ανασυνδυασμένος πλασμιδιακός φορέας να χρησιμοποιηθεί για να μετασχηματιστούν κατάλληλοι βακτηριακοί φορείς (συνήθως διάφορα στελέχη του εντεροβακτηριδίου *Escherichia coli*). Ο προκαρυωτικός φορέας χρησιμοποιείται για να υπερέκφραστεί το ένθεμα. Με τον όρο υπερέκφραση περιγράφεται η παραγωγή μεγάλης ποσότητας μιας πρωτεΐνης από ένα φορέα σε συνθήκες που ευνοούν την έντονη μεταγραφή και μετάφρασή της. Η μεγάλη ποσότητα του αντιγόνου αντισταθμίζει τις απώλειες λόγω πρωτεόλυσης αλλά κυρίως κατά την διάρκεια των σταδίων καθαρισμού που μεσολαβούν μέχρι τον εμβολιασμό, και έτσι εξασφαλίζεται η ισχυρή ανοσολογική αντίδραση από το φορέα ανοσοποίησης με αποτέλεσμα την έντονη παραγωγή και παρουσία του αντισώματος στον ορό αίματος του φορέα.

Επόμενο στάδιο είναι η απομόνωση και ο καθαρισμός του αντιγόνου. Αποφασίζεται η τελική μορφή που αυτό θα έχει κατά το στάδιο των εμβολιασμών και εκτιμάται η δόση του, ενώ παράλληλα επιλέγεται ο κατάλληλος φορέας ανοσοποίησης. Ακολουθούν επαναλαμβανόμενοι εμβολιασμοί του αντιγόνου στο φορέα με σκοπό την επίτευξη ισχυρής ανοσολογικής αντίδρασης. Τελευταίο στάδιο της διαδικασίας είναι η παραλαβή δειγμάτων από ορό αίματος του φορέα ανοσοποίησης και απομόνωση σε καθαρή μορφή του αντισώματος από αυτά.

Παρακάτω φαίνονται συνοπτικά τα στάδια παραγωγής του αντισώματος.

- I. Έλεγχος υδροπάθειας του αντιγόνου για την ανίχνευση υδρόφιλων περιοχών.
- II. Κλωνοποίηση των υδρόφιλων περιοχών σε προκαρυωτικό φορέα υπερέκφρασης.
- III. Επώαση του μετασχηματισμένου φορέα με σκοπό την εύρεση της συνθήκης υπερέκφρασης των χιμαιρικών πρωτεϊνών.
- IV. Υπερέκφραση και παραγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα.
- V. Απομόνωση των χιμαιρικών πρωτεϊνών από το φορέα και παραλαβή των αντιγόνων σε καθαρή μορφή από αυτές (καθορισμός της μορφής των αντιγόνων και της δόσης των εμβολιασμών).
- VI. Επαναλαμβανόμενοι εμβολιασμοί των αντιγόνων σε κατάλληλους φορείς ανοσοποίησης.

- VII. Συλλογή δειγμάτων από τον ορό του αίματος των φορέων ανοσοποίησης. Απομόνωση και παραλαβή των αντισωμάτων έπειτα από καθαρισμό.

Στάδιο I : Έλεγχος της αλληλουχίας της PνLHY πρωτεΐνης για υδρόφιλες περιοχές.

Τα αντισώματα έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες περιοχές των αντίστοιχων αντιγόνων, οι οποίες ονομάζονται επίτοποι. Για να μπορέσει να γίνει εφικτή η αναγνώριση του επίτοπου από το αντίσωμα ώστε να καταφέρει το τελευταίο να προσκολληθεί στο αντιγόνο, πρέπει ο επίτοπος να είναι εκτεθειμένος στη περιφέρεια του εκάστοτε αντιγόνου. Δεδομένης της στερεοχημείας των πρωτεϊνών όταν αυτές λαμβάνουν την τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή τους, οι περιοχές που αποτελούνται από μη πολικά αμινοξέα αναδιπλώνονται στο κέντρο της πρωτεΐνης ενώ οι υδρόφιλες περιοχές που αποτελούνται από πολικά αμινοξέα εκτίθενται στην περιφέρεια αυτής. Συνεπώς περιοχές ενός αντιγόνου που χαρακτηρίζονται από μεγάλη συχνότητα εμφάνισης πολικών αμινοξέων, είναι εκτεθειμένες προς στη περιφέρεια αυτού και έτσι εμφανίζουν αυξημένη πιθανότητα να δράσουν ως επίτοποι για τη δημιουργία αντισωμάτων.

Με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του PνLHY-cDNA έγινε η πρόβλεψη της αλληλουχίας αμινοξέων της PνLHY πρωτεΐνης. Στη συνέχεια με χρήση ενός προγράμματος ανάλυσης υδροφοβικότητας πρωτεϊνών έγινε εφικτός ο *in silico* προσδιορισμός των υδρόφιλων περιοχών της πρωτεΐνης. Από την ανάλυση προέκυψαν διάφορες υδροφιλικές περιοχές με ποικίλα επίπεδα υδροφιλικότητας. Από αυτές επιλέχθηκαν δύο υψηλά υδρόφιλες περιοχές οι οποίες ονομάστηκαν C₁ και C₂ (βλ. Κεφάλαιο IV : Αποτελέσματα). Οι C₁ και C₂ υδρόφιλες περιοχές της πρωτεΐνης περιέχουν μια υδρόφοβη περιοχή ανάμεσά τους. Για την κλωνοποίηση επιλέχθηκαν τόσο οι C₁ και C₂ όσο και η ευρύτερη περιοχή C₁₋₂ που περιλαμβάνει τόσο τις C₁ και C₂ υδρόφιλες περιοχές, όσο και την ενδιάμεση υδρόφοβη περιοχή. Στη συνέχεια του κειμένου οι C₁, C₂ και C₁₋₂ περιοχές θα αναφέρονται αντίστοιχα ως C₁, C₂ και C₁₋₂ ενθέματα.

Σημειώνεται ότι είναι εφικτή η χρήση ολόκληρης της πρωτεΐνης PνLHY σαν αντιγόνο. Μάλιστα το μεγαλύτερο μέγεθος της θα εξασφαλίσει πιθανότατα καλύτερη ανοσολογική αντίδραση στο φορέα ανοσοποίησης σε σχέση με υποπεριοχές αυτής. Όμως η υπογενωμική κλωνοποίηση επιλεγμένων περιοχών του αντιγόνου (PνLHY πρωτεΐνη) θα εξειδικεύσει την παραγωγή των αντισωμάτων με αποτέλεσμα η αναγνώριση του αντιγόνου από αυτά να είναι πιο εξειδικευμένη. Αυτό εξηγεί και το λόγο για τον οποίο επιλέχθηκε αυτή η στρατηγική στο πειραματικό μέρος.

Στάδιο II : Υπογενωμική κλωνοποίηση (Sub-cloning) των υδρόφιλων περιοχών στον προκαρυωτικό φορέα υπερέκφρασης pGEX.

Η απομόνωση των C₁, C₂ και C₁₋₂ ενθεμάτων έγινε με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR) στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως DNA-στόχος η κλωνοποιημένη στον T-πλασμιδιακό φορέα (T-Vector), αλληλουχία του PνLHY cDNA (Kaldis *et al.*, 2003). Και τα τρία ενθέματα κλωνοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικούς τύπους του πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης pGEX με σκοπό να επιτευχθεί το ορθό πλαίσιο ανάγνωσης. Τα τρία κλωνοποιημένα ενθέματα στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό του στελέχους BL-21 του εντεροβακτηρίου *Escherichia coli*. Παρακάτω αναπτύσσονται αναλυτικά τα στάδια της κλωνοποίησης και του μετασχηματισμού.

Στάδιο II α : Χαρακτηρισμός του πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης pGEX

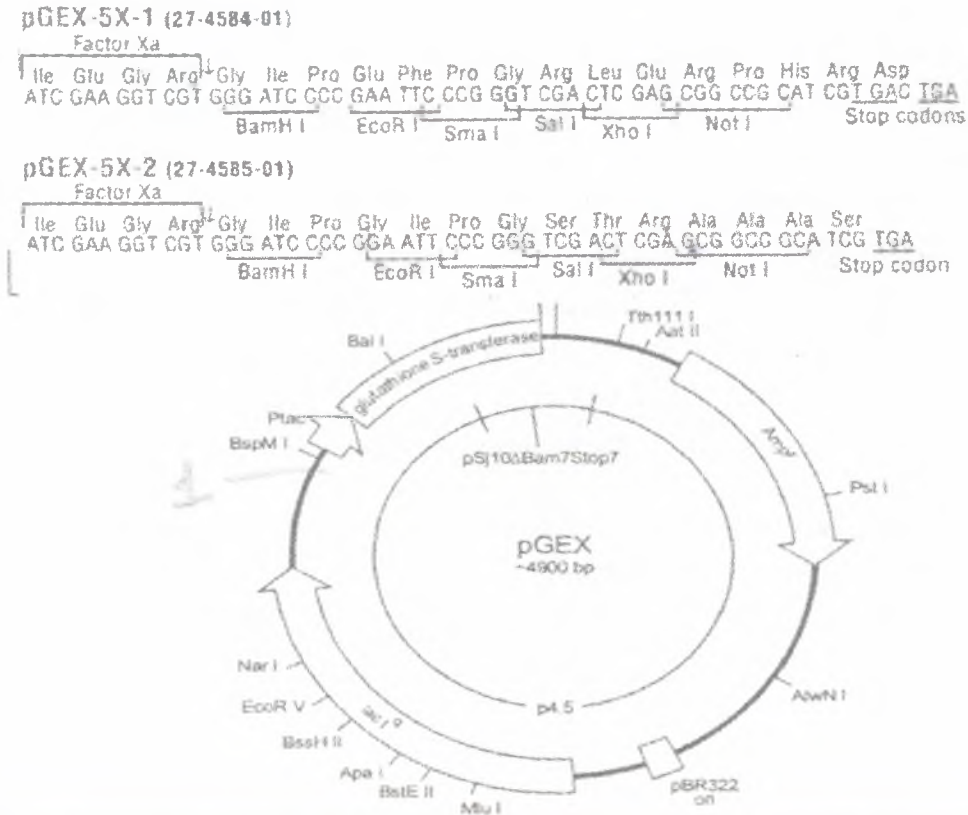
Ο φορέας υπερέκφρασης pGEX (*Pharmacia GST Gene Fusion Guide*), είναι ένα πλασμίδιο μεγέθους 4,9 kbp το οποίο περιέχει μια περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (**Multiple Cloning Site – MCS**) και περιλαμβάνει τρεις διαφορετικούς τύπους : i) pGEX 5x1, ii) pGEX 5x2 και iii) pGEX 5x3. Οι τρεις αυτοί τύποι διαφέρουν στην προσθήκη ενός (1) και δύο (2) αντίστοιχα νουκλεοτιδίων στη περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης των pGEX 5x2 και pGEX 5x3 σε σύγκριση με την περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης του στελέχους pGEX 5x1.

Έτσι καλύπτονται τα τρία πιθανά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης - ORFs (**Open Reading Frames**) και εξασφαλίζεται η σωστή μετάφραση του ενθέματος. Σε αντίθετη περίπτωση (εσφαλμένο πλαίσιο ανάγνωσης), η μετάφραση θα σταματούσε πρόωρα λόγω της εμφάνισης κάποιου κωδικονίου λήξης. Μεγάλη σημασία λοιπόν έχει η ακριβής κλωνοποίηση του ενθέματος στην περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης του πλασμιδιακού φορέα. Επιπροσθέτως η MCS φέρει διαδοχικά τις αλληλουχίες αναγνώρισης πολλών περιοριστικών ενδονουκλεασών καθώς και κωδικόνια λήξης της μετάφρασης. Αυτές οι περιοχές αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών, θα χρησιμοποιηθούν για να ενσωματωθεί το ένθεμα στο πλασμιδιακό φορέα.

Τα C_1 και C_{1-2} ενθέματα κλωνοποιήθηκαν στο pGEX 5x2 τύπο του φορέα υπερέκφρασης ενώ για την κλωνοποίηση του C_2 ενθέματος χρησιμοποιήθηκε ο pGEX 5x1 τύπος. Η MCS του pGEX 5x1 έχει μήκος 76 ζευγών βάσεων και εκτείνεται από την A⁹²¹ έως την A⁹⁷⁷, ενώ η MCS του pGEX 5x2 στελέχους έχει μέγεθος 77 ζευγών βάσεων και εκτείνεται από την A⁹²¹ έως την A⁹⁷⁸ λόγω της προσθήκης μιας επιπλέον γουανίνης μετά την C⁹⁵¹ αλλάζοντας έτσι το πλαίσιο ανάγνωσης. Η περιοχή 12 νουκλεοτιδικών βάσεων από την A⁹²¹ έως και την T⁹³² αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία Ile – Glu – Gly – Arg και στα δύο στελέχη. Η συγκεκριμένη αμινοξική αλληλουχία αποτελεί την περιοχή αναγνώρισης μιας εξειδικευμένης πρωτεάσης, του Παράγοντα Xa (**Factor Xa**), η οποία κόβει το πολυπεπίδιο αμέσως μετά την αργινίνη. Ο συγκεκριμένος παράγοντας θα χρησιμοποιηθεί στο στάδιο της απομόνωσης του αντιγόνου πριν τον εμβολιασμό.

Ακριβώς πριν από την περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης, εδρεύει η αλληλουχία ενός ενζύμου, της S-Τρανσφεράσης της Γλουταθειόνης ή GST (**Glutathione – S – Transferase**) για συντομία. Ο υποκινητής της Περιοχής Πολλαπλής Κλωνοποίησης βρίσκεται ανοδικά της αλληλουχίας του GST. Συνεπώς ενεργοποίηση της μεταγραφής από τον εν λόγω υποκινητή θα παράγει ένα χμαιορικό μεταγράφημα το οποίο όταν μεταφραστεί θα οδηγήσει στην παραγωγή μιας χμαιορικής πρωτεΐνης που θα περιλαμβάνει δύο πολυπεπίδια, το GST και την ενθεματική πρωτεΐνη ή πεπίδιο, της οποίας η αλληλουχία κλωνοποιήθηκε στη MCS του φορέα, συντηγμένα σε ένα μόριο (γι' αυτό και ο χαρακτηρισμός *χμαιορική πρωτεΐνη*). Ανάμεσα στα δύο αυτά πολυπεπίδια όπως αναφέρθηκε, βρίσκεται η περιοχή αναγνώρισης του παράγοντα Xa. Ο λόγος που συντήκεται η ενθεματική πρωτεΐνη στο GST είναι για να γίνει δυνατή η απομόνωση της από τις υπόλοιπες βακτηριακές πρωτεΐνες. Τέλος, ο πλασμιδιακός φορέας φέρει και μια αλληλουχία που κωδικοποιεί το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, η οποία θα βοηθήσει κατά το στάδιο ελέγχου της διαδικασίας κλωνοποίησης (Σχ. 3.1).





Σχήμα 3.1 Χαρτογράφηση του πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης pGEX. Διακρίνονται η αλληλουχία της S – Τρανσφεράσης της Γλουταθειόνης (GST) καθώς και η θέση που εδρεύει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό Αμικικιλίνη. Επίσης σε μεγένθυση φαίνεται αναλυτικά η Περιοχή Πολλαπλής Κλωνοποίησης τόσο του στελέχους 5x1 όσο και του στελέχους 5x2, οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών και της εξειδικευμένης πρωτεάσης Factor Xa καθώς επίσης και τα κωδικόνια λήξης της μετάφρασης TGA. (ΠΗΓΗ : Pharmacia GST Gene Fusion System Guide)

Στάδιο II β : Απομόνωση των C1, C2 και C1-2 περιοχών με Αλσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.

Από τη γνωστή αλληλουχία του PnLHY cDNA σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη (Forward και Reverse Primer) 27μερών μορίων εκκινητών (ssDNA). Τα δύο ζεύγη είναι ειδικά ως προς το 5' και 3' άκρο των αλληλουχιών C₁ και C₂ καθώς και για τα άκρα της αλληλουχίας C₁₋₂. Από τα 27 νουκλεοτίδια των εκκινητών, τα 18 υβριδίζονται στα άκρα των ενθεμάτων. Έξι επιπλέον νουκλεοτίδια προστέθηκαν ανοδικά των 5' άκρων όλων των εκκινητών. Αυτά τα έξι νουκλεοτίδια είναι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του κάθε ενθέματος. Άλλα τρία νουκλεοτίδια προστέθηκαν επίσης ανοδικά του 5' άκρου κάθε εκκινητή για να διευκολύνουν την διαδικασία της πέψης με τα αντίστοιχα περιοριστικά ένζυμα. Συνολικά τα τρία ζεύγη εκκινητών μαζί με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των C₁, C₂ και C₁₋₂ φαίνονται παρακάτω.

- C₁ Forward Primer (Νοηματική Αλληλουχία)



- C₁ Reverse Primer (Μη νοηματική Αλληλουχία)



με πράσινο χρώμα σημειώνεται η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης **SmaI**, με κόκκινο σημειώνεται η αλληλουχία αναγνώρισης της **XhoI** περιοριστικής ενδονουκλεάσης, με μπλε η περιοχή του 5' και 3' άκρου του C₂ ενθέματος και με μαύρο τα τρία επιπλέον νουκλεοτίδια που προστέθηκαν. Τα μαύρα βέλη δείχνουν τις θέσεις αποκοπής στα άκρα των εκκινητών από την δράση των ενδονουκλεασών.

- C₂ Forward Primer (Νοηματική Αλληλουχία)

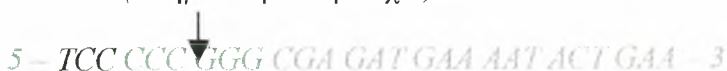


- C₂ Reverse Primer (Μη νοηματική Αλληλουχία)

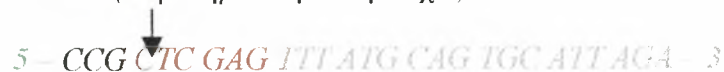


με πράσινο χρώμα σημειώνεται η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης **EcoRI**, με κόκκινο σημειώνεται η αλληλουχία αναγνώρισης της **XhoI** περιοριστικής ενδονουκλεάσης, με καφέ η περιοχή του 5' και 3' άκρου του C₂ ενθέματος και με μαύρο τα τρία επιπλέον νουκλεοτίδια που προστέθηκαν. Τα μαύρα βέλη δείχνουν τις θέσεις αποκοπής στα άκρα των εκκινητών από την δράση των ενδονουκλεασών.

- C₁₋₂ Forward Primer (Νοηματική Αλληλουχία)



- C₁₋₂ Reverse Primer (Μη νοηματική Αλληλουχία)



με πράσινο χρώμα σημειώνεται η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης **EcoRI**, με κόκκινο σημειώνεται η αλληλουχία αναγνώρισης της **XhoI** περιοριστικής ενδονουκλεάσης, με γκρι η περιοχή του 5' και 3' άκρου του C₁₋₂ ενθέματος και με μαύρο τα τρία επιπλέον νουκλεοτίδια που προστέθηκαν. Τα μαύρα βέλη δείχνουν τις θέσεις αποκοπής στα άκρα των εκκινητών από την δράση των ενδονουκλεασών.

Οι παραπάνω εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν για να πολλαπλασιάσουν επιλεκτικά τις περιοχές C₁, C₂ και C₁₋₂ από το cDNA του PνLHY παράγοντα. Έτσι μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) γίνεται δυνατή η απομόνωση συγκεκριμένων υπογενωμικών αλληλουχιών από το ίδιο μόριο cDNA. Αλλά το πλεονέκτημα που δίνει η τεχνική δεν εξαντλείται μόνο εκεί. Δίνεται η δυνατότητα να δημιουργηθούν κατά βούληση, νέα άκρα στις τρεις ενθεματικές αλληλουχίες DNA, τα οποία αποτελούν θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών που εδρεύουν πάνω στην MCS του πλασμιδιακού φορέα. Συνεπώς γίνεται πλέον δυνατή η

σύντηξη των δύο μορίων (ένθεμα και πλασμιδιακός φορέας). Το πρωτόκολλο της αντίδρασης PCR καθώς και οι συνθήκες αυτής συνοψίζονται στους Πίνακες 1 και 2.

Από τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ελήφθησαν 2 μl ενώ προστέθηκαν 5 μl διαλύματος φορτώματος DNA και ddH₂O έως τελικού όγκου 20 μl. Το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης 0,9 % έπειτα από προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό με βάση την συγκέντρωση πρότυπου δείγματος DNA απομονωμένου από τον φάγο λ και κομμένου με την ενδονουκλεάση BstE II. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε διάλυμα 1x TAE (αραίωση από 50x TAE : 242 gr Tris base, 57,1 ml οξικό οξύ, 100 ml από 0,5M EDTA, προσαρμογή στο 1 L με ddH₂O) σε συνεχή τάση 80 V. Η συγκέντρωση του δείγματος εκτιμήθηκε στα 100 ng/μl. Επιβεβαίωση της παραπάνω συγκέντρωσης έγινε μετά από απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο στα 260 nm.

Πίνακας 1 : Συνστατικά της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης για την απομόνωση των ενθεματικών C1, C2 και C1-2

200 ng από το DNA στόχος (PvlHY cDNA)

5 μl από 10x διάλυμα αντίδρασης PCR

20 pmoles από τον κατάλληλο ενθύ (Forward) και ανάστροφο (Reverse) εκκινητή

1,5 mM από Mg⁺².

250 μM από dNTPs

1 unit από Taq Πολυμεράση

Προσαρμογή στα 50 μl με προσθήκη ddH₂O

Πίνακας 2 : Συνθήκες της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

Στάδιο	Συνθήκες	Κύκλοι
<i>Αρχική αποδιάταξη των αλυσίδων</i>	94 βαθμοί Κελσίου, 5 λεπτά	-
<i>Αποδιάταξη των αλυσίδων</i>	95 βαθμοί Κελσίου, 1 λεπτό	-
<i>Επικόλληση των εκκινητών</i>	54 βαθμοί Κελσίου, 1 λεπτό	30
<i>Σύνθεση και επιμήκυνση των νέων αλυσίδων</i>	72 βαθμοί Κελσίου, 2 λεπτά	-
<i>Τελική επιμήκυνση των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων</i>	72 βαθμοί Κελσίου, 8 λεπτά	-
<i>Αποθήκευση των προϊόντων της αντίδρασης</i>	4 βαθμοί Κελσίου, επ άπειρων	-

Στάδιο II γ : Απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης από γρήνη βακτηριακή καλλιέργεια κυττάρων *E. coli*.

Μετά την απομόνωση των ενθεμάτων C₁, C₂, C₁₋₂ μέσω αντίδρασης PCR όπως περιγράφηκε παραπάνω, το επόμενο βήμα ήταν η απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης pGEX. Οι δύο πλασμιδιακοί φορείς υπερέκφρασης, pGEX 5x1 και pGEX 5x2, είχαν μετασηματίσει βακτηριακά κύτταρα *E. coli* (στέλεχος DH5a) χωρίς να περιέχουν κάποιο κλωνοποιημένο ένθεμα (empty vectors). Δύο καλλιέργειες

των 10 ml με αποστειρωμένο θρεπτικό διάλυμα LBamp (10 gr Bacto-tryptone, 5 gr Yeast-Extract, 5 gr NaCl, 100 mg / ml αμπικιλίνη και προσαρμογή σε τελικό όγκο 1 L με ddH₂O) επιμολύνθηκαν με μετασηματισμένα, ως προς τους κενούς πλασμιδιακούς φορείς *pGEX 5x1* και *pGEX 5x2*, βακτηριακά κύτταρα του DH5α στελεχούς του *E. coli* αντίστοιχα και στη συνέχεια οι δύο καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 °C, με ανάδευση 200 στροφές το λεπτό (rpm), για μια νύχτα (Overnight – O/N).

Μετά από 16 ώρες ελήφθησαν υπό ασηπτικές συνθήκες, δείγματα από τις ανεπτυγμένες καλλιέργειες, προστέθηκε γλυκερόλη (150 μl απόλυτη γλυκερόλη, 850 μl βακτήρια σε θρεπτικό διάλυμα LB) ακολούθησε έντονη ανάδευση, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο (- 196 °C, 1 min) και στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους - 40 °C. Η παραπάνω μέθοδος αποθήκευσης είναι η πλέον κοινή για μακράς χρονικής διάρκειας αποθήκευση βακτηριακών στελεχών με ή χωρίς πλασμιδιακό φορέα και θα περιγράφεται στο εξής στο κείμενο ως παρασκευή διαλυμάτων γλυκερόλης (Glycerol stocks).

Στη συνέχεια από τα δύο διαλύματα γλυκερόλης (έναντι των *pGEX 5x1* και *pGEX 5x2*) προστέθηκαν 60 μl σε δύο καλλιέργειες αποστειρωμένου LBamp των 10 ml και αφέθηκαν για επώαση στους 37 °C, 200 rpm για μια νύχτα. Σε δύο ογκομετρικές φιάλες με 500 ml αποστειρωμένου LBamp προστέθηκαν 3 ml ανά περίπτωση και υπό ασηπτικές συνθήκες, από κάθε νυχτερινή καλλιέργεια έναντι των δύο στελεχών του πλασμιδιακού φορέα και οι δύο καλλιέργειες αφέθηκαν να αναπτυχθούν στους 37 °C, 200 rpm για μια νύχτα. Την επόμενη μέρα απομονώθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, οι δύο πλασμιδιακοί φορείς σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA της εταιρίας Nucleobond (Nucleobond Plasmid DNA Extraction Kit). Το DNA των δύο πλασμιδιακών φορέων μετά την απομόνωση διαλύθηκε σε 1 ml ddH₂O. Ελήφθησαν 5 μl από το παραπάνω απόθεμα (stock), προστέθηκαν 5 μl διαλύματος χρώσης και ddH₂O έως τελικού όγκου 20 μl και το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης 0,9 %, σε διάλυμα 1x TAE και σταθερή τάση 80 V, με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό του με βάση την συγκέντρωση πρότυπου δείγματος DNA απομονωμένου από τον φάγο λ και κομμένου με την ενδονουκλεάση Bst II έπειτα από προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η συγκέντρωση του δείγματος εκτιμήθηκε στα 10 ng/μl. Επιβεβαίωση της παραπάνω συγκέντρωσης έγινε έπειτα από απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο στα 260 nm.

Στάδιο II δ : Πέψη του ενθεματικού DNA και των πλασμιδιακών φορέων με τις αντίστοιχες περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Για να γίνει εφικτή η ενσωμάτωση των ενθεμάτων στην MCS του πλασμιδιακού φορέα πρέπει όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα άκρα του ενθέματος να έχουν κοινή ακολουθία με κάποια περιοχή της MCS. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη θέσεων αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών στα άκρα του ενθέματος όπως έχει περιγραφεί. Οι ίδιες θέσεις αναγνώρισης υπάρχουν και στην MCS του πλασμιδιακού φορέα συνεπώς μετά την εκδήλωση της δράσης των ενδονουκλεασών, τα κοινά άκρα είναι πλέον συμπληρωματικά και έτσι τα δύο μόρια (φορέας και ένθεμα) συντήκονται σε ένα, παρουσία του ενζύμου λιγάση. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες δεν επιλέχθηκαν τυχαία καθώς οι θέσεις αναγνώρισης τους έπρεπε να απουσιάζουν από ενδιάμεσες θέσεις της αλληλουχίας των αντίστοιχων ενθεμάτων. Σε αντίθετη περίπτωση η αντίδραση αποκοπής θα κατακερμάτιζε το μόριο σε τόσα κομμάτια όσες θα ήταν και οι θέσεις αναγνώρισης. Συνεπώς με τη χρήση του προγράμματος *NEB cutter v.2* έγινε μια χαρτογράφηση περιοριστικών

ενδονουκλεασών στην αλληλουχία του PnLHY cDNA αλλά και σε αυτή των πλασμιδιακών φορέων.

Αναφέρθηκε επίσης ότι πέρα από τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών, στα άκρα των εκκινητών προστέθηκαν τρία επιπλέον νουκλεοτίδια. Ο ρόλος αυτών των νουκλεοτιδίων είναι να αυξήσουν την απόδοση των περιοριστικών ενδονουκλεασών κατά την αποκοπή των άκρων των εκκινητών. Τα επιπλέον νουκλεοτίδια συμβάλλουν στην αύξηση της πιθανότητας αναγνώρισης της θέσης αποκοπής από την περιοριστική ενδονουκλεάση με αποτέλεσμα να αυξηθεί το ποσοστό των μορίων που θα κοπεί τελικά (από 10 % σε 90 % στα XhoI και EcoRI) αυξάνοντας παράλληλα και την απόδοση της αντίδρασης αποκοπής. Φυσικά αυτό το πρόβλημα δεν συναντάται στο κλειστό κυκλικό μόριο DNA του πλασμιδιακού φορέα. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων και οι συνθήκες των αντιδράσεων αποκοπής τόσο για τα τρία ενθέματα όσο και για τα δύο στελέχη του πλασμιδιακού φορέα συνοψίζονται στους Πίνακες 3 και 4.

Πίνακας 3 : Συνθήκες και ποσότητες αντιδραστηρίων κατά την αντίδραση αποκοπής των δύο πλασμιδιακών στελεχών.

<i>pGEX 5x2</i>	<i>PGEX 5x1</i>
1 μg πλασμιδιακού DNA	1 μg πλασμιδιακού DNA
13 μl από 10x T-buffer (Takara)	13 μl από 10x H-buffer (Takara)
13 μl από 10x H-buffer (Takara)	24 U από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI
32 U από την περιοριστική ενδονουκλεάση SmaI	18 U από την περιοριστική ενδονουκλεάση XhoI
18 U από την περιοριστική ενδονουκλεάση XhoI	Προσαρμογή στα 130 μl τελικός όγκος με ddH ₂ O
13 μl από BSA διάλυμμα (όπου είναι απαραίτητο ανάλογα με τις απαιτήσεις του ενζύμου)	
Προσαρμογή στα 130 μl τελικός όγκος με ddH ₂ O	
Συνθήκες αντίδρασης	
Πρώτη αντίδραση αποκοπής στους 30 βαθμούς Κελσίου για τρεις ώρες (SmaI)	Ταυτόχρονη αντίδραση αποκοπής και για τα δύο ένζυμα στους 37 βαθμούς Κελσίου για τρεις ώρες
Δεύτερη αντίδραση αποκοπής στους 37 βαθμούς Κελσίου για τρεις ώρες (XhoI)	

Λόγω της επιλογής των περιοριστικών ενδονουκλεασών SmaI και XhoI για την αποκοπή του *pGEX 5x2* φορέα, η αντίδραση έπρεπε να γίνει σε δύο διαφορετικά στάδια, λόγω του ότι το πρώτο ένζυμο λειτουργεί φυσιολογικά στους 30 °C ενώ το δεύτερο στους 37 °C. Πρώτα έγινε η αποκοπή με το ένα ένζυμο και στη συνέχεια έγινε ολονύχτια καταβύθιση σε αιθανόλη παρουσία οξικού αμμωνίου (βλ. Παράρτημα *Ethanol Precipitation*) στους -20 °C για να καθαριστεί το πλασμιδιακό DNA από τα άλατα του πρώτου διαλύματος (T-διάλυμα) καθώς και από το ένζυμο. Την επόμενη μέρα έγινε προσθήκη του δεύτερου ενζύμου και του διαλύματος που

αυτό απαιτεί και έγινε νέα αντίδραση αποκοπής σε νέες συνθήκες, όπως περιγράφεται στους πίνακες 3 και 4.

Πίνακας 4 : Συνθήκες και ποσότητες αντιδραστηρίων κατά την αντίδραση αποκοπής των τριών ενθεμάτων.

C1 και C1-2	C2
1,5 µg ενθεματικού DNA	1,5 µg ενθεματικού DNA
3 µl από 10x T-buffer (Takara)	4 µl από 10x H-buffer (Takara)
3 µl από 10x H-buffer (Takara)	24 U από την περιοριστική ενδονουκλεάση <i>EcoRI</i>
24 U από την περιοριστική ενδονουκλεάση <i>SmaI</i>	18 U από την περιοριστική ενδονουκλεάση <i>XhoI</i>
27 U από την περιοριστική ενδονουκλεάση <i>XhoI</i>	Προσαρμογή στα 40 µl τελικός όγκος με ddH ₂ O
3 µl από BSA διάλυμα (όπου είναι απαραίτητο ανάλογα με τις απαιτήσεις του ενζύμου)	
Προσαρμογή στα 30 µl τελικός όγκος με ddH ₂ O	
Συνθήκες αντίδρασης	
Πρώτη αντίδραση αποκοπής στους 30 βαθμούς Κελσίου για τρεις ώρες (<i>SmaI</i>)	Ταυτόχρονη αντίδραση αποκοπής και για τα δύο ένζυμα στους 37 βαθμούς Κελσίου για τρεις ώρες
Δεύτερη αντίδραση αποκοπής στους 37 βαθμούς Κελσίου για τρεις ώρες (<i>XhoI</i>)	

Στη περίπτωση του φορέα *pGEX 5x1*, η αποκοπή έγινε με δύο ενδονουκλεάσες που απαιτούν ίδιες συνθήκες, συνεπώς η αντίδραση έγινε ταυτόχρονα. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και κατά την αποκοπή των άκρων των εκκινητών ανάλογα με τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε έναν, από αυτούς. Στην περίπτωση των πλασμιδιακών φορέων πάρθηκε δείγμα 5 µl μετά την αντίδραση αποκοπής όλων των περιοριστικών ενδονουκλεασών, προστέθηκαν σε αυτό 4 µl διαλύματος χρώσης και το δείγμα συμπληρώθηκε έως τελικού όγκου 20 µl με ddH₂O.

Στη συνέχεια φορτώθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1 % και μετά από προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου εκτιμήθηκε η απόδοση της αποκοπής, παρουσία δείγματος αναφοράς (λ DNA κομμένου με *BstE II*). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα 5 µl άκοπου πλασμιδίου μετά από προσθήκη 4 µl διαλύματος χρώσης και προσαρμογή σε τελικό όγκο 20 µl με ddH₂O. Η εκτίμηση στηρίχθηκε στο ότι το άκοπο πλασμίδιο εμφανίζει δύο διαμορφώσεις σε πηκτή αγαρόζης, την υπερελικωμένη και την χαλαρή κυκλική μορφή. Λόγω της διαφορετικής διαμόρφωσης που έχουν οι τρεις μορφές του κυκλικού πλασμιδίου, χαρακτηρίζονται και από διαφορετική κινητική μετανάστευσης κατά την ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή αγαρόζης, δίνοντας τελικά ένα ηλεκτροφορητικό πρότυπο με δύο διακριτές ζώνες.

Η ζώνη που έχει διανύσει την μεγαλύτερη απόσταση μέσα στην πηκτή είναι η ζώνη της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου ενώ η ζώνη που έχει διανύσει τη μικρότερη απόσταση είναι η ζώνη της γραμμικής μορφής διότι αυτή έχει τη

μικρότερη πυκνότητα και συνάντησε και τις μεγαλύτερες δυσκολίες κατά τη διέλευση μέσα από τους πόρους της πηκτής αγαρόζης. Όταν το πλασμίδιο έχει αποκοπεί πλήρως, εμφανίζεται μόνο στη γραμμική μορφή του συνεπώς στην πηκτή εμφανίζεται μόνο μια ζώνη. Σε όλες τις περιπτώσεις εμφανίστηκε η παρουσία μιας μόνο ζώνης στα 4,9 Kbp, επιβεβαιώνοντας τη σωστή αποκοπή του πλασμιδίου. Η παραπάνω μέθοδος επιβεβαίωσης της αποκοπής δεν εφαρμόστηκε στους εκκινητές διότι τα μόρια εκεί παραμένουν γραμμικά πριν και μετά την αποκοπή. Η ελάχιστη διαφορά μήκους μετά την αποκοπή μερικών μόνο βάσεων δεν είναι δυνατό να ανιχνευτεί σε κοινή πηκτή αγαρόζης.

Στάδιο II ε : Σύντηξη των ενθεματικών DNA στους πλασμιδιακούς φορείς παρουσία του ενζύμου της λιγάσης.

Μετά την αποκοπή των ενθεματικών και πλασμιδιακών μορίων DNA από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, έπρεπε να απομακρυνθούν τόσο τα ένζυμα όσο και τα υπολειμματικά άλατα από τα διαλύματα αποκοπής, για να μπορέσουν έπειτα να συντηχθούν μεταξύ τους τα δύο είδη μορίων (ένθεμα και πλασμιδιακός φορέας). Η αντίδραση σύντηξης είναι ένα πολύ ευαίσθητο και κρίσιμο στάδιο της όλης διαδικασίας. Τα μόρια DNA που πρόκειται να συντηχθούν πρέπει να είναι πολύ καθαρά ενώ δεν θα πρέπει να υπάρχει παρουσία άλλων μορίων στο δείγμα (υπολείμματα άκοπου DNA, άλατα, πρωτεΐνες κλπ). Σε αντίθετη περίπτωση η δράση του ενζύμου λιγάση θα μειωθεί κατακόρυφα και η απόδοση της αντίδρασης θα είναι πολύ μικρή. Ακόμα και να δημιουργηθούν κάποια χημικά μόρια DNA υπό αυτές τις συνθήκες, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να έχουν συντηχθεί εσφαλμένα (π.χ να έχουν αποκοπεί κάποιες βάσεις) με αποτέλεσμα να αλλάξει το πλαίσιο ανάγνωσης κατά την μετάφραση.

Παρόλο που υπάρχει μια ευθέως ανάλογη σχέση ανάμεσα στον αριθμό καθαρισμών που εφαρμόζονται σε ένα δείγμα και στο ποσοστό απωλειών που εμφανίζει αυτό τελικά, εντούτοις λόγω της κρισιμότητας του σταδίου εφαρμόστηκαν δύο διαδοχικά στάδια καθαρισμού στα προϊόντα της αποκοπής. Αρχικά όλη η ποσότητα των αντιδράσεων αποκοπής των πλασμιδιακών φορέων και των ενθεμάτων-προϊόντων της Αλυσίδωτης Αντίδρασης Πολυμεράσης από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, φορτώθηκε σε πηκτή ειδικής αγαρόζης υψηλής καθαρότητας (Low Melting Agarose) και συγκέντρωσης 1,2 % παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και πρότυπου δείγματος DNA (λ DNA). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε 1x TAE και σε συνεχή τάση 80 V. Μόλις τα δείγματα διαχωρίστηκαν επαρκώς, αποκόπηκαν με αποστειρωμένο νυστέρι οι ειδικές ζώνες μαζί με την αγαρόζη και μεταφέρθηκαν χωριστά σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες Eppendorf του 1,5 ml.

Στη συνέχεια τα δείγματα καθαρίστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης και καθαρισμού δειγμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (Nucleospin DNA Extraction kit) Ένα επιπλέον στάδιο καθαρισμού εφαρμόστηκε στη συνέχεια με ολονύχτια καταβύθιση παρουσία αιθανόλης και οξικού αμμωνίου στους -40°C . Τέλος σε 1 ml από κάθε δείγμα προστέθηκαν 4 ml διαλύματος χρωστικής και συμπληρώθηκε ο όγκος έως τα 20 ml με ddH₂O. Όλα τα δείγματα φορτώθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1 % παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και ηλεκτροφορήθηκαν με σκοπό την εκτίμηση της συγκέντρωσης DNA μετά τα στάδια του καθαρισμού.

Με γνωστή τη συγκέντρωση του DNA στα δείγματα, ακολούθησε η αντίδραση σύντηξης τους παρουσία του ενζύμου λιγάση. Οι ποσότητες και οι συνθήκες της αντίδρασης συνοψίζονται στον Πίνακα 5. Όπως αναφέρθηκε, η αντίδραση σύντηξης των δύο μορίων είναι ένα ιδιαίτερα κρίσιμο και ευαίσθητο στάδιο. Εκτός της

καθαρότητας του υλικού, μεγάλη σημασία για την επιτυχία της αντίδρασης έχει και η αναλογία στην οποία βρίσκονται τα μόρια του ενθέματος και του πλασμιδιακού

Πίνακας 5 : Συνθήκες και ποσότητες αντιδραστηρίων κατά την αντίδραση σύντηξης των τριών ενθεμάτων στους αντίστοιχους πλασμιδιακούς φορείς.

C1	C2	C1-2
5 ng DNA από τον πλασμιδιακό φορέα pGEX 5x2	50 ng DNA από τον πλασμιδιακό φορέα pGEX 5x1	50 ng DNA από τον πλασμιδιακό φορέα pGEX 5x2
30 ng ενθεματικού DNA	10 ng ενθεματικού DNA	30 ng ενθεματικού DNA
2 μl από 5x διάλυμα λιγάσης	2 μl από 5x διάλυμα λιγάσης	2 μl από 5x διάλυμα λιγάσης
1 U λιγάση	1 U λιγάση	1 U λιγάση
προσαρμογή στα 10 μl με ddH ₂ O	προσαρμογή στα 10 μl με ddH ₂ O	προσαρμογή στα 10 μl με ddH ₂ O
μοριακή αναλογία φορέα / ενθέματος 1 : 5	μοριακή αναλογία φορέα / ενθέματος 1 : 2	μοριακή αναλογία φορέα / ενθέματος 1 : 2

Συνθήκες αντίδρασης

Ολονύχτια αντίδραση στους 12 βαθμούς Κελσίου

φορέα στην αντίδραση. Για κάθε ζεύγος ενθέματος / φορέα δεν υπάρχει κάποια καθορισμένη μοριακή αναλογία. Η σωστή αναλογία βρίσκεται μετά από δοκιμές της αντίδρασης συγκόλλησης σε διάφορες αναλογίες των δύο ειδών αντιδρώντων μορίων DNA. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 5., οι αναλογίες για τα τρία ζεύγη διαφέρουν. Συνήθως διατηρείται σταθερή η ποσότητα του DNA του φορέα στα 50 ng και αυτό που αλλάζει είναι η ποσότητα DNA του ενθέματος που προστίθεται. Η ποσότητα αυτή υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο :

$$\text{ενθέματος} = \frac{\text{ng του πλασμιδιακού φορέα} \times \text{μέγεθος σε kbp του ενθέματος}}{\text{μέγεθος σε kbp του πλασμιδιακού φορέα}} \times \text{μοριακή αναλογία ενθέματος / φορέα}$$

Στάδιο II στ : Μετασχηματισμός του προκαρυωτικού φορέα υπερέκφρασης με το συντηγμένο χιμαιρικό μόριο.

Μετά την αντίδραση συγκόλλησης ακολουθεί ένα στάδιο ελέγχου και ανεύρεσης (Screening) των μορίων που έχουν συντηχθεί κανονικά. Το στάδιο αυτό προϋποθέτει το μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* (στελέχος DH5a) με τα προϊόντα της αντίδρασης σύντηξης. Για τον μετασχηματισμό επιλέχθηκε η μέθοδος της ηλεκτροπόρωσης (Electroporation) στα 1.400V.

Από κάθε προϊόν της αντίδρασης σύντηξης αφαιρέθηκε 1 μl και αραιώθηκε μια φορά με προσθήκη 3 μl ddH₂O. 3 μl από την αραιώση προστέθηκαν σε 60 μl ηλεκτροδεκτικών κυττάρων (Electrocompetent cells) του στελέχους DH5a του βακτηριδίου *E. coli* (αποθηκευμένα υπό μορφή glycerol stock στους - 80 °C). Το μίγμα τοποθετήθηκε σε ειδική κυψελίδα και εφαρμόστηκε τάση 1.400V για 1 msec. Η εφαρμογή της τάσης είχε ως αποτέλεσμα να δημιουργηθούν οπές στη

κυτοπλασματική μεμβράνη και στο βακτηριακό τοίχωμα ορισμένων βακτηρίων, μέσω των οποίων τα συντηγμένα μόρια DNA εισήλθαν στο κυτόπλασμα αυτών.

Αμέσως μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού παλμού, προστέθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες, 1 ml θρεπτικό διάλυμα LB σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία αμπικιλίνης και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37 °C, και 100 grm για να ανακάμψουν από τη διαδικασία μετασχηματισμού τους και να επουλωθούν έτσι οι πλασματικές τους μεμβράνες. Μετά το πέρας της μίας ώρας, ακολούθησε φυγοκέντρηση και αφαιρέθηκαν 800 μl από το 1 ml (1000 μl) ενώ το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε στα εναπομείναντα 200 μl θρεπτικού διαλύματος. Τα 200 μl τοποθετήθηκαν στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σε τριβλία Petri παρουσία αμπικιλίνης (10 gr Bacto-tryptone, 5 gr Yeast-Extract, 5 gr NaCl, 25 gr άγαρ, 100 μg / ml αμπικιλίνη, προσθήκη ddH₂O σε τελικό όγκο 1 λίτρο) και η καλλιέργεια αφέθηκε για επώαση στους 37 °C για μία νύχτα.

Αν η αντίδραση συγκόλλησης έγινε σωστά τότε ο πλασμιδιακός φορέας pGEX που αρχικά είχε την μορφή γραμμικού μόριου, έγινε πλέον ένα κυκλικό χμαιοικό μόριο λόγω της ενσωμάτωσης του ενθεματικού DNA στη MCS αυτού. Σε όσα βακτηριακά κύτταρα έγινε επιτυχής εισαγωγή του χμαιοικού μορίου DNA στο εσωτερικό τους, τότε αυτά παρουσίασαν ένα φαινότυπο ανθεκτικό στην αμπικιλίνη λόγω του γονιδίου ανθεκτικότητας που εδρεύει στο πλασμιδιακό φορέα pGEX. Αυτά τα κύτταρα θα εκμεταλλευθούν τα θρεπτικά συστατικά του στερεού θρεπτικού υποστρώματος και θα μεγαλώσουν όλη τη νύχτα, δίνοντας βακτηριακές αποικίες την άλλη μέρα. Όσα κύτταρα δεν μετασχηματίστηκαν, θα θανατωθούν από την παρουσία του αντιβιοτικού.

Στα παραπάνω στηρίζεται και η τοποθέτηση δείγματος κομμένου πλασμιδιακού φορέα για αντίδραση συγκόλλησης, χωρίς την παρουσία ενθέματος ως μάρτυρας της διαδικασίας αποκοπής και συγκόλλησης. Εφόσον και οι δύο ενδονουκλεάσες περιορισμού αναγνώρισαν και έκοψαν τις θέσεις περιορισμού τους στην MCS του φορέα τότε το πλασμίδιο από κυκλικό που ήταν αρχικά, έγινε γραμμικό με τα άκρα του οποίου να μην είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους (διότι κόπηκαν από διαφορετικά ένζυμα). Συνεπώς η λιγάση δεν μπορεί να τα συγκολήσει και έτσι το μόριο παραμένει στη γραμμική μορφή. Ωστόσο πολύ μικρό ποσοστό γραμμικών μορίων εισέρχεται σε κύτταρα κατά τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης, σε αντίθεση με την κυκλική μορφή, με αποτέλεσμα η καλλιέργεια που προέκυψε από το συγκεκριμένο δείγμα, να μην επιβιώνει απουσία του γονιδίου ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη που φέρει το πλασμίδιο, δίνοντας έτσι πολύ χαμηλό έως μηδενικό ποσοστό αποικιών στα τριβλία *Petri*.

Ωστόσο η παρουσία αποικιών στα τριβλία *Petri* σε καλλιέργειες που προήλθαν από σύντηξη παρουσία ενθέματος, ακόμα και αν συνοδεύεται από πλήρη απουσία αποικιών στο δείγμα του μάρτυρα (Test Ligation) δεν συνεπάγεται ότι όλες αυτές οι αποικίες προέρχονται από θετικούς κλώνους, δηλαδή από βακτήρια που περιέχουν το χμαιοικό μόριο DNA. Θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι ένα μικρό ποσοστό μπορεί να οφείλεται σε μόρια του πλασμιδιακού φορέα που παρέμειναν άκοπα από τις ενδονουκλεάσες και έτσι εισήλθαν ως κυκλικά στα κύτταρα, χωρίς να περιέχουν ένθεμα, ωστόσο το ενδεχόμενο αυτό αποκλείεται καθώς η ζώνη του πλασμιδιακού φορέα αποκόπηκε από την πηκτή ειδικής αραρόζης πριν την αντίδραση συγκόλλησης. Ένα άλλο ποσοστό μπορεί να οφείλεται σε ανορθόδοξη συγκόλληση των άκρων του πλασμιδιακού φορέα έστω και αν αυτά δεν είναι συμπληρωματικά (φαινόμενο σπάνιο, αλλά πιθανό).

Έτσι για να εξακριβωθούν οι θετικοί κλώνοι για κάθε περίπτωση κλωνοποίησης, πρέπει να ελεγχθούν οι αποικίες από τα τριβλία *Petri*. Με τη βοήθεια μιας

αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας που βυθίζεται σε μια καλλιέργεια, “σηκώνεται” διαδοχικά και υπό ασηπτικές συνθήκες, ένας μεγάλος αριθμός αποικιών (τουλάχιστον 20) και τοποθετούνται, η κάθε μια, σε 5 ml LBamp πάλι υπό ασηπτικές συνθήκες, για επώαση στους 37 °C, 200 rpm για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα (16 ώρες επώαση) ακολουθεί απομόνωση πλασμιδιακού DNA (βλ. Παράρτημα *Απομόνωση πλασμιδιακού DNA*) από όσες καλλιέργειες θολώσουν (ένδειξη ότι η καλλιέργεια αναπτύχθηκε και ήταν ανθεκτική στην αμικιλίνη).

Στη συνέχεια, ακολουθεί μια αντίδραση αποκοπής του ενθέματος όπως ακριβώς περιγράφηκε στον Πίνακα 3. Στα προϊόντα της αντίδρασης, προστίθεται διάλυμα χρωστικής και ακολούθως ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης (1 %) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και πρότυπου δείγματος DNA (λ DNA κομμένου με BstE II). Όσα δείγματα περιέχουν το ένθεμα (θετικοί κλώνοι) θα δώσουν δύο ζώνες στη πηκτή. Το μέγεθος της μίας ζώνης αντιστοιχεί στο μήκος του ενθέματος (450 bp για C_1 , C_2 και 1350 bp για C_{1-2}) ενώ το μέγεθος της άλλης ζώνης αντιστοιχεί στο μήκος του γραμμικού πλασμιδιακού φορέα (4.900 bp). Έτσι διαχωρίστηκαν οι θετικοί κλώνοι από τους αρνητικούς για όλα τα ενθέματα. Από τις νυχτερινές καλλιέργειες των θετικών κλώνων, ελήφθησαν 60 μl και τοποθετήθηκαν με τη βοήθεια αποστειρωμένης, γυάλινης ράβδου σε τριβλία *Petri* με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LBamp (100 mg/ml αμικιλίνη) όπως περιγράφηκε παραπάνω και επώαστηκαν στους 37 °C για μια νύχτα.

Την επόμενη μέρα “σηκώθηκε” με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας μια ξεκάθαρη, μονή αποικία (προς αποφυγήν μόλυνσεων) από κάθε περίπτωση και τοποθετήθηκε σε 5 ml υγρής καλλιέργειας LBamp και στη συνέχεια επώαστηκε για μια νύχτα στις προαναφερθείσες συνθήκες. Από τη νυχτερινή επώαση αυτής της καλλιέργειας, παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα γλυκερόλης (Glycerol stocks) του 1 ml για διατήρηση των θετικών κλώνων ενώ από το υπόλοιπο της καλλιέργειας απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA σύμφωνα με το πρωτόκολο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA της *Qiagen*. Από το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA για κάθε περίπτωση, στάλθηκαν 1,5 μg μαζί με κατάλληλους εκκινητές, για αλληλούχιση νουκλεοτιδικών βάσεων με σκοπό την επιβεβαίωση της σωστής ενσωμάτωσης των ενθεμάτων στους πλασμιδιακούς φορείς τους.

Στάδιο III : Εύρεση της συνθήκης υπερέκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης.

Όπως περιγράφηκε, οι θετικοί κλώνοι που περιέχουν τα συντηγμένα ενθέματα C_1 , C_2 και C_{1-2} στους πλασμιδιακούς φορείς *pGEX 5x2* και *pGEX 5x1* είναι ηλεκτροδεκτικά κύτταρα του στελέχους DH5α του εντεροβακτηριδίου *E. coli*. Το συγκεκριμένο στέλεχος είναι το πλέον ενδεδειγμένο για κλωνοποιήσεις διότι επιτείνει τον έντονο πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου που θα εισαχθεί σε αυτό. Ο αριθμός των αντιγράφων που θα δημιουργήσει ένα πλασμίδιο μετά την εισαγωγή του σε ένα βακτηριακό στέλεχος, εξαρτάται τόσο από το είδος του πλασμιδίου (αντιγραφή κατά το πρότυπο Θ ή κατά το πρότυπο του κυλιόμενου κύκλου) όσο και από το είδος του βακτηριακού στελέχους.

Αντίθετα, η υπερέκφραση ενός γονιδίου είναι καθαρά θέμα επιλογής του πλασμιδιακού φορέα καθώς εξαρτάται από το είδος του υποκινητή που το κυβερνά. Ωστόσο το είδος του στελέχους μπορεί να συμβάλλει με έμμεσο τρόπο στην απόδοση της υπερέκφρασης π.χ με προστασία της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης από πρωτεόλυση. Για την υπερέκφραση των GST-χιμαιρικών C_1 , C_2 και C_{1-2} πρωτεϊνικών περιοχών επιλέχθηκε το BL-21 στέλεχος του βακτηριδίου *E. coli*. Το συγκεκριμένο στέλεχος είναι αυτό που επιλέγεται συνήθως σε πειράματα υπερέκφρασης, καθώς από

το κυτόπλασμα του απουσιάζουν οι γνωστές πρωτεάσες όπως Lon, OmpT, DegP, και HtpR, περιορίζοντας έτσι τη πιθανότητα πρωτεολυτικής αποικοδόμησης αυτού (*Pharmacia GST Gene Fusion Guide*).

Για να μπορέσει να γίνει ο έλεγχος της υπερέκφρασης των χιμαιρικών πρωτεϊνών πρέπει αφενός αυτές να έχουν διαφορετικό μοριακό βάρος (για να διαχωριστούν μεταξύ τους) αφετέρου πρέπει το μοριακό βάρος τους να είναι γνωστό για να μπορέσουν να εντοπιστούν στο σύνολο των υπολοίπων πρωτεϊνών της βακτηριακής καλλιέργειας. Τα C₁ και C₂ πολυπεπίδια έχουν μήκος 150 αμινοξέα και μοριακό βάρος 15 kDa, το C₁₋₂ πολυπεπίδιο έχει μήκος 450 αμινοξέα και μοριακό βάρος 45 kDa, ενώ τέλος η GST πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 30 kDa. Συνεπώς το μοριακό βάρος των C₁ και C₂ χιμαιρικών πρωτεϊνών αναμένεται να είναι 45 kDa ενώ το μοριακό βάρος της C₁₋₂ χιμαιρικής πρωτεΐνης αναμένεται να είναι 75 kDa.

Από τα διαλύματα γλυκερόλης (Glycerol stocks) των θετικών C₁, C₂ και C₁₋₂ κλώνων επώαστηκαν ολονύχτιες καλλιέργειες των 10 ml σε θρεπτικό διάλυμα LBamp στους 37 °C, 200 rpm. Την επόμενη μέρα απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA (βλ. Παράρτημα *Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA*) από τις νυχτερινές καλλιέργειες. Ποσότητα 1 ng από κάθε απομονωμένο χιμαιρικό πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό κυττάρων του στελέχους BL-21 του εντεροβακτηριδίου *E. coli* (βλ. Παράρτημα : *Μετασχηματισμός κυττάρων του στελέχους BL-21*). Στο τέλος παρασκευάστηκαν διαλύματα γλυκερόλης και για τα τρία μετασχηματισμένα BL-21 στελέχη (ενθέματα C₁, C₂ και C₁₋₂) και αποθηκεύτηκαν στους -40 °C.

Το επόμενο βήμα ήταν η χρησιμοποίηση των BL-21 καλλιέργειών των GST-C₁, GST-C₂, GST-C₁₋₂ χιμαιρικών πρωτεϊνών (στο εξής θα αναφέρονται ως BL-21 χίμαιρες) για να βρεθεί η συνθήκη υπερέκφρασης τους. Στόχος αυτού του σταδίου, ήταν να γίνει εφικτή η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη παραγωγή των τριών χιμαιρικών πρωτεϊνών με τις μικρότερες δυνατές απώλειες λόγω πρωτεολυτικής αποικοδόμησης! Οι παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα, με σκοπό να επιτευχθεί η υπερέκφραση, ήταν οι εξής : θερμοκρασία επώασης της καλλιέργειας (°C), οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας (OD), ποσότητα του IPTG (mM) που αποτέλεσε το παράγοντα επαγωγής της έκφρασης των χιμαιρικών πρωτεϊνών και διάρκεια επαγωγής (h).

Από τα διαλύματα γλυκερόλης των BL-21 χιμαιρικών πρωτεϊνών αφαιρέθηκαν 60 μl και προστέθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε 10 ml LBamp με γλυκόζη 2 % β/ο. Η προσθήκη της γλυκόζης αποσκοπεί στη μείωση της πιθανότητας να εκφραστούν οι χιμαιρικές πρωτεΐνες πριν την είσοδο του παράγοντα επαγωγής (IPTG) μέσω της καταστολής του lacI^q γονιδίου που βρίσκεται ανοδικά του υποκινητή της MCS του πλασμιδιακού φορέα (Σχ. 3.3, "*Biochemistry*", *Stayer* : *ρύθμιση της μεταγραφής του lacI^q οπερονίου*). Οι τρεις καλλιέργειες (μια για κάθε χίμαιρα) επώαστηκαν στους 37 °C, και 200 rpm για μια νύχτα.

Παράλληλα με τις τρεις καλλιέργειες των χιμαιρικών πρωτεϊνών, προστέθηκαν άλλες δύο που αντιπροσωπεύουν τους μάρτυρες της διαδικασίας. Η πρώτη ήταν κύτταρα BL-21 που περιείχαν μόνο τον πλασμιδιακό φορέα (pGEX) χωρίς κλωνοποιημένο σε αυτόν ένθεμα (empty vector). Το προϊόν υπερέκφρασης αυτής της καλλιέργειας ήταν μόνο το GST και χρησίμευσε ως μάρτυρας προς την επαγωγή για υπερέκφραση και γι' αυτό από εδώ και στο εξής στο κείμενο θα αναφέρεται ως θετικός μάρτυρας. Η επώαση του συγκεκριμένου μάρτυρα έγινε σε LBamp θρεπτικό μέσο παρουσία γλυκόζης 2 % ακριβώς όπως αναφέρθηκε και για τις καλλιέργειες των τριών χιμαιρικών πρωτεϊνών.

Ο δεύτερος μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε, ήταν καλλιέργεια BL-21 βακτηριδίων τα οποία δεν περιέχαν κανένα πλασμιδιακό φορέα. Ο συγκεκριμένος μάρτυρας αποτέλεσε τον αρνητικό μάρτυρα του πειράματος καθώς επέτρεψε να γίνει εφικτή η παρακολούθηση της γενικότερης ανάπτυξης των καλλιεργειών. Εφόσον η συγκεκριμένη καλλιέργεια δεν περιέχει τον πλασμιδιακό φορέα pGEX που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικιλίνη, η επώαση του σε όλες τις περιπτώσεις έγινε σε LB θρεπτικό μέσο παρουσία γλυκόζης 2 % β/ο, χωρίς προσθήκη αμικιλίνης. Οι συνθήκες επώασης και των δύο μαρτύρων ήταν οι ίδιες που εφαρμόζονταν κάθε φορά και για τις χιμαιρικές πρωτείνες δίνοντας συνολικά πέντε καλλιέργειες.

Την επόμενη μέρα έγινε μια αραιώση των νυχτερινών καλλιεργειών (αραίωση 1 : 33 ή 300 μl νυχτερινής καλλιέργειας σε 10 ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LBamp ή LB ανάλογα με την περίπτωση, παρουσία γλυκόζης 2 % β/ο). Η αραιώση εξασφάλισε μια πτώση της αρχικής τιμής της οπτικής πυκνότητας της νυχτερινής καλλιέργειας περί τις 0,15 μονάδες OD και αποσκοπούσε στο να ευνοηθεί η διαίρεση των κυττάρων της καλλιέργειας και να αποφευχθεί η προσέγγιση της φάσης θανάτου των βακτηριακών κυττάρων. Οι αραιωμένες καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 °C και 200 rpm για περίπου δύο ώρες. Κατά το διάστημα αυτό γίνονταν συνεχώς μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας. Μόλις η οπτική πυκνότητα έπαιρνε την επιθυμητή τιμή, τότε στην καλλιέργεια γινόταν προσθήκη υπό ασηπτικές συνθήκες κατάλληλης ποσότητας IPTG από διάλυμα αποθέματος (stock) συγκεντρώσεως 0,5 M, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του στην καλλιέργεια να είναι αυτή που έχει επιλεγεί κάθε φορά ανάλογα με τη συνθήκη που δοκιμαζόταν.

Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες επωάζονταν στους 37 °C και 200 rpm συνήθως για 4 ώρες και λαμβάνονταν δείγματα (80 μl) σε χρονικά διαστήματα που είχαν προεπιλεγεί ανάλογα με την συνθήκη. Στα 80 μl του δείγματος γινόταν μια φορά αραιώση λόγω της προσθήκης 80 μl από το διάλυμα φορτώματος πρωτεϊνών (2x loading buffer : 100 mM Tris-Cl με pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0,2 % BPB, 8 % β-mercaptoethanol). Το διάλυμα περιέχει : χρωστική (BPB) για να διευκολυνθεί το στάδιο της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης των δειγμάτων, Tris για να ρυθμιστεί το pH του δείγματος, SDS για να προσδοθεί αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο σε όλες τις πρωτείνες του δείγματος και έτσι να αναπτυχθούν ομοιόμορφα μέσα στην πηκτή υπό το καθεστώς της ηλεκτρικής τάσης που θα εφαρμοστεί, γλυκερόλη για να αυξηθεί το ειδικός βάρος του δείγματος και να φορτωθεί έτσι χωρίς απώλειες στην πηκτή και β-μερκαπτοαιθανόλη που είναι γνωστό αποδιατακτικό πρωτεϊνών ώστε να συμβάλλει στην ομοιόμορφη αποδιάταξη (unfolding) όλων των πρωτεϊνών του δείγματος μέσω της λύσης των δισουλφιδικών δεσμών, με αποτέλεσμα να αναπτυχθούν στην πηκτή με βάση το πραγματικό μοριακό τους βάρος ως γραμμικά μόρια.

Τα δείγματα μετά την προσθήκη του διαλύματος, μπορούσαν να αποθηκευτούν στους - 20 °C. Ωστόσο αποθήκευση για μεγάλο χρονικό διάστημα δεν συνιστάται διότι το σύνολο των πρωτεϊνών του δείγματος υφίσταται πρωτεολυτική αποικοδόμηση ακόμα και υπό αυτές τις συνθήκες. Συνήθως τα δείγματα εξετάζονταν την ίδια ή την επόμενη μέρα. Η εξέταση των δειγμάτων περιελάμβανε την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (βλ. Παράρτημα : παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμιδίου για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών) και τη φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή. Μαζί με τα δείγματα φορτώθηκαν και 8 μl πρότυπου δείγματος πρωτεϊνών με γνωστό μοριακό βάρος ώστε να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες σύγκρισης.

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε σε σταθερή ένταση ρεύματος 35 mA ανά πηκτή σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer : 6,05 gr Tris, 28,5 gr γλυκίνη, 0,95 gr Na-metabisulfite, 10 ml από διάλυμα 200 mM EDTA, 15 ml από διάλυμα

10 % SDS και προσαρμογή σε τελικό όγκο 1 L με ddH₂O). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολουθούσε χρώση των πηκτών σε διάλυμα κουμάσης, (Staining buffer : 2,5 gr Coomassie Brilliant Blue, 70 ml καθαρού οξικού οξέος, 400 ml μεθανόλης και προσθήκη ddH₂O έως τελικού όγκου 1 L) για 15 λεπτά υπό ελαφριά ανάδευση σε ειδικό σκεύος ενώ στη συνέχεια ακολούθησε ξέβαμμα των πηκτών σε διάλυμα απομάκρυνσης του μη ειδικού σήματος (Destaining buffer : 100 ml καθαρού οξικού οξέος, 200 ml μεθανόλης και προσθήκη ddH₂O έως τελικού όγκου 1 L) υπό ελαφριά ανάδευση σε ειδικό σκεύος για μια νύχτα. Κατά το ξέβαμμα, απομακρύνονταν τα μη ειδικά προσδεδεμένα μόρια της χρωστικής δίνοντας τελικά ευδιάκριτες ζώνες (ειδικό σήμα) μόνο όπου βρίσκονταν οι πρωτεΐνες του δείγματος.

Με βάση το αναμενόμενο μοριακό βάρος και τις ενδείξεις του πρότυπου πρωτεϊνικού δείγματος, ελέγχονταν οι πηκτές για την ύπαρξη κάποιας υπερέκφρασμής πρωτεΐνης στην περιοχή των 45 kDa (περίπτωση C₁, C₂) ή των 75 kDa (περίπτωση C₁₋₂) με βάση το πρότυπο δείγμα πρωτεϊνών (marker). Παράλληλα το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των δειγμάτων συγκρίνονταν με το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα. Αν η παρουσία ζωνών στην περιοχή των 45 ή 75 kDa στα δείγματα αντιστοίχως, συνοδευόταν από απουσία ζωνών στις αντίστοιχες περιοχές των δύο μαρτύρων (θετικού και αρνητικού) τότε οι ζώνες αυτές ήταν ειδικές και ελέγχονταν ως προς την έντασή τους για να εκτιμηθεί η ένταση της υπερέκφρασης. Τέλος ο θετικός μάρτυρας (καλλιέργεια μόνο με GST) επιβεβαίωνε την ορθή επαγωγή κατά τις συνθήκες του πειράματος, μέσω της ζώνης του GST στα 30 kDa του πρότυπου πρωτεϊνικού δείγματος η οποία απουσίαζε τόσο από τα δείγματα όσο και από τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του τελευταίου φυσιολογικά δεν έπρεπε να δίνει ειδικό σήμα για καμία από τις προαναφερόμενες πρωτεΐνες, παρά μόνο για το μη ειδικό σύνολο των πρωτεϊνών του βακτηριακού κυττάρου.

Η ύπαρξη πολλών πρωτεϊνών έκανε πολλές φορές δύσκολη την ασφαλή διάκριση των ειδικών ζωνών καθώς και την εκτίμηση της έντασης της υπερέκφρασης τους, καθώς άλλες μη ειδικές πρωτεΐνες με το ίδιο ή παραπλήσιο μοριακό βάρος ηλεκτροφορούσαν με την ίδια κινητική με τις ειδικές χιμαιρικές πρωτεΐνες και τελικά προκαλούσαν ενίσχυση του σήματος δίνοντας εσφαλμένα αποτελέσματα. Επιπλέον ήταν αδύνατος ο ποιοτικός προσδιορισμός των χιμαιρικών πρωτεϊνών δηλαδή η διαπίστωση της έκτασης της αποικοδόμησης τους μέσω της παρατήρησης των πρωτεϊνικών κλασμάτων που θα προέκυπταν από αυτήν.

Για τους παραπάνω λόγους, πρώτου επιλεγούν οι συνθήκες υπερέκφρασης που αναφέρονται στο παρόν κείμενο, τα αντίστοιχα δείγματα εκτός της ηλεκτροφόρησης σε πηκτική ακρυλαμίδιου, αναλύθηκαν και με ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλ. *Παράρτημα : Ανοσοαποτύπωση κατά Western*). Για την ανοσοαποτύπωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GST (anti-GST). Εφόσον η GST πρωτεΐνη έχει συντηχθεί με τα C₁, C₂, C₁₋₂ πολυπεπτίδια δίνοντας τις αντίστοιχες χιμαιρικές πρωτεΐνες, το anti-GST αντίσωμα, εφόσον αναγνωρίζει αποκλειστικά το GST, θα δώσει σήμα μόνο για τις χιμαιρικές πρωτεΐνες των δειγμάτων και το GST του θετικού μάρτυρα (ειδικό σήμα) και όχι για το σύνολο των πρωτεϊνών (μη ειδικό σήμα) του βακτηριακού κυττάρου, όπως η χρώση με κουμάση.

Έτσι επιβεβαιώνεται η υπερέκφραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών, γίνεται πιο αντικειμενική διαπίστωση της έντασης της υπερέκφρασης ανά συνθήκη και επιτυγχάνεται ο ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων, καθώς η πρωτεολυτική αποικοδόμηση αυτών θα δώσει ειδικό σήμα αφού τα πρωτεϊνικά κλάσματα (προϊόντα)

της αποικοδόμησης εξακολουθούν να είναι GST-χίμαιρες με μοριακό βάρος μικρότερο της αρχικής χίμαιρας από την οποία προέκυψαν.

Στάδιο IV : Υπερέκφραση και παραγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών σε μεγαλύτερη κλίμακα.

Εφόσον βρέθηκε η συνθήκη υπερέκφρασης για κάθε χιμαιρική πρωτεΐνη, κατέστη πλέον δυνατή η παραγωγή τους σε μεγαλύτερη κλίμακα. Από κατάλληλα BL-21 διαλύματα γλυκερόλης για κάθε χίμαιρα, επιμολύνθηκαν 10 ml αποστειρωμένου LBamp θρεπτικού μέσου με 2 % γλυκόζη. Επιπλέον επιμολύνθηκαν, από κατάλληλα διαλύματα γλυκερόλης και 10 ml αποστειρωμένων LBamp και LB με 2 % γλυκόζη που αντιστοιχούν στο θετικό και αρνητικό μάρτυρα του πειράματος αντίστοιχα, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα. Οι πέντε καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 °C, 200 rpm όλη νύχτα.

Την επόμενη μέρα ελήφθησαν 6 ml από κάθε νυχτερινή καλλιέργεια χιμαιρικής πρωτεΐνης και αραιώθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε 200 ml αποστειρωμένου LBamp με 2 % γλυκόζη (αραίωση 1 προς 33). Εφόσον υπάρχουν δύο συνθήκες υπερέκφρασης (μία για τις C₁ και C₂ χιμαιρικές πρωτεΐνες και μία άλλη για την C₁₋₂ χιμαιρική πρωτεΐνη) οι οποίες διαφέρουν ως προς την τελική συγκέντρωση του παράγοντα επαγωγής (IPTG), έπρεπε να επωαστούν διαφορετικές καλλιέργειες τόσο για το θετικό όσο και για τον αρνητικό μάρτυρα και ως προς τις δύο συνθήκες.

Δύο δόσεις των 300 ml από τη νυχτερινή καλλιέργεια τόσο του θετικού όσο και του αρνητικού μάρτυρα αραιώθηκαν, ανά περίπτωση και υπό ασηπτικές συνθήκες σε δύο φλάσκες που περιείχαν 10 ml αποστειρωμένου LBamp και LB αντίστοιχα, ενώ παράλληλα προστέθηκε γλυκόζη σε τελική συγκέντρωση 2 %. Στη συνέχεια μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση κάθε μιας από τις επτά καλλιέργειες που προέκυψαν (Πίνακας 6) και εφόσον επιβεβαιώθηκε ότι αυτή προσεγγίζει την τιμή 0,15 για κάθε καλλιέργεια, τότε ακολούθησε επώαση, προσθήκη του παράγοντα επαγωγής και επαγωγή σύμφωνα με τη συνθήκη υπερέκφρασης της κάθε χιμαιρικής πρωτεΐνης (Πίνακας 6).

Για να βελτιστοποιηθεί η απόδοση του σταδίου της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων που ακολούθησε, έπρεπε να προηγηθεί ένα στάδιο λύσης των κυττάρων της βακτηριακής καλλιέργειας. Συνήθως υπάρχουν δύο επιλογές για να λυθούν τα βακτηριακά κύτταρα, είτε με υπερήχους (Sonication), είτε ασκώντας μηχανική πίεση (French Press). Και οι δύο μέθοδοι δοκιμάστηκαν και βρέθηκε ότι η δεύτερη μέθοδος ήταν πιο αποδοτική. Επιπροσθέτως λόγω της πιθανότητας η εφαρμογή των υπέρηχων να κατακερματίζει τις χιμαιρικές πρωτεΐνες εξαιτίας μοριακού συντονισμού τους, επιλέχθηκε τελικά η μηχανική λύση των καλλιεργειών με τη χρήση της συσκευής French Press.

Η μέθοδος στηρίζεται στην τοποθέτηση της υγρής βακτηριακής καλλιέργειας μέσα σε κατάλληλη οβίδα, η οποία ασφαρίζει με έμβολο. Η ασφαλισμένη οβίδα τοποθετήθηκε κατακόρυφα στη συσκευή με το έμβολο στο πάνω μέρος και επιλέχθηκε η πίεση που θα εφαρμοστεί. Ακολούθησε ολίσθηση του εμβόλου μέσα στην οβίδα, πιέζοντας έτσι την υγρή καλλιέργεια μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή πίεση. Το άνοιγμα μιας βαλβίδας που υπάρχει στο κάτω μέρος της οβίδας επέτρεψε την συλλογή του δείγματος. Η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της λύσης.

Πίνακας 6 : Εύρος των δειγμάτων υπερέκφρασης και τελική συνθήκη αυτής

Είδος καλλιέργειας*	Συνθήκες επώασης	Παράγοντας
200 ml LBamp καλλιέργειών έναντι των χιμαιρικών C1 και C2 πρωτεϊνών	25 Βαθμοί Κελσίου 0,7 OD	Θερμοκρασία επώασης Οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας
10 ml LBamp καλλιέργειας έναντι του θετικού μάρτυρα των C1 και C2 χιμαιρων	0,2 mM IPTG (τελική συγκέντρωση)	Παράγοντας επαγωγής
10 ml LB καλλιέργειας έναντι του αρνητικού μάρτυρα των C1 και C2 χιμαιρων	2 ώρες	Χρόνος επώασης
200 ml LBamp καλλιέργειών έναντι της χιμαιρικής C1-2 πρωτεΐνης	25 βαθμοί Κελσίου 0,7 OD	Θερμοκρασία επώασης Οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας
10 ml LBamp καλλιέργειας έναντι του θετικού μάρτυρα της C1-2 χιμαιρας	0,7 mM IPTG (τελική συγκέντρωση)	Παράγοντας επαγωγής
10 ml LB καλλιέργειας έναντι του αρνητικού μάρτυρα της C1-2 χιμαιρας	2 ώρες	Χρόνος επώασης

* Όλα τα θρεπτικά μέσα περιείχαν 2 % β / ο τελική συγκέντρωση γλυκόζης.

Μετά το τέλος της επαγωγής, οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στις 5.000 στροφές το λεπτό (rpm) για πέντε λεπτά, στους 4 °C. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο διάλυμα (θρεπτικό μέσο LBamp ή LB) και το βακτηριακό ίζημα που σχηματίστηκε, επαναδιαλύθηκε σε 10 ml διαλύματος λύσης (French Press Lysis Buffer-FPLB : 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM PMSF). Η προσθήκη του Tris ρυθμίζει το pH του διαλύματος όπως αναφέρθηκε, τα άλατα Na και Mg μέσω της αύξησης της ωσμωτικής πίεσης θα συμβάλλουν στην κυτταρική λύση, η διθειοθρεϊτόλη (DTT) είναι γνωστός αντιοξειδωτικός παράγοντας των πρωτεϊνών και προστατεύει την ολική πρωτεΐνη του δείγματος από την οξειδωση ενώ ο PMSF παράγοντας είναι γενικός αναστολέας πρωτεασών και συνέβαλε στην προστασία των δειγμάτων από την πρωτεόλυση.

Η επαναδιάλυση όλων των βακτηριακών καλλιέργειών μετά την φυγοκέντρωσή τους, σε 10 ml FPL διαλύματος οδήγησε στη συμπύκνωση των χιμαιρικών καλλιέργειών κατά 20 φορές (αρχικά 200 ml LBamp, μετά την επαναδιάλυση 10 ml FPLB) ενώ η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης των μαρτύρων δεν άλλαξε διότι επαναδιαλύθηκαν σε ίδιο όγκο (10 ml). Η οβίδα έχει προψυχθεί στους 4 °C καθόλη τη διάρκεια της προηγούμενης νύχτας, για να αποφευχθούν όσο το δυνατόν οι απώλειες σε πρωτεΐνη λόγω πρωτεολυτικής αποικοδόμησης. Μετά την επαναδιάλυση των ιζημάτων σε FPL διάλυμα, τα επαναδιαλυθέντα δείγματα προστέθηκαν διαδοχικά στην προψυγμένη οβίδα και εφαρμόστηκε πίεση 600 psi για δύο φορές.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε καθαρό φυγοκεντρικό σωλήνα των 40 ml και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g και στους 4 °C για 15 λεπτά για να καταβυθιστούν τα βαριά πρωτεϊνικά θραύσματα των κυτταρικών μεμβρανών και να μείνουν στο υπερκείμενο διάλυμα μόνο υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους, όπως οι χιμαιρες του πειράματος. Μαζί με τα πρωτεϊνικά θραύσματα εξαιτίας της

βακτηριακής λύσης ενδέχεται να καταβυθιστούν και έγκλειστα πρωτεϊνικά σωμάτια, γνωστά ως inclusion bodies.

Ο σχηματισμός σωματιδίων αυτού του είδους είναι σύνηθες φαινόμενο ειδικά σε πειράματα έντονης υπερέκφρασης ή τοξικών για το βακτηριακό κύτταρο, υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών. Το βακτηριακό κύτταρο είτε διότι δεν αναγνωρίζει την ξένη υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη που το ίδιο αναγκάζεται να παράγει, είτε λόγω της τοξικότητας αυτής, προσπαθεί να την απομονώσει συσσωματώνοντας πολλά μόρια αυτής μαζί τα οποία περιβάλλονται από βακτηριακή μεμβράνη. Ο σχηματισμός αυτός που παραμένει στο κυτόπλασμα του βακτηρίου, έχει μεγάλο μοριακό βάρος και χαρακτηρίζεται από υψηλή λιποφιλικότητα γι' αυτό και καταβυθίζεται έντονα σε αυτό το στάδιο.

Μετά την φυγοκέντριση και πριν αποθηκευτεί το υπερκείμενο των δειγμάτων στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ελήφθησαν 80 μl δείγματος για ηλεκτροφόρηση. Επιπλέον το ίζημα μετά τη φυγοκέντριση, επαναδιαλύθηκε σε όγκο ίσο με του υπερκείμενου διαλύματος και ελήφθησαν 80 μl δείγματος από αυτό για να ελεγχθεί τυχόν σχηματισμός έγκλειστων πρωτεϊνικών σωμάτων (inclusion bodies). Τα 80 μl δείγματος, αραιώθηκαν μια φορά με την προσθήκη άλλων 80 μl διαλύματος (2x loading buffer) και ακολούθησε βρασμός για 5 λεπτά, έτσι ώστε να αποδιαταχθούν πλήρως όλες οι πρωτεΐνες και να διαχωριστούν κατά την ηλεκτροφόρηση σύμφωνα με το πραγματικό μοριακό τους βάρος. Μετά την αποδιάταξη τους, τα δείγματα φορτώθηκαν σε πηκτή πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου και ηλεκτροφορήθηκαν σε συνεχή ένταση ρεύματος (35 mA ανα πηκτή) για περίπου 1,5 με 2 ώρες. Ακολούθησε χρώση των πηκτών σε διάλυμα κουμάσης και απομάκρυνση της μη ειδικά προσδεδεμένης χρωστικής σε διάλυμα απομάκρυνσης του μη ειδικού σήματος. Σε όλες τις περιπτώσεις δεν διαπιστώθηκε σχηματισμός έγκλειστων πρωτεϊνικών σωματιδίων σε κανένα από τα επαναδιαλυμένα ιζήματα που εξετάστηκαν.

Στάδιο V : Απομόνωση των χιμαιρικών πρωτεϊνών από τον φορέα και παραλαβή των αντιγόνων σε καθαρή μορφή από αυτές.

Μετά τη διαπίστωση με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης και επιβεβαίωση με ανοσοαποτύπωση κατά Western με μονοκλωνικό GST αντίσωμα της υπερέκφρασης των GST χιμαιρικών C₁, C₂ και C₁₋₂ πρωτεϊνών από κύτταρα του στελέχους BL-21 του *E. coli*, το επόμενο βήμα ήταν ο καθαρισμός των χιμαιρικών πρωτεϊνών από το σύνολο των υπολοίπων πρωτεϊνών του κυττάρου. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο (Στάδιο II α), η σύντηξη των κλωνοποιημένων C₁, C₂ και C₁₋₂ ενθεμάτων με την αλληλουχία του GST θα δώσει χιμαιρικές GST-πρωτεΐνες.

Η σύντηξη με GST αποσκοπεί στο να γίνει δυνατός ο καθαρισμός των χιμαιρικών πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας (Affinity Chromatography) από το σύνολο της ολικής βακτηριακής πρωτεΐνης. Η χρωματογραφία συγγένειας έγινε με τη χρήση σφαιριδίων σεφαρόζης 4B με προσδεδεμένη γλουταθειόνη (Glutathione Sepharose 4B beads, Amersham Biosciences) τα οποία έλκουν και προσδέουν το GST (*Pharmacia GST Gene Fusion Guide*). Η πρόσδεση της γλουταθειόνης πάνω στα σφαιρίδια της σεφαρόζης έγινε με έποξυ-συγκόλληση της οξυρανικής ομάδας της γλουταθειόνης στα σφαιρίδια της 4B σεφαρόζης, ενώ η αναγνώριση της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) επιτυγχάνεται μέσω της συμπληρωματικότητας της δομής της προσδεδεμένης γλουταθειόνης πάνω στο ενεργό κέντρο του GST (*Pharmacia GST Gene Fusion Guide*). Αξιοσημείωτο είναι ότι η πρόσδεση του GST πάνω στη γλουταθειόνη, δεν επηρεάζει την αντιγονική ιδιότητα των χιμαιρικών πρωτεϊνών.

Μετά την λύση της βακτηριακής καλλιέργειας σύμφωνα με την μέθοδο French Press και τη φυγοκέντρωση που ακολούθησε απομακρύνθηκαν τα μεγαλομοριακά πρωτεϊνικά υπολείμματα των βακτηριακών μεμβρανών και έτσι 9 ml από το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης μεταφέρθηκαν σε ένα καθαρό σωλήνα Falcon των 15 ml. Σε αυτά προστέθηκε 1 ml σφαιριδίων GST και το μείγμα αφήθηκε για μια ώρα σε ειδική συσκευή με ανάδευση χαμηλής ταχύτητας σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της μιας ώρας το μείγμα μεταφέρθηκε σε ειδική κολώνα και εφαρμόστηκαν πάνω από 20 πλυσίματα με 10 ml καθαρού διαλύματος FPL.

Την προσθήκη των 10 ml του διαλύματος FPL κάθε φορά ακολουθούσε ισχυρή ανάδευση και στη συνέχεια ανοίγονταν η ειδική στρόφιγγα στον πάτο της κολώνας για να απελευθερωθεί το περιεχόμενό της και να παραμείνει 1 ml μέσα σε αυτήν (σφαιρίδια σεφαρόζης). Το φίλτρο της κολώνας δεν επιτρέπει τη διέλευση των σφαιριδίων σεφαρόζης (διαμέτρου 45-165 μm), ενώ η προσδεδεμένη σε αυτή γλουταθειόνη έχει ήδη προσδέσει τις χμιαϊκές GST-πρωτεΐνες του δείγματος λόγω χημικής συγγένειας. Έτσι η επαναλαμβανόμενη διέλευση του διαλύματος FPL μέσα από τα σφαιρίδια σεφαρόζης και η απομάκρυνση από την κολώνα στη συνέχεια, παρέσυρε το σύνολο των μη ειδικών πρωτεϊνών του δείγματος, αφήνοντας τελικά μόνο τα σφαιρίδια της γλουταθειόνης 4B σεφαρόζης με προσδεδεμένα πάνω τους τα μόρια των GST χμιαϊκών πρωτεϊνών.

Μετά από πέντε πλυσίματα της στήλης (διελεύσεις από 10 ml του FPL διαλύματος μέσα από αυτήν) λαμβάνονταν 80 μl δείγματος από το εκχυλισμένο διάλυμα, τα οποία αραιώνονται μια φορά με προσθήκη 80 μl - 2x διαλύματος φορτώματος και στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται μαζί με 80 μl δείγματος σφαιριδίων μέσα από τη στήλη σε πηκτική πολυακρυλαμίδης με σκοπό να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα της απομάκρυνσης των μη ειδικών πρωτεϊνών από το δείγμα. Επιτυχής απομάκρυνση σημαίνει ότι από το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του δείγματος έκλουσης απουσιάζουν οι ειδικές ζώνες των ενθεμάτων ενώ το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των δειγμάτων σφαιριδίων από τη στήλη αποτελείται από μια μόνο ειδική ζώνη (στα 30 kDa, 45 kDa ή 75 kDa ανάλογα αν το δείγμα είναι μόνο GST ή χμιαϊκή C₁ / C₂ ή C₁₋₂ πρωτεΐνη) ενώ από αυτό απουσιάζουν όλες οι μη ειδικές ζώνες των υπολοίπων πρωτεϊνών του βακτηριακού κυττάρου.

Το τελευταίο στάδιο προκειμένου να απομονωθούν σε καθαρή μορφή τα C₁, C₂ και C₁₋₂ αντιγόνα είναι η αποκοπή του GST από τις απομονωμένες C₁, C₂ και C₁₋₂ χμιαϊκές πρωτεΐνες. Στο 1 ml των σφαιριδίων GST που περιέχονται στην ειδική κολώνα, προστέθηκε επιπλέον 1,5 ml FPL διαλύματος. Στα 2,5 ml που προέκυψαν, προστέθηκαν 10 μl του παράγοντα Xa από απόθεμα συγκέντρωσης ενζύμου 1 ng / μl (τελική συγκέντρωση παράγοντα 10 ng και αναλογία ενζύμου / υποστρώματος 1 : 200). Στη συνέχεια έγινε ελαφριά ανάδευση και η αντίδραση αφήθηκε στους 21 °C για μια νύχτα (16 ώρες). Την επόμενη μέρα έγινε δειγματοληψία 80 μl τόσο από το εκχύλισμα της κολώνας (κανονικά πρέπει να περιέχει μόνο το αντίστοιχο αντιγόνο του δείγματος και καμία άλλη πρωτεΐνη) όσο και από το περιεχόμενο αυτής (GST σφαιρίδια που περιέχουν μόνο το προσδεδεμένο GST) για να διαπιστωθεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης, η απόδοση της αντίδρασης αποκοπής των αντιγόνων.

-- B. ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΥΠΟΥ RAPD--

3.2 Περιγραφή του γενετικού υλικού

Κατά την μοριακή γενετική ανάλυση στο γένος *Phaseolus* χρησιμοποιήθηκαν δέκα (10) τοπικές ποικιλίες του είδους *Phaseolus vulgaris* και μια (1) του είδους *Phaseolus coccineus*. Ειδικότερα πρόκειται για δεκατέσσερις (14) οικογένειες της τοπικής ποικιλίας της Ροδόπης και τυχαίο δείγμα σπόρων των τοπικών ποικιλιών της Ξάνθης, του Βελεστίνου, της Βυζίτσας (Καθιστά, Καφετί, Ασπρόμαυρα και Μπέζ), της Καστοριάς (Χονδρά), των Σβανάδων και των Τσολακίων Μαγνησίας που ανήκουν στο αυτογονιμοποιούμενο είδος *Phaseolus vulgaris*. Οι οικογένειες της Ροδόπης ήταν απόγονοι από το σπόρο γενοτύπων που τη προηγούμενη του πειράματος χρονιά είχε σπαρεί στην ομώνυμη περιοχή. Ως μάρτυρες τόσο για την φυλογενετική ανάλυση αυτών των πληθυσμών όσο και για την εκτίμηση της αγρονομικής συμπεριφοράς τους σε πειράματα αγρού, χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικές ποικιλίες κοινού φασολιού *Magirus* και *Ζαργάνα Καβάλας*.

Οι οκτώ (8) οικογένειες των σταυρογονιμοποιούμενων φασολιών τύπου γίγαντες προέρχονται γεωγραφικά από την περιοχή των Γρεβενών και ήταν απόγονοι HS από φυτά που είχαν σπαρεί την προηγούμενη του πειράματος, χρονιά στο αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ως μάρτυρας αυτού του πληθυσμού χρησιμοποιήθηκε η εμπορική ποικιλία *DiSpragna*. Στην εικόνα 3.1 συνοψίζονται οι έντεκα πληθυσμοί του γένους *Phaseolus* καθώς και η γεωγραφική προέλευση τους.

3.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Το γενωμικό DNA αναφορικά με τους πληθυσμούς της Ξάνθης, του Βελεστίνου, της Βυζίτσας (Καθιστά, Καφετί, Ασπρόμαυρα και Μπέζ), της Καστοριάς (Χονδρά), των Σβανάδων και των Τσολακίων Μαγνησίας απομονώθηκε από μείγμα ιστού νεαρών, υγιών φύλλων, συνολικού βάρους 0,3 γρ από δεκαπέντε (15) γενότυπους αντιπροσωπευτικούς των εν λόγω πληθυσμών, σύμφωνα με την CTAB μέθοδο (βλ. Παράρτημα : *Απομόνωση ολικού DNA σύμφωνα με την CTAB μέθοδο*). Με την ίδια μέθοδο απομονώθηκε DNA και από μείγμα ιστού δεκαπέντε (15) γενοτύπων από κάθε μια εκ των δεκατεσσάρων (14) οικογενειών που αποτελούν τον πληθυσμό της Ροδόπης.

Με την μέθοδο απομόνωσης γενωμικού DNA της εταιρίας *Qiagen* (*Qiagen DNA Extraction Kit*) απομονώθηκε γενωμικό DNA από μείγμα ιστού υγιών, νεαρών φύλλων συνολικού βάρους 0,3 gr από δεκαπέντε (15) γενότυπους κάθε μιας εκ των οκτώ (8) οικογενειών που αποτελούν τον πληθυσμό των φασολιών τύπου γίγαντες των Γρεβενών. Το απομονωμένο DNA σε όλες τις περιπτώσεις διαλύθηκε σε 200 μl TE διαλύματος (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂ EDTA, pH 8.0).

3.2.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός DNA

Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε με φασματοφωτόμετρο στη περιοχή του υπεριώδους / ορατού με απορρόφηση των δειγμάτων στα 260 nm. Ο ποιοτικός προσδιορισμών των δειγμάτων έγινε με απορρόφηση στα 280 nm για να εκτιμηθεί η



Εικόνα 3.1 Δορυφορική εικόνα της Ελλάδας. Απεικονίζονται οι περιοχές προέλευσης των έντεκα πληθυσμών του γένους *Phaseolus* που συμπεριλήφθησαν στην φυλογενετική ανάλυση του πειράματος.

παρουσία πρωτεΐνων στο δείγμα με βάση το λόγο 260 / 280 nm. Ο μέσος όρος της συγκέντρωσης του DNA των δειγμάτων, υπολογίστηκε στα 100 ng / μl. Οι παραπάνω εκτιμήσεις, επιβεβαιώθηκαν και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,8 % με πρότυπο δείγμα DNA ως μάρτυρα.

3.2.3 Ανάλυση με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης κατά RAPD

Σε κάθε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, χρησιμοποιήθηκαν 150 ng γενωμικού DNA ως μήτρα, 2.5 μl 10x PCR buffer (Minotech), 0.625 μM από 10-νουκλεοτιδικό RAPD εκκινητή (Operon Tech.), 2 mM MgCl₂, 150 μM dNTPs και 1.5U Taq DNA πολυμεράσης (Minotech), ενώ η αντίδραση ρυθμίστηκε σε 25 μl τελικό όγκο με αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό (ddH₂O). Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων και οι συνθήκες της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης κατά RAPD συνοψίζονται στους Πίνακες 7 και 8.

Πίνακας 7 : Συστατικά της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης για την φυλογενετική ανάλυση σύμφωνα με το RAPD πρότυπο

150 ng γενωμικού DNA
2,5 µl από 10x διάλυμα αντίδρασης PCR (Minotech)
10 pmoles (0,625 µM) από τον 10-νουκλεοτιδικό RAPD εκκινητή (Operon Tech.)
2 mM από MgCl.
150 µM από dNTPs
1,5 unit από Taq Πολυμεράση
Προσαρμογή σε τελικό όγκο 25 µl με ddH ₂ O

Πίνακας 8 : Συνθήκες του προγράμματος Αντίδρασης Αλυσιδωτής Πολυμεράσης κατά RAPD

Στάδιο	Συνθήκες	Κύκλοι
Προ-αποδιάταξη των αλυσίδων (Hot Start)	94 βαθμοί Κελσίου, 8 λεπτά	-
Αποδιάταξη των αλυσίδων	94 βαθμοί Κελσίου, 1 λεπτό	-
Επικόλληση των εκκινητών	35 βαθμοί Κελσίου, 1 λεπτό	35
Σύνθεση και επιμήκυνση των νέων αλυσίδων	72 βαθμοί Κελσίου, 1,5 λεπτό	-
Τελική επιμήκυνση των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων	72 βαθμοί Κελσίου, 10 λεπτά	-
Αποθήκευση των προϊόντων της αντίδρασης	4 βαθμοί Κελσίου	-

3.2.4 Ανάλυση των αποτελεσμάτων και κατασκευή των δενδρογράμμων φυλογενετικών σχέσεων

Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για κάθε γενότυπο, αναμιχθηκαν με 2 µl διαλύματος φόρτωσης και ηλεκτροφορήθηκαν για 1 ώρα σε πηκτή αγαρόζης (1 %) στην οποία είχε προσθεθεί βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφήθηκε μετά από καταγραφή των πολυμορφισμών των δειγμάτων και υπολογισμό του μοριακού τους βάρους με τη χρήση πρότυπου δείγματος DNA για μάρτυρα (100 bp PCR ladder).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την χρήση του προγράμματος *NTSYS pc v2.02i* σε Windows 98 SE, μετά την κωδικοποίηση των μοριακών δεδομένων. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία ζώνης αντιπροσωπεύτηκε με (1) και η απουσία με (0). Στη συνέχεια ο υπολογισμός της γενετικής ομοιότητας των δειγμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο του JACCARD $S_{ij} = a/(a+b+c)$ (κατά *Sneath και Sokal, 1973*) και DICE $S_{ij} = 2a/(2a+b+c)$ (κατά *Nei και Li, 1979*) όπου :

- S_{ij} : η γενετική ομοιότητα των δειγμάτων *i* και *j*.
- *a* : το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα *i* και στο δείγμα *j*.
- *b* : το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα *i* και στο δείγμα *j*.

- c : το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα j και στο δείγμα i.

Με βάση τις μήτρες γενετικής ομοιότητας, κατασκευάστηκαν δενδρογράμματα φυλογενετικής ανάλυσης με τη μέθοδο NEIBORJOIN και με τη μέθοδο UPGMA. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης (MxCorr) της μήτρας με τα αρχικά δεδομένα για να επιλεγεί η μέθοδος με το μεγαλύτερο βαθμό συσχέτισης. Τελικά επιλέχθηκε η μέθοδος JACCARD-UPGMA ως η καταλληλότερη και η πιο αντιπροσωπευτική για τα δεδομένα αφού ο συντελεστής προσαρμογής της (MxCorr) ήταν της τάξεως του 0,9 (90 % βαθμός συσχέτισης).

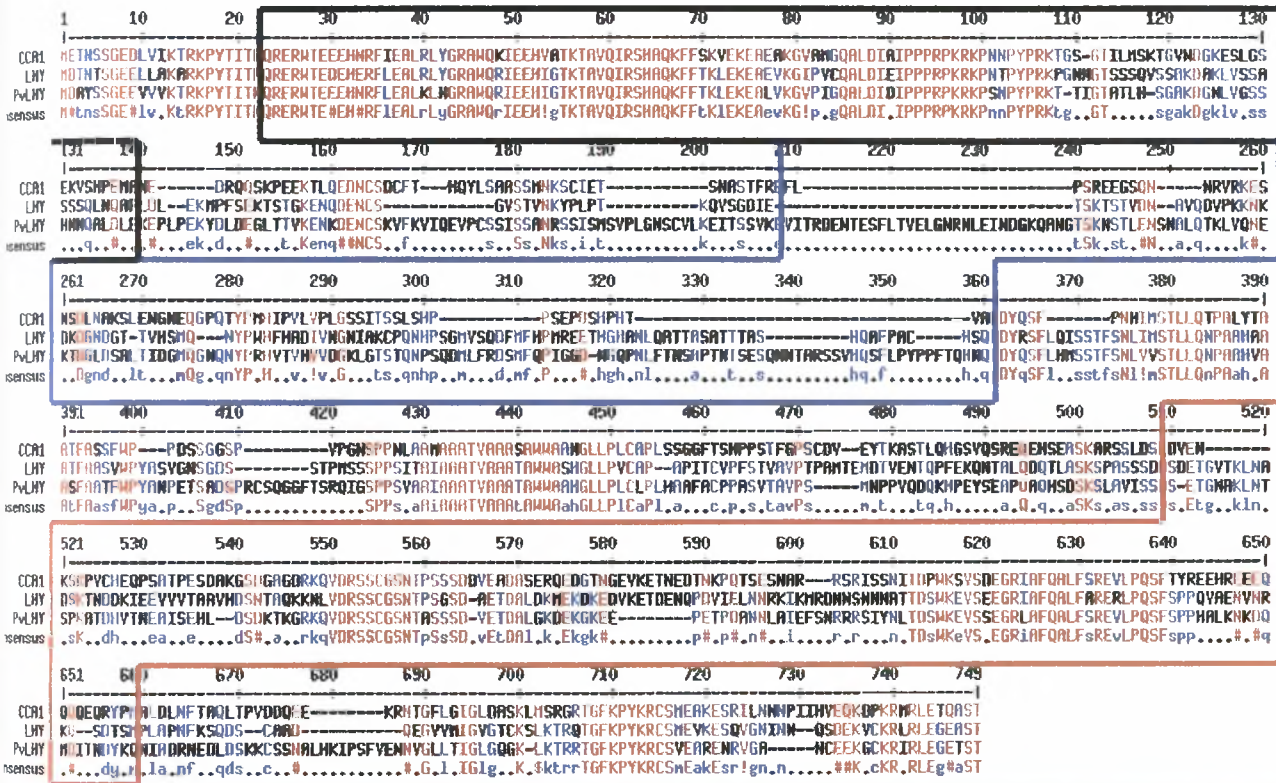
3.2.5 Αγρονομική συμπεριφορά

Το προηγούμενο γενετικό υλικό αξιολογήθηκε παράλληλα ως προς την αγρονομική συμπεριφορά του από τον κ. Κώστα Καλλιμόπουλο στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διατριβής του που εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης φυτών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα δεδομένα που προέκυψαν, χρησιμοποιήθηκαν ως μια πρώτη προσέγγιση σύγκρισης των μοριακών δεδομένων με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από την αξιολόγηση στον αγρό.

IV. Αποτελέσματα

4.1.1 Περιγραφή της PvLHY πρωτεΐνης και ομοιότητα με τις LHY/CCA1 πρωτεΐνες

Όπως αναφέρθηκε, η PvLHY πρωτεΐνη ανήκει στη MYB οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, η οποία αριθμεί μέλη όχι μόνο στο Βασίλειο των φυτών αλλά και σε ζωϊκούς οργανισμούς. Συνήθως το χαρακτηριστικό των MYB μεταγραφικών παραγόντων των φυτών είναι η ύπαρξη δύο MYB μοτίβων στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Τα δύο MYB μοτίβα καλούνται R2 και R3 και συμμετέχουν στην αναγνώριση και πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα σε συγκεκριμένο νουκλεοτιδικό πυρήνα.



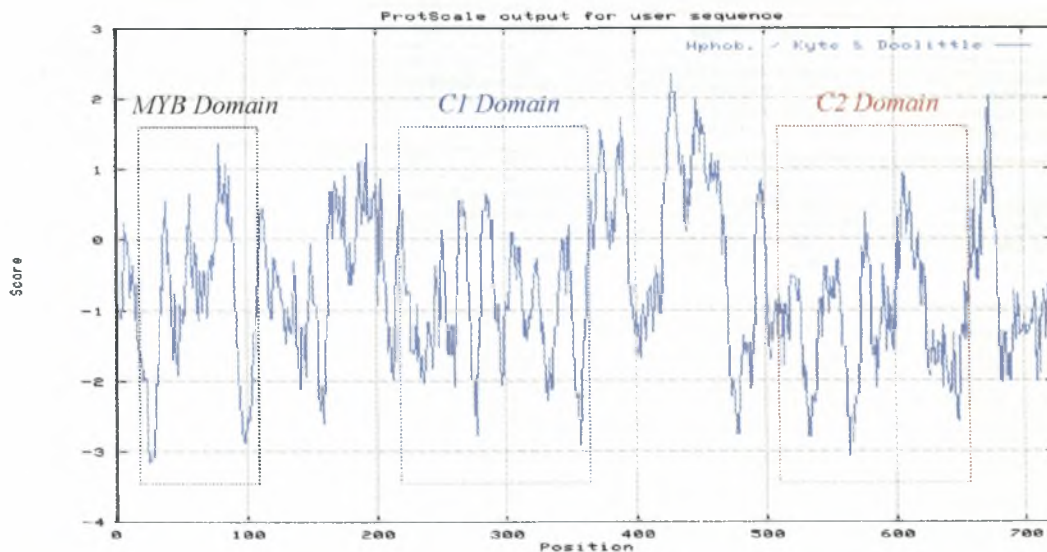
Σχήμα 4.1 Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών PvLHY, LHY και CCA1 με το πρόγραμμα Multalign. Παρατίθεται ολόκληρη η αλληλουχία των τριών πρωτεϊνών καθώς και το αποτέλεσμα της σύγκρισης αυτών ανα αμινοξύ (consensus). Τα κόκκινα γράμματα αντιπροσωπεύουν ταύτιση των αντίστοιχων αμινοξέων και στις τρεις πρωτεΐνες ενώ τα μπλε γράμματα αντιπροσωπεύουν ταύτιση των αντίστοιχων αμινοξέων στις δύο από τις τρεις πρωτεΐνες. Τα τρία πλαίσια φανερώνουν σημαντικές περιοχές της PvLHY. Το μαύρο πλαίσιο εσωκλείει το MYB μοτίβο της PvLHY πρωτεΐνης, ενώ το μπλέ και το κόκκινο πλαίσιο αντίστοιχα εσωκλείουν την C₁ και C₂ υδροφίλη περιοχή που κλωνοποιήθηκαν. Η C₁₋₂ περιοχή αποτελείται από το μπλέ και κόκκινο πλαίσιο καθώς και από την ενδιάμεση αυτών αλληλουχία αμινοξέων.

Εντούτοις η PvLHY MYB πρωτεΐνη στο είδος *Phaseolus vulgaris*, όπως και η ορθόλογη της LHY αλλά και η CCA1 στο *Arabidopsis thaliana*, αποτελούν τρία αλληλόμορφα μέλη της MYB οικογένειας καθότι αριθμούν μόνο ένα MYB μοτίβο, το οποίο εδρεύει στο αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών. Ειδικότερα για την PvLHY πρωτεΐνη, η MYB περιοχή έχει μήκος 115 αμινοξέα και εκτείνεται από την Arg²⁴ έως το Glu¹³⁹. Τα MYB μοτίβα είναι υψηλά συντηρημένες περιοχές ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας και αυτό διαπιστώθηκε και κατά τη σύγκριση των PvLHY, LHY και CCA1 πρωτεϊνών. Έτσι η MYB περιοχή της PvLHY πρωτεΐνης μοιράζεται ένα βαθμό ταύτισης (Identity degree) της τάξεως του 71 % με το αντίστοιχο MYB μοτίβο της ορθόλογης LHY (Σχ. 4.1).

Ο βαθμός ομοιότητας ανάμεσα στη συνολική αλληλουχία της PνLHY πρωτεΐνης και την αντίστοιχη αλληλουχία της LHY πρωτεΐνης ανέρχεται σε ποσοστό της τάξεως του 58,7 % ενώ το ίδιο μέγεθος για την σύγκριση της PνLHY πλήρους αλληλουχίας αμινοξέων και της αντίστοιχης αλληλουχίας της CCA1 πρωτεΐνης στο είδος *Arabidopsis thaliana* είναι της τάξεως του 49,6 %. Ο βαθμός ταύτισης των πρωτεϊνών PνLHY και LHY είναι της τάξεως του 43,6 % ενώ τέλος ο βαθμός ταύτισης των πρωτεϊνών PνLHY και CCA1 είναι της τάξεως του 35,1 % (Σχ. 4.1). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η PνLHY πρωτεΐνη όχι μόνο ομοιάζει αλλά και ταυτίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στο σύνολο της με την LHY πρωτεΐνη του είδους *Arabidopsis thaliana* σε σχέση με τη πρωτεΐνη CCA1 συνεπώς ορθά χαρακτηρίστηκε ως ορθόλογος μεταγραφικός παράγοντας του LHY στο είδος *Phaseolus vulgaris* (Kaldis et al., 2003).

4.1.2 Έλεγχος υδροπάθειας της πρωτεΐνης PνLHY

Από τον έλεγχο υδροπάθειας της πρωτεΐνης PνLHY κατά Kyte και Doolittle επιλέχθηκαν δύο υψηλά υδροφιλικές περιοχές, οι C₁ και C₂. Και οι δύο αλληλουχίες έχουν μήκος 450 ζευγών νουκλεοτιδικών βάσεων και κωδικοποιούν δύο πολυπεπτίδια μήκους 150 αμινοξέων και μοριακού βάρους 15 kDa (Σχ. 4.2). Το C₁ πολυπεπτίδιο εκτείνεται από την Arg²¹⁰ έως την Tyr³⁶⁰ ενώ το C₂ πολυπεπτίδιο εκτείνεται από την Asp⁵¹⁰ έως την Lys⁶⁶⁰. Ενδιάμεσα των C₁ και C₂ περιοχών της PνLHY πρωτεΐνης, υπάρχει μια υδρόφοβη αλληλουχία μήκους 148 αμινοξέων και μοριακού βάρους 15 kDa που εκτείνεται από την Glu³⁶¹ έως την Leu⁵³⁹ (Σχ. 4.3).



Σχήμα 4.2 Ανάλυση υδροφοβικότητας κατά Kyte και Doolittle. Ο κατακόρυφος άξονας δίνει την τιμή της υδροφοβικότητας ενώ ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει με βασική μονάδα μέτρησης τα 100 αμινοξέα, ολόκληρη την αλληλουχία αμινοξέων της PνLHY. Όσο μεγαλύτερη αρνητική τιμή έχει μια περιοχή τόσο μεγαλύτερη υδροφιλικότητα την χαρακτηρίζει ενώ όσο μεγαλύτερη θετική τιμή έχει μια περιοχή τόσο περισσότερο υδρόφοβη είναι. Περιοχές που χαρακτηρίζονται από τιμές πλησίον του μηδενός είναι αμφιπολικές αλληλουχίες της πρωτεΐνης. Το μαύρο διακεκομμένο πλαίσιο εσωκλείει το MYB μοτίβο της πρωτεΐνης ενώ το μπλέ και το κόκκινο διακεκομμένο πλαίσιο εσωκλείουν αντίστοιχα τις C₁ και C₂ υδρόφιλες περιοχές που κλωνοποιήθηκαν.

Σύμφωνα με τον έλεγχο υδροφοβικότητας, το MYB μοτίβο αντιπροσωπεύει μια έντονα υδρόφιλη περιοχή της PvLHY πρωτεΐνης (Σχ. 4.2). Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς έχει ήδη αναφερθεί ότι το MYB μοτίβο είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση και πρόσδεση σε συγκεκριμένο νουκλεοτιδικό πυρήνα, συνεπώς πρέπει να είναι εκτεθειμένο στο εξωτερικό της πρωτεΐνης. Ωστόσο όπως φανέρωσε η σύγκριση των αλληλουχιών των τριών πρωτεϊνών (Σχ. 4.1), το MYB μοτίβο είναι μια ισχυρά συντηρημένη περιοχή συνεπώς αν επιλεγόταν ως αντιγόνο για την παρασκευή αντισωμάτων, τα τελευταία δεν θα ήταν εξειδικευμένα ως προς την PvLHY πρωτεΐνη ενώ ανάμεσα στο φάσμα αναγνώρισης τους μπορεί να συμπεριλαμβάνονταν ακόμα και μέλη της MYB οικογένειας των θηλαστικών.

MDAYSSGEEVVVKTRKPYTITKQREERWTEEEHNRFLKALHGRAWQRIEEHIGTKTAVQ	60
IRSHAQKFFFTKLEKEALVKGVPIGOALDIDIPPPRPKRKPSNPYPRKTTIGTATLHSGAK	120
DGNLVGSSSHNNQALDLEKEPLPEKYDDLDEGLTTVKENKDNENCSKVFKVIQEVPCSSISSA	180
NRSSISMSVPLGNSCVLKEITSSVKEVITRDENTESFLTVELGNRNLEINDGKQANGTSK	240
NSTLENSNALQTKLVQNEKTDGLDSALITDGMQGNQNYPRHVTVHVVDGKLGSTQNPSSQ	300
DMLFRDSMFQPIGGDNGQPNLFTNSAPTNTSESQNNRTARSSVHQSFLLPYPPFTQHNQDDY	360
QSFLHMSSTFVSNLVVSTLLQNPAAHVAAASFAATFWPYANPETSADSPRCSQGGFTSRQIG	420
SPPSVAAIAAAATVAAAATAWAAHGLLPLCLPLHAAAFACPPASVTAVPSMNPVQDQKHPE	480
YSEAPQAQHSDSKSLAVISSDSETGNAKLNTSPKATDHVTNEAISEHLDSDKTKGRKQVD	540
RSSCGSNTASSSDVETDALGKDEKGEKEPFTPDANNLAIEFNSRRRSIYNLTDSWKEVSS	600
EGRLAFQALFSREVLVQSFSPPHALKNKDQMDITNDYKQNIADRNEGLDSSKCCSSNALHK	660
IPSFVENNVGLLTIIGLGQGKLTTRRTGFKPYKRCVSEARENVRGANCEEKGCKRIRLEGE	720
TST*	723

Σχήμα 4.3 Η πλήρης ακολουθία αμινοξέων της PvLHY πρωτεΐνης. Τα έντονα μαύρα γράμματα αντιπροσωπεύουν το MYB μοτίβο της πρωτεΐνης, ενώ μπλέ και κόκκινα γράμματα αντιστοιχούν στις C₁ και C₂ υδρόφιλες περιοχές που επιλέχθηκαν τελικά για την κλωνοποίηση. Τα πράσινα γράμματα αντιστοιχούν στην μήκος 150 αμινοξέων, υδρόφοβη περιοχή που εσωκλείουν οι C₁ και C₂ αλληλουχίες ενώ η C₁₋₂ που κλωνοποιήθηκε εξίσου με τις C₁ και C₂ περιοχές αποτελείται από τα μπλέ, πράσινα και κόκκινα γράμματα της PvLHY αλληλουχίας αμινοξέων.

4.1.3 Αλληλούχηση των κλωνοποιημένων C₁, C₂ και C₁₋₂ ενθεμάτων

Τα C₁, C₂ και C₁₋₂ ενθέματα, κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλα στελέχη του πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης pGEX. Επειδή απώτερος σκοπός της κλωνοποίησης ήταν η υπερέκφραση των τριών GST χημικών πρωτεϊνών που προέκυψαν, έπρεπε να εξασφαλιστεί στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό ότι η ενσωμάτωση των τριών ενθεμάτων στις αντίστοιχες MCS του πλασμιδιακού φορέα θα ήταν η σωστή.

Αρχικά η ενσωμάτωση καθενός εκ των τριών ενθεμάτων έπρεπε να γίνει με τον σωστό προσανατολισμό, δηλαδή να ενσωματωθούν με την κατεύθυνση 5' – 3' στην MCS. Σε αντίθετη περίπτωση (ενσωμάτωση με κατεύθυνση 3'–5'), τα ενσωματωμένα ενθέματα δεν θα κωδικοποιούν τις αντίστοιχες C₁, C₂, C₁₋₂ περιοχές της PvLHY πρωτεΐνης. Η επιλογή δύο διαφορετικών περιοριστικών ενδονουκλεασών για την κλωνοποίηση κάθε ενθέματος, απομακρύνει αυτό το ενδεχόμενο. Οι δύο διαφορετικές ενδονουκλεάσες δημιουργούν διαφορετικά άκρα τόσο στο ένθεμα όσο και στο γραμμικό πλασμιδιακό φορέα μετά την αντίδραση αποκοπής. Έτσι, όπως αποτράπηκε λόγω μη συμπληρωματικότητας των άκρων η επανασυγκόλληση του γραμμικού πλασμιδιακού φορέα, αντίστοιχα μειώθηκε η πιθανότητα τα ενθέματα να

ενσωματωθούν με λάθος προσανατολισμό στις MCS των αντίστοιχων πλασμιδιακών φορέων.

Ένα δεύτερο κρίσιμο σημείο κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης των τριών ενθεμάτων ήταν η ενσωμάτωση στη σωστή θέση έτσι ώστε να εξασφαλίζεται το ορθό πλαίσιο ανάγνωσης για την παραγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών. Ακόμα και με απόκλιση μιας νουκλεοτιδικής βάσης, η παραγωγή του αντίστοιχου πολυπεπτιδίου θα ήταν αδύνατη καθώς η μετάφραση του θα τελείωνε πρόωρα λόγω της δημιουργίας κάποιου κωδικονίου λήξης. Επιπλέον η αλληλουχία αμινοξέων που θα είχε συντεθεί μέχρι να προσεγγιστεί το κωδικόνιο λήξης από το ριβόσωμα θα ήταν τελείως διαφορετική εξαιτίας της τοποθέτησης άλλων αμινοξέων λόγω της αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης κατά μια βάση.

Η τελική επιβεβαίωση της σωστής κλωνοποίησης όλων των ενθεμάτων έγινε με αλληλούχιση των αντίστοιχων θετικών κλώνων (Σχ 4.4, 4.5, 4.6). Η αλληλούχιση των θετικών κλώνων δεν έδειξε μόνο τον ορθό προσανατολισμό κατά την ενσωμάτωση των τριών ενθεμάτων αλλά επιπλέον επιβεβαίωσε την ύπαρξη σημαντικών στοιχείων πάνω στα ενθέματα όπως την αλληλουχία αναγνώρισης του παράγοντα Xa, τον επανασηματισμό των θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών (όπως πρόβλεψε και η αντίδραση αποκοπής των προϊόντων της συγκόλλησης τους) καθώς και την ύπαρξη κωδικονίων λήξης της μετάφρασης λίγο μετά τα κλωνοποιημένα ενθέματα όπως προβλέπει η αλληλουχία της MCS των αντίστοιχων πλασμιδιακών φορέων.

Vector Sequence	Factor Xa site	Sma I site
5' - AA TCG GAT CTG	ATC GAA GGT CGT	GGG ATC CCC GGA ATT
<u>AA TACTGAA TCA TTT CTG ACT GTT GAA CTT GGA AAC AGG AAT TTG GAG ATC AAT GAT GGA</u>		<u>CCC GGG CGA GAT GAA</u>
<u>AAA CAG GCT AAT GGC ACT AGT AAA AAC TCC ACG TTG GAG AAT TCT AAT GCT TTA CAA ACG</u>		
<u>AAA TTG GTT CAA AAT GAG AAA ACA GAT GGT CTC GAT AGT GCA TTA ACA ATA GAT GGG ATG</u>		
<u>A GGC AAT CAG AAT TAC CCT AGA CAT GTA ACT GTG CAC GTT GTT GAC GGG AAA CTT GGA</u>		
<u>I AGT ACT CAA AAT CCA TCA CAA GAT ATG CTG TTT CGA GAC TCT ATG TTT CAG CCA ATA</u>		
<u>4 GGG GAT AAT GGG CAA CCA AAT CTT TTC ACC AAT TCA GCT CCA ACG AAC ACA AGT GAA</u>		
<u>" CAA AAT AAT ACA GCA CGA TCT TCT GTT CAT CAA TCA TTT CTT CCG TAT CCT CCC TTC</u>		
<u>CAG CAC AAT CAG GAC GAT TAC GCT CGA GCG GCC GCA TCG TGA CTG ACT GAC GAT</u>		
CC - 3'	Xho I site	Stop Codon
ector Sequence		

Σχήμα 4.4 Η αρχιτεκτονική του C₁ κλωνοποιημένου ενθέματος στην MCS του pGEX 5x2 πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης όπως φανερώθηκε με αλληλούχιση νουκλεοτιδικών βάσεων. Με τα μαύρα γράμματα φαίνεται μέρος της αλληλουχίας του φορέα (Vector Sequence). Η γκρι αλληλουχία αντιπροσωπεύει την αλληλουχία αναγνώρισης του Παράγοντα Xa. Με πράσινο και καφέ χρώμα αντιπροσωπεύονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών SmaI και XhoI που χρησιμοποιήθηκαν κατά την κλωνοποίηση και επανασηματίστηκαν κατά την συγκόλληση των δύο μορίων. Τέλος με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται το κωδικόνιο λήξης της μεταγραφής που σηματοδοτεί και το τέλος της MCS του φορέα. Οι υπογραμμισμένες αλληλουχίες φανερώνουν τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του ενθέματος από το PvlLHY cDNA.

Ωστόσο μια πρώτη εκτίμηση για το ορθό της κλωνοποίησης των τριών ενθεμάτων είχε προηγηθεί με τη παρατήρηση ότι μετά το στάδιο του μετασηματισμού βακτηριακών κυττάρων DH5a με τα προϊόντα της αντίδρασης συγκόλλησης, υπήρξε ένας αριθμός θετικών, ως προς την παρουσία του γονιδίου της αμικιλίνης, αποικιών στα τριβλία Petri. Πιο συγκεκριμένα κατά την αντίδραση συγκόλλησης, η μοριακή αναλογία 1 / 2 στην περίπτωση των pGEX 5x1 / C₂ έδωσε συνολικά επτά ανθεκτικές αποικίες ενώ η αναλογία 1 / 4 έδωσε τέσσερις ανθεκτικές αποικίες. Η ανάλυση των

επτά κλώνων έδειξε ότι τέσσερις από αυτούς περιείχαν ένθεμα ενώ οι υπόλοιποι ήταν κενός πλασμιδιακός φορέας.

Vector Sequence	Factor Xa site	EcoRI site	C2 Insert Sequence
5' - CG GAT CTG	ATC GAA GGT CGT	GGG ATC CCC	GAA TTC AAT ACT TCA ACA AAG GCT
ATGAT CAT GTG ACG AAC	GAA GCA ATT TCT GAG CAC	CTT GAT TCC GAC AAA ACA AAGGGC	GA AAA CAG GTT GAC CGT TCC TCG TGT GGT TCC AAC ACA GCC TCA AGC AGC GAT GTG
GA ACT GAT GCA CTA GGG AAG GAT GAG AAA GGG AAG GAA GAG CCT GAA ACA CCC GAC	CTT AC CAA AAT TTA GCC ATT GAG TTT AGT AAT CGT CGT AGA AGC ATT TAC AAC CTT ACT GAT	CT TGG AAA GAG GTC TCT TCA GAG GGG AGA CTA GCA TTT CAG GCT CTA TTC TCC AGA	CAG GTG TTG CCT CAA AGC TTT TCA CCT CCT CAT GCT CTA AAG AAT AAG GAC CAA ATG GAC
ATC ACC AAT GAT TAC AAG CAA AAC ATA GCC GAC AGA AAT GAA GAC CTT GAC AGC AAG AAA	ATC AGT TCT AAT GCA CTG CAT AAA	CTC GAG	CGG CCG CAT CGT GAC TGA CTG ACG ATC
TGC CTC GCG CGT TT - 3'	XhoI site		Stop Codon
Vector Sequence			

Σχήμα 4.5 Η αρχιτεκτονική του C₂ κλωνοποιημένου ενθέματος στην MCS του pGEX 5x1 πλασμιδιακού φορέα. Η αλληλουχία του φορέα (Vector Sequence) φαίνεται με μαύρα γράμματα, η γκρι αλληλουχία αντιπροσωπεύει την αλληλουχία αναγνώρισης του παράγοντα Xa. Με πράσινο και καφέ χρώμα αντιπροσωπεύονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών EcoRI και XhoI που χρησιμοποιήθηκαν κατά την κλωνοποίηση και επανασηματίστηκαν κατά την συγκόλληση των δύο μορίων. Τέλος με μπλέ χρώμα εμφανίζεται το κωδικόνιο λήξης της μεταγραφής που σηματοδοτεί την απομόνωση του ενθέματος από το P_vLHY cDNA.

Στην περίπτωση της κλωνοποίησης του C₁₋₂ στον φορέα pGEX 5x2, η μοριακή αναλογία 1 / 2 έδωσε συνολικά δεκαπέντε ανθεκτικές στην αμπικιλίνη αποικίες ενώ η μοριακή αναλογία 1 / 5 έδωσε μόνο τέσσερις. Από την ανάλυση δεκαέξι συνολικά αποικιών (δεκαπέντε από την αναλογία 1 / 2 και μιας από την αναλογία 1 / 5) προέκυψαν τρεις θετικοί κλώνοι που περιείχαν το C₁₋₂ ένθεμα ενώ οι υπόλοιπες δώδεκα αποικίες καθώς και μία από την μοριακή αναλογία 1 / 5 προέρχονταν από αρνητικούς κλώνους καθώς περιείχαν μόνο άδειο πλασμιδιακό φορέα.

Η αντίδραση αποκοπής από περιοριστικές ενδονουκλεάσες, δείγματος απομονωμένου πλασμιδίου από τους θετικούς κλώνους που προέκυψαν έπειτα από την συγκόλληση των αντίστοιχων ενθεμάτων με τους πλασμιδιακούς φορείς έδωσε και μια δεύτερη ένδειξη υπέρ της σωστής ενσωμάτωσης των ενθεμάτων στους πλασμιδιακούς φορείς. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν ανά περίπτωση ήταν οι ίδιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει η κλωνοποίηση. Η απόκλιση ή αλλαγή έστω και μιας βάσης κατά την ενσωμάτωση των ενθεμάτων στους πλασμιδιακούς φορείς τους, θα διατάραζε την ορθή θέση αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών με αποτέλεσμα να μην γίνει αποκοπή. Πιθανές μεταλλάξεις σε ενδιάμεσες θέσεις που θα άλλαζαν το πλαίσιο ανάγνωσης, θα παρατηρούνταν κατά την αλληλούχιση δείγματος DNA των θετικών κλώνων.

Ωστόσο η επιλογή των περιοριστικών ενδονουκλεασών που χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο των κλωνοποιήσεων, δεν ήταν τυχαία. Λόγω του κινδύνου οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών που προστέθηκαν στα άκρα των τριών ενθεμάτων, να εδρεύουν παράλληλα και σε κάποιες θέσεις ενδιάμεσα της αλληλουχίας αυτών, πριν την επιλογή των περιοριστικών ενζύμων έπρεπε να προηγηθεί χαρτογράφηση της αλληλουχίας cDNA του P_vLHY για θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών (Σχ. 4.7). Η χαρτογράφηση έδειξε ότι 626 και 735 ζεύγη βάσεων από το 5' άκρο της cDNA αλληλουχίας του P_vLHY,

εδρεύουν οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *XhoI* και *EcoRI* αντιστοίχως.

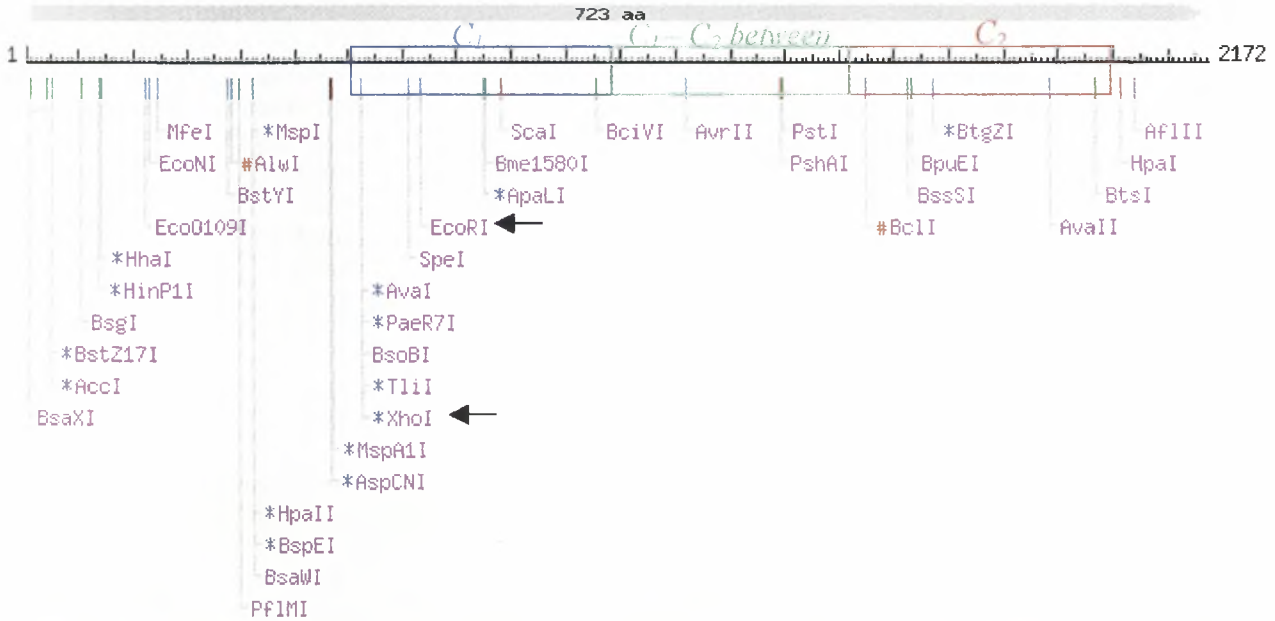
Vector Sequence	Factor Xa site	Sma I site	C1-2 Insert Sequence
AATCGGATCTG	ATCGAAGGTCGT	GGGAT	CCCGGGAATTCCC
TCTGACTGTTGAACTTGGAAACAGGAAITTTGGAGATCAATGATGGAAAACAGGCTAATGGCACTAGTAA			
AACTCCACGTTGGAGAATTCTAATGCTTTACAAACGAAATTTGGTTCAAAATGAGAAAACAGATGGTCTCC			
ATAGTGCATTAACAATAGATGGGATGCAAGGCAATCAGAAATACCCCTAGACATGTAACCTGTGCACGTTGT			
TGACGGGAAACTTGGAAACAAGTACTCAAAAATCCATCACAAGATATGCTGTTTCGAGACTCTATGTTTCAG			
CCAATAGGAGGGGATAATGGGCAACC AAAATCTTTTCACCAATTCAGCTCCAACGAACACAAGTGAAAGT			
CAAAAATAATACAGCACGATCTTCTGTTTCATCAATCAATTTCTTCCGATCCCTCCCTTCACACAGCACAAATCA			
GGACGATTACCAATCAATTTCTTCCACATGTCCTTCCACGGTCTTCTAATCTCTCTCTCTCTACCTTGGCTG			
CAAAAACCCAGCAGCCCATGTTGCAGCAAGTTTTCGCAGCTACATTTTGGCCTTAATGCAAAATCCAG			
AACTTCAGCAGATTTCTCCTAGGTGCTCCCAAGGAGGTTTCACATCTAGACAAAATCGGTTCCCTTC			
CAAGCGTTCCAGCTATTGCAGCAGCTACTGTAGCTGCTGCAACTCCGTCGTTGGGCAGCTCATGGA			
TTGCTTCCCTTGTGTCCTTCTCCTTCATGCTGCTTTTGGCTGTCCTCCTGCATCAGTGACTGCAGTCC			
CATCAATGAATCCTCCTCTGTGCAAGATCAGAAAGCATCCAGAAATACTCGGAAGCACCGCAAGCTCA			
ACATTCAGATTCAAAAGTCACTAGCTGTCAATTCATCAGATTTCTGAGACTGGAAAATGCCAAGTTAA			
ATACTTCACCAAAGGCTACTGATCATGTGACGAACGAAGCAATTTCTGAGCACCTTGAATTCGGACAAAAC			
AAAGGGCAGAAAACAGGTTGACCGTTCCTTCGTGIGGTTCCAACACAGCCTCAAGCAGCGATGTGGAAA			
CTGATGCACTAGGGAAGGATGAGAAAGGGAAAGGAAAGAGCCTGAAACACCCGACCGCTAAACAATTTAGCC			
ATTGAGTTTAGTAAATCGTCTGTAGAAGCAATTTACAACCTTACTGATTTCTTGGAAAGAGGTTCTTTCAGAGG			
GGAGACTAGCATTTCAGGCTCTAATTTCTCCAGAGAGGTTGTGCTC AAAAGCTTTTCACCTCCTCATGCTCT			
AAAGAATAAGGACCAAATGGACATCACCAATGATTACAAGCAAAAACATAGCCGACAGAAAATGAAGACCTT			
GACAGCAAGAAAATGCAGTTCTAATGCACCTGCATAAACTCGAGCGGCCGCATCGTGA			
TCTGCCTCGCGCGTTTTCGGTG			
Vector Sequence		XhoI site	Stop Codon

Σχήμα 4.6 Η αρχιτεκτονική του C_{1,2} κλωνοποιημένου ενθέματος στην MCS του pGEX 5x2 πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης όπως φανερώθηκε με αλληλούχηση νουκλεοτιδικών βάσεων. Με τα μαύρα γράμματα φαίνεται μέρος της αλληλουχίας του φορέα (Vector Sequence). Η γκρι αλληλουχία αντιπροσωπεύει την αλληλουχία αναγνώρισης τους Παράγοντα Xa. Με πράσινο και μπλέ χρώμα αντιπροσωπεύονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *SmaI* και *XhoI* που χρησιμοποιήθηκαν κατά την κλωνοποίηση και επανασηματίστηκαν κατά την συγκόλληση των δύο μορίων. Τέλος με καφέ χρώμα εμφανίζεται το κωδικόνιο λήξης της μεταγραφής που σηματοδοτεί και το τέλος της MCS του φορέα. Οι υπογραμμισμένες αλληλουχίες φανερώνουν τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του ενθέματος από το PνLHY cDNA. Η μπλέ αλληλουχία αντιπροσωπεύει την C₁ περιοχή, η κόκκινη αλληλουχία την C₂, ενώ η πράσινη αλληλουχία αντιπροσωπεύει την ενδιάμεση των προηγούμενων, υδρόφοβη περιοχή της πρωτεΐνης PνLHY.

Οι συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιήθηκαν κατά την κλωνοποίηση των τριών ενθεμάτων, συνεπώς έπρεπε να διαπιστωθεί αν θα εκδηλώσουν την δράση τους και σε ενδιάμεση θέση της αλληλουχίας αυτών. Η έναρξη του C₁ ενθέματος εντοπίζεται στη C⁶²⁸ και η λήξη του στη C¹⁰⁸⁰. Λόγω του ότι από τα έξι νουκλεοτίδια της θέσης αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *XhoI* που εδρεύει μεταξύ της C⁶²⁶ και της G⁶³¹, μόνο τα τέσσερα τελευταία συμπεριλαμβάνονται στο C₁ ένθεμα αλλά και εξαιτίας της δημιουργίας νέων άκρων κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στο ίδιο ένθεμα, η συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης παύει να είναι λειτουργική και δεν αναγνωρίζεται από το αντίστοιχο ένζυμο.

Ωστόσο μέσα στο C₁ ένθεμα και συγκεκριμένα από την G⁷³⁵ έως και την C⁷⁴⁰ εδρεύει άλλη μια περιοριστική ενδονουκλεάση που χρησιμοποιήθηκε κατά το στάδιο

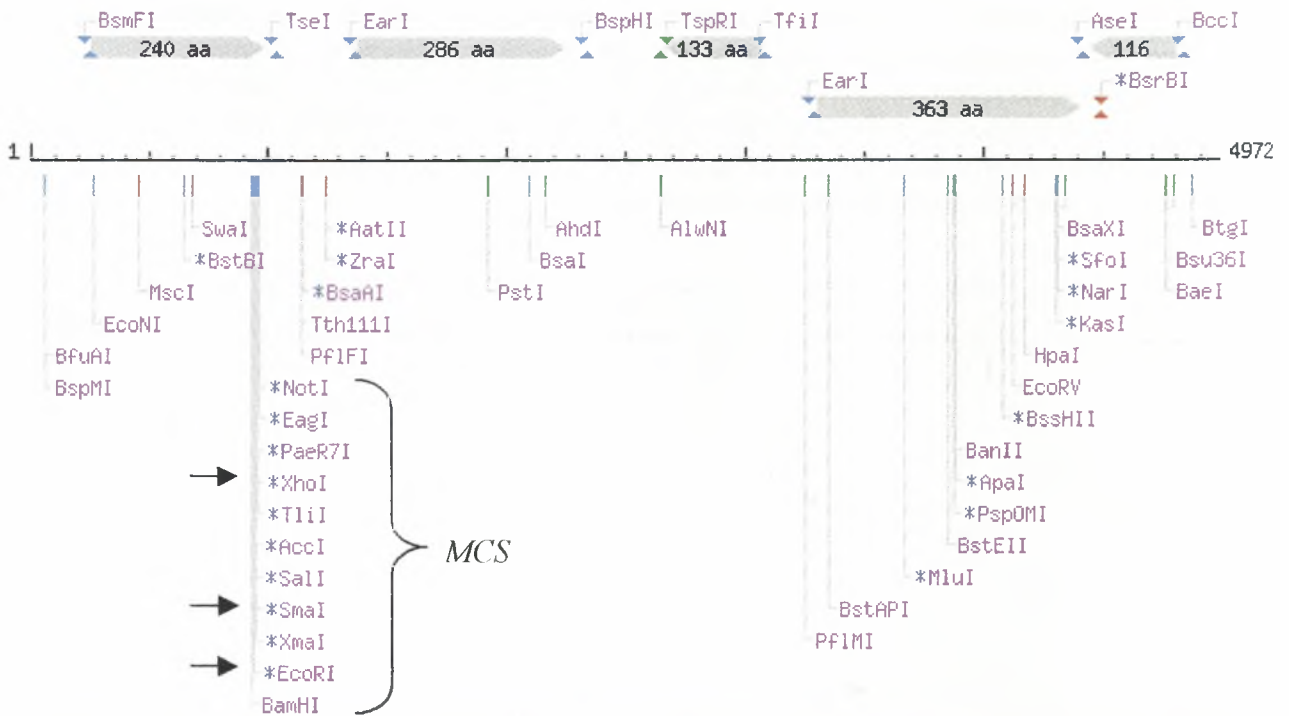
των κλωνοποιήσεων, η *EcoRI*. Σε αυτή την περίπτωση ολόκληρη η θέση αναγνώρισης βρισκόταν αυτούσια μέσα στην αλληλουχία του ενθέματος και δεν θα έπαινε να είναι λειτουργική ούτε και μετά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Οπότε για την κλωνοποίηση του C_1 ενθέματος καθώς και του C_{1-2} που το εμπεριέχει, επιλέχθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση *SmaI* της οποίας η θέση αναγνώρισης δεν εδρεύει σε κανένα από τα τρία ενθέματα και η οποία προστέθηκε στα άκρα των C_1 και C_{1-2} μετά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.



Σχήμα 4.7 Χάρτης περιορισμού της cDNA αλληλουχίας του PνLHY. Τα βέλη ξεχωρίζουν, από το σύνολο των θέσεων περιοριστικών ενδονουκλεασών που εδρεύουν σε ολόκληρη την cDNA αλληλουχία του PνLHY, εκείνες που αναγνωρίζονται από τα *EcoRI* και *XhoI* ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο της κλωνοποίησης. Και οι δύο βρίσκονται μέσα στη αλληλουχία του C_1 ενθέματος (μπλέ πλαίσιο) ενώ στη αλληλουχία του C_2 (κόκκινο πλαίσιο) καθώς και στην ενδιάμεση των C_1 και C_2 υδρόφοβη αλληλουχία (C_1-C_2 between – πράσινο πλαίσιο) δεν περιέχουν θέσεις αναγνώρισης των παραπάνω περιοριστικών ενδονουκλεασών. Θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *SmaI* που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των C_1 και C_{1-2} ενθεμάτων δεν εντοπίζεται πουθενά στο σύνολο της αλληλουχίας cDNA του PνLHY. Ο χάρτης περιορισμού έγινε με την βοήθεια του on-line προγράμματος NEB Cutter v. 2.

Αναφορικά με το C_2 ένθεμα καθώς και με την ενδιάμεση των C_1 και C_2 υδρόφοβη περιοχή που αποτελεί μέρος του C_{1-2} ενθέματος, καμία από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *SmaI*, *EcoRI* και *XhoI* που χρησιμοποιήθηκαν κατά στο στάδιο της κλωνοποίησης δεν εμφανίζει θέση/εις αναγνώρισης σε αυτές. Τέλος σχετικά με τους πλασμιδιακούς φορείς *pGEX 5x1* και *pGEX 5x2*, καμία θέση αναγνώρισης των παραπάνω ενδονουκλεασών δεν εδρεύει σε άλλα σημεία της συνολικής αλληλουχίας των φορέων, πλην αυτών που εντοπίζονται στις αντίστοιχες MCS (Σχ. 4.8).

Με βάση τα παραπάνω η αποκοπή σε όλες τις περιπτώσεις, έγινε φυσιολογικά και η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της αντίδρασης αποκοπής έδωσε δύο ειδικές ζώνες, μία στα 4.9 kbp που αντιστοιχεί, σε ζεύγη νουκλεοτιδικών βάσεων, στο μήκος του γραμμικού πλασμιδιακού φορέα και μια ειδική ζώνη ανα περίπτωση που αντιστοιχούσε στο μήκος του ενθέματος που είχε ενσωματωθεί (450 bp έναντι των C_1 και C_2 και 1350 bp έναντι του C_{1-2} ενθέματος).



Σχήμα 4.8 Χάρτης περιορισμού της αλληλουχίας του *pGEX* πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης. Τα βέλη ξεχωρίζουν, από το σύνολο των θέσεων περιοριστικών ενδονουκλεασών που εδρεύουν σε ολόκληρη την αλληλουχία του φορέα, εκείνες που αναγνωρίζονται από τα *SmaI*, *EcoRI* και *XhoI* ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο της κλωνοποίησης. Όλες οι παραπάνω θέσεις αναγνώρισης βρίσκονται μόνο μέσα στη αλληλουχία της Περιοχής Πολλαπλής Κλωνοποίησης (MCS) του φορέα. Ο χάρτης περιορισμού έγινε με την βοήθεια του on-line προγράμματος *NEB Cutter v.2*.

4.1.4 Η υπερέκφραση των τριών χιμαιρικών πρωτεϊνών

Όπως περιγράφηκε, ο κοινός μεταγραφικός έλεγχος που ασκούσε ο υποκινητής που εδρεύει ανοδικά της αλληλουχίας του GST, στο GST και στο εκάστοτε ένθεμα που είχε κλωνοποιηθεί στην MCS του φορέα, οδήγησε τελικά στην παραγωγή GST χιμαιρικών πρωτεϊνών έναντι των τριών ενθεμάτων του πειράματος. Επόμενο βήμα μετά την διαπίστωση της ορθής κλωνοποίησης και των τριών ενθεμάτων στις MCS των αντίστοιχων πλασμιδιακών φορέων ήταν να βρεθεί η συνθήκη υπερέκφρασης τους. Υπενθυμίζεται ότι το κρίσιμο στάδιο αυτής της φάσης του πειράματος ήταν η επίτευξη όσο το δυνατόν μεγαλύτερης παραγωγής πρωτεΐνης με τις μικρότερες απώλειες λόγω πρωτεολυτικής αποικοδόμησης. Λόγω της ευθέως ανάλογης σχέσης ανάμεσα στη παραγόμενη ποσότητα μιας ξένης πρωτεΐνης από ένα προκαρυωτικό φορέα και της αποικοδόμησης της από τον ίδιο, έπρεπε να δοκιμαστούν πολλές συνθήκες προτού βρεθεί τελικά εκείνη που θα ισορροπούσε ανάμεσα στην επαρκή παραγωγή της εκάστοτε εκ των τριών, χιμαιρικής πρωτεΐνης και στην πρωτεόλυση αυτής.

Με τη διαδικασία που περιγράφηκε στη προηγούμενη ενότητα (βλ. *Υλικά και Μέθοδοι, Στάδιο IV*), παρασκευάστηκαν και ελέγχθηκαν ως προς την υπερέκφραση των C₁, C₂ και C₁₋₂ συνολικά πάνω από 180 δείγματα από διάφορους συνδυασμούς όλων των παραγόντων που δοκιμάστηκαν (θερμοκρασία, πυκνότητα της καλλιέργειας, τελική συγκέντρωση του παράγοντα επαγωγής της έκφρασης, χρόνος

επαγωγής), καλύπτοντας έτσι ένα εύρος συνθηκών και για τους τέσσερις παράγοντες. Το εύρος των συνθηκών που κάλυψαν τα 180 δείγματα για τον κάθε παράγοντα ξεχωριστά καθώς και η τελική συνθήκη υπερέκφρασης των τριών χιμαιρικών πρωτεϊνών φαίνονται στον Πίνακα 4.1

Κατά τη διάρκεια των σταδίων επώασης της καλλιέργειας και πριν τη λύση αυτής, δεν ήταν δυνατή η προστασία των χιμαιρικών πρωτεϊνών έναντι της ενδογενούς αποικοδόμησης, μέσω της προσθήκης κάποιου/ων αναστολέα/ων πρωτεασών καθώς κάτι τέτοιο θα θανάτωνε και την ίδια την καλλιέργεια. Συνεπώς η φιλοσοφία του πειράματος ήταν, κατά το στάδιο ανάπτυξης της βακτηριακής καλλιέργειας η πρωτεόλυση των χιμαιρικών πρωτεϊνών να ελεγχθεί κύρια από την συνθήκη υπερέκφρασης των χιμαιρικών πρωτεϊνών. Μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, η προσθήκη του αναστολέα πρωτεασών PMSF καθώς και η διεξαγωγή όλων των σταδίων που ακολούθησαν σε μέγιστη θερμοκρασία τους 4 °C, προστάτεψε επαρκώς τις χιμαιρικές πρωτεΐνες από την πρωτεόλυση.

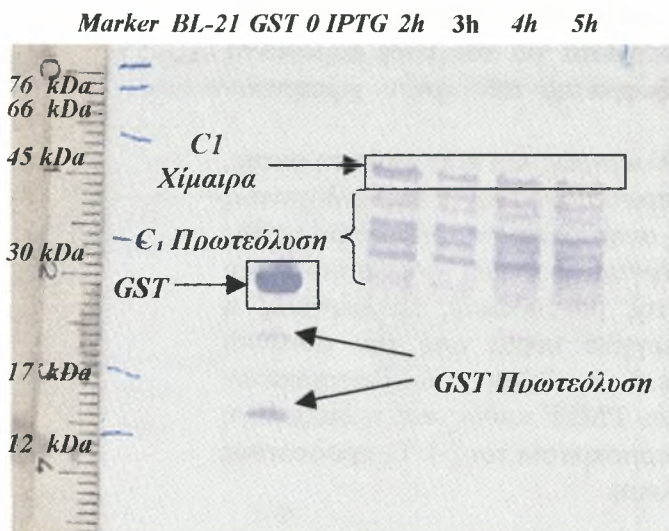
Πίνακας 4.1 : Εύρος των δειγμάτων υπερέκφρασης και τελική συνθήκη αυτής

Παράγοντας	Εύρος συνθηκών που καλύφθηκε	Τελική συνθήκη υπερέκφρασης των C1 και C2 χιμαιρικών πρωτεϊνών	Τελική συνθήκη υπερέκφρασης της C1-2 χιμαιρικής πρωτεΐνης	Συνθήκες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία
Θερμοκρασία Επαγωγής	25 - 37 βαθμοί Κελσίου	25 βαθμοί Κελσίου	25 βαθμοί Κελσίου	20 - 30 βαθμοί Κελσίου
Ποσότητα της καλλιέργειας (μονάδες OD)	0,6 - 1	0,7	0,7	0,5 - 0,8
Κατά τη συγκέντρωση του IPTG κατά επαγωγή	0,01 mM - 1 M.	0,2 mM	0,7 mM	0,01 - 0,3 mM
Χρόνος Επαγωγής	1 - 5 ώρες	2 ώρες	2 ώρες	2-3 ώρες

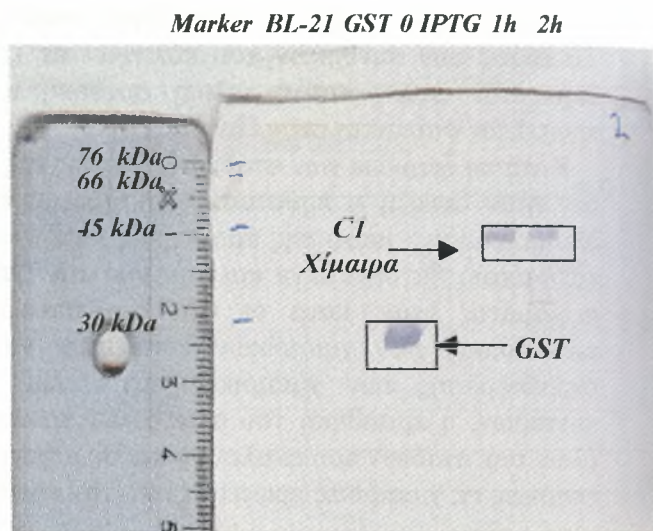
Ωστόσο καθοριστικό ρόλο στην επιτυχία της μεθόδου ήταν η εύρεση της σωστής συνθήκης υπερέκφρασης κάθε μιας εκ των τριών χιμαιρικών πρωτεϊνών. Μικρές αλλαγές στη συνθήκη υπερέκφρασης άλλαζαν δραματικά την αναλογία μεταξύ της ποσότητας πρωτεΐνης που παραγόταν και του βαθμού αποικοδόμησης της. Αν, κατά την υπερέκφραση της C₁ χιμαιρικής πρωτεΐνης, επικρατούσαν συνθήκες θερμοκρασίας και τελικής συγκέντρωσης IPTG υψηλότερες από αυτές που απαιτούσε η συνθήκη υπερέκφρασης της συγκεκριμένης χίμαιρας τότε αυτές είχαν αρνητική επίπτωση στην σταθερότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης.

Πιο συγκεκριμένα, μια δοκιμαστική επώαση για τη C1 χίμαιρα έγινε σε συνθήκες 29 °C θερμοκρασίας επαγωγής, 0.7 μονάδων απορρόφησης αναφορικά με την πυκνότητα της καλλιέργειας, με 0.7 mM τελική συγκέντρωση του παράγοντα επαγωγής IPTG και από δύο έως πέντε ώρες επαγωγή. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western των δειγμάτων με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της GST πρωτεΐνης (Εικ. 4.1).

Η ανοσοαποτύπωση φανέρωσε ότι σε αυτές τις συνθήκες ευνοείται η πρωτεολυτική αποικοδόμηση της χίμαιρας καθώς η μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης που παράγεται αρχικώς, τελικά αποικοδομείται σχεδόν πλήρως δίνοντας πολλαπλά προϊόντα αποικοδόμησης που εμφανίζονται ως διαδοχικές ζώνες με μοριακό βάρος ενδιάμεσο του αναμενόμενου για την άθικτη χιμαιρική πρωτεΐνη (45 kDa) και αυτού



Εικόνα 4.1 : Ανοσοαποτύπωση της C_1 χίμαιρας
 Συνθήκες : $29^\circ\text{C} / 0,7 \text{ OD} / 0,7 \text{ mM IPTG} / 2-5 \text{ h}$
 (Ανοσοαποτύπωση με GST μονοκλωνικό αντίσωμα)



Εικόνα 4.2 : Ανοσοαποτύπωση της C_1 χίμαιρας
 Συνθήκες : $25^\circ\text{C} / 0,7 \text{ OD} / 0,2 \text{ mM IPTG} / 1-2 \text{ h}$
 (Ανοσοαποτύπωση με GST μονοκλωνικό αντίσωμα)

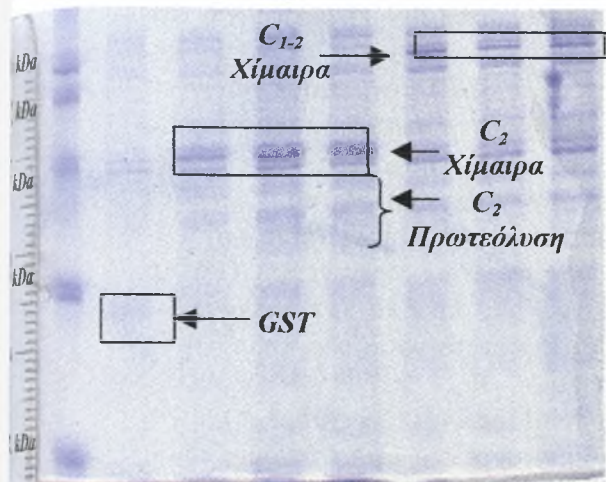
που αντιστοιχεί στο GST (30 kDa, Εικ. 4.1).

Αναφορικά με τα δείγματα των μαρτύρων, ο αρνητικός μάρτυρας (απουσία πλασμιδιακού φορέα σε κύτταρα BL-21) δεν έδωσε καμία ένδειξη, όπως αναμενόταν, καθώς δεν υπήρχε η GST αλληλουχία για να παραχθεί η αντίστοιχη πρωτεΐνη και να αναγνωριστεί έτσι από το αντίσωμα είτε στην απλή είτε στη χιμαιρική της μορφή. Στις ίδιες συνθήκες επαγωγής, ο θετικός μάρτυρας (μόνο GST) έδωσε ισχυρό σήμα αποδεικνύοντας ότι η συνθήκη μπορούσε να εξασφαλίσει ισχυρή υπερέκφραση αν δεν υπερίσχυε η πρωτεόλυση της υπερέκφρασης. Διακριτά έγιναν μόνο δύο προϊόντα αποικοδόμησης της GST πρωτεΐνης με μοριακό βάρος 18 και 12 kDa αντίστοιχα φανερώνοντας την αρνητική επίδραση που είχε η συγκεκριμένη συνθήκη και στη σταθερότητα του GST. Τέλος το δείγμα στο οποίο δεν προστέθηκε ο παράγοντας επαγωγής IPTG (0 IPTG) δεν έδωσε σήμα έναντι της χιμαιρικής C_1 πρωτεΐνης επιβεβαιώνοντας ότι η προσθήκη της γλυκόζης απέτρεψε την έναρξη της μετάφρασης της χίμαιρας πριν τη προσθήκη του παράγοντα επαγωγής, αφήνοντας τον τελευταίο ως αποκλειστικό υπεύθυνο παράγοντα της παραγωγής των χιμαιρικών πρωτεϊνών.

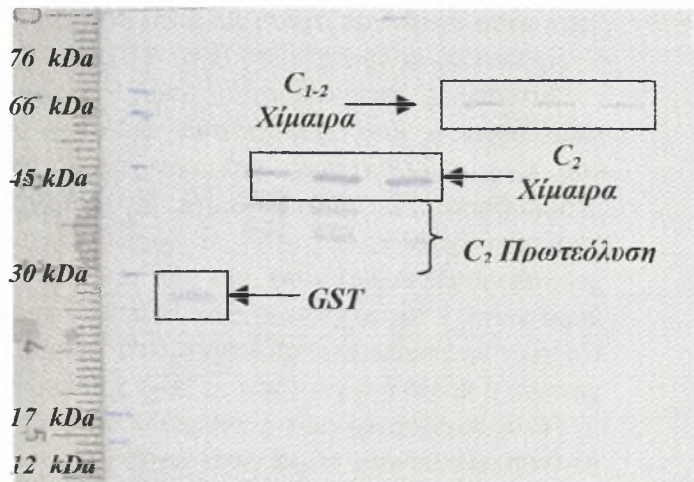
Στον αντίποδα των παραπάνω, τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης αναφορικά με την παραγωγή αλλά και σταθερότητα της C_1 χιμαιρικής πρωτεΐνης ήταν τελείως διαφορετικά όταν εφαρμόστηκε διαφορετική συνθήκη υπερέκφρασης του συγκεκριμένου πολυπεπτιδίου (Εικ. 4.2). Ελάττωση της θερμοκρασίας κατά 4°C και προσθήκη λιγότερου παράγοντα επαγωγής IPTG με τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται μια μείωση της συγκέντρωσης του παράγοντα επαγωγής κατά 3,5 φορές (από 0,7 mM στα 0,2 mM τελική συγκέντρωση IPTG ανα δείγμα) κατάφεραν να παράγουν υψηλά επίπεδα χιμαιρικής πρωτεΐνης, αποτρέποντας παράλληλα στο ελάχιστο τη πρωτεόλυση.

Και σε αυτή τη συνθήκη, ο αρνητικός μάρτυρας δεν έδωσε καμία ένδειξη επιβεβαιώνοντας την απουσία του πλασμιδιακού φορέα από αυτόν ενώ αντίθετα το δείγμα του θετικού μάρτυρα παρήγαγε σε μεγάλη ποσότητα τη GST πρωτεΐνη και μάλιστα χωρίς να παρατηρηθεί αποικοδόμηση αυτής. Τέλος η απουσία σήματος στο δείγμα στο οποίο δεν προστέθηκε ο παράγοντας επαγωγής IPTG, επιβεβαίωσε ότι η επαγωγή της υπερέκφρασης στηρίζεται αποκλειστικά στην παρουσία του εν λόγω παράγοντα (Εικ. 4.2).

Marker GST C₂-a C₂-b C₂-c C₁₋₂-a C₁₋₂-b C₁₋₂-c



Marker GST C₂-a C₂-b C₂-b C₁₋₂-a C₁₋₂-b C₁₋₂-c



Εικόνα 4.3 : PAGE ηλεκτροφόρηση των C₂ και C₁₋₂ Συνθήκες : 25 °C / 0,7 OD / 0,2 mM IPTG / 2 h (20 µl δείγμα, χρώση με κουμάση)

Εικόνα 4.4 : Ανοσοαποτύπωση των C₂ και C₁₋₂ Συνθήκες : 25 °C / 0,7 OD / 0,2 mM IPTG / 2 h (Ανοσοαποτύπωση με μονοκλωνικό anti-GST)

Αναφορικά με την υπερέκφραση των C₂ και C₁₋₂ χμαιρικών πρωτεϊνών, υπήρξαν αποκλίσεις που φανερώνουν το πως διαμορφώνει το είδος αλλά και το μέγεθος ενός πολυπεπτιδίου τη τύχη του κατά την υπερέκφραση. Πιο συγκεκριμένα, δείγματα ολικής πρωτεΐνης από τρεις διαφορετικούς θετικούς κλώνους ηλεκτροφορήθηκαν τόσο για την περίπτωση της C₂ (C₂-a, C₂-b και C₂-c κλώνοι) όσο και έναντι της C₁₋₂ χίμαιρας (C₁₋₂-a, C₁₋₂-b, C₁₋₂-c κλώνοι). Οι έξι καλλιέργειες επώαστηκαν στη συνθήκη υπερέκφρασης της C₁ χμαιρικής πρωτεΐνης (25 °C θερμοκρασία επώασης / 0,7 OD πυκνότητα καλλιέργειας / 0,2 mM η τελική συγκέντρωση του παράγοντα επαγωγής IPTG / 1-2 h το εύρος της υπερέκφρασης).

Προηγούμενα πειράματα είχαν ήδη επιβεβαιώσει δύο δικλείδες ασφαλείας του πειράματος. Αρχικά η παρατήρηση της απουσίας ειδικού σήματος σε δείγματα στα οποία ήταν απών ο πλασμιδιακός φορέας σε οποιαδήποτε μορφή του (απλή ή χμαιρική), τόσο μετά την ηλεκτροφόρηση και τη χρώση της πηκτής με κουμάση όσο και με ανοσοαποτύπωση κατά Western διασφάλισαν ότι ειδικό σήμα θα έχουν μόνο τα δείγματα που περιέχουν τον πλασμιδιακό φορέα. Παράλληλα η διαπίστωση ότι η παρουσία γλυκόζης στο περιβάλλον των κυττάρων μπόρεσε να καταστείλει την έκφραση των χμαιρικών πρωτεϊνών μέχρι την προσθήκη του παράγοντα επαγωγής, εξασφάλισε την ελεγχόμενη υπερέκφραση των δειγμάτων. Συνεπώς ο αρνητικός μάρτυρας καθώς και δείγμα χμαιρικής πρωτεΐνης από το οποίο απουσίαζε ο παράγοντας επαγωγής IPTG δεν χρησιμοποιήθηκαν. Αντιθέτως χρησιμοποιήθηκε δείγμα έναντι του θετικού μάρτυρα στις ίδιες συνθήκες (25 °C θερμοκρασία επώασης / 0,7 OD πυκνότητα καλλιέργειας / 0,2 mM η τελική συγκέντρωση του παράγοντα επαγωγής IPTG / 1-2 h το εύρος της υπερέκφρασης) για να επιβεβαιωθεί η υπερέκφραση και να εκτιμηθεί ο βαθμός αυτής.

Τόσο η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και εν συνεχεία η χρώση με διάλυμα κουμάσης, όσο και η ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση μονοκλωνικού GST αντισώματος φανέρωσαν ότι και οι τρεις θετικοί κλώνοι ανα περίπτωση, έναντι των συγκεκριμένων χμαιρικών πρωτεϊνών μπόρεσαν να παράγουν τις αντίστοιχες χμαιρικές πρωτεΐνες. Η C₂ χμαιρική πρωτεΐνη φαίνεται ότι υπερέκφραστηκε στα ίδια επίπεδα με την C₁ χίμαιρα, της οποίας η παραγωγή κρίθηκε ικανοποιητική (Εικ. 4.3 και 4.4). Αναφορικά με την πρωτεόλυση, η ανοσοαποτύπωση

φανέρωσε προϊόντα πρωτεόλυσης της C₂ χίμαιρας, ωστόσο τα επίπεδα αυτής δεν ήταν τόσο υψηλά σε σχέση με αυτά που παρατηρήθηκαν κατά την υπερέκφραση του C₁ χιμαιρικού πολυπεπτιδίου (Εικ. 4.2).

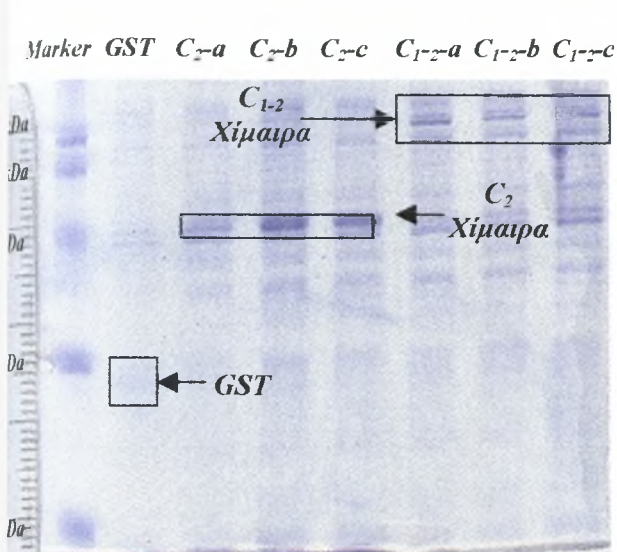
Ωστόσο η αποικοδόμιση της C₂ χίμαιρας δεν οφείλεται στην συνθήκη υπερέκφρασης που εφαρμόστηκε αλλά στο ότι ανάμεσα στην υπερέκφραση των C₂ και C₁₋₂ καλλιιεργειών και την ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση τους, μεσολάβησαν 7 ημέρες. Κατά τη διάρκεια αυτών των ημερών τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -40 °C τόσο υπό αποδιατακτικές συνθήκες (παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης) όσο και με την παρουσία αναστολέων πρωτεασών (PMSF παράγοντας) ταυτοχρόνως στο διάλυμα φορτώματος των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Παρόλα τα παραπάνω προστατευτικά μέτρα, δεν έγινε εφικτό να προστατευτεί η C₂ χιμαιρική πρωτεΐνη για τόσο μεγάλο χρονικό διάστημα.

Τέλος αναφορικά με την υπερέκφραση του θετικού μάρτυρα (κενός φορέας), αυτή με δυσκολία έδωσε σήμα μετά τη χρώση με διάλυμα κουμάσης ενώ το ειδικό σήμα κατά την ανοσοαποτύπωση ήταν εξασθενημένο σε σύγκριση με το αντίστοιχο σήμα στην περίπτωση του C₁ χιμαιρικού πολυπεπτιδίου (Εικ. 4.1 και 4.2). Ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση, υπαίτια της χαμηλής παραγωγής πρωτεΐνης δεν ήταν η συνθήκη υπερέκφρασης που εφαρμόστηκε αλλά το εξασθενημένο διάλυμα γλυκερόλης (glycerol stock) από το οποίο επώαστηκε η καλλιέργεια του θετικού μάρτυρα, καθώς αυτή δεν έφτασε την επιθυμητή πυκνότητα έπειτα από 16 ώρες επώασης όπως έγινε με τις καλλιέργειες των χιμαιρικών πρωτεϊνών ή με τα αντίστοιχα δείγματα του θετικού μάρτυρα κατά την υπερέκφραση της C₁ χίμαιρας. Η μικρότερη πυκνότητα κυττάρων κατά την έναρξη της διαδικασίας υπερέκφρασης της καλλιέργειας του θετικού μάρτυρα, εξηγεί και τη μειωμένη παραγωγή πρωτεΐνης που παρατηρήθηκε τελικά.

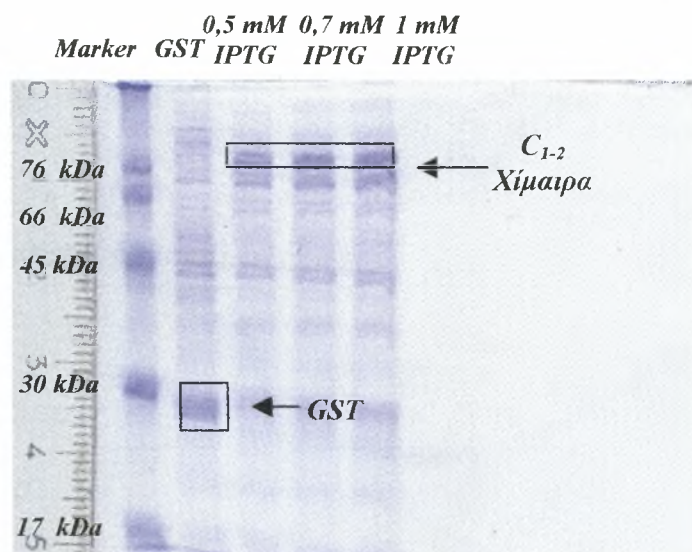
Στον αντίποδα της ικανοποιητικής απόδοσης της συνθήκης υπερέκφρασης έναντι της C₂ χιμαιρικής πρωτεΐνης, η συγκεκριμένη συνθήκη μπορεί να παρήγαγε κάποια ποσότητα από τη πρωτεΐνη C₁₋₂, ωστόσο αυτή δεν ήταν αρκετή (Εικ. 4.3 και 4.4). Έτσι διεξήχθησαν νέα πειράματα με σκοπό να βρεθεί μια καλύτερη συνθήκη υπερέκφρασης για την συγκεκριμένη χίμαιρα. Καθότι, αύξηση της θερμοκρασίας φαίνεται να ευνοεί την παραγωγή περισσότερης χιμαιρικής πρωτεΐνης ωστόσο αυξάνει ραγδαία τα επίπεδα αποικοδόμισης της, επιλέχθηκε στη νέα συνθήκη να διατηρηθεί σταθερή η χαμηλή θερμοκρασία των 25 °C κατά την υπερέκφραση όπως και στην περίπτωση των C₁ και C₂ χιμαιρικών πρωτεϊνών. Παράλληλα προτιμήθηκε να διατηρηθεί σταθερή και η χρονική διάρκεια της υπερέκφρασης για να μην ευνοηθεί η πρωτεόλυση, αλλά και η πυκνότητα της καλλιέργειας κατά την επαγωγή έτσι ώστε να αποφευχθούν οι απώλειες της παραγόμενης χιμαιρικής πρωτεΐνης από τυχόν προσέγγιση της φάσης θανάτου της καλλιέργειας (Εικ. 4.5).

Με βάση τα παραπάνω, ο παράγοντας που επιλέχθηκε τελικά με σκοπό να βελτιωθεί η υπερέκφραση της C₁₋₂ χίμαιρας, ήταν η τελική συγκέντρωση του IPTG. Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές ποσότητες έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του παράγοντα στην καλλιέργεια να είναι 0.5, 0.7 και 1 mM. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν παρουσία μόνο του θετικού μάρτυρα στον οποίο προστέθηκε ποσότητα IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,2 mM για να είναι εφικτή η σύγκριση της έντασης της επαγωγής του με τα αποτελέσματα που έδωσε το ίδιο δείγμα στη συνθήκη υπερέκφρασης των C₁ και C₂.

Από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων διαπιστώθηκε ότι η αύξηση του παράγοντα επαγωγής IPTG σε όλες τις περιπτώσεις οδήγησε σε αντίστοιχη αύξηση της παραγωγής χιμαιρικής C₁₋₂ πρωτεΐνης (Εικ. 4.6). Ειδικότερα, προσθήκη κατάλληλης ποσότητας IPTG έτσι ώστε να αυξηθεί η τελική συγκέντρωση του στο



Εικόνα 4.5 : PAGE ηλεκτροφόρηση των C₂ και C₁₋₂
 Συνθήκες : 25 °C / 0,7 OD / 0,2 mM IPTG / 2 h
 (20 μl δείγμα, χρώση με κουμάση)



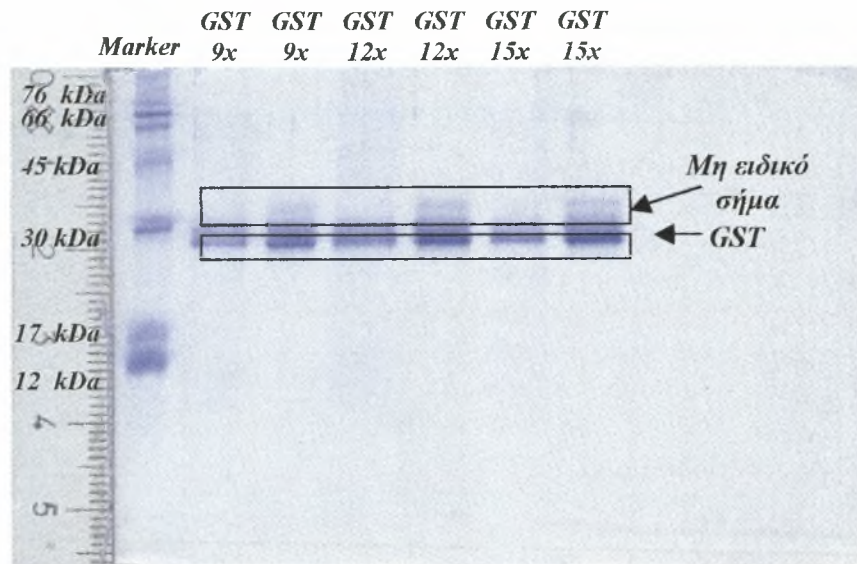
Εικόνα 4.6 : PAGE ηλεκτροφόρηση της C₁₋₂
 Συνθήκες : 25 °C / 0,7 OD / 0,5 - 0,7 - 1 mM IPTG / 2 h
 (20 μl δείγμα, χρώση με κουμάση)

δείγμα κατά 2,5 φορές (0,5 mM από 0,2 mM) οδήγησε σε παραγωγή πολλαπλάσιας ποσότητας πρωτεΐνης. Προσθήκη του παράγοντα σε τελική συγκέντρωση 0,7 mM (αύξηση ποσότητας κατά 3,5 φορές) σχεδόν διπλασίασε την παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης σε σχέση με την τελική συγκέντρωση των 0,5 mM ενώ προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM (αύξηση κατά 5 φορές) αύξησε λίγο ακόμα τα επίπεδα της παραγόμενης χιμαιρικής πρωτεΐνης σε σχέση με την τελική συγκέντρωση των 0,7 mM (Εικ. 4.6). Παράλληλα η παραγωγή της χιμαιρικής C₁₋₂ πρωτεΐνης στις δύο τελευταίες περιπτώσεις, έφτασε τα επίπεδα παραγωγής των C₁ και C₂ πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να επιλεγεί τελικά η τελική συγκέντρωση IPTG της τάξεως των 0,7 mM ως η τελική συνθήκη υπερέκφρασης της C₁₋₂ χίμαιρας.

Με βάση το ειδικό σήμα που έδωσε ο θετικός μάρτυρας του συγκεκριμένου πειράματος, επιβεβαιώθηκε ότι η απώλεια σε παραγόμενη πρωτεΐνη που παρατηρήθηκε κατά την υπερέκφραση της C₂ χίμαιρας πράγματι οφειλόταν στο επίπεδο βιωσιμότητας των βακτηριακών κυττάρων μετά την αποθήκευσή τους (Εικ. 4.5). Η παραγωγή GST πρωτεΐνης που έδωσε δείγμα καλλιέργειας θετικού μάρτυρα από νέο διάλυμα γλυκερόλης κατά την υπερέκφραση του C₁₋₂ χιμαιρικού πολυπεπτιδίου, ήταν πολλαπλάσια αυτής που έδωσε το αντίστοιχο δείγμα θετικού μάρτυρα κατά την υπερέκφραση της C₂ χίμαιρας.

4.1.5 Απομόνωση της χιμαιρικής C₁ χιμαιρικής πρωτεΐνης από την ολική πρωτεΐνη της καλλιέργειας και αποκοπή του GST.

Όπως περιγράφηκε και στην προηγούμενη ενότητα (Κεφάλαιο III, Στάδιο V), τη παραγωγή σε μεγάλη ποσότητα των χιμαιρικών πρωτεϊνών ακολούθησε η απομόνωσή τους από το σύνολο της ολικής πρωτεΐνης της βακτηριακής καλλιέργειας. Η απομόνωση αυτή έγινε με τη βοήθεια σφαιριδίων σεφαρόζης 4B στα οποία είχε δεσμευτεί το μόριο της γλουταθειόνης που έχει την ικανότητα να προσδένει τη GST πρωτεΐνη. Η τοποθέτηση των σφαιριδίων σεφαρόζης σε ειδική στήλη μετά την πρόσδεση των χιμαιρικών πρωτεϊνών και η εφαρμογή πολλαπλών, διαδοχικών εκπλύσεων με 10 ml διαλύματος λύσης της French Press (FPL διάλυμα) απομάκρυνε



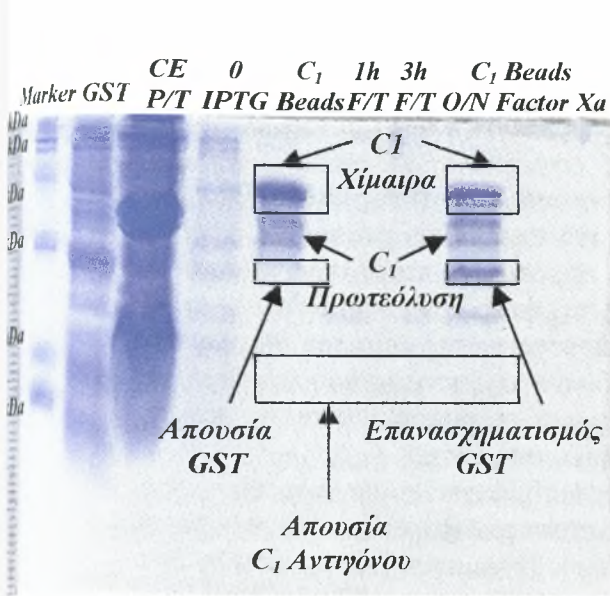
Εικόνα 4.7 : PAGE ηλεκτροφόρηση έπειτα από υπερέκφραση σε συνθήκες 25 °C / 0,7 OD / 0,2 mM IPTG / 2 h και πρόσδεση σε σφαιρίδια σεφαρόζης 4B. δειγμάτων σκέτου GST (θετικός μάρτυρας). Τη GST πρόσδεση ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις με 10 ml FPLB για εννιά, δώδεκα και δεκαπέντε φορές. Από κάθε συνθήκη πλυσίματος φορτώθηκαν 10 (αριστερό δείγμα) και 20 μl (δεξί δείγμα) από δείγμα συνολικού όγκου 160 μl (80 μl σφαιριδίων σεφαρόζης και 80 μl 2x loading buffer)

όλες τις μη ειδικές πρωτεΐνες από το δείγμα, καθώς το μέγεθος των σφαιριδίων σεφαρόζης δεν επέτρεψε την διέλευση τους από τις οπές του φίλτρου της κολώνας.

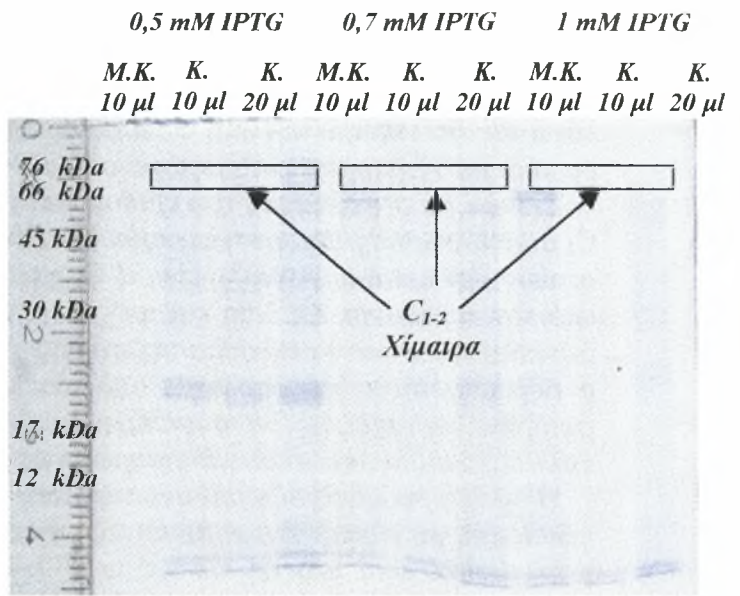
Όπως φανέρωσε η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που ακολούθησε, σε όλες τις περιπτώσεις απομακρύνθηκε η πλειονότητα των μη ειδικών πρωτεϊνών αφήνοντας παράλληλα ανέπαφη τη δεσμευμένη GST πρωτεΐνη (Εικ. 4.7, σύγκρινε με το δείγμα του θετικού μάρτυρα της εικόνας 4.6). Ωστόσο μια μικρή ποσότητα μη ειδικών πρωτεϊνών παραμένει στο δείγμα ακόμα και μετά από 15 πλύσεις. Μάλιστα αυτές οι πρωτεΐνες δεν προέρχονται από πρωτεόλυση της GST πρωτεΐνης καθώς ανιχνεύονται άνωθεν της περιοχής που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της (30 kDa). Το φόρτωμα δύο διαφορετικών ποσοτήτων (10 και 20 μl) στην πηκτή φανέρωσε παράλληλα ότι δεν υπήρξαν απώλειες της δεσμευμένης στα σφαιρίδια πρωτεΐνης κατά το στάδιο της απομάκρυνσης των μη ειδικών πρωτεϊνών.

Εφόσον διαπιστώθηκε ότι επιτυγχάνεται σε σημαντικό βαθμό η απομάκρυνση των μη ειδικών πρωτεϊνών από το δείγμα του θετικού μάρτυρα, χωρίς απώλειες της χμαιοτικής πρωτεΐνης, επιχειρήθηκε να γίνει κάτι αντίστοιχο και στην περίπτωση της C₁ χμαιορας. Σε αυτή την περίπτωση μάλιστα, έγινε και μια απόπειρα να γίνει αποκοπή του GST από τη χμαιοτική πρωτεΐνη με τον παράγοντα Xa, για να παραληφθεί εν συνεχεία το C₁ αντιγόνο σε καθαρή πλέον μορφή. Τέλος έγινε και μια πρώτη διαπίστωση σχετικά με τη πιθανότητα σχηματισμού έγκλειστων πρωτεϊνικών σωματιδίων (inclusion bodies) από την C₁ χμαιορα.

Αναφορικά με τον σχηματισμό έγκλειστων πρωτεϊνικών σωματιδίων, εξετάστηκε δείγμα που προερχόταν από την επαναδιάλυση του ιζήματος της φυγοκέντρησης που ακολούθησε τη λύση C₁ βακτηριακής καλλιέργειας από την French Press μέθοδο. Η ηλεκτροφόρηση του δείγματος απέκλεισε σε μεγάλο βαθμό την πιθανότητα σχηματισμού τέτοιου είδους σωματιδίων, καθώς στην περιοχή των 45 kDa όπου αναμενόταν να εμφανιστούν αυτά, με βάση το μοριακό τους βάρος, δεν εντοπίστηκε



Εικόνα 4.8 Αποκοπή του GST από την χιμαιρική μορφή C₁ αντισώματος. Κατά την αποκοπή εντοπίστηκε επανασηματισμός του GST αλλά δεν επιβεβαιώθηκε η παρουσία του C₁ αντιγόνου σε κανένα από τα δείγματα. P/T : επαναδιαλυμένο ιζήμα μετά την λύση της υπερβλαύσης. C₁ Beads : C₁ χιμαιρική πρωτεΐνη σε σφαιρίδια σεφαρόζης. 1h και 2h : Έκλουμα 1 και 3 ώρες μετά την προσθήκη του παράγοντα Xa. C₁ Beads O/N Factor Xa : σφαιρίδια σεφαρόζης μετά την ολόκληρη αποκοπή από τον παράγοντα Xa.



Εικόνα 4.9 : Ολονόηχτα καταβύθιση των δειγμάτων βελτίωσης της υπερέκφρασης της C₁₋₂ χιμαιρας. Η πρώτη τριάδα δειγμάτων αντιστοιχεί σε τελική συγκέντρωση IPTG 0,5 mM, η επόμενη σε 0,7 mM IPTG και η τελευταία σε 1 mM IPTG. M.K 10 μl : μη καταβυθισμένο δείγμα, φόρτωμα 10 μl στη πηκτή, K. 10 μl : καταβυθισμένο δείγμα, φόρτωμα 10 μl στη πηκτή, K. 20 μl : καταβυθισμένο δείγμα, φόρτωμα 20 μl στη πηκτή.

κάποια έντονη ζώνη (Εικ. 4.8). Ωστόσο η ύπαρξη μιας ασυνήθιστα έντονης ζώνης στη περιοχή μεταξύ των 45 και 30 kDa, μπορεί να κρύβει τη παρουσία τέτοιων σωματιδίων των οποίων η μεγάλη ποσότητα ενδέχεται να προκάλεσε την ηλεκτροφόρηση τους με ανώμαλο τρόπο στην πηκτή και γι' αυτό να αποκλίνουν από την περιοχή των 45 kDa. Σε κάθε περίπτωση ο σχηματισμός ή όχι τέτοιων σωματιδίων στο δείγμα πρέπει να επιβεβαιωθεί με ανοσοαποτύπωση κατά Western με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του GST.

Αναφορικά με την απομάκρυνση, μετά από εφαρμογή 21 πλυσιμάτων, των μη ειδικών πρωτεϊνών από το δείγμα σφαιριδίων σεφαρόζης 4B της γλουταθειόνης με προσδεσμεμένη την C₁ χιμαιρα, αυτή ήταν επιτυχής όπως φανέρωσε η ηλεκτροφόρηση καθώς καμία άλλη μη ειδική πρωτεΐνη δεν έδωσε σήμα, πλην της C₁ χιμαιρικής καθώς και των προϊόντων αποικοδόμησης της (Εικ. 4.8). Οι διαδοχικές ζώνες που παρατηρήθηκαν κάτω από το ειδικό σήμα της C₁ χιμαιρας, αποτελούν με μεγάλη βεβαιότητα προϊόντα πρωτεόλυσης της για δύο λόγους :

α) Αφενός το μοριακό πρότυπο των προϊόντων αυτών ταιριάζει απόλυτα με το πρότυπο που φανέρωσαν τα προϊόντα λόγω πρωτεόλυσης της ίδιας χιμαιρας σε άλλη συνθήκη (σύγκρινε C₁ πρωτεόλυση μεταξύ εικόνων 4.1 και 4.8). Δεδομένου ότι η πρωτεόλυση γίνεται σε συγκεκριμένα σημεία της αλληλουχίας αμινοξέων της κάθε πρωτεΐνης, τα κύρια προϊόντα που προκύπτουν είναι τα ίδια ανεξαρτήτως συνθηκών.

β) Αφετέρου όλες οι ζώνες που παρατηρούνται, εντοπίζονται ενδιάμεσα της περιοχής που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της C₁ χιμαιρικής πρωτεΐνης (45 kDa) και στο μοριακό βάρος της GST πρωτεΐνης (30 kDa).

Επιπλέον στο δείγμα δεν παρουσιάστηκαν ζώνες πάνω από την περιοχή των 45 kDa, συνεπώς οι συγκεκριμένες ζώνες αντιστοιχούν σε προϊόντα αποικοδόμησης της C₁ χίμαιρας (Εικ. 4.7). Η παραμονή τους στο δείγμα έπειτα από τις πλύσεις, εξηγείται λόγω του ότι παραμένουν στη GST χιμαιρική μορφή και συνεπώς εξακολουθούν να βρίσκονται δεσμευμένες στα σφαιρίδια σεφαρόζης.

Σχετικά με την αποκοπή του GST από τον παράγοντα Χα και της παραλαβής του C₁ αντιγόνου, υπήρξε μερική επιτυχία. Στο δείγμα των σφαιριδίων σεφαρόζης επί των οποίων βρίσκεται προσκολλημένη η C₁ χίμαιρα, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα από τον παράγοντα Χα. Μία και τρεις ώρες μετά την έναρξη της αντίδρασης, έγινε δειγματοληψία από το έκλουμα της στήλης. Δεκατέσσερις ώρες μετά την έναρξη της αντίδρασης, έγινε δειγματοληψία από το περιεχόμενο της στήλης που περιείχε τα σφαιρίδια σεφαρόζης. Τα συγκεκριμένα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και ακολούθησε χρώση με διάλυμα κουμάσης.

Η ηλεκτροφόρηση των εκλουμάτων δεν έδωσε σήμα για καμία πρωτεΐνη είτε ειδική είτε μη ειδική (Εικ. 4.8). Οι μη ειδικές πρωτεΐνες, είχαν απομακρυνθεί όπως περιγράφηκε μετά από τις πλύσεις με FPL διάλυμα. Η χιμαιρική C₁ πρωτεΐνη δεν ανιχνεύτηκε διότι παρέμεινε προσδεσμένη πάνω στο GST και συνεπώς δεν μπόρεσε να περάσει στο συγκεκριμένο δείγμα μέσω των φίλτρων της κολώνας, όπως και τα μη ειδικά προϊόντα της πρωτεόλυσης αυτής. Η μόνη πιθανότητα να ανιχνευτεί κάποια πρωτεΐνη σε αυτό το δείγμα ήταν να ανιχνευτεί το C₁ αντιγόνο καθώς έχει πλέον απελευθερωθεί από την GST χιμαιρική του μορφή μετά την αποκοπή του από τον παράγοντα Χα. Ωστόσο δεν ανιχνεύτηκε καμία πρωτεΐνη ούτε στο δείγμα της 1 ώρας ούτε σε αυτό των 3 ωρών μετά την έναρξη της αντίδρασης (Εικ. 4.8).

Αναφορικά με το δείγμα των σφαιριδίων σεφαρόζης μετά από δεκατέσσερις ώρες από την έναρξη της αντίδρασης αποκοπής, εκεί παρατηρήθηκαν υπολείμματα χιμαιρικής C₁ πρωτεΐνης, τα προϊόντα της μη εξειδικευμένης πρωτεόλυσής της από το σύνολο των πρωτεασών της βακτηριακής καλλιέργειας αλλά και επανασχηματισμός άθικτου GST (Εικ. 4.8). Το σήμα έναντι του GST κρίνεται ως ιδιαίτερα σημαντική εξέλιξη καθώς η απουσία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης από το δείγμα πριν τη προσθήκη του παράγοντα Χα και ο επανασχηματισμός έπειτα από αυτήν, επιβεβαιώνει ότι η εξειδικευμένη πρωτεόλυση της C₁ χίμαιρας από τον παράγοντα Χα έγινε κανονικά. Τα προϊόντα της συγκεκριμένης αντίδρασης φυσιολογικά έπρεπε να είναι το επανασχηματισμένο GST που παρατηρήθηκε, αλλά και το C₁ αντιγόνο, παρατήρηση του οποίου δεν έγινε δυνατή όπως και στην περίπτωση των εκλουμάτων (Εικ. 4.8).

Ωστόσο η αδυναμία ανίχνευσης του C₁ αντιγόνου, δεν συνεπάγεται απαραίτητα ότι αυτό δεν σχηματίστηκε. Πιθανόν οι συγκεκριμένες συνθήκες του πειράματος δεν επαρκούσαν για να γίνει η παρατήρηση του. Το μικρό μέγεθος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης (150 αμινοξέα) καθώς και ο ακόμα μικρότερος όγκος που φορτώθηκε στη πηκτή σε σχέση με τον όγκο του αρχικού δείγματος, μπορεί να μην ήταν επαρκή για να γίνει χρώση της πρωτεΐνης από το διάλυμα της κουμάσης που θα επέτρεπε την παρατήρηση της.

Σε μια απόπειρα να μειωθεί ο αρχικός όγκος τους δείγματος μετά την αντίδραση αποκοπής, δοκιμάστηκε ολονύχτια καταβύθιση παρουσία ακετόνης. Για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου συμπυκνώθηκε δείγμα ολικής πρωτεΐνης, απουσία σφαιριδίων σεφαρόζης, καθενός εκ των τριών συνθηκών που είχαν δοκιμαστεί με σκοπό τη βελτίωση της υπερέκφρασης του C₁₋₂ ενθέματος (Εικ. 4.6, συνθήκες υπερέκφρασης 25 °C / 0,7 OD / 0,5-0,7-1 mM IPTG / 2 h επώαση). Μετά την ολονύχτια καταβύθιση, τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε ίδιο όγκο με τον αρχικό

για να γίνει δυνατή η εκτίμηση τυχόν απωλειών σε ολική πρωτεΐνη κατά την διαδικασία.

Σε πηκτή πολυακρυλαμίδης φορτώθηκαν τρία δείγματα ανά συνθήκη. Το πρώτο ήταν 10 μl δείγματος πριν την καταβύθιση. Το δεύτερο δείγμα ήταν 10 μl δείγματος μετά την καταβύθιση. Το τρίτο δείγμα ήταν 20 μl δείγματος μετά την καταβύθιση. Τα δύο πρώτα δείγματα είχαν ως σκοπό την εκτίμηση τυχόν απωλειών σε ολική πρωτεΐνη κατά την καταβύθιση, ενώ το τρίτο δείγμα προσομοίωσε την ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης που θα εμφάνιζαν στη πηκτή 10 μl δείγματος όπου μετά την καταβύθιση, είχε συμπυκνωθεί κατά το ήμισυ.

Από την ηλεκτροφόρηση των παραπάνω δειγμάτων φάνηκε ότι σε όλες τις περιπτώσεις δεν υπήρξαν ορατές απώλειες ολικής πρωτεΐνης από την ολονύχτια καταβύθιση (Εικ. 4.9). Η ίδια ποσότητα δείγματος πριν και μετά από την καταβύθιση έδωσε ζώνες της ίδιας έντασης στην πηκτή, τόσο σε μεγάλα μοριακά μεγέθη όσο και σε μικρά. Η παρατήρηση ότι δεν υπήρξαν απώλειες πρωτεΐνης σε όλα τα μοριακά βάρη, είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς υπόσχεται ομοιόμορφη συμπεριφορά C₁, C₂ και C₁₋₂ αντιγόνων κατά την καταβύθιση τους.

Παράλληλα η σύγκριση ανάμεσα στο πρώτο δείγμα μετά την καταβύθιση και σε αυτό με διπλάσια ποσότητα ολικής πρωτεΐνης μετά από αυτήν, όχι μόνο επιβεβαίωσε ότι δεν υπήρξαν σημαντικές απώλειες αλλά επιπλέον έδειξε ότι είναι δυνατή η συμπύκνωση των δειγμάτων (Εικ. 4.9). Συνεπώς η συμπύκνωση των δειγμάτων μετά από ολονύχτια καταβύθιση παρουσία ακετόνης, ίσως ανοίξει το δρόμο στο εντοπισμό των αντιγόνων μετά την αποκοπή τους από τη χιμαιρική μορφή.

4.2.1 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των έντεκα πληθυσμών του γένους Phaseolus.

Όπως αναφέρθηκε στη προηγούμενη ενότητα (Υλικά και μέθοδοι, 3.5), μετά την εξαγωγή του γενωμικού DNA από τους γενότυπους που συγκροτούν τους έντεκα πληθυσμούς του γένους *Phaseolus* που αναλύθηκαν, ακολούθησε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA στα δείγματα. Όλα τα δείγματα φωτομετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο σε απορρόφηση A_{260 nm} με σκοπό να εκτιμηθεί η συγκέντρωση του DNA και στα A_{280 nm} με σκοπό να εκτιμηθεί η παρουσία πρωτεϊνών στο δείγμα από τον λόγο A_{260 nm} / A_{280 nm} (Πίν. 4.2). Υπενθυμίζεται ότι τιμή μεταξύ 1,8 και 2,0 μονάδων του παραπάνω λόγου βεβαιώνει την απουσία πρωτεϊνικών προσμίξεων από το δείγμα. Ωστόσο ο ποιοτικός έλεγχος δείγματος DNA με φωτομέτρηση δεν μπορεί να υποδείξει την κατάσταση του DNA αναφορικά με το βαθμό αποικοδόμησης του. Σε αυτή την περίπτωση ο ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων ολοκληρώθηκε με ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή αγαρόζης.

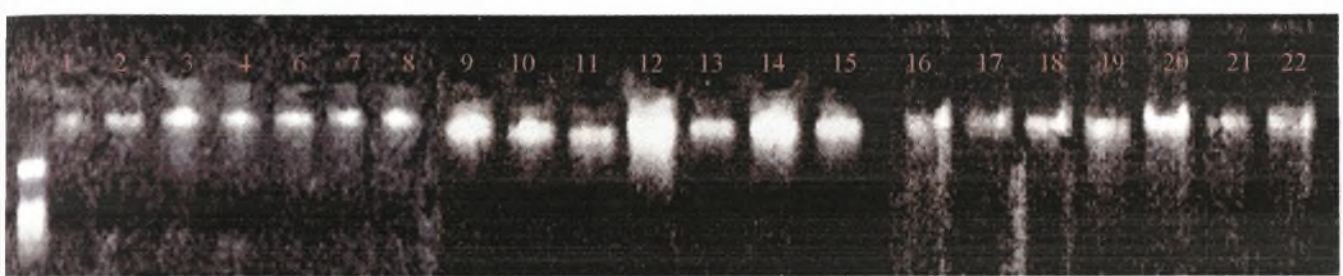
Η καθαρότητα του δείγματος είναι ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας διότι επηρεάζει άμεσα την απόδοση της αντίδρασης PCR. Ειδικότερα όταν η συγκεκριμένη αντίδραση γίνεται με γενωμικό DNA ως στόχο, όπως στο συγκεκριμένο πείραμα, η απόδοση της PCR μπορεί να επηρεαστεί πολύ σοβαρά ή ακόμα και να αποτύχει για δύο λόγους. Ο πρώτος είναι ότι λόγω του μεγάλου μεγέθους και της υπερελίκωσης του γενωμικού DNA, είναι δύσκολο να γίνει μετάπτωση από τη δίκλωνη στην μονόκλωνη μορφή κατά το στάδιο αποδιάταξης και έτσι τα μόρια των εκκινητών δεν υβριδίζονται σε σημαντικό βαθμό στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες πάνω στο γένωμα για να ξεκινήσουν την αντίδραση. Ο δεύτερος λόγος είναι ότι το γενωμικό DNA δημιουργεί σύμπλοκα με πυρηνικές πρωτεΐνες ενώ παράλληλα τα άκρα των χρωμοσωμάτων είναι συνδεδεμένα με τις πρωτεΐνες της πυρηνικής λάμινας.

Πίνακας 4.2 : Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των 31 γενοτύπων και των 3 μαρτύρων

Όνομασία γενότυπου	Ποσότητα αρχικού ιστού (gr)	Συγκέντρωση dsDNA (ng/μl)	Ποιοτικός προσδιορισμός (λόγος 260/280)	Είδος στο οποίο ανήκει ο γενότυπος
Μάρτυρες				
<i>Ποικιλία Magirus</i>	0,17	58,8	1,65	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Ποικιλία Zargana</i>	0,1	39,4	2,01	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Ποικιλία DiSpragna</i>	0,3	354,4	1,89	<i>Phaseolus coccineus</i>
Μεικτός πληθυσμός Μαγνησίας, Ξάνθης και Καστοριάς				
<i>Σβανάδες (Svanades)</i>	0,1	90,9	1,79	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Τσολάκια (Tsolakia)</i>	0,1	92,8	1,62	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Μπέζ Βυζίτσας (Beige Vizitsas)</i>	0,12	76,4	1,86	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>ΑΜ Βυζίτσας (BW Vizitsas)</i>	0,13	30,6	1,79	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Βυζίτσα Κλαρωτιά (Klarota Vizitsas)</i>	0,11	62,8	1,76	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Ξάνθη (Xanthi)</i>	0,15	66,5	1,66	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Καφετί Βυζίτσας (Brown Vizitsas)</i>	0,12	24,0	1,82	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Χονδρά Καστοριάς (Burly Kastorias)</i>	0,13	10,0	2,01	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Βελεστίνου (Velestino)</i>	0,15	10,0	1,93	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Οικογένειες πληθυσμού Ροδόπης				
<i>F-1 Ροδόπη</i>	0,3	523,5	1,83	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F-2 Ροδόπη</i>	0,3	67,5	1,80	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F-4 Ροδόπη</i>	0,3	411,6	1,78	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F-5 Ροδόπη</i>	0,3	61,8	1,84	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F-6 Ροδόπη</i>	0,3	361,9	1,82	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F-7 Ροδόπη</i>	0,3	1003,0	1,80	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F-8 Ροδόπη</i>	0,3	222,2	1,98	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F-9 Ροδόπη</i>	0,3	367,0	1,93	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F-10 Ροδόπη</i>	0,3	608,5	2,05	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F-11 Ροδόπη</i>	0,3	36,0	1,76	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F-12 Ροδόπη</i>	0,3	36,4	2,00	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F-13 Ροδόπη</i>	0,3	120,0	1,97	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F-14 Ροδόπη</i>	0,3	384,3	2,10	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F-15 Ροδόπη</i>	0,3	294,7	1,98	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Οικογένειες πληθυσμού Γρεβενών				
<i>F-4 Γρεβενά</i>	0,3	345,2	2,00	<i>Phaseolus coccineus</i>
<i>F-5 Γρεβενά</i>	0,3	398,7	1,80	<i>Phaseolus coccineus</i>
<i>F-6 Γρεβενά</i>	0,3	337,0	1,70	<i>Phaseolus coccineus</i>
<i>F-8 Γρεβενά</i>	0,3	442,4	1,95	<i>Phaseolus coccineus</i>
<i>F-16 Γρεβενά</i>	0,3	483,8	2,11	<i>Phaseolus coccineus</i>
<i>F-17 Γρεβενά</i>	0,3	375,1	1,99	<i>Phaseolus coccineus</i>
<i>F-19 Γρεβενά</i>	0,3	357,6	1,70	<i>Phaseolus coccineus</i>
<i>F-22 Γρεβενά</i>	0,3	351,3	2,01	<i>Phaseolus coccineus</i>

Οι περισσότερες από αυτές, απομακρύνονται κατά την εξαγωγή ωστόσο ένα υπολειμματικό ποσοστό πυρηνικών πρωτεϊνών που παραμένουν στο δείγμα, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά ακόμα περισσότερο την απόδοση της αντίδρασης. Συνήθως το πρώτο πρόβλημα λύνεται με εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (HotStart) πριν την έναρξη των κύκλων μιας PCR για μεγάλο σχετικά διάστημα (8 min) έτσι ώστε να αποδιατακτούν πλήρως οι δύο κλώνοι της αλυσίδας DNA. Το δεύτερο πρόβλημα είναι καθαρά θέμα τεχνικής κατά την εξαγωγή του γενωμικού DNA και μπορεί μόνο να διαπιστωθεί η ποιότητα του δείγματος κατά τον ποιοτικό προσδιορισμό αυτού.

Στα δείγματα όσων γενοτύπων η εξαγωγή DNA έγινε με βάση τη CTAB μέθοδο (οικογένειες του πληθυσμού της Ροδόπης και των Γρεβενών), η συγκέντρωση του DNA βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη, σε αντίθεση με τους γενότυπους του μεικτού πληθυσμού, των οποίων η εξαγωγή DNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο εξαγωγής γενωμικού DNA της εταιρίας Qiagen. Ωστόσο ανεξαρτήτως μεθόδου όλα τα δείγματα πλην ελαχίστων εξαιρέσεων βρέθηκαν να είναι σε ικανοποιητική κατάσταση αναφορικά με την παρουσία πρωτεϊνών.



Εικόνα 4.10 : Ποιοτικός προσδιορισμός επιλεκτικών γενοτύπων κατά την ηλεκτροφόρηση 5 μl δείγματος απομονωμένου γενωμικού DNA μετά από επεξεργασία του με RNAαση σε πηκτή αγαρόζης 0,8 % παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου. Η ηλεκτροφόρηση έδειξε ότι ο βαθμός αποικοδόμησης του γενωμικού DNA είναι χαμηλός σε όλους τους γενότυπους. M : Μάρτυρας 1 : Σβανάδες, 2 : Τσολάκια, 3 : Μπέζ Βυζίτσας, 4 : Α/Μ Βυζίτσας, 5 : Κλαρωτά Βυζίτσας, 6 : Ξάνθη, 7 : Καφετί Βυζίτσας, 8 : Χονδρά Καστοριάς, 9 : F1-Ροδόπης, 10 : F4-Ροδόπης, 11 : F6-Ροδόπης, 12 : F7-Ροδόπης, 13 : F12-Ροδόπης, 14 : F14-Ροδόπης, 15 : F15 Ροδόπης, 16 : F4-Γρεβενά, 17 : F5-Γρεβενά, 18 : F6-Γρεβενά, 19 : F8-Γρεβενά, 20 : F16-Γρεβενά, 21 : F17-Γρεβενά, 22 : F19-Γρεβενά.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA των δειγμάτων έγινε με φασματοφωτομέτρηση, ενώ επιβεβαιώθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης (0,8 %) παρουσία δείγματος γενωμικού DNA γνωστής συγκέντρωσης. Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, διαπιστώθηκε ότι όλοι οι γενότυποι ήταν σε πολύ καλή κατάσταση αναφορικά με το βαθμό αποικοδόμησης (Εικ. 4.10).

4.2.2 Η μοριακή ανάλυση του γενώματος έντεκα τοπικών πληθυσμών του γένους *Phaseolus* κατά το RAPD πρότυπο

Για τη μοριακή ανάλυση του γενώματος των έντεκα πληθυσμών του γένους *Phaseolus*, χρησιμοποιήθηκαν δεκαοκτώ (18) δεκαμερείς, μονόκλωνες αλληλουχίες τύπου RAPD ως εκκινητές (Operon Tech.). Από το σύνολο των δεκαοκτώ RAPD εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, πολυμορφισμοί ανιχνεύτηκαν μόνο σε δεκαπέντε από αυτούς ενώ το μοριακό πρότυπο των υπολοίπων τριών εκκινητών ήταν μονομορφικό σε όλους τους πληθυσμούς. Το μοριακό πρότυπο των δεκαπέντε πολυμορφικών εκκινητών, όπως φανερώθηκε από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1 %) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου έπειτα από έκθεση σε υπεριώδες φως,

Πίνακας 4.3 : Σύνοψη του μοριακού προτύπου των δεκαοκτώ εκκινήτων

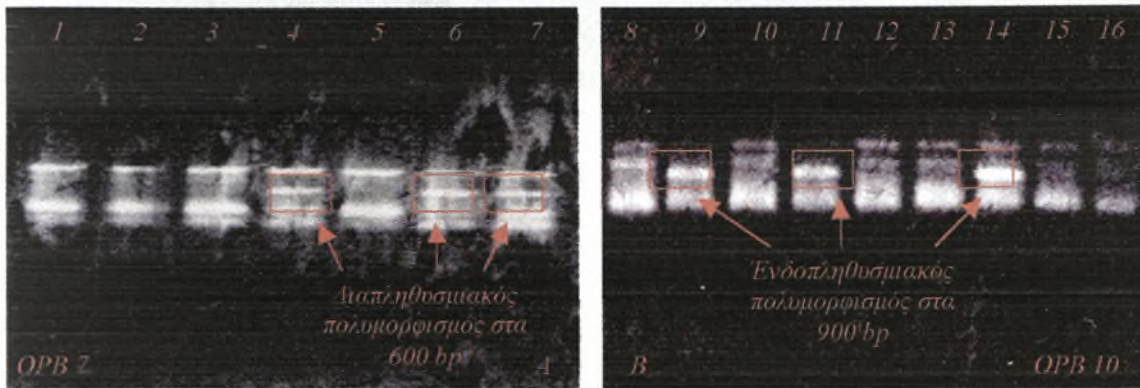
RAPD εκκινήτης	Αλληλουχία του εκκινήτη	Αριθμός πολυμορφικών τόπων που ανιχνεύτηκαν	Σύνολο περιοχών που πολλαπλασιάσε ο εκκινήτης	Πολυμορφικότητα του εκκινήτη	Χαρακτηρισμός του εκκινήτη *
OPB 7	5'-GGTGACGCAG-3'	4	6	67%	Δια- / Ένδο-
OPB 10	5'-CTGCTGGGAC-3'	3	6	50%	Ένδο- / Δια-
OPB 16	5'-TTTGCCCCGGA-3'	1	5	20%	Δια-
OPB 17	5'-AGGGAACGAG-3'	5	6	83%	Δια-
OPC 1	5'-TTCGAGCCAG-3'	3	10	30%	Δια-
OPC 3	5'-GGGGGTCTTI-3'	1	10	10%	Δια-
OPC 4	5'-CCGCATCTAC-3'	5	10	50%	Δια-
OPC 5	5'-GATGACCGCC-3'	3	9	33%	Δια- / Ένδο-
OPC 6	5'-GAACGGACTC-'3	3	10	30%	Δια- / Ένδο-
OPC 7	5'-GTCCCGACGA-3'	4	10	40%	Δια-
OPC 8	5'-TGGACCGGTG-3'	5	9	56%	Ένδο-
OPC 9	5'-CTCACCGTCC-3'	6	10	60%	Δια- / Ένδο-
OPC 10	5'-TGTCTGGGTG-3'	7	10	70%	Δια- / Ένδο-
OPD 11	5'-AGCGCCATTG-3'	3	10	30%	Δια- / Ένδο-
OPE 14	5'-TGCGGCTGAG-3'	8	8	100%	Δια- / Ένδο-
OPE 6	5'-AAGACCCCTC-3'	Μονομορφικός	6	0%	-
OPF 4	5'-GGTGATCAGG-3'	Μονομορφικός	5	0%	-
OPF 19	5'-CCTCTAGACC-3'	Μονομορφικός	4	0%	-

* Οι χαρακτηρισμοί "Ένδο-" και "Δια-" αναφέρονται στην αποκλειστική ύπαρξη ή όχι ενδοπληθυσμιακών και διαπληθυσμιακών πολυμορφισμών αντίστοιχα

* Οι χαρακτηρισμοί "Ένδο- / Δια-" και "Δια- / Ένδο" περιγράφουν το αν υπερισχύουν οι ενδοπληθυσμιακοί πολυμορφισμοί των διαπληθυσμιακών ή το αντίθετο, αντίστοιχα

αποτελείται συνολικά από εκατό εκατόν τριάντα (130) ζώνες που αντιστοιχούν σε ίσο αριθμό περιοχών του γενώματος που πολλαπλασιάστηκαν κατά το σύνολο των αντιδράσεων PCR.

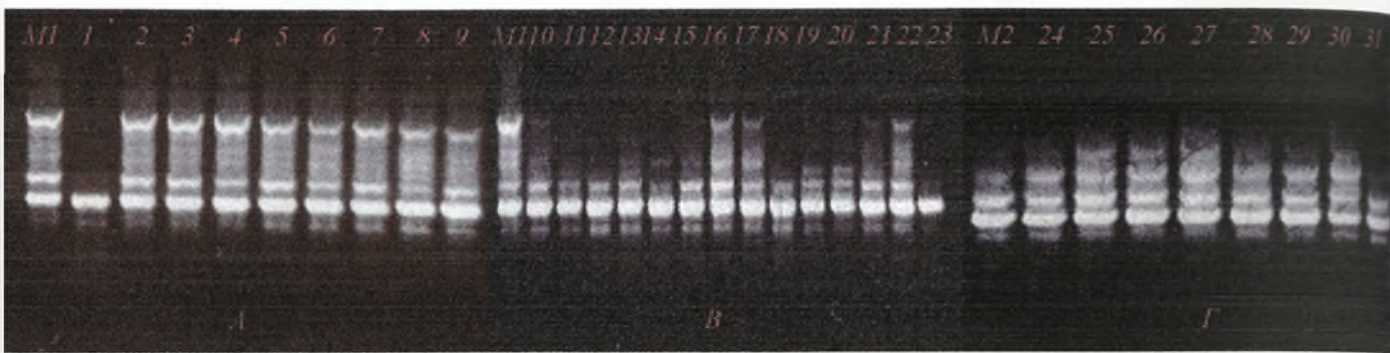
Από το σύνολο των πολυμορφικών περιοχών που ανιχνεύτηκαν, η πλειονότητα αυτών αφορούσε διαπληθυσμιακούς πολυμορφισμούς ενώ κάποιοι εκκινητές μπόρεσαν να εντοπίσουν και ενδοπληθυσμιακούς πολυμορφισμούς μεταξύ των οικογενειών που συγκροτούν τους πληθυσμούς της Ροδόπης και των Γρεβενών (Εικ. 4.11 Α και Β). Η ενδοπληθυσμιακή πολυμορφικότητα που ανιχνεύτηκε, μπόρεσε τελικά να υποδείξει και τις συγγενικές σχέσεις που επικρατούν μεταξύ των οικογενειών που αποτελούν τους παραπάνω πληθυσμούς.



Εικόνα 4.11 : Διαπληθυσμιακή και ενδοπληθυσμιακή πολυμορφικότητα που έδωσε το μοριακό πρότυπο των μεικτών πληθυσμών Μαγνησίας, Ξάνθης και Καστοριάς καθώς και των οικογενειών του πληθυσμού των Γρεβενών κατά την ανάλυση με τους RAPD εκκινητές **OPB 7** και **OPB 10** αντίστοιχα. Τα βέλη δείχνουν μια διαπληθυσμιακή πολυμορφική ζώνη **600 bp** και μια ενδοπληθυσμιακή πολυμορφική ζώνη **900 bp** αντίστοιχα. **A) OPB 7** δείγματα **1** : Τσολάκια, **2** : Κλαρωτά Βυζίτσας, **3** : AM Βυζίτσας, **4** : Καφετί Βυζίτσας, **5** Μπέζ Βυζίτσας, **6** : Χονδρά Καστοριάς, **7** : Βελεστίνο **B) OPB 10** δείγματα **8** : Di Spragna ποικιλία, **9** : F8 Γρεβενά, **10** : F14 Γρεβενά, **11** : F19 Γρεβενά, **12**: F16 Γρεβενά, **13** : F22 Γρεβενά, **14** : F6 Γρεβενά, **15** : F17 Γρεβενά, **16** : F5 Γρεβενά.

Η συνολική πολυμορφικότητα ανέρχεται σε ποσοστό 47 % καθώς εξήντα μια (61) από τις εκατόν τριάντα (130) περιοχές του γενώματος των έντεκα πληθυσμών που πολλαπλασιάστηκαν, βρέθηκαν να είναι πολυμορφικές (Εικ. 4.12). Ανα μέσο όρο ανιχνεύτηκαν δύο έως τέσσερις πολυμορφικές περιοχές ανά εκκινητή, ενώ ο μέγιστος αριθμός του αθροίσματος πολυμορφικών και μονομορφικών ζωνών ανά εκκινητή ήταν δέκα και ο ελάχιστος πέντε (Πιν. 4.3).

Το μοριακό πρότυπο κάθε εκκινητή καταγράφηκε και στη συνέχεια κωδικοποιήθηκε για το σύνολο των γενοτύπων όλων των πληθυσμών. Η κωδικοποίηση μετέτρεψε τη παρουσία ή απουσία ζωνών από τις πηκτές σε ηλεκτρονική μορφή (μονάδες “1” και μηδέν “0” αντίστοιχα), σύμφωνα με το δυαδικό σύστημα. Το σύνολο των παραπάνω κωδικοποιημένων παρατηρήσεων αποτέλεσε τη βάση για τον υπολογισμό των μητρών γενετικής συγγένειας σύμφωνα με τους αλγόριθμους JACCARD και DICE, ενώ οι φυλογενετικές σχέσεις υπολογίστηκαν από τις μήτρες που προέκυψαν, σύμφωνα με τους NEIBORJOIN και UPGMA αλγόριθμους. Η τελική επιλογή της μεθόδου, έγινε με βάση την συσχέτιση των αποτελεσμάτων κάθε φυλογενετικής ανάλυσης με την αρχική μήτρα από την οποία προέκυψε αυτή. Το μέτρο εκτίμησης του παραπάνω βαθμού συσχέτισης προέκυψε από τον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης MxComp. Με βάση το αποτέλεσμα



Εικόνα 4.12 : Πολυμορφικό πρότυπο του συνόλου των γενοτύπων όλων των πληθυσμών κατά την ανάλυση με τον OPC RAPD εκκινήτη. Α) Δείγματα M1 : Ποικιλία Maggirus, M2 : Ποικιλία Di Spagna, 1 : Ξάνθη, 2 : Σβανάδες, 3 : Τσολάκια, 4 : Κλαρωτά Βυζίτσας, 5 : Α/Μ Βυζίτσας, 6 : Καφετί Βυζίτσας, 7 : Μπέζ Βυζίτσας, 8 : Χονδρά Καστοριάς, 9 : Βελεστίνο, 10 : F1-Ροδόπης, 11 : F2-Ροδόπης, 12 : F4-Ροδόπης, 13 : F5-Ροδόπης, 14 : F6-Ροδόπης, 15 : F7 Ροδόπης, 16 : F8-Ροδόπης, 17 : F9-Ροδόπης, 18 : F10-Ροδόπης, 19 : F11-Ροδόπης, 20 : F12-Ροδόπης, 21 : F13-Ροδόπης, 22 : F14-Ροδόπης, 23 : F15-Ροδόπης, 24 : F4-Γρεβενών, 25 : F5-Γρεβενών, 26 : F6-Γρεβενών, 27 : F8-Γρεβενών, 28 : F16-Γρεβενών, 29 : F17-Γρεβενών, 30 : F19-Γρεβενών, 31 : F22-Γρεβενών.

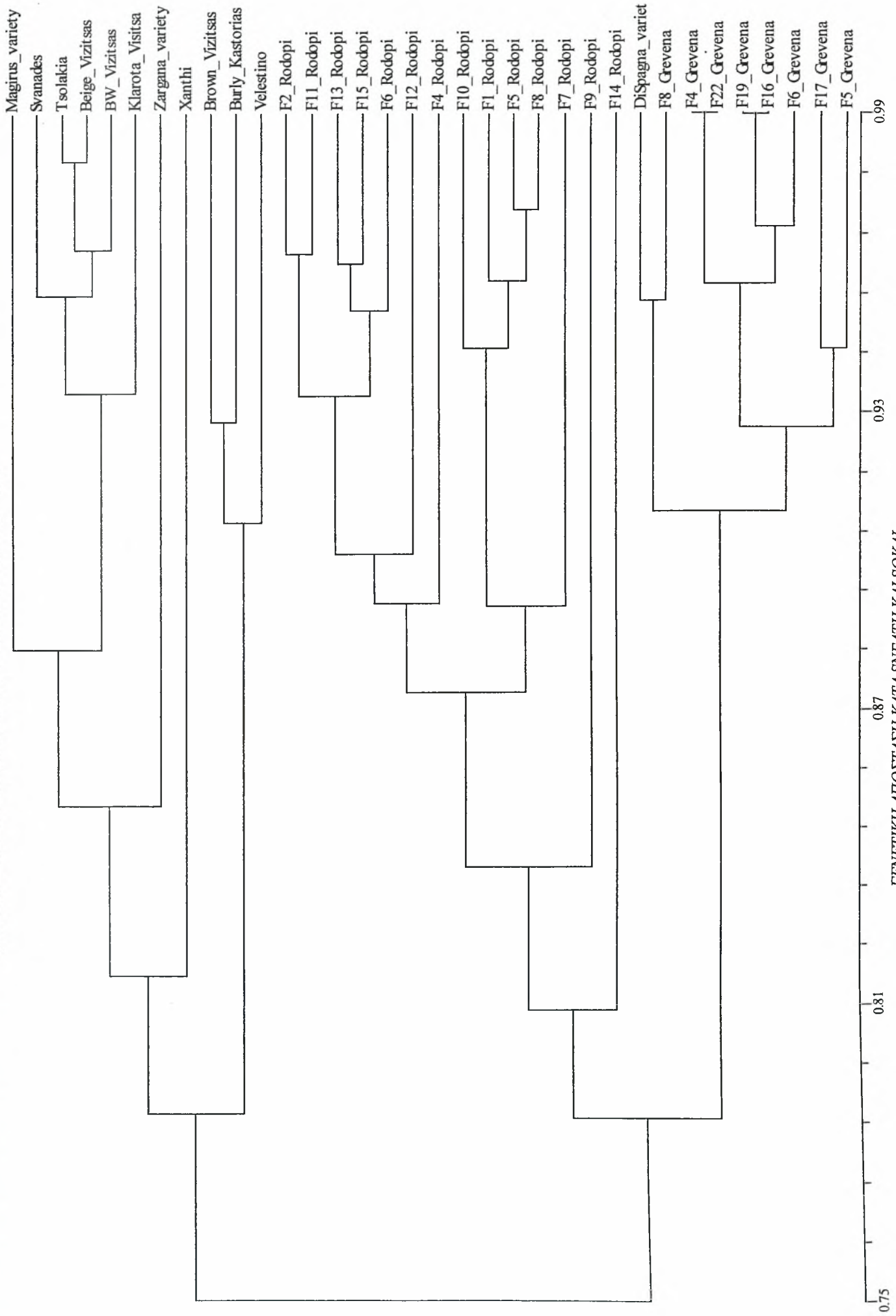
του συντελεστή MxComp που έδωσαν όλοι οι συνδυασμοί των μεθόδων υπολογισμού των φυλογενετικών σχέσεων, επιλέχθηκε τελικά ο υπολογισμός των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των έντεκα πληθυσμών του πειράματος να γίνει σύμφωνα με τον JACCARD / UPGMA αλγόριθμο (Πίν. 4.4).

Πίνακας 4.4 : Βαθμός συσχέτισης των φυλογενετικών σχέσεων με τα μοριακά δεδομένα

Μέθοδος υπολογισμού των φυλογενετικών σχέσεων	Τιμή MxComp
DICE-NEIGHBORJOIN	0,78
JACKARD-NEIGHBORJOIN	0,80
DICE-UPGMA	0,88
JACKARD-UPGMA	0,9

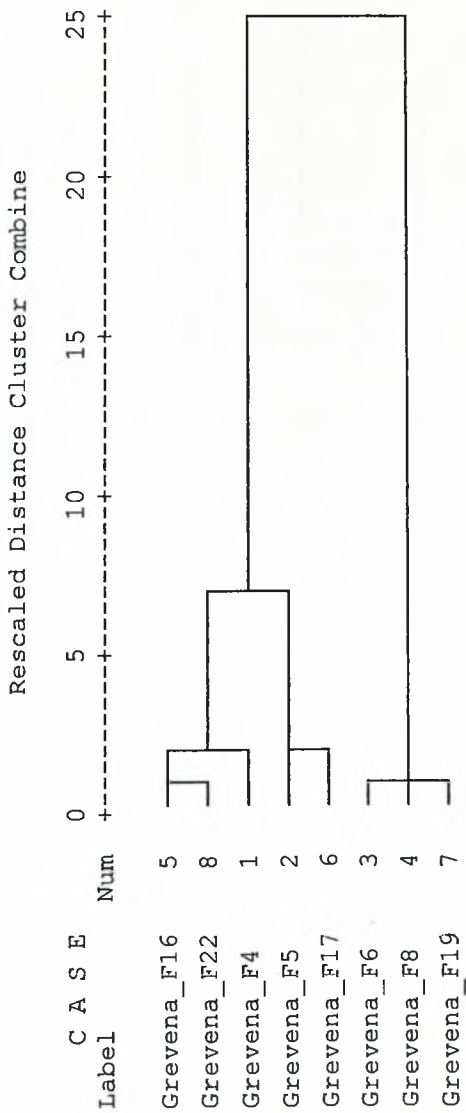
4.3.1 Ομαδοποίηση των έντεκα πληθυσμών με βάση την αγρονομική συμπεριφορά τους.

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της αγρονομικής συμπεριφοράς των έντεκα πληθυσμών στον αγρό, αξιοποιήθηκαν για να ομαδοποιηθούν αυτοί με βάση την τελική απόδοση, τη πρωιμότητα στην άνθιση και τη πρωιμότητα στην καρποφορία (Πίν. 4.5). Η ανάλυση έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS με βάση την ιεραρχική μέθοδο και αποσκοπούσε στο να συγκριθούν οι δύο μέθοδοι ομαδοποίησης των γενοτύπων (φυλογενετική ανάλυση με βάση γενετικά δεδομένα και ιεραρχική ομαδοποίηση με βάση αγρονομική συμπεριφορά). Τυχόν συμφωνία των δύο μεθόδων κατάταξης θα αποτελούσε ένα ισχυρό οδηγό αναφορικά με την επιλογή των νέων γενοτύπων. Βρέθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα αποτελέσματα των δύο



* * * * * H I E R A R C H I C A L C L U S T E R A N A L Y S I S * * * * *

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



Πίνακας 4.5 : Αποτελέσματα σχετικά με την αγρονομική συμπεριφορά των οικογενειών του πληθυσμού των Γρεβενών

Οικογένειες πληθυσμού Γρεβενών	Τελική απόδοση σε γρ./φυτό (Μ.Ο ± Τ.Α)	Χρονικό διάστημα μέχρι την εμφάνιση του 1 ^{ου} άνθους (Μ.Ο ημερών ± Τ.Α)	Χρονικό διάστημα μέχρι την εμφάνιση του 1 ^{ου} λοβού (Μ.Ο ημερών ± Τ.Α)
F4 Γρεβενά	654,6 ± 110,1	113,0 ± 0,9	119,0 ± 1,9
F5 Γρεβενά	806,7 ± 75,7	114,0 ± 0,9	120,0 ± 0,5
F6 Γρεβενά	528,8 ± 49,6	113,5 ± 1,2	119,0 ± 0,9
F8 Γρεβενά	516,8 ± 118,5	116,0 ± 0,5	121,0 ± 0,9
F16 Γρεβενά	703,5 ± 15,4	113,0 ± 2,3	119,0 ± 1,9
Γρεβενά F17	765,6 ± 38,8	113,0 ± 0,5	119,0 ± 0,9
Γρεβενά F19	559,0 ± 0,0	114,5 ± 0,2	119,5 ± 0,2
Γρεβενά F22	699,9 ± 41,0	114,0 ± 1,9	119,5 ± 1,6

ΠΗΓΗ : Καλλιμόπουλος, 2004

μεθόδων κυρίως στον πληθυσμό των Γρεβενών. Η ομοφωνία που διαπιστώθηκε συγκεκριμένο πληθυσμό ανέρχεται σε ποσοστό 75 % καθώς έξι από τις οκτώ οικογένειες που τον αποτελούν, ομαδοποιήθηκαν με κοινό τρόπο και με τις δύο μεθόδους.

Αναφορικά με τον μεικτό πληθυσμό Μαγνησίας, Ξάνθης και Καστοριάς δεν υπήρξε ταύτιση αποτελεσμάτων ανάμεσα στις δύο μεθόδους εκτός από την κοινή ομαδοποίηση του πληθυσμού που συλλέχθηκε από την περιοχή της Καστοριάς (Χονδρά Καστοριάς) και ενός από την περιοχή της Βυζίτσας (Καφέ Βυζίτσας). Τέλος αναφορικά με τις οικογένειες του πληθυσμού της Ροδόπης, δεν διαπιστώθηκε ταύτιση σε σημαντικό βαθμό μεταξύ των δύο μεθόδων εκτός από τη μεγάλη γενετική απόσταση ανάμεσα στην οικογένεια 9 και στην οικογένεια 2 που έδειξε η φυλογενετική ανάλυση. Οι ίδιες οικογένειες παρουσίασαν την υψηλότερη τελική αποδόση στον αγρό και εξαιτίας της μεγάλης γενετικής τους απόστασης, επιλέχθηκαν μεταξύ άλλων για την έναρξη βελτιωτικού σχήματος από το εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης φυτών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

V. Συζήτηση και Συμπεράσματα

5.1 Συμπεράσματα αναφορικά με την παραγωγή αντισώματος έναντι του PvLHY παράγοντα.

Παρόλο ότι το πειραματικό μέρος που περιλαμβάνει την παρασκευή αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης PvLHY βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη, κάποια πρώτα συμπεράσματα αναφορικά με τη μεθοδολογία που εφαρμόστηκε μέχρι τώρα, μπορούν να εξαχθούν.

Συμπερασματικά λοιπόν μπορεί να ειπωθεί ότι οι συνθήκες που επικράτησαν κατά την επώαση των καλλιιεργειών και την υπερέκφραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών, έλεγξαν σχεδόν αποκλειστικά τη τύχη αυτών. Καθώς ο βαθμός αποικοδόμησης της χιμαιρικής C₁ πρωτεΐνης απόκλινε σε σημαντικό βαθμό ανάμεσα στις συνθήκες επώασης των δειγμάτων, φαίνεται ότι οι πειραματικές συνθήκες μετά τη λύση της βακτηριακής καλλιέργειας μπόρεσαν να προστατέψουν την ποσότητα της χιμαιρικής πρωτεΐνης που υπερέκφραστηκε. Σε αντίθετη περίπτωση η ένταση της αποικοδόμησης έπρεπε να είναι παρόμοια και στις δύο περιπτώσεις, επισκιάζοντας τις συνθήκες που επικρατούσαν κατά την επώαση ανά περίπτωση.

Εκτός από τη παραγωγή χιμαιρικής πρωτεΐνης και το βαθμό πρωτεόλυσης της η συνθήκη υπερέκφρασης που επιλέχθηκε τελικά για τη C₁ χίμαιρα, επιβεβαιώθηκε ότι ήταν η σωστή και από την ένδειξη που έδωσε ο θετικός μάρτυρας. Η ύπαρξη δύο ζωνών που αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα της αποικοδόμησης της GST πρωτεΐνης στη τυχαία συνθήκη, σε σχέση με την απουσία αντίστοιχων ζωνών κατά την συνθήκη υπερέκφρασης, επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η συγκεκριμένη συνθήκη ευνοεί την πρωτεολυτική αποικοδόμηση της παραγόμενης πρωτεΐνης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η GST πρωτεΐνη θεωρείται ότι είναι ένα σταθερό μόριο καθώς δεν πρωτεολύεται εύκολα στη πλειονότητα των περιπτώσεων. Παράλληλα η παραγωγή περισσότερης GST πρωτεΐνης στην τυχαία συνθήκη και η πρωτεόλυση της σε σχέση με την συνθήκη υπερέκφρασης, φαίνεται ότι επιβεβαιώνουν την ευθέως ανάλογη σχέση των δύο μεγεθών, ενώ αποδεικνύεται ότι η συνθήκη υπερέκφρασης που επιλέχθηκε τελικά, δεν υπερβαίνει το κατώφλι ισορροπίας ανάμεσα στη παραγωγή και στη πρωτεόλυση της C₁ χίμαιρας.

Επιπρόσθετα, όπως αποδείχτηκε και από την απουσία σήματος στο δείγμα στο οποίο δεν προστέθηκε ο παράγοντας IPTG, η έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης έγινε μόνο κατά τη παρουσία του στη καλλιέργεια, ενώ πριν τη προσθήκη του η παρουσία της γλυκόζης στο περιβάλλον των βακτηριακών κυττάρων, μπόρεσε να καταστείλει μέσω του lacI^q γονιδίου, την έκφραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών. Τέλος η συνθήκη υπερέκφρασης της C₁ χιμαιρικής πρωτεΐνης μπόρεσε να παράγει αρκετή ποσότητα από την πρώτη ώρα επαγωγής της καλλιέργειας και να την διατηρήσει στη συνέχεια σταθερή έως και για μια ώρα, χωρίς να παρατηρηθεί αποικοδόμηση.

Η απόδοση της ίδιας συνθήκης υπερέκφρασης στις άλλες δύο χίμαιρες (C₂ και C₁₋₂) φανέρωσε την ευαισθησία του συγκεκριμένου συστήματος. Έτσι με βάση την σύγκριση των αποτελεσμάτων από την υπερέκφραση των C₁, C₂ και C₁₋₂ φάνηκε ότι η πρώτη συνθήκη υπερέκφρασης που θέλει την επώαση της καλλιέργειας με πυκνότητα 0,7 μονάδων απορρόφησης να λαμβάνει χώρα για δύο ώρες στους 25 °C, με προσθήκη του παράγοντα επαγωγής IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,2 mM, κρίθηκε ικανοποιητική μόνο για την παραγωγή των C₁ και C₂ χιμαιρικών πρωτεϊνών καθώς εξασφάλισε ικανοποιητική ποσότητα συνοδευόμενη από ελάχιστα επίπεδα αποικοδόμησης λόγω πρωτεόλυσης στην περίπτωση του C₁ πολυπεπτιδίου και μεγαλύτερα επίπεδα πρωτεόλυσης κατά την υπερέκφραση του C₂ πολυπεπτιδίου.

Η εντονότερη πρωτεόλυση στην δεύτερη περίπτωση φανέρωσε και τις τεχνικές δυσκολίες της συγκεκριμένης διαδικασίας καθώς και το γενικότερο πρόβλημα των μεθοδολογιών που περιλαμβάνουν μεταχείριση πρωτεϊνών, αφού συνήθως είναι δύσκολο να ελεγχθούν οι απώλειες λόγω πρωτεόλυσης κατά την αποθήκευση, ακόμα και αν αυτή γίνει σε συνθήκες που δεν την ευνοούν όπως χαμηλή θερμοκρασία συνοδευόμενη από παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων έναντι ενζύμων (όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη) και αναστολέων πρωτεασών (όπως ο παράγοντας Phenylmethanesulfonyl-saufluorid / PMSF).

Η ανάγκη εύρεσης διαφορετικής συνθήκης για την υπερέκφραση της C₁₋₂ χίμαιρας, φανέρωσε την επίδραση του μεγέθους της χιμαιρικής πρωτεΐνης στην συνθήκη υπερέκφρασης της. Αναφορικά με τις δύο χίμαιρες C₁ και C₂, έγινε εφικτή η παραγωγή όμοιας ποσότητας χιμαιρικής πρωτεΐνης στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και τελικής συγκέντρωσης του παράγοντα επαγωγής IPTG. Ωστόσο όπως φάνηκε, η υπερέκφραση πρωτεΐνης με τριπλάσιο μέγεθος (450 αμινοξέα το C₁₋₂ αντιγόνο έναντι μόλις 150 αμινοξέων για τα αντιγόνα C₁ και C₂) απαιτούσε προσθήκη του παράγοντα επαγωγής έως και 3,5 φορές μεγαλύτερη για να παραχθεί τελικά η ίδια ποσότητα χιμαιρικής πρωτεΐνης.

Σχετικά με το στάδιο της απομόνωσης των χιμαιρικών πρωτεϊνών, συνιστάται εφαρμογή πλύσεων άνω των δεκαπέντε φορές για αποτελεσματική απομάκρυνση των μη ειδικών πρωτεϊνών, όπως φανέρωσε η ηλεκτροφόρηση δείγματος GST θετικού μάρτυρα. Αυτό το επιβεβαιώνει και η παρατήρηση ότι από δείγμα C₁ χιμαιρικής πρωτεΐνης, προσδεδεμένης επί των σφαιριδίων σεφαρόζης 4B της γλουταθειόνης, στο οποίο εφαρμόστηκαν διελεύσεις 10 ml διαλύματος FPL πάνω από 21 φορές, απουσίαζαν πλήρως οι μη ειδικές πρωτεΐνες της βακτηριακής καλλιέργειας. Παράλληλα το φόρτωμα δύο διαφορετικών ποσοτήτων ανά περίπτωση, έδωσε τη δυνατότητα να εκτιμηθούν τυχόν απώλειες σε ειδική πρωτεΐνη κατά το στάδιο των πλυσιμάτων. Όπως διαπιστώθηκε τελικά, ακόμα και εφαρμογή 15 πλυσιμάτων δεν φαίνεται να επηρεάζει την ποσότητα της ειδικής πρωτεΐνης (GST) του δείγματος.

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα που φανερώθηκαν κατά τη δέσμευση και ηλεκτροφόρηση της C₁ χίμαιρας, ήταν προϊόντα από την αποικοδόμηση του ίδιου του πεπτιδίου, τα οποία παρέμειναν προσδεδεμένα επί των σφαιριδίων σεφαρόζης και γι' αυτό και δεν απομακρύνθηκαν μετά τις πλύσεις. Η ξεκάθαρη παρατήρηση τους έγινε εφικτή μετά από χρώση με κουμάση, λόγω της απομάκρυνσης του συνόλου των μη ειδικών πρωτεϊνών του δείγματος. Επιπρόσθετα, όπως φανέρωσε η επαναδημιουργία του GST έπειτα από την αντίδραση αποκοπής της C₁ χιμαιρικής πρωτεΐνης από τον παράγοντα Xa, η αντίδραση εξειδικευμένης πρωτεόλυσης, έγινε με επιτυχία. Η αδυναμία να εντοπιστεί το C₁ αντιγόνο πιθανότατα οφείλεται στο μικρό μέγεθος του καθώς και στην μικρή ποσότητα που φορτώθηκε στη πηκτή πολυακρυλαμίδης σε σχέση με τον όγκο του αρχικού δείγματος.

Στη προσπάθεια να εξηγηθεί η παραπάνω παρατήρηση, αναπτύχθηκαν πολλές θεωρίες. Μια πιθανότητα είναι ότι μετά την αποκοπή του GST, το C₁ αντιγόνο που σχηματίζεται είναι μια μικρή σχετικά πρωτεΐνη (150 αμινοξέα) και ενδέχεται να πρωτεολύεται. Η χιμαιρική GST μορφή του C₁ αντιγόνου, μπορεί να το προστάτευε λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους της, δίνοντας την ευκαιρία για πολυπλοκότερη στερεοχημική διαμόρφωση και προστασία από τις πρωτεάσες. Ωστόσο μια τέτοια εξήγηση δεν φαίνεται να είναι απόλυτα ικανοποιητική. Μια άλλη πιθανότητα είναι η αντίδραση αποκοπής του GST να μην έγινε σε μεγάλο βαθμό ή και καθόλου. Σε αυτή την περίπτωση, ούτε τα εναπομείναντα μη πρωτεολυμένα μόρια της C₁ χίμαιρας, ούτε τα GST χιμαιρικά προϊόντα της μη ειδικής πρωτεόλυσης της αλλά ούτε τα μόρια GST που επανασηματίστηκαν από την αποκοπή, θα μπορούσαν να περάσουν το φίλτρο

διότι όλα θα ήταν προσδεδεμένα στα σφαιρίδια σεφαρόζης. Η μικρή ποσότητα αντιγόνου που θα προέκυπτε από την μικρής κλίμακας αποκοπή, δεν θα επαρκούσε για να δώσει ειδικό σήμα στην πηκτή καθώς θα ήταν κάτω από το όριο διακριτικής ικανότητας της μεθόδου. Ωστόσο όπως διαπιστώθηκε, η αντίδραση αποκοπής έγινε σε ικανοποιητικό βαθμό.

Η καθολική απουσία του C₁ αντιγόνου από όλα τα δείγματα, παρά την διαπίστωση ότι η εξειδικευμένη αντίδραση πρωτεολυτικής αποκοπής του GST από τον παράγοντα Χα έγινε φυσιολογικά, φανέρωσε την αδυναμία των συγκεκριμένων συνθηκών του πειράματος να ανιχνεύσουν το αντιγόνο. Η πιο πιθανή εξήγηση είναι ότι ο όγκος του δείγματος που φορτώθηκε στη πηκτή (10 μl πρωτεΐνης) είναι απειροελάχιστος σε σχέση με τον ολικό όγκο του δείγματος (1 ml). Παρόλο που η C₁ χιμαιρική πρωτεΐνη υπερεκφράστηκε, η συγκέντρωση της σε τελικό όγκο 1 ml παραμένει πολύ μικρή και η ποσότητα που φορτώθηκε στη πηκτή φυσιολογικά περιείχε το C₁ αντιγόνο σε συγκέντρωση εκατό φορές μικρότερη όπως προκύπτει από την αναλογία του όγκου που φορτώθηκε στην πηκτή και του αρχικού δείγματος. Σε αυτή την περίπτωση, η εφαρμογή του πρωτοκόλλου συμπύκνωσης πρωτεΐνων με ολονύχτια καταβύθιση παρουσία ακετόνης, υπόσχεται να συμβάλει στη λύση του παραπάνω προβλήματος καθώς δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές απώλειες ολικής πρωτεΐνης κατά την δοκιμή του.

5.2 Συμπεράσματα αναφορικά με την φυλογενετική ανάλυση των έντεκα πληθυσμών του γένους *Phaseolus*.

Η χρήση μοριακών δεικτών και ειδικότερα τύπου RAPD αναφέρεται σε πολλές έρευνες σχετικά με τη Γενετική Βελτίωση του φασολιού. Οι κυριότερες εφαρμογές που αναφέρονται, αφορούν ποιοτικά κυρίως γνωρίσματα όπως ανθεκτικότητα σε ασθένειες. Έτσι οι μοριακοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για να χαρτογραφηθούν γονιδιακές θέσεις που ελέγχουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στον ιό του μωσαϊκού (Johnson *et al.*, 1997), στον άνθρακα (Kelly *et al.*, 1997), στη βακτηριακή σήψη και την σκωρίαση (Jung *et al.*, 1996). Με βάση το γενετικό χάρτη που έχει προταθεί από τον Bassett (1991) και με την βοήθεια πολλών τύπων μοριακών δεικτών, έχουν χαρτογραφηθεί και χαρακτηριστεί πολλές γονιδιακές θέσεις που ελέγχουν ποσοτικά χαρακτηριστικά (QTL's) όπως για πολυγονιδιακή αντίσταση στη βακτηριακή σήψη (Yu *et al.*, 1998), για ανθεκτικότητα στον ιό του κίτρινου μωσαϊκού στο φασόλι (Urrea *et al.*, 1996) αλλά και για ανθεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις, όπως ξηρασία (Schneider *et al.*, 1997).

Τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος έδειξαν ότι η φυλογενετική ανάλυση των δύο ειδών (*Phaseolus vulgaris* και *Phaseolus coccineus*) βασισμένη στο μοριακό πολυμορφικό πρότυπο που έδωσαν οι δεκαπέντε (15) εκκινητές τύπου RAPD που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν επαρκής για να ξεχωρίσει και σε μοριακό επίπεδο τα δύο προαναφερθέντα είδη. Αυτό συμφωνεί και με άλλες μελέτες που αναφέρουν τη χρήση μοριακών δεικτών τύπου RAPD's στο φασόλι για την διάκριση ειδών αλλά και πληθυσμών (Beebe *et al.*, 1995). Σύμφωνα με το φυλογενετικό δένδρο, εμφανίζονται δύο βασικά ομοειδή σύμπλοκα (clusters). Το πρώτο ομοειδές σύνολο ομαδοποιεί το σύνολο των πληθυσμών της περιοχής Μαγνησίας καθώς και τους πληθυσμούς της Ξάνθης, και της Καστοριάς. Το δεύτερο ομοειδές σύνολο διαχωρίζεται περαιτέρω σε δύο βασικά ομοειδή υποσύνολα που αντιπροσωπεύουν τους πληθυσμούς της Ροδόπης και των Γρεβενών.

Αναφορικά με το ομοειδές υποσύνολο του αυτογονιμοποιούμενου είδους *Phaseolus vulgaris* που αντιπροσωπεύει τις οικογένειες του πληθυσμού της Ροδόπης,

παρατηρείται μια ενδοπληθυσμιακή ομαδοποίηση. Συγκεκριμένα το πολυμορφικό μοριακό πρότυπο αυτού του πληθυσμού ομαδοποίησε σε δύο βασικά ομοειδή σύνολα τις οικογένειες του πληθυσμού (το πρώτο αποτελείται από 7 οικογένειες και το δεύτερο από 5) ενώ δύο οικογένειες (F9 και F14) που ανήκουν στο συγκεκριμένο πληθυσμό ομαδοποιούνται ανεξάρτητα από τα παραπάνω ομοειδή σύνολα, φανερώνοντας μια διαφοροποίηση τους σε σχέση με τον πληθυσμό.

Στην περίπτωση των δύο οικογενειών (F9 και F14) του πληθυσμού της Ροδόπης, που ανεξαρτητοποιούνται από τα δύο βασικά ομοειδή υποσύνολα στα οποία κατατάσσονται οι υπόλοιπες οικογένειες, μπορεί να ειπωθεί ότι προήλθαν και συνεπώς αντιπροσωπεύουν δύο μη τυπικούς γενότυπους του πληθυσμού στον οποίο φαίνονταν έως τώρα ότι ανήκουν. Παράλληλα η ιεραρχική ομαδοποίηση με βάση τις παρατηρήσεις αγρού, έδειξε μεγάλη γενετική απόσταση ανάμεσα στις οικογένειες F9 και F2. Οι ίδιες οικογένειες επιλέχθηκαν για τον επόμενο βελτιωτικό κύκλο λόγω της υψηλής τελικής απόδοσης που εμφάνισαν. Η μεγάλη γενετική τους απόσταση σε συνδυασμό με την υψηλή παραγωγικότητα που αυτές εμφανίζουν, ίσως αποτελέσει προπομπό εμφάνισης ετέρωσης στους απογόνους που θα προκύψουν από την τεχνητή τους διασταύρωση.

Σχετικά με το ομοειδές υποσύνολο του σταυρογονιμοποιούμενου είδους *Phaseolus coccineus* που αντιστοιχεί στον πληθυσμό των Γρεβενών, το μοριακό πολυμορφικό πρότυπο των 15 εκκινήτων που εξετάστηκαν, φανέρωσε αντίστοιχες ομαδοποιήσεις κατά την φυλογενετική ανάλυση. Συγκεκριμένα 5 οικογένειες του συγκεκριμένου πληθυσμού, ομαδοποιούνται σε ένα ομοειδές υποσύνολο και μάλιστα φανερώνουν αρκετά στενή συγγένεια μεταξύ τους, ενώ 2 οικογένειες σχηματίζουν ανεξάρτητο ομοειδές σύνολο και μία διαχωρίζεται εντελώς από όλες τις άλλες. Το υψηλό ποσοστό ομοφωνίας με την μοριακή ανάλυση, που παρατηρήθηκε κατά την ομαδοποίηση των ίδιων οικογενειών με δεδομένα αγρού, ενισχύει το συγγενικό πρότυπο των οικογενειών του πληθυσμού στο οποίο κατέλειξε η φυλογενετική ανάλυση.

Καθώς το είδος *Phaseolus coccineus* είναι σταυρογονιμοποιούμενο, μπορεί να ειπωθεί ότι οι ανεξάρτητες συγγενικές σχέσεις μεταξύ των οικογενειών εντός του πληθυσμού των Γρεβενών, όπως φανερώθηκαν από το πολυμορφικό μοριακό τους πρότυπο, υποδηλώνουν ότι ο συγκεκριμένος πληθυσμός αποτελείται από ημι-συγγενικές οικογένειες (Half-Sib) στενής γενετικής βάσης. Η συμφωνία μοριακών δεδομένων με παρατηρήσεις αγρού, θα οδηγήσει σε μια αντικειμενική επιλογή των καλύτερων οικογενειών από αυτόν τον πληθυσμό. Σύνδεση δεδομένων από ανάλυση με βάση γενετικούς δείκτες και μορφολογικές παρατηρήσεις έχει αναφερθεί με επιτυχία στο φασόλι (*Singh et al., 1988*).

Αναφορικά με τους υπόλοιπους πληθυσμούς των περιοχών Μαγνησίας, Ξάνθης και Καστοριάς που επίσης ανήκουν στο αυτογονιμοποιούμενο είδος *Phaseolus vulgaris*, αυτοί ομαδοποιούνται σε δύο βασικά ομοειδή υποσύνολα. Το πρώτο περιλαμβάνει τους πληθυσμούς Σβανάδες, Τσολάκια, Μπεζ Βυζίτσας, Ασπρόμαυρα Βυζίτσας και Κλαρωτα Βυζίτσας. Όλοι αυτοί οι πληθυσμοί έχουν συγκεντρωθεί από την ίδια γεωγραφική περιοχή (Μαγνησία) και αυτό εξηγεί την κοινή τους ομαδοποίηση. Στη συνέχεια ο πληθυσμός της Ξάνθης ομαδοποιήθηκε ανεξάρτητα από τους υπόλοιπους, κάτι το οποίο πιθανότατα υποδηλώνει το ότι αυτός ο πληθυσμός εξελίχθηκε ανεξάρτητα από τους άλλους, λόγω της γεωγραφικής του απομόνωσης.

Αυτό που επίσης είναι ενδιαφέρον, είναι η ομαδοποίηση που παρατηρείται ανάμεσα στους πληθυσμούς των περιοχών Καφετί Βυζίτσας, Χονδρά Καστοριάς και Βελεστίνου. Τόσο ο πληθυσμός Καφετί Βυζίτσας όσο και ο πληθυσμός από την περιοχή του Βελεστίνου, ανήκουν γεωγραφικά στον νομό Μαγνησίας και αυτό εξηγεί

VI. Προοπτικές

6.1 Προοπτικές που ανοίγει η παρασκευή αντισώματος έναντι του PnLHY παράγοντα

Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων της PnLHY πρωτεΐνης με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες στο φασόλι αναμένεται με ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς η μέχρι τώρα έρευνα στο είδος *Arabidopsis thaliana* έχει επιβεβαιώσει τον καθοριστικό ρόλο αυτού του είδους των αλληλεπιδράσεων στην εύρυθμη λειτουργία του κίρκαδικού ρολογιού. Παράλληλα όπως έχει ήδη αναφερθεί στο εισαγωγικό μέρος, η παρουσία ή απουσία φωτός εκτός του ελέγχου που ασκεί στη μεταγραφή κάποιων παραγόντων του ρολογιού (*LHY*, *CCA1* καθώς και οι φωτοϋποδοχείς ή ο παράγοντας *ELF3*) μέσω ρύθμισης της έκφρασης των στοιχείων του κεντρικού ταλαντωτή, δύναται να επηρεάσει την σταθερότητα κάποιων άλλων πρωτεϊνικών παραγόντων (για παράδειγμα η σκοτοεξαρτώμενη σηματοδότηση της αποικοδόμησης της TOC1 πρωτεΐνης από τον παράγοντα *ZLT*).

Συνεπώς το είδος της αποικοδόμησης της PnLHY πρωτεΐνης, η κινητική της και οι συνθήκες υπό τις οποίες θα εκδηλωθεί αυτή, θα καθορίσουν άμεσα το μεταγραφικό πρότυπο των γονιδίων στόχων του μεταγραφικού παράγοντα καθώς θα επηρεάσουν την ακριβή φάση του κίρκαδικού κύκλου στην οποία θα σημειωθούν τα μέγιστα επίπεδα mRNA των τελευταίων. Ήδη αναφέρθηκε μια διαφορά μεταξύ του *Arabidopsis thaliana* και του *Phaseolus vulgaris* αναφορικά με το είδος της κινητικής της επίτευξης των μεγίστων επιπέδων των PnLHY μηνυμάτων μετά από επίδραση φωτεινού ερεθίσματος σε συγκεκριμένη φάση προϋπάρχοντος ρυθμού. Αντίστοιχες διαφορές μπορεί να παρουσιάζει και το μεταφραστικό πρότυπο του παράγοντα στα δύο είδη.

Τα παραπάνω έρχονται να συμπληρώσουν έναν ήδη περιορισμένο γνωστικό ορίζοντα σε αυτόν τον τομέα του κίρκαδικού ρολογιού στο είδος *Arabidopsis thaliana* (μεταφραστικό πρότυπο και αλληλεπιδράσεις της LHY πρωτεΐνης) ο οποίος διαφωτίστηκε ως ένα βαθμό, πολύ πρόσφατα από μια μελέτη ερευνητών του εργαστηρίου της Isabelle Carre (*Kim et al., 2003*), ενώ παράλληλα συνοδεύεται από μια μόνο μελέτη των παραγόντων ρύθμισης του μεταγραφικού προτύπου του ορθόλογου μεταγραφικού παράγοντα PnLHY στο φασόλι (*Kaldis et al., 2003*) και από παντελή έλλειψη πειραματικών δεδομένων σχετικά με το μεταφραστικό πρότυπο και τυχόν μεταφραστικά επίπεδα ελέγχου του εν λόγω παράγοντα στο ίδιο φυτικό είδος.

Σε τέτοιου είδους μελέτες, το αντίσωμα αναμένεται να πρωταγωνιστεί καθώς θα επιτρέψει τη παρακολούθηση του μεταφραστικού προτύπου της PnLHY πρωτεΐνης και θα δώσει στοιχεία αναφορικά με τις συνθήκες αποικοδόμησης της (μελέτη μεταφραστικού προτύπου, κινητική της αποικοδόμησης, σταθερότητα αυτής κ.α., Western blotting). Επιπροσθέτως θα γίνει εφικτή η μελέτη της αλληλεπίδρασης της PnLHY πρωτεΐνης με άλλες πρωτεΐνες (π.χ κινάσες) ενώ θα διερευνηθούν τυχόν αλληλεπιδράσεις τόσο με trans παράγοντες της μεταγραφής άλλων γονιδιακών τόπων όσο και με τα cis ρυθμιστικά στοιχεία αυτών (Co-immunoprecipitation assays).

Επιπλέον θα μπορέσει να διαλευκανθεί τυχόν γενικότερη εμπλοκή του κίρκαδικού ρολογιού στην κληρονομούμενη επιγενετική ρύθμιση των γονιδιακών προγραμμάτων έκφρασης του φυτικού κυττάρου μέσω των μεταπτώσεων ευχρωματίνης σε ετεροχρωματίνη (Chromatin Immunoprecipitation). Οι μεταπτώσεις αυτές στους ευκαρυώτες κυβερνώνται από μεθυλιώσεις ή/και αποακετυλιώσεις των ιστονών στις μεταγραφικά ανενεργές περιοχές της ετεροχρωματίνης και σε κύτταρα θηλαστικών έχει ήδη παρατηρηθεί κίρκαδικά ελεγχόμενη ακετυλίωση ιστονών (*Etchegaray et al., 2003*).

6.2 Η εφαρμογή της φυλογενετικής ανάλυσης σε μελλοντικά βελτιωτικά σχήματα σε είδη του γένους *Phaseolus*.

Η φυλογενετική ανάλυση των έντεκα πληθυσμών του γένους *Phaseolus* η οποία στηρίζεται σε μοριακά δεδομένα, αναμένεται να δώσει πολλά στοιχεία τόσο για την σημερινή κατάσταση των φυσικών πληθυσμών όσο και για την προέλευση αυτών. Η μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των πληθυσμών θα αποτελέσει ένα επιπλέον εργαλείο σε μελλοντικές τεχνητές διασταυρώσεις αυτών, ειδικά στην περίπτωση του σταυρογονιμοποιούμενου είδους *Phaseolus coccineus*. Με βάση την ευθέως ανάλογη σχέση που παρατηρείται ανάμεσα στην εμφάνιση ετερωτικών φαινομένων στον απόγονο μιας διασταύρωσης και στο βαθμό συγγένειας των δύο πατρικών γενοτύπων αυτού, όσο μεγαλύτερη είναι η γενετική απόσταση δύο πατρικών γενωμάτων τόσο μεγαλύτερη αναμένεται να είναι και η ετέρωση του απογόνου τους. Τέλος η ανάλυση των σημερινών φυλογενετικών σχέσεων αυτών των πληθυσμών μπορεί άμεσα να παρέχει συμπεράσματα για την τύχη και μετακίνηση κάποιων εξ αυτών κατά το παρελθόν μέσω του εμπορίου.

Βραχυπρόθεσμα, ο υπολογισμός των γενετικών παραμέτρων ενός πληθυσμού όπως η γενετική του παραλλακτικότητα, μπορεί να συνδυαστεί και με τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης των γενοτύπων που τον αποτελούν. Ανάλογος συνδυασμός έχει αναφερθεί σε μελέτες που έχουν ήδη γίνει στο φασόλι (*Beede et al., 1995*). Μελλοντικά τυχόν συσχέτιση ανάμεσα στις παρατηρήσεις της αξιολόγησης στο χωράφι και στις φυλογενετικές σχέσεις που θα υποδείξει η μοριακή ανάλυση του γενώματος, μπορεί να δώσει στοιχεία και σε μοριακό επίπεδο αναφορικά με τον τρόπο κληρονομίας κάποιων επιθυμητών χαρακτηριστικών στους συγκεκριμένους πληθυσμούς, αξιολογώντας έτσι την πρόοδο επιλογής. Έτσι ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων από τον φυλογενετικό έλεγχο αλλά και την συμπεριφορά στο χωράφι ανά γενεά επιλογής, μπορεί μεσοπρόθεσμα να έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη πρόοδο επιλογής επιταχύνοντας την πορεία δημιουργίας των μελλοντικών ποικιλιών και συντομεύοντας το χρόνο απελευθέρωσης τους στο μισό, ενώ μακροπρόθεσμα μπορεί να οδηγήσει στα πλέον σύγχρονα βελτιωτικά σχήματα μέσω της χρωμοσωμικής χαρτογράφησης των επιθυμητών χαρακτηριστικών (Quantative Trait Loci Analysis, Marker Assisted Selection και Marker Assisted Backcrossing Breeding).

Σε αυτή την περίπτωση οι ημικυρίαρχου τύπου RAPD μοριακοί δείκτες, μπορούν με κλωνοποίηση και αλληλούχιση των υψηλά και σταθερά πολυμορφικών περιοχών του γενώματος που θα φανερώσουν, να αναβαθμιστούν στους κυρίαρχου τύπου μοριακούς δείκτες SCAR's. Ο απώτερος σκοπός θα είναι ο συνδυασμός τους και με άλλους κυρίαρχου τύπου μοριακούς δείκτες (SSR's και RFLP's) αποτελώντας έτσι ένα χρήσιμο εργαλείο στη διαδικασία διάκρισης, τυποποίησης και αναγνώρισης των μελλοντικών καλλιεργούμενων ποικιλιών, καθώς σε αυτή τη περίπτωση ο συνδυασμός των μοριακών προτύπων από την ανάλυση πολλών αντιπροσωπευτικών γενοτύπων μιας ποικιλίας θα μετατραπεί σε ένα είδος μοριακής ταυτότητας για αυτήν.

6.3 Μελλοντικές προοπτικές που προκύπτουν μετά από σύνδεση των αποτελεσμάτων

Σημαντικές προοπτικές στη βελτίωση μιας ποικιλίας φασολιού μπορεί να προκύψουν με μια πιθανή σύνδεση των αποτελεσμάτων των δύο παραπάνω πειραμάτων στο απώτερο μέλλον. Με δεδομένο τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει το κिरκαδικό ρολόι στην γενικότερη ευρωστία του φυτού, μια επιλογή

στα πλαίσια βελτιωτικών προγραμμάτων βασισμένη και στην ομοιομορφία των κिरκαδικών προτύπων έκφρασης, θα μπορούσε να συνεπάγεται αντίστοιχη ομοιομορφία στην ικανότητα εκμετάλλευσης της ηλιακής ενέργειας, πιο ομοιόμορφη φωτοσυνθετική αποδοτικότητα και τελικά πιο ομοιόμορφη τελική απόδοση μεταξύ των φυτών της καλλιέργειας.

Φυσικά το θέμα της απόδοσης είναι ένα ποσοτικό γνώρισμα που ελέγχεται από πολλές γονιδιακές θέσεις και επηρεάζεται από παράγοντες του περιβάλλοντος (λόγου χάριν άρδευση, λίπανση). Επιπροσθέτως ο PnLHY παράγοντας όσο σημαντικός και αν είναι, δεν παύει να παραμένει ένα πόνι στη σκακίερα που λέγεται κिरκαδικό ρολόι στο είδος *Phaseolus vulgaris*. Ωστόσο η γνώση από αντίστοιχες μελέτες και άλλων σημαντικών παραγόντων του κिरκαδικού ρολογιού μπορεί να αξιοποιηθεί στη βελτίωση των φυτών όπως περιγράφηκε πιο πάνω, υπό την προϋπόθεση ότι μια ομοιομορφία στην έκφραση κομβικών κिरκαδικών γονιδίων θα συνεπάγεται αντίστοιχη ομοιομορφία στην φωτοσυνθετική απόδοση μεταξύ των φυτών μιας καλλιέργειας. Έτσι ίσως για πρώτη φορά δώσει η ευκαιρία να συμπεριληφθεί στη δημιουργία ενός γενοτύπου ο έλεγχος ενός σημαντικού παράγοντα, όπως είναι το φώς, που επηρεάζει την τελική απόδοση και την ευρωστία του φυτού.

Πώς μπορούν όμως τα παραπάνω να συνδυαστούν ώστε να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα ενός βελτιωτικού προγράμματος ; Σε πρώτη φάση η φυλογενετική ανάλυση των γενοτύπων που αποτελούν ένα φυσικό πληθυσμό, βασισμένη σε δεδομένα από μοριακούς δείκτες, θα φανερώσει τις συγγενικές σχέσεις ανάμεσα στα άτομα τον αποτελούν, μέσω της κοινής ομαδοποίησης γενοτύπων των οποίων το γένωμα παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες. Η κλωνοποίηση συγκεκριμένων υψηλά και σταθερά πολυμορφικών γονιδιακών θέσεων θα αναγάγει όσους ημικυρίαρχους μοριακούς δείκτες χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό τους, σε κυριαρχικούς. Εν συνεχεία, προσθήκη και άλλων τύπων κυρίαρχων μοριακών δεικτών θα αυξήσει την πυκνότητα ανίχνευσης των πολυμορφικών περιοχών του γενώματος.

Η μελέτη των γενετικών σχέσεων μεταξύ των πληθυσμών σε συνδυασμό με τα αγρονομικά τους γνωρίσματα, θα βοηθήσει στην επιλογή των γονέων που θα συμμετέχουν στις διασταυρώσεις έναρξης για την ανάπτυξη νέων βελτιωτικών προγραμμάτων. Παράλληλα θα αναπτυχθεί η δυνατότητα χρήσης ενός επιπλέον μοριακού δείκτη (*PnLHY*) του οποίου η συμβολή μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα αποφασιστική για την μελέτη της παραγωγής, της συμπεριφοράς αλλά και της προσαρμοστικότητας των νεοαναπτυσσόμενων ποικιλιών φασολιού.

Ειδικά για την περίπτωση των φυλογενετικών σχέσεων, αυτές μπορούν να συγκρίνονται μεταξύ τους σε κάθε κύκλο επιλογής με σκοπό να εκτιμάται και σε μοριακό επίπεδο το εύρος της γενετικής παραλλακτικότητας που απομένει στον πληθυσμό ενώ τα δένδρογράμματα με βάση την αγρονομική συμπεριφορά θα μπορούν να επιβεβαιώσουν την πρόοδο επιλογής που θα προβλέπει η στατιστική ανάλυση των δεδομένων από τον αγρό. Απώτερος σκοπός θα είναι η χρωμοσωμική χαρτογράφηση ποσοτικών γνωρισμάτων (QTL-Quantative Trait Loci) και η υποβοηθούμενη με μοριακούς δείκτες, επιλογή.

Η ανοσοαποτύπωση γενοτύπων προσαρμοσμένων σε διαφορετικές συνθήκες αναφορικά με τη φωτοπερίοδο, με τη χρήση του αντισώματος έναντι του PnLHY παράγοντα θα μπορούσε να συμβάλει στη βασική έρευνα καθώς έτσι θα γίνει εφικτή η μελέτη της συμβολής του στη εναρμόνιση της φυσιολογίας των φυτών σε διαφορετικές φωτοπεριόδους. Σε συνδυασμό με αντισώματα έναντι άλλων σημαντικών παραγόντων του κिरκαδικού ρολογιού στο φασόλι, το PnLHY αντίσωμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και στην εφαρμοσμένη έρευνα για να γίνει αρχικά

ένας έλεγχος με σκοπό την κατάταξη σε μοριακό επίπεδο των γενοτύπων που αποτελούν ένα φυσικό πληθυσμό με κριτήριο την ομοιομορφία στις κερκαδικές ταλαντώσεις τους που αντανακλά και αντίστοιχη ομοιομορφία στη λειτουργία του βιολογικού ρολογιού.

Στη συνέχεια αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να συνδυαστούν με εκείνα που θα προκύψουν από την αξιολόγηση της αγρονομικής αξίας των νέων ποικιλιών στον αγρό, με σκοπό να επιλεγούν γενότυποι με αυξημένη φωτοσυνθετική ικανότητα, καλή προσαρμογή στις αλλαγές της φωτοπεριόδου αλλά και ταχύτερη αξιοποίηση των φωτοσυνθετικών προϊόντων. Τέλος αν αποκαλυφθεί στο φασόλι ο ακριβής έλεγχος σε μοριακό επίπεδο, που ασκεί το κερκαδικό ρολόι στη μεταβάση από το βλαστικό στο αναπαραγωγικό στάδιο (όπως έχει ήδη γίνει σε σημαντικό βαθμό στο είδος *Arabidopsis thaliana*) θα είναι πλέον δυνατή με την βοήθεια και των μοριακών δεικτών, η γενετική ανάλυση με σκοπό την ανίχνευση και επιλογή πρώιμων γενοτύπων, γεγονός που θα οδηγήσει στη σύντμηση του χρόνου που απαιτεί η αξιολόγηση του ίδιου χαρακτηριστικού στον αγρό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής έγινε μια προετοιμασία με σκοπό τη παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης PnLHY που κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο στη κερκαδική ρύθμιση του είδους *Phaseolus vulgaris*. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν δεκαπέντε ημικυρίαρχοι μοριακοί δείκτες τύπου RAPD για τη φυλογενετική ανάλυση των γενοτύπων που αντιπροσωπεύουν δέκα τοπικούς πληθυσμούς του αυτογονιμοποιούμενου είδους *Phaseolus vulgaris* και ενός που ανήκει στο σταυρογονιμοποιούμενο είδος *Phaseolus coccineus*. Τα αποτελέσματα της μοριακής φυλογενετικής ανάλυσης συγκρίθηκαν με τα εκείνα που προέκυψαν από την ομαδοποίηση των ίδιων γενοτύπων με βάση την αγρονομική αξιολόγηση τους με έμφαση στα χαρακτηριστικά της τελικής απόδοσης και της πρωϊμότητας στην άνθιση και στον σχηματισμό λοβών.

Αναφορικά με το πρώτο σκέλος της διατριβής, έγινε εφικτή η υπογενωμική κλωνοποίηση συνολικά τριών υψηλά υδρόφιλων περιοχών της PnLHY πρωτεΐνης σε πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης. Επιπρόσθετα οι τρεις GST χμαιρικές πρωτεΐνες που προέκυψαν, υπερεκφράστηκαν με επιτυχία σε βακτηριακά κύτταρα του στελέχους BL-21 της *E. coli* ακολουθώντας δύο διαφορετικές συνθήκες υπερέκφρασης. Εν συνεχεία έγινε επιτυχής αποκοπή του C₁ αντιγόνου από τη GST χμαιρική μορφή του έπειτα από εξειδικευμένη πρωτεόλυση με τη χρήση του παράγοντα Χα. Την αδυναμία εντοπισμού του C₁ αντιγόνου έπειτα από την αποκοπή του, φιλοδοξεί να υπερκεράσει η συμπύκνωση των δειγμάτων έπειτα από καταβύθιση παρουσία ακετόνης.

Κατά τη φυλογενετική ανάλυση των έντεκα πληθυσμών, έγινε εφικτός ο διαχωρισμός των δύο ειδών. Ο πληθυσμός της Ροδόπης που ανήκει στο *Phaseolus vulgaris* ομαδοποιήθηκε σε δύο βασικά ομοειδή υποσύνολα, ενώ προέκυψαν και δύο μη τυπικοί γενότυποι που ομαδοποιήθηκαν με ανεξάρτητο τρόπο από τους υπόλοιπους. Το είδος της στρωμάτωσης του συγκεκριμένου πληθυσμού φανερώνει ότι αυτός πιθανότατα προήλθε από δύο συγγενικούς προγονικούς γενότυπους, η αυτογονιμοποίηση των οποίων έδωσε τις δύο συγγενικές καθαρές σειρές που παρατηρήθηκαν. Οι γενότυποι του πληθυσμού των Γρεβενών που ανήκουν στο είδος *Phaseolus coccineus* ομαδοποιήθηκαν σε τρία ομοειδή υποσύνολα, φανερώνοντας ότι ο συγκεκριμένος πληθυσμός αποτελείται από ένα μείγμα ετεροθαλλικών οικογενειών στενής γενετικής βάσης.

Οι πληθυσμοί του είδους *Phaseolus vulgaris* που προέρχονται γεωγραφικά από την περιοχή της Μαγνησίας ομαδοποιήθηκαν με κοινό τρόπο. Εξάιρεση αποτελεί ο πληθυσμός Καφετί Βυζίτσας που ομαδοποιήθηκε μαζί με τους πληθυσμούς Χονδρά Καστοριάς και Βελεστίνου, υποδηλώνοντας πιθανότατα μια κοινή καταγωγή των τριών παρότι αυτοί είναι γεωγραφικά απομονωμένοι. Αναφορικά με την σύγκριση των αποτελεσμάτων της μοριακής φυλογενετικής ανάλυσης και της ομαδοποίησης με βάση την αγρονομική αξιολόγηση των παραπάνω γενοτύπων, υψηλή ταύτιση μεταξύ των δύο μεθόδων σημειώθηκε μόνο στους γενοτύπους του πληθυσμού των Γρεβενών όπου το ποσοστό συμφωνίας των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων ήταν της τάξης του 75 %.

Τα αντισώματα έναντι της PnLHY πρωτεΐνης, θα χρησιμοποιηθούν μελλοντικά με σκοπό να κατανοηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό η συμβολή του συγκεκριμένου παράγοντα στο βιολογικό ρολόι του είδους *Phaseolus vulgaris*, ενώ παράλληλα η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων του εν λόγω παράγοντα με άλλα στοιχεία του

ρολογιού θα φανερώσει σημαντικές πτυχές της κερκαδικής ρύθμισης στο άνωθεν καλλιεργούμενο είδος.

Η φυλογενετική ανάλυση με βάση μοριακά δεδομένα φαίνεται ότι παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα και είναι δυνατός ένας επικουρικός ρόλος της σε μελλοντικά βελτιωτικά προγράμματα. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων τέτοιων μελετών με αναλύσεις δεδομένων αγρού θα παρέχει αντικειμενικότερη και πιο αξιόπιστη επιλογή των γενοτύπων που θα προκρίνονται στα πλαίσια μελλοντικών βελτιωτικών προγραμμάτων ενώ μια ενδεδειγμένη μοριακή σάρωση του γενώματος με πολλούς τύπους μοριακών δεκτών θα ανοίξει πολλές προοπτικές για εφαρμογή της σύγχρονης μεθοδολογίας της γενετικής βελτίωσης στο είδος και θα αποτελέσει *a priori* ένα είδος μοριακής ταυτότητας για τις καλλιεργούμενες ποικιλίες που πρόκειται να δημιουργηθούν και με την συμβολή αυτής.

Η αξιοποίηση και συνδυασμός της μελέτης της PnLHY πρωτεΐνης και άλλων στοιχείων του κερκαδικού ρολογιού στο φασόλι με τη βοήθεια αντισωμάτων, με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω σχετικά με τη βελτίωση στο ίδιο είδος θα κάνει εφικτή για πρώτη φορά την εισαγωγή του φωτός, ενός παράγοντα που συμμετέχει καθοριστικά στην ευρωστία των φυτών, στον σχεδιασμό των μελλοντικών γενοτύπων. Την σημασία αυτού του εγχειρήματος υπογράφει ο ρόλος του κερκαδικού ρολογιού για τους οργανισμούς καθώς αποτελεί έναν ενδογενή μηχανισμό καταγραφής του χρόνου, ο οποίος εν είδει “μαέστρου” συντονίζει πλήθος φυσιολογικών λειτουργιών με τις περιοδικές εναλλαγές φωτός και σκότους κατά την εικοσιτετράωρη περιστροφή της Γης γύρω από τον άξονα της, αυξάνοντας έτσι μεταξύ άλλων τη γενικότερη ευρωστία του φυτού και επιτρέποντας τη βέλτιστη εκμετάλλευση της δεσμευόμενης ενέργειας κατά τη φωτοσύνθεση.

VII. Παράρτημα

ΕΝΟΤΗΤΑ 1 : ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.

7.1.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωμικού DNA (CTAB method)

- Put a suitable amount of CTAB buffer in water bath at 60-65 °C in the fume hood (1 ml/sample are needed). Put the 1,5 ml centrifuge tubes on ice
- Grid 0,1 gr of young leaf tissue in liquid nitrogen.
- Quickly transfer with a spatula and leave in the water bath for 10-15'. On the meantime start with another sample.
- Add 1 ml of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 v/v) made fresh. Invert gently 100 times the tube. (Open the cap at intervals to allow gas leaking). Keep at room temperature until all samples are processed.
- Centrifuge at 6000 rpm for 25-30' at 15-20 °C.
- Under the fume hood, collect the aqueous phase (top phase) into another centrifuge tube, using 1 ml cut tip.
- Add at least 2/3 of the volume of isopropanol and 1/10 of the sample volume K-acetate.(700 µl isopropanol and 100 µl of K-acetate 0,1 M). Swirl gently and put in the freezer at -20 °C for at least 30'.
- Centrifuge at 8.000 rpm for 15 min at 15-20 °C. Dispose the supernatant carefully without removing the DNA pellet.
- Wash twice with 70 % EtOH (1 ml) and 0,1 NH₃-acetate buffer pH 6.0 (100 µl).
- Rinse with absolute EtOH and dry in Speedvac at 37 °C for 10'.
- Add proper volume of TE buffer.
- Add 2 µl of RNase (10 mg/ml stock solution). Overnight at 37 °C.
- The next day, centrifuge at 6000 g for 5' at 0 °C to precipitate DNA. Remove the supernatant carefully.
- Rinse with chilled absolute EtOH. Centrifuge briefly. Dry in speedvac like above.
- Resuspend in proper volume (100 or 200 µl) of TE buffer.

7.1.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης σε μικρή κλίμακα, πλασμιδιακού DNA (Mini Prep.)

- Βάζουμε O/N καλλιέργεια (από single colonie ή από glycerol stock) σε 5-10 ml L.B με **αντιβιοτικό**.
- Φυγοκέντριση 2X από 1,5 ml O/N καλλιέργεια, 5', R.T.
- Πλύσιμο του ιζήματος των κυττάρων με 500 λ STE → vortex → \varnothing → πετάμε το SN.
- Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 200 λ STE → vortex → stand 5', R.T (Room Temp)
- + 200 λ Sol II **ΦΡΕΣΚΟ** → αναποδογυρίζουμε το tube 4-6 φορές και → stand σε R.T μέχρι 5' (**όχι παραπάνω**).
- + 200 λ **COLD** Sol III → αναποδογυρίζουμε το tube 4-6 φορές και → stand σε **πάγο** μέχρι 5' (**όχι παραπάνω**).
- \varnothing , 15-30', 4°C → παίρνουμε το SN πολύ προσεκτικά (με κομμένο tip).
- Προσθέτουμε Rnάση A [τελική 100-200 μg/ml από stock 10 mg/ml], 37°C, 1 h.
- Phenol/CHCl₃ extraction → \varnothing , 5', R.T → παίρνουμε το SN.
- Καταβυθίζουμε το πλασμιδιακό DNA προσθέτοντας 0,6 με 1 όγκους ισοπροπανόλη και → \varnothing , 3', R.T.
- Πλένουμε το ίζημα με 500 λ 70% EtOH → \varnothing → πετάμε SN → ΣΤΕΓΝΩΜΑ → επαναδιαλύουμε σε 30 με 50 λ H₂O.
- Παίρνουμε 6-8 λ για πέψη με ένζυμα περιορισμού.
- ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ: Πλύσιμο σε 1,5 ml STE → \varnothing , πετάμε SN, και ακολούθως 200 λ Sol I (+ 200 λ λυσοζύμη) + 400 λ Sol II → mix .. → + 300 λ Sol III → mix κλπ.

7.1.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης σε μεγάλη κλίμακα πλασμιδιακού DNA (Mini Prep.)

- Βάζουμε O/N καλλιέργεια (από single colonie ή από glycerol stock ή από 1-2 ml καλλιέργειας που είχε γίνει για mini-prep) σε 100-150 ml L.B με **αντιβιοτικό**.
- \varnothing , 4K, 15' (π.χ βάζουμε από 35 ml O/N καλλιέργειας σε 4 tubes με καπάκι και φυγοκεντρούμε στην SS34 στην Sorvall).
- Πλύσιμο του ιζήματος των κυττάρων με STE (π.χ με 7 ml σε κάθε tube, και μετά τα ενώνουμε όλα μαζί) → \varnothing , 4K, 15' → πετάμε το SN.

- Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 3 ml STE → vortex → + 0,3 ml λυσοζύμη (από παγωμένο μία μόνο φορά stock 10 mg/ml σε 10 mM Tris pH 8).
- + 6,5 ml Sol II **ΦΡΕΣΚΟ** → αναποδογυρίζουμε το tube 4-6 φορές και → stand σε R.T μέχρι 5' (**όχι παραπάνω**).
- + 5 ml **COLD Sol III** → αναποδογυρίζουμε το tube 4-6 φορές και → stand σε **πάγο** μέχρι 5' (**όχι παραπάνω**).
- \varnothing , 10 K, 30', 4°C → παίρνουμε 10-15 ml SN πολύ προσεκτικά (με κομμένο tip) → παίρνουμε από **βρεγμένη** τετραπλή γάζα (με χωνάκι).
- Προσθέτουμε Rνάση A [τελική 100-200 $\mu\text{g/ml}$ από stock 10 mg/ml], 37°C, 1 h.
- Phenol/ CHCl_3 extraction → \varnothing , 5', R.T → παίρνουμε το SN.
- Καταβυθίζουμε το πλασμιδιακό DNA προσθέτοντας 0,6 με 1 όγκους ισοπροπανόλη (μπορούμε να χωρίσουμε το υλικό σε πολλά erpendorf tubes) και → \varnothing , 3', R.T.
- Πλένουμε το/α ίζημα/τα με 500 λ 70% EtOH → \varnothing → πετάμε SN → **ΣΤΕΓΝΩΜΑ** → επαναδιαλύουμε συνολικά σε 100 με 200 λ H_2O .
- Παίρνουμε 6-8 λ για πέψη με ένζυμα περιορισμού για ένα πρώτο έλεγχο.
- Για μεγάλη πέψη (αν π.χ μετά θέλουμε να κάνουμε elution σε κάποια ζώνη και να πάρουμε πολύ υλικό) παίρνουμε 30-50 λ .
- **ΥΣΤΕΡΟΓΡΑΦΟ**: γενικά 1 ml καλλιέργειας δίνει ~ 1 μg πλασμιδιακού DNA.

ΕΝΟΤΗΤΑ II : ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ GST ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ, ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΛΥΣΗ ΣΤΗ FRENCH PRESS ΚΑΙ ΑΠΟΚΟΠΗ ΜΕ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ Xa .

7.2.1 Πρωτόκολλο επαγωγής της υπερέκφρασης κλωνοποιημένων ενθεμάτων στο pGEX πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης

- O/N incubation of 5-10 ml of sterile LBamp from proper glycerol stock. Incubation at 37°C.
- Store the French Press cell at 4°C, O/N.
- Next day : Measurement of the OD absorption of the O/N culture (usually it is around 3 OD).

- Dilute proper volume from the O/N culture into another sterile LBamp with 2% w/v glucose. The final volume depends on the case and can be from 10 – 200 ml.
- Measure the OD absorption of the diluted culture. Make sure that it is around 0,15 OD.
- Incubate the culture preferably at the same temperature as the induction temperature (see bellow). Alternatively incubate at 37°C. Incubation at the induction temperature will give better results.
- Measure regularly (1h at first and then every 20 min) the OD absorption until it reaches the desire OD (usually between 0,6-0,8 OD).
- Add proper volume of IPTG in order to achieve the desire final concentration for the induction (this is case-dependent, according to the properties and size of the chimeric molecule).
- Incubate at proper temperature (usually between 20-30°C) for proper time (1-4 hours).

7.2.2 Πρωτόκολλο λύσης βακτηριακής καλλιέργειας με την συσκευή French Press.

- Centrifuge the culture at 5.000 rpm for 5 min at 4°C.
- Remove the supernatant (LB) and dilute the bacterial pellet in 10 ml of French Press Lysis Buffer (FPLB). Dilute the pellet by vortexing.
- Place the French Press cell upon the tripod. Secure the bottom of the French Press cell with the lid. Put the 10 ml of diluted pellet inside the French Press cell. Secure the top of the cell with the bolt. Attach the slide valve and the leader on the cell.
- Slightly release the slide valve by turning it clockwise and press the bolt until all the air has left from inside the cell and the liquid starts coming out the slide valve. Then clam tight the slide valve by turning it counterclockwise.
- Secure the French Press cell on the French Press base with the two screws. **Make sure to place the bolt in vertical position in regard to the two screws.**
- Turn the power switch to the “ON” position.
- Turn the pressure faucet until it reaches the desire PSI according to the table (usually between 500-600).
- Turn the release handle to the “HIGH” position. The pressure reading will return to zero.
- Wait until the bolt reaches the top and the pressure reading reaches the desire pressure.

- Slowly release the slide valve to let the diluted culture to come out of the cell. Recover in a sterile tube, placed inside ice.
- Once done, restore the release handle (3) to the initial position. The pressure reading will return to “ZERO” position and the cell will start lowering. Once reached the bottom, the pressure reading will return to the settled adjustment.
- Repeat the procedure 1-3 times if necessary. This step is case-dependent as well. It is necessary to take samples each time in order to test the lysis progress by PAGE assay. However each time the clarity of the culture should increase.
- Proceed to the next step after taken sample for PAGE assay.

7.2.3 Πρωτόκολλο δέσμευσης των χιμαιρικών GST πρωτεϊνών σε σφαιρίδια 4B γλουταθειόνης.

- Place 9 ml of the diluted culture in a falcon tube. Add 1 ml of GST-beads. Attach the falcon tube on a spinning wheel and perform the binding procedure for 1 h at RT.
- Place the culture and the beads inside the appropriate column. Remove the liquid. **Make sure to leave 1 ml of liquid, covering the beads to avoid dry them.**
- Wash the column with 9 ml of FPLB. Repeat the procedure at least 20-30 times. Take samples every 5 washes for PAGE assay.

7.2.4 Πρωτόκολλο δέσμευσης του GST σε σφαιρίδια σεφαρόζης

- Wash beads (1 ml) three times with 14 ml (each time) of French Press Lysis Buffer (FPLB) without DTT (final volume : 15 ml). Proceed the centrifugation at 3.000 rpm for 5 min.
- Add to 1 ml beads approximately 9 ml of cell lysate (cell pellet, diluted in 9 ml FPLB with DTT). Keep an aliquot of the cell lysate, to serve as marker sample.
- Shake the mix for 1 h at R.T or 2 hrs at 14 °C. Increased binding time might cause nonspecific protease cleavage of the sample and decreased binding time might be deficient for the binding.
- Transfer the binding mix to the wash column. Alternatively prepare tip-column using a 5 ml tip with a small amount of glasswool.
- Fit column on stand and numerate new falcon tubes.
- Load Sepharose mix onto the column. Make a final wash of tube with approximately 2 ml buffer. Collect flow-through.
- Wash column multiple times (over 15) with equal volume of FPLB without DTT. Keep aliquots from every wash at the beginning (first 5 samples) and every 3 wash later.

- After the washes, keep 1 ml of FPLB over the beads and put the column in the refrigerator tightly closed. Take an aliquot (20μl) for the evaluation of the purification process by SDS-gel electrophoresis.
- Proceed with Factor Xa cleavage if necessary.

7.2.5 Πρωτόκολλο αποκοπής του GST με το Παράγοντα Xa

- Estimate the amount of the Factor Xa that will perform the cleavage reaction, based on the stock concentration (1 μg/ μl) and on the enzyme-substrate ratio (1 : 200 to 1 : 10).
- Add the estimated amount of the protease, into the GST-Beads after the binding (1 ml beads + 1 ml FPLB over the tips). It is essential to have the pH of the reaction buffer between 7 and 10. Take an aliquot to serve as marker, before the enzyme addition.
- Perform the reaction, O/N at 22°C. To avoid nonspecific protease cleavage and to evaluate the cleavage performance, take flow through aliquot samples every 1 hour, at least for the first 4 hours of the reaction.
- The next day, wash the column five times with FPLB. Make aliquots from every eluate fraction. Also take sample from the beads.
- Check the performance of the purification and cleavage process with gel electrophoresis

ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙΙ : PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

7.3.1 Πρωτόκολλο ηλεκτροφορητικής ανάλυσης πρωτεϊνικών δειγμάτων κατά PAGE

Διαλυτοποίηση των δειγμάτων με 1x και 2x solubilisation buffer [που περιέχει Tris, sucrose, SDS, μερκαπτοαιθανόλη] έτσι ώστε κάθε δείγμα να έχει την ίδια συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης. Αν τα διάφορα δείγματα δεν έχουν την ίδια συγκέντρωση, τότε κατά την ηλεκτροφόρηση θα έχουν διαφορετικό βαθμό διάχυσης και πιθανότατα δεν θα είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους.

[-σουκρόζη → κάνει βαρύ το δείγμα

-μερκαπτοαιθανόλη → σπάει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και έτσι αποδιατάσσονται οι πρωτεΐνες αποκτώντας ομοιομορφία σχήματος

-SDS → απορυπαντικό που προσδίδει ομοιομορφία στην πυκνότητα φόρτισης των πρωτεϊνών]

Πως φτιάχνουμε την πηκτή ακρυλαμίδιου :

Φτιάχνουμε 2 διαλύματα, ένα για το resolving gel και ένα για το stacking gel (Πιν. 6.1). Για το resolving (που περιέχει νερό, ακρυλαμίδιο-bis ακρυλαμίδιο, σουκρόζη,

Πίνακας 7.1 : Ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή πρωτεϊνικών πηκτών

Διαλύματα	Πηκτή <i>Resolving</i> (4 πηκτές)	Πηκτή <i>Stacking</i> (4 πηκτές)	
H ₂ O	12,75 ml	6,6 ml	
Ακρυλαμίδιο-bis ακρυλαμ. (32:0,85%)	18,75 ml	1,5 ml	
Σουκρόζη 1,875 M	0,875 ml	-	
Tris 3M pH 8,8	6,125 ml	Tris 0,5 M pH 6,8	3,75 ml
EDTA 200 Mm	0,475 ml	0,15 ml	
Ουρία 6M	8 ml	2,5 ml	
SDS 10%	0,725 ml	0,225 ml	

Tris pH 8,8, EDTA, ουρία, SDS) αναλόγως πόσο πυκνό το θέλουμε, αλλάζουμε την αναλογία νερού-ακρυλαμιδίου. Το stacking είναι πάντα standard και διαφέρει από το resolving στο ότι περιέχει πολύ λιγότερο ακρυλαμίδιο, καθόλου σουκρόζη και Tris pH 6,8.

[-σουκρόζη → δίνει ελαστικότητα στο resolving

-ουρία → ανοίγει τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες]

Στήνουμε τη συσκευή (αλουμίνες-spacers-τζαμάκια) και προσθέτουμε TEMED + APS στο resolving και αμέσως αδειάζουμε το μίγμα στη συσκευή. Αμέσως προσθέτουμε από 300 λ νερό σε καθένα από τους χώρους όπου θα σχηματιστεί πηκτή (αυτό να γίνει επίπεδη η επάνω επιφάνεια της πηκτής). Αφού πήξει το resolving αδειάζουμε το νερό και προσθέτουμε TEMED + APS στο stacking και αμέσως αδειάζουμε το μίγμα στη συσκευή πάνω από το resolving και τοποθετούμε τα χτενάκια.

Αφού πήξει και το stacking αφαιρούμε προσεκτικά τα χτενάκια και ξεχωρίζουμε τις πηκτές με νυστέρι, στήνουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθέτουμε Running Buffer [Περιέχει Tris, γλυκίνη Na-metabisulfite, EDTA, SDS] Τέλος φορτώνουμε τα δείγματα και ηλεκτροφορούμε για ~1 ώρα και 30' σε 35 mA ανά πηκτή. Στην πηκτή ακρυλαμιδίου φορτώνουμε την ίδια ποσότητα ολικής πρωτεΐνης από κάθε δείγμα.

ΕΝ ΤΕΛΕΙ με όλα αυτά, οι πρωτεΐνες μετακινούνται κατά την ηλεκτροφόρηση ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (πιο σωστό: ανάλογα με το φαινόμενο μοριακό βάρος, π.χ αν έχουν έχουν κολλημένα κάποια σάκχαρα πάνω τους αλλάζει η κινητικότητά τους).

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ:

1. Για να πολυμεριστεί και να πήξει το resolving, προσθέτουμε 50 λ TEMED και 250 λ 10% APS (Ammonium persulfate).
2. Αντίστοιχα για να πήξει το stacking, προσθέτουμε 25 λ TEMED και 100 λ 10% APS.

3. Αν θέλουμε το resolving gel να έχει άλλη συγκέντρωση, τότε προσαρμόζουμε ανάλογα τους όγκους του ακρυλαμ.-bis ακρυλαμ. (32:0.85%) και του νερού. Π.χ για resolving 15%, θα πρέπει να αραιώσουμε το stock του 32% κατά $32/15=2,133$ φορές. Εφόσον ο τελικός όγκος του διαλύματος για το resolving είναι 48 ml, τότε θα βάλουμε $48/2,133=22,5$ ml stock ακρυλαμιδίου (δηλ. 3,75 ml παραπάνω από ότι για resolving 12,5%). Αυτά τα επιπλέον 3,75 ml θα τα αφαιρέσουμε από το νερό, άρα θα βάλουμε $12,75-3,75=9$ ml νερό.
4. Το ακρυλαμίδιο απουσία του bis-ακρυλαμιδίου, μπορεί να πολυμεριστεί μόνο γραμμικά οδηγώντας στον σχηματισμό ενός πηκτού διαλύματος και όχι πηκτής. Ο πλήρης πολυμερισμός σε μορφή πηκτής, επιτυγχάνεται με την προσθήκη bis-ακρυλαμιδίου. Τα μόρια του bis-ακρυλαμιδίου ενώνουν τα γραμμικά πολυμερή του ακρυλαμιδίου δρώντας ως γέφυρες και σχηματίζοντας σε μοριακό επίπεδο ένα τρισδιάστατο πολυμερισμένο δίκτυο (πηκτή). Το APS (Ammonium persulfate) είναι δισουλφιδικός εστέρας του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Είναι πολύ ασταθής ένωση και εύκολα παράγει ελεύθερες ρίζες $\bullet\text{SO}_4$. Οι συγκεκριμένες ρίζες αντιδρούν με το TEMED που είναι μια τεταρτογενής αμίνη, σχηματίζοντας νέες ελεύθερες ρίζες που θα σχηματίσουν τις γέφυρες bis-ακρυλαμιδίου ενώνοντας τα γραμμικά πολυμερή του ακρυλαμιδίου σε τρισδιάστατο δίκτυο (Alexander J. Ninfa and David P. Ballou "Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology")

7.3.2 Πρωτόκολλο μεταφοράς σε μεμβάνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτόπωση κατά Western

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης γίνεται η μεταφορά των πρωτεϊνών από την κάθε πηκτή σε μεμβράνη π.χ νιτροκυτταρίνης (Western blot). Σε κατάλληλο σκεύος με Transfer buffer [Περιέχει Tris, γλυκίνη, μεθανόλη] και στα ειδικά πλαίσια με τα σφουγγαράκια, βάζουμε με τη σειρά 2 χαρτιά 3MM + την πηκτή (resolving) ανάποδα + την μεμβράνη + άλλα 2 χαρτιά 3MM και πιέζουμε συνεχώς να φύγουν οι φουσκάλες. Ακολουθώς τοποθετούμε όλο το πλαίσιο στην ειδική συσκευή, καλύπτουμε έτσι ώστε να σκεπάζονται πλήρως με transfer buffer και ηλεκτροφορούμε για ~ 1 ώρα και 30' στα 390 mA.

Ακολουθώς τσεκάρουμε χοντρικά τη μεταφορά βάζοντας τις μεμβράνες με Ponceau και τέλος τις ξεβάζουμε με 1X PBS και τις τοποθετούμε σε πυκνό Blocking Buffer (5% γάλα σκόνη, 0,2% Tween 20 σε 1X PBS) για όλη τη νύχτα στο shaker.

Την επόμενη μέρα :

- 2X πλύσιμο τις μεμβράνες από 10' με blocking buffer στο shaker
- αντίσωμα (διαλυμένο σε blocking buffer) ειδικό για την πρωτεΐνη που θέλουμε να ανιχνεύσουμε για ~ 2 ώρες στο shaker (για το τι αραιώση αντισώματος χρειάζεται, πρέπει να γίνουν προκαταρκτικά πειράματα χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις αντισώματος)
- 5X πλύσιμο από 10' με 1X PBS στο shaker
- αντιαντίσωμα (διαλυμένο σε blocking buffer) ειδικό έναντι του 1^{ου} αντισώματος για ~2 ώρες στο shaker. Το αντιαντίσωμα έχει προσδεσμένη πάνω του αλκαλική φωσφατάση.
- 2X πλύσιμο από 10' στο shaker με 1X PBS

- 2X πλύσιμο από 10' στο shaker με TNM
- ΕΜΦΑΝΙΣΗ: σε 30 ml TNM προσθέτουμε 10 mg NBT + 5 mg BCIP. Ακολουθεί καλή ανάδευση. Εν συνεχεία βουτάμε μέσα στο εμφανιστικό τις μεμβράνες και αφήνουμε να κουνιούνται στο shaker μέχρι να πάρουμε ικανοποιητικό σήμα και σταματάμε την αντίδραση βουτώντας τις μεμβράνες σε 0.02 M EDTA.

7.3.3 Πρωτόκολλο μετασχηματισμού βακτηριακού στελέχους BL-21 της E. coli με πλασμιδιακό DNA

- Μεταφέρουμε ένα aliquot competent cells από τους -70 σε πάγο.
- Προσθέτουμε στο tube 50-100 pg πλασμιδιακού DNA.
- Αναμειγνύουμε πολύ προσεκτικά με tip πάνω-κάτω.
- Στον πάγο για 30'.
- Heat shock στους 42°C (σε μπανάκι) για 45" → σε πάγο.
- Προσθέτουμε προζεσταμένο L.B (800-900 λ).
- Στους 37°C, να κουνιούνται στα 125 rpm για 1 h.
- Επιστρώνουμε 200-500 λ σε antibiotic plates.
- Επώαση O/N στους 37°C.
- (Μετρώντας τις αποικίες υπολογίζουμε την efficiency των competent cells: καλή είναι όταν είναι πάνω από 10^7 αποικίες/ μg DNA).
- Από μια single colony εμβολιάζουμε L.B για O/N επώαση στους 37°C (mini ή big prep, με σκοπό να αυξήσουμε το πλασμιδιακό DNA).

Πίνακας 7.2 : Σύνοψη των κοριότερων αντιδραστηρίων

Διάλυμα	Συστατικά	Προστιθέμενη ποσότητα	Ιδιαίτερες απαιτήσεις
100 ml CTAB extraction buffer	CTAB σκόνη	2 gr	Καμία
	Tris-HCl (1M, pH 8.0)	10 ml	
	Na ₂ -EDTA (0,5 M)	4 ml	
	NaCl (4M)	35 ml	
200 ml Na ₂ -EDTA (0,5M, pH 8.0)	Na ₂ -EDTA (0,5 M)	37.22 gr	Ρύθμιση σε pH 8.0 με NaOH, αποστείρωση
1L Tris-HCl (1M, pH 8.0)	Tris base	121,1 gr	Ρύθμιση σε pH 8.0 με HCl, αποστείρωση
100 ml Tris base (1M)	Tris base	12,1 gr	Αποστείρωση
200 ml NaCl (4M)	NaCl	46,752 gr	Αποστείρωση
100 ml Ammonium acetate (10 M)	Ammonium acetate	77,08 gr	Αποστείρωση
100 ml Na-acetate (3M)	Na-acetate	8,203 gr	Αποστείρωση
100 ml K-acetate (1M, pH 6.0)	K-acetate	9,814 gr	Ρύθμιση σε pH 6.0 με οξικό οξύ, αποστείρωση
100 ml TE	Tris-HCl (1M, pH 8.0)	1 ml	Καμία
	Na ₂ -EDTA (0,5 M)	200 μl	
1L TAE (50x, pH 8.0)	Tris base	242 gr	Αποστείρωση
	Acetic acid	57,1 ml	
	Na ₂ -EDTA (0,5 M)	100 ml	
200 ml Ethanol & Ammonium Acetate (70 % & 10 mM)	Absolute Ethanol	152 ml	Καμία
	10 M Ammonium acetate	200 μl	
10 % SDS	SDS	10 gr	Θέρμανση στους 70 Βαθμούς Κελσίου για να διαλυθεί το SDS
1 ml Glycerol Stock	Bacterial culture	850 μl	Καλή ανάδευση, παραμονή 1' σε υγρό άζωτο, αποθήκευση στους - 80 βαθμούς Κελσίου
	100 % Glycerol	150 μl	

Όλα τα διαλύματα ρυθμίζονται στο τελικό τους όγκο με προσθήκη ddH₂O

Πίνακας 7.2 : Σύνοψη των κυριότερων αντιδραστηρίων (συνέχεια)

Διάλυμα	Συστατικά	Προστιθέμενη ποσότητα ή τελική συγκέντρωση	Ιδιαίτερες απαιτήσεις
1 L Running Buffer	Tris	6,05 gr	Αποθήκευση στους 4 βαθμούς Κελσίου πριν την χρήση
	Glycine	28,5 gr	
	Na-metabisulfite	0,95 gr	
	200 mM EDTA	10 ml	
1 L Transfer Buffer	10 % SDS	15 ml	Αποθήκευση στους 4 βαθμούς Κελσίου πριν την χρήση
	Tris	3 gr	
	Glycine	14,4 gr	
	Methanol	200 ml	
10x PBS (pH 7,25)	KH ₂ PO ₄	50 mM	Ρύθμιση του pH με NaOH
	K ₂ HPO ₄	50 mM	
	NaCl	1,5 mM	
TNM	Tris	100 mM	Καμμία
	NaCl	100 mM	
	MgCl ₂	5 mM	
2x διάλυμα φορτώματος πρωτεϊνών	Tris pH 7,6	100 mM	Αποθήκευση στους 4 βαθμούς Κελσίου
	Sucrose	600 mM	
	SDS	4%	
	Mercaptoethanol	8%	
Prep. STE	NaCl	100 mM	Αποθήκευση στους 4 βαθμούς Κελσίου
	Tris pH 8.0	10 mM	
	EDTA pH 8.0	1 mM	
Prep. SOL. I	Glucose	50 mM	Αποθήκευση στους 4 βαθμούς Κελσίου
	Tris pH 8.0	25 mM	
	EDTA	10 mM	
Prep. SOL. II	NaOH	0,2 N	Πάντα φρέσκο πριν την χρήση
	SDS	1%	
Prep. SOL III	K-acetic acid	3M	Αποθήκευση στους 4 βαθμούς Κελσίου
	Glacial acetic acid	5M	
1 L LB	Bacto-Trypton	10 gr	Σφράγισμα, αποστείρωση και αποθήκευση στους 4 βαθμούς Κελσίου
	Yeast Extract	5 gr	
	NaCl	5 gr	
1 L LB για τριβλία	Bacto-Trypton	10 gr	Στέγνωμα των τριβλίων και αποθήκευση στους 4 βαθμούς Κελσίου
	Yeast Extract-Agar	35 gr	
	NaCl	10 gr	

Όλα τα διαλύματα ρυθμίζονται στο τελικό τους όγκο με προσθήκη ddH₂O

Πίνακας 7.2 : Σύνοψη των κυριότερων αντιδραστηρίων (συνέχεια)

Διάλυμα	Συστατικά	Προστιθέμενη ποσότητα ή τελική συγκέντρωση	Ιδιαίτερες απαιτήσεις
<i>Coomassie Staining Buffer</i>	Coomassie	2,5 gr	<i>Καμμία</i>
	Methanol	400 ml	
	Acetic acid	70 ml	
<i>Destaining Buffer</i>	Methanol	200 ml	<i>Καμμία</i>
	Acetic acid	100 ml	
<i>100 ml French Press Lysis Buffer (FPLB)</i>	Tris-HCl, pH 7.5	50 mM	<i>Καμμία</i>
	NaCl	50 mM	
	MgCl ₂	1 mM	
	DTT	5 mM	
	PMSF	1 mM	

Όλα τα διαλύματα ρυθμίζονται στο τελικό τους όγκο με προσθήκη ddH₂O

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΕΝΤΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟΥ

Γονιδιακές θέσεις και πρωτεΐνες

- PvLHY = Phaseolus vulgaris Late Elongated Hypocotyl
- LHY = Late Elongated Hypocotyl
- CCA1 = Circadian Clock Associated 1
- TOC1 = Timing of CAB Expression 1
- ELF = Early Flowering
- Lhcb = Light Harvesting Complex B
- CAB = Chlorophyll a/b Binding protein
- LHC II = Light Harvesting Complex II
- GST = Glutathione-S Transferase
- PHY = Phytochrome
- Pr = Phytochrome red
- Pfr = Phytochrome far red
- CRY = Cryptochrome
- PHO = Phototropin
- GI = Gigantea
- CO = Constans
- APRR = Arabidopsis Pseudo-Response Regulator
- SSU (RUBISCO) = Small Subunit (RUBISCO)
- ZTL = Zeitlupe
- PKS1 = Phytochrome Kinase Substrate 1
- PIF3 = Phytochrome Interacting Factor 3
- bHLH (Transcription factor) = basic helix-loop-helix (transcription factor)
- MYB = Myeloblastosis

Αντιδραστήρια και μέθοδοι

- MCS = Multiple Cloning Site
- RAPD = Random Amplified Polymorphic DNA
- RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphisms
- FPLB = French Press Lysis Buffer
- PCR = Polymerase Chain Reaction
- SDS = Sodium Dodecyl Sulphate
- ddH₂O = deionized, distilled H₂O
- O/N = Overnight
- RPM = Rounds Per Minute
- PMSF = Phenyl Methansulfon Saurefluorid
- APS = Ammonium Persulfate
- QTL = Quantative Trait Loci
- MAS = Marker Assisted Selection
- MAB = Marker Assisted Backcrossing
- cDNA= complementary DNA

Διάφορα

- Σχ. = Σχήμα
- Εικ. = Εικόνα
- Πιν. = Πίνακας
- Τ.π = Τίτλος Πρωτοτύπου
- kbp = kilo base pairs
- kDa = kilo Dalton

VIII. Βιβλιογραφία

- Ahmad M, Cashmore AR., 1993. *HY4 gene of A. thaliana encodes a protein with characteristics of a blue light photoreceptor*. Nature 366: 162-166.
- Ahmad M., Jarillo JA., Smirnova O, Cashmore AR., 1998. *The CRY1 blue light photoreceptor of Arabidopsis interacts with phytochrome A in vitro*. Mol. Cell., 1: 939-948.
- Alabadi David, Oyama Tokitaka, Yanovsky J. Marcelo, Harmon G. Franklin, Mas Paloma and Kay A. Steve, 2001. *Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock*. Science 293: 880-883.
- Alabadi David, Yanovsky J. Marcelo, Mas Paloma, Harmer L. Stacey and Kay A. Steve, 2002. *Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in Arabidopsis*. Current Biology, 12: 757-761.
- Anderson, S.L., Somers, D.E., Millar, A.J., Hanson, K., Chory, J., and Kay, S., 1997. *Attenuation of phytochrome A and B signaling pathways by the Arabidopsis circadian clock*. Plant Cell 9, 1727-1743.
- Apel K., 1981. *The protochlorophyllide holochrome of barley (Hordeum vulgare L.) Phytochrome-induced decreased of translatable mRNA coding for the NADPH : protochlorophyllide oxidoreductase*. Eur. J. Biochem., 120: 89-93.
- Aschoff, J. 1979. *Circadian rhythms: Influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions*. Z. Tierpsychol. 49: 225-247.
- Bassett (1993). *Genetic map of Phaseolus vulgaris*. Ann. Report of Bean Imp. Coop. 36:vi
- Bedbrook J.R., Link G., Coen D.M., Bogorad L., Rich A., 1978. *Maize plastid gene expressed during photoregulated development*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3060-3064.
- Beebe E. Stephen, Ochoa Ivan, Skroch Paul, Nienhuis James and Tivang Jan, 1995. *Genetic diversity among common bean breeding lines developed for central America*. Crop Sc. 35: 1178-1183.
- Beveridge A. Christine, Weller L. James, Singer R. Susan and Hofer M.I Julie, 2003. *Axillary meristem development, budding Relationships between networks controlling flowering, branching and photoperiod responsiveness*. Plant Physiology, 131: 927-934.
- Bhoo SH, Davis SJ, Walker J, Karniol B, Vierstra RD., 2001. *Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore*. Nature 414:776-779.
- Borthwick HA., Hendricks SB, Parker MW., Toole EH., Toole VK., 1952. *A reversible photoreaction controlling seed germination*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 38: 662-666.

- Bunning E., 1936. *Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion*. Ber Dtsch Bot. Ges. 54: 590-607.
- Carre A. Isabelle and Kim Jae-Yean, 2002. *MYB transcription factors in the Arabidopsis circadian clock*. Journal of experimental Botany, 53: 1551-1557.
- Carre A. Isabelle, 2002. *ELF3 : a circadian safeguard to buffer effects of light*. Trends in Plant Sc. 7: 4-6
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D., 1999. *Cryptochromes : blue light receptors for plants and animals*. Science, 284: 760-765.
- Cattan-Toupance, I., Y. Michalakis, and C. Neema. 1998. *Genetic structure of wild bean populations in their South-Andean centre of origin*. Theor. Appl. Genet. 96:844-851.
- Cerff R., Kloppstech K., 1982. *Structural diversity and differential light control of mRNAs coding for angiosperm glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 7624-7628.
- Chua N.-H., Schmidt, G. W., 1979. *Transport of proteins into mitochondria and chloroplasts*. J. Cell Biol., 81: 461-483.
- Clough, R.C., Vierstra, R.D., 1997. *Phytochrome degradation*. Plant Cell Environ. 20, 713-721.
- Cosgrove D. J., 1997. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13, 171.
- Covington F. Michael, Panda Satchidanda, Liu Liang Xing, Strayer, Wanger D. Ry and Kay A. Steve., 2001. *ELF3 modulates resetting of the circadian clock in Arabidopsis*. The Plant Cell, 13: 1305-1315.
- Cress W. D. and Triezenberg S. J., 1991. *Science* 251, 87.
- Cutler SR., Ehrhardt DW., Griffitts JS., Somerville CR., 2000. *Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 3718-3723.
- Darwin C., [1895] 1981. *The power of movements in plants*. New York: D. Appleton and Co.
- Devlin F. Paul, 2002. *Signs of time : environmental input to the circadian clock*. Journal of Experimental Botany, 53: 1535-1550.
- Dice, L. R. 1945. *Measures of the amount of ecologic association between species*. Ecology, 26:297-302.
- Dowson-Day M.J., Millar A.J., 1999. *Plant J.* 17: 63.

- Ellis R.J., 1981. *Chloroplast proteins: Synthesis transport and assembly*. Ann. Rev. Plant Physiol. 32: 111-137.
- Etchegaray Jean-Pier, Lee Choogon, Wade Paul A. and Reppert M. Steven, 2003. *Rhythmic histone acetylation underlies trascription in the mammalia circadian clock*. Nature, 421 : 177-182.
- Fankhauser Christian and Staiger Dorothee, 2002. *Photoreceptors in Arabidopsis thaliana : light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock*. Planta, 216: 1-16.
- Fankhauser Christian, Yeh Kuo-Chen, Lagarias Clark, Zhang Hong, Elich D. Tedd, Chory Joanne, 1999. *PKSI, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis*. Science 284: 1539-1541.
- Folta KM., Spalding EP., 2001. *Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition*. Plant J., 26: 471-478.
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland, G., and Putterill, J. 1999. *GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in Arabidopsis and encodes a protein with several possible membrane spanning domains*. EMBO J. 18: 4679-4688.
- Gepts P. and Shonnard C. Gisela, 1994. *Genetics of heat tolerance during reproductive development in common bean*. Crop Sc. 34: 1168-1175.
- Gottmann K., Schafer E., 1982. *In vitro synthesis of phytochrome apoprotein directed by mRNA from light and dark grown Avena seedlings*. Photochem. Photobiol., 35: 521-525.
- Green M. Rachel and Tobin M. Elaine, 2003. *The role of CCA1 and LHY in the plant circadian clock*. Developmental Cell, 516-518.
- Green R.M. and Tobin E.M., 1999. *Loss of the circadian clock-associated protein 1 in Arabidopsis results in altered clock-regulated gene expression*. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 4176-4179.
- Gressel J., 1979. Blue light photoreceptor. Photochem. Photobiol. 30: 749-754.
- Guo HW, Duong H., Ma N., Lin CT., 1999. *The Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regylated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism*. Plant J. 19: 279-287.
- Hague, D.R., Uhler M., Collins P.D., 1983. *Cloning of cDNA for pyruvate, Pi dikinase from maize leaves*. Nucleic Acids Res. 11: 4853-4865.
- Harmer L. Stacey, Hogenesch B. John, Straume Marty, Chang Hur-Song, Bin Han, Zhu Tong, Wang Xun, Kreps A. Joel and Kay A. Steve, 2000. *Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock*. Science, 290: 2110-2113.

- Hendricks SB and Borthwick HA, 1967. *The function of phytochrome in regulation of plant growth*. Proc. Naatl. Acad. Sci. USA, 58: 2125-2130.
- Hendricks SB and van der Woude WJ., 1983. *How phytochrome acts-perspectives on the continuing quest*. Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo: Springer-Verlag 2nd ed. pp : 4-23.
- Hicks, K.A., Albertson, T.M., and Wagner, D.R., 2001. EARLY FLOWERING3 encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in Arabidopsis. Plant Cell 13, 1281–1292.
- Hicks, K.A., Millar, A.J., Carré, I.A., Somers, D.E., Straume, M., Meeks-Wagner, R., and Kay, S., 1996. *Conditional circadian dysfunction of the Arabidopsis early-flowering 3 mutant*. Science 274, 790–792.
- Hisada A., Millar AJ., Carre IA., Somers DE., Straume M., et al. *Conditional circadian dysfunction of the Arabidopsis Early Flowering 3 mutant*. Science, 274: 790-792.
- Hock B, Mohr H., 1964. *Die Regulation der O₂-Aufnahme von Senfkeimlingen (Sinapis alba L.) durch Licht*. Planta, 61: 209-227.
- Hoffman PD, Batschauer A., Hays JB., 1996. *PHH1, a novel gene from Arabidopsis thaliana that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases*. Mol. Gen. Genet., 253: 259-265.
- Huang Ning and Subudhi Kumar Prasanta, 1999. *RAPD mapping in a double haploid population of rice (Oryza sativa L.)*. Hereditas 130: 41-49.
- Jaccard, P. 1908. *Nouvelles recherches sur la distribution florale*. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat., 44:223-270.
- Jaffe M.J., 1969. *Phytochrome controlled RNA changes in terminal buds of dark grown peas (Pisum sativum cv. Alaska)*. Physiol. Plant. 22: 1033-1037.
- Jarillo A. Jose, Capel Juan, Tang Ru-Hang, Yang Hong-Quan, Alonso M. Jose, Ecker R. Joseph and Cashmore R. Anthony, 2001. *An Arabidopsis circadian clock component interacts with both CRY1 and PHY B*. 410: 487-490.
- Jarillo JA., Capel J., Tang RH., Yang HQ., Alonso JM., et al., 2001. *An Arabidopsis circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB*. Nature, 410: 487-490.
- Johnson Hirschie Carl, 2001. *Endogenous timekeepers in photosynthetic organisms*. Annu. Rev. Physiol. 63: 695-728.
- Johnson, C.H., 1992. *Phase response curves: What can they tell us about circadian clocks?* In Circadian Clocks from Cell to Human, T. Hiroshige and K. Honma, eds (Sapporo, Japan: Hokkaido University Press), pp. 209–249.

- Johnson, William C., 1997. *Dissertation: Improving the efficiency of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) breeding programs using molecular markers.*
- Jung, G., D.P. Coyne, P.W. Skroch, J. Nienhuis, J. Bokosi, H.M. Ariyaratne, J.R. Steadman, J.S. Beaver and S.M. Kaeppler. 1996. *Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight and rust in common beans.* J. Am. Soc. Hortic. Sci. 121(5):794-803.
- Kaldis Athanasios-Dimitrios, Kousidis Panagiotis, Kesanopoulos Konstantinos and Prombona Anastasia, 2003. *Light and circadian regulation in the expression of LHY and Lhcb genes in Phaseolus vulgaris.* Plant Molecular Biology, 52: 981-997.
- Kim Jae-Yean, Song Hae-Ryong, Taylor L. Bethan and Carre A. Isabelle, 2003. *Light-regulated translation mediates gated induction of the Arabidopsis clock protein LHY.* The EMBO Journal, 22: 935-944.
- Kiyosue T., Wada M., 2000. *LKP1 (LOV kelch protein 1): a factor involved in the regulation of flowering time in Arabidopsis.* Plant J., 23: 807-815.
- Kleiner O., Kircher S., Harter K., Batschauer A., 1999. *Nuclear localization of the Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2.* Plant J., 19: 289-296.
- Koinange EMK, Singh SP, Gepts P. 1996. *Genetic control of the domestication syndrome in common bean.* Crop Sci.36:1037-1045.
- Lin Chentao and Shalitin Dror, 2003. *Cryptochrome structure and signal transduction.* Annu. Rev. Plant Biol. 469-496.
- Lumsden John Peter, 1991. *Circadian rhythms and phytochrome,* Annu. Rev. Plant Mol. Biol. 42: 351-371.
- Lynch P. Jonathan, Yan Xiaolong, Beebe E. Stephen, 1995. *Genetic variation for phosphorus efficiency of common bean in contrasting soil types : II. Yield response.,* Crop Sc. 35: 1094-1099.
- Martinez-Garcia JF, Huq E, Quail PH., 2000. *Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor.* Science, 288: 859-863.
- Mas P., Devlin PF., Panda S., Kay SA., 2000, *Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2.* Nature, 408: 207-211.
- Mas Paloma, Alabadi David, Yanovsky J. Marcelo, Oyama Tokitaka and Kay A. Steve, 2003. *Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in Arabidopsis.* Plant Cell, 15: 223-236.
- Mas Paloma, Kim Woe-Yeon, Somers E. David and Kay A. Steve, 2003. *Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in Arabidopsis thaliana.* Nature 426: 567-570.

- Matsushika Akinori, Makino Seiya, Kojima Masaya, Yamashino Takafumi and Mizuno Takeshi, 2002. *The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of Arabidopsis thaliana :II. Characterization with CCA1-overexpressing plants*. Plant Cell Physiol., 43: 118-122.
- McWatters G. Harriet, Bastow M. Ruth, Hall Anthony and Millar Andrew, 2000. *The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock*. Nature, 408: 716-720
- Metais I., Aubry C., Hamon B., Jalouzot R., Peltier D., 2000. *Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (Phaseolus vulgaris L.)*. Theor. Appl. Genet., 101: 1207-1214.
- Millar A.J., Kay S.A., 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 15491.
- Mizoguchi Tsuyoshi, Wheatley Kay, Hanzawa Yoshie, Wright Louisa, Mizoguchi Mutsuko, Song Hae-Ryong, Carre A. Isabelle and Coupland George, 2002. *LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in Arabidopsis*. Developmental Cell, 2: 629-641.
- Murtas Giovanni and Andrew J. Millar, 2000. *How plants tell the time*. Current opinion in Plant Biology, 3: 43-46.
- Nagatani Akira, 2000. *Lighting up the nucleus*. Science 288: 821-822.
- Nagy F, Schaefer E., 2002. *Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol., 53:329-355.
- Nagy Ferenc and Schafer Eberhard, 2002. *Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signalling pathways in higher plants*. Annu. Rev. Plant. Biol., 53: 329-355.
- Negri Valeria and Tosti Nicola, 2002. *Phaseolus genetic diversity maintained on-farm in central Italy*. Genetic Resources and Crop Evolution, 49: 511-520.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5269-5273.
- Ni Min, Tepperman M. James and Quail H. Peter, 1999. *Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light*. Nature 400: 781-783.
- Parks BM., Folta KM., Spalding EP., 2001. *Photocontrol of stem growth*. Curr. Opin. Plant Biol. 4: 436-440.
- Pergota G., Nimu L., Flamma F., Weller JL., Kendrick RE., et al., 2000. *Tomato contains homologues of Arabidopsis cryptochrome 1 and 2*. Plant Mol. Biol., 42: 765-773.

- Pfannschmidt Thomas, 2003. *Chloroplast redox signals : how photosynthesis controls its own genes*. Trends in Plant Sciences, 8: 33-41.
- Putterill J. *et al.*, 1997. Plant Physiol. 114, 396.
- Putterill J., Robson F., Lee K., Simon R., Coupland G., 1995. Cell 80, 847.
- Quail P.H., 1991. *Phytochrome : a light-activated molecular switch that regulates plant gene expression*. Annual Review of Genetics 25, 389-409.
- Quail P.H., 2002 b. *Phytochrome photosensory signalling networks*. Nat Rev Mol Cell Biol., 3:85-93.
- Quail, P., 1997. *An emerging molecular map of the phytochromes*. Plant Cell Environ. 20, 657-666.
- Reed, J.W., Nagpal, P., Bastow, R.M., Solomon, K.S., Dowson- Day, M.J., Elumalai, R.P., and Millar, A.J., 2000. *Independent action of ELF3 and phyB to control hypocotyl elongation and flowering time*. Plant Physiol. 122, 1149-1160.
- Robert L.S., Robson F., Sharpe A., Lydiate D., Coupland G., 1998. Plant Mol. Biol. 37, 763.
- Roden C. Laura and Carre A. Isabelle, 2001. *The molecular genetics of circadian rhythms in Arabidopsis*. Cell and Developmental Biology, 12: 305-315.
- Samach A. *et al.*, 2000. Science 288, 1613.
- Sancar A., 1994. *Structure and function of DNA photolyase*. Biochemistry 33: 2-9.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I.A. and Coupland, G., 1998. *The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering*. Cell 93 : 1219-1229.
- Schneider, K.A., M.E. Brothers, and J.D. Kelly. 1997. *Marker assisted selection to improve drought resistance in common bean*. Crop Sci. 37:51-60
- Senger H., 1980. *The blue light syndrome*, Berlin: Springer-Verlag.
- Senger H., 1984. *Cryptochrome, some terminological thoughts*. Blue Light Effects in Biological systems, p. 72. Berlin: Springer-Verlag.
- Shalitin D., Yang HY., Mockler TC., Maymon M, Guo HW, *et al.*, 2002. *Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation*. Nature, 417: 763-767.
- Sharrock, R. A., Quail P.H., 1989. *Novel phytochrome sequences in Arabidopsis thaliana : structure, evolution and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family*. Gene Dev., 3: 1745-57.

- Shinomura T, Uchida K, Furuya M., 2000. *Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high irradiance response of hypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol., 122:147–156.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2000. Current Opinion of Plant Biology, 3: 217.
- Shirley B.W., 1996. Trends Plant Sci., 1: 377.
- Sims T.L., Hague D.R., 1981. *Light-stimulated increase of translatable mRNA for phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of maize*. J. Biol. Chem., 256: 8252-8256.
- Singh K. B., 1998. *Plant Physiol.* 118, 1111.
- Singh P. Shree and Nienhuis James, 1986. *Combining ability analyses and relationships among yield, yield components and architectural traits in dry bean*. Crop Sc. 26: 21-27.
- Singh P. Shree, Morales J. Francisco, Miklas N. Phillip and Teran Henry, 2000. *Selection for bean mosaic resistance in Intra- and interracial bean populations*. Crop Sc. 40: 1565-1572.
- Singh P. Shree, Nodari R. and Gepts P., 1991. *Genetic diversity in cultivated common bean: I. Allozymes*. Crop Sc. 31: 19-23.
- Singh P. Shree, Teran Henry, Munoz German Carlos, Osorno Juan Manuel, Takegami Juan Carlos, Thung T.D. Michael, 2003. *Low fertility tolerance in landraces and improved common bean genotypes*. Crop Sc. 43: 110-119.
- Smith H., Whitelam GC., 1990. *Phytochrome, a family of photoreceptors with multiple physiological roles*. Plant Cell Environ., 13: 695-707.
- Somers D. E., 1999. *Plant Physiol.* 121, 9.
- Somers E. David, Schultz F. Thomas, Milnamow Maureen and Kay A. Steve, 2000. *Zeitlupe encodes a novel Clock-associated PAS protein from Arabidopsis*. Cell, 101: 319-329.
- Staiger Dorothee and Heintzen Christian, 1998. *The Circadian system of Arabidopsis thaliana : forward and reverse genetic approaches*. Chronobiology Int., 16: 1-16
- Staiger Dorothee, Allenbach Laure, Salathia Neeraj, Fiechter Vincent, Davis J. Seth, Millar J. Andrew, Chory Joanne and Fankhauser Christian, 2003. *The Arabidopsis SRR1 gene mediates phyB signaling and is required for normal circadian clock function*. *Genes and Development*, 17:256-268.
- Stayer A. Carl and Kay A. Steve, 1999. *The ins and outs of circadian regulated gene expression*. Current opinion in Plant Biology, 2: 114-120.
- Stock J. B., Stock A. M., Mottonen J. M., 1991. Nature 344, 395.

- Strayer Carl, Oyama Tokitaka, Schultz F. Thomas, Raman Ramanujam, Somers E. David, Mas Paloma, Panda Satchidananda, Kreps A. Joel and Kay A. Steve, 2000. *Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, a autoregulatory response regulator homolog*. Science, 289: 768-771.
- Strayer C. A. *et al.*, 2000. *Science* 289, 768.
- Sullivan A. James and Deng Wang Xing, 2003. *From seed to seed : the role of photoreceptors in Arabidopsis development*. Developmental Biology, 260: 289-297.
- Tavladoraki Paraskevi, Kloppstech Klaus and Argyroudi-Akoyunoglou Joan. *Circadian rhythm in the expression of the mRNA coding for the apoprotein of the Light-Harvesting complex of photosystem II*. Plant Physiol., 90: 665-672.
- Thien W., Schopfer P., 1975. *Control by phytochrome of cytoplasmic and plastid rRNA accumulation in cotyledons of mustard seedlings in the absense of photosynthesis*. Plant Physiol., 56: 660-664.
- Thien W., Schopfer P., 1982. *Control by phytochrome of cytoplasmic precursor rRNA synthesis in the cotyledons of mustard seedlings*. Plant Physiol., 69: 1156-1160.
- Tobin E. M., 1978. *Light regulation od specific mRNA species in Lemna gibba L*. G-3 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 4749-4753.
- Tobin E. M., Klein A.O., 1975. *Isolation and tranlation of plant messenger RNA*. Plant Physiol., 56: 88-92.
- Tobin M. Elaine and Silverthorne Jane, 1985. *Light regulation of gene expression in higher plants*. Ann. Rev. Plant Physiol., 36:569-593.
- Todo T, 1999. *Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family*. Mutat. Res., 434:89-97.
- Todo T., Takemori H., Ryo H., Ihara M., Matsunaga T, et al., 1993. *A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts*. Nature, 361: 371-374.
- Triantaphyllopoulos Kostas A. and Argyroudi-Akoyounoglou H. Joan, 1993. *Action spectrum of light-harvesting-II precursor apoprotein transcript accumulation and coordinated translation*. Eur. J. Biochem, 211:127-134
- Vierstra RD, Davis SJ., 2000. *Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction*. Semin Cell Dev Biol., 11:511-521.
- Wang H., Ma LG., Li JM., Zhao HY., Deng XW., 2001. *Direct interaction of Arabidopsis cryptochromes with COP1 in light control development*. Science, 294: 154-158.
- Wang Z. Y. *et al.*, 1997. *Plant Cell* 9, 491.

- Wang, Z. -Y. and Tobin, E.M, 1998. *Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression*. Cell 93: 1207-1217.
- Williams G.R., Novelli G.D., 1968. *Ribosome changes following illumination of dark-grown plants*. Biochem. Biophys. Acta, 155: 183-192.
- Yamaguchi Rumi, Nakamura Masanobu, Mochizuki Nobuyoshi, Kay A Steve and Nagatani Akira, 1999. *Light-Dependent translocation of a Phytochrome B-GSPfusion protein to the nucleus in Transgenic Arabidopsis*. The journal of Cell Biology, 145: 437-445.
- Yang H-Q, Wu Y-J, Tang R-H, Liu D., Liu Y. et al., 2000. *The C termini of Arabidopsis Cryptochromes mediate a constitutive light response*. Cell, 103: 815-827.
- Yanovsky J. Marchelo and Kay A. Steve, 2003. *Living by the calendar : how plants know when to flower*. Nature reviews, 4: 265-275.
- Yeh K, Wu S, Murphy J, Lagarias J.C., 1997. *A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system*. Science, 277:1505-1508.
- Yeh KC, Lagarias J.C., 1998. *Eucaryotic phytochromes: light regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 13976-13981.
- Yeh KC, Wu SH, Murphy JT, Lagarias J.C., 1997. *A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system*. Science 277: 1505-1508.
- Young, R.A. and J.D. Kelly. 1997. *RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common beans*. Crop Sci. 37:940-946
- Zagotta, M.T., Hicks, K.A., Jacobs, C.I., Young, J.C., Hangarter, R.P., and Meeks-Wagner, D.R., 1996. *The Arabidopsis ELF3 gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering*. Plant J. 10, 691-702.
- Zagotta, M.T., Shannon, S., Jacobs, C.I., and Meeks-Wagner, D.R., 1992. *Early-flowering mutants of Arabidopsis thaliana*. Aust.J. Plant Physiol. 19, 411-418.
- ZH Yu, RE Stall and CE Vallejos. 1998. *Detection of genes for resistance to common bacterial blight of beans*. Crop Sci. 38: 1290-1296.
- Ziemienowicz Alicja and Gabrys Halina, 2003. *From light to genes: phytochromes shuttle into and out of the nucleus*. The Elso Gazette, 1-6.

Βιβλία και συγγράμματα

Alberts B., Dennis B., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson D.J., “*Molecular Biology of the cell*”, Third edition

Alexander J. Ninfa and David P. Ballou “*Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology*”.

Cooper M.G., “*The Cell, a molecular approach*” Second edition

Roit, Brostoff, Male “*Immunology*”. Fifth edition.

Watson, Hopkins Roberts, Steitz, Weiner “*Molecular biology of the Gene*” Fourth edition.

William G. Hopkins “*Introduction to Plant Physiology*” Second Edition.

Γαλανοπούλου, 1999. “Σημειώσεις μαθήματος Ειδικής Γεωργίας Γ”

Γούναρης, 2000. “Σημειώσεις μαθήματος Μοριακής Γενετικής”

Pharmacia GST gene fusion Guide.

Προγράμματα και διαδικτυακοί τόποι

Η σύγκριση των αλληλουχιών μεταξύ των πρωτεϊνών LHY, CCA1 και PνLHY έγινε με το πρόγραμμα του διαδικτυακού τόπου :

<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin>

Ο έλεγχος υδροπάθειας της αλληλουχίας της PνLHY πρωτεΐνης, έγινε με το πρόγραμμα του διαδικτυακού τόπου :

<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>

Οι χάρτες περιορισμού των τριών ενθεμάτων αλλά και του πλασμιδιακού φορέα έγιναν με το πρόγραμμα :

NEB Cutter v.2.

Η φυλογενετική ανάλυση των έντεκα πληθυσμών του γένους *Phaseolus* έγινε με το πρόγραμμα :

NTSYSpc v2.02i για Windows SE

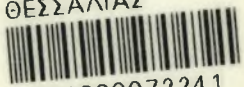
Τέλος η ομαδοποίηση, κατα την ιεραρχική μέθοδο, των έντεκα πληθυσμών με βάση τα δεδομένα αγρού έγινε με τα προγράμματα :

SPSS 10.0 για Windows SE.

SPSS 11.0 για Windows SE.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000072241