



**Υπερέκφραση του γονιδίου AtNOC, μιας αποαδενυλάσης που σχετίζεται με τον κινκάρδιο ρυθμό στο φυτό *Arabidopsis thaliana***



**Επιβλέπων Καθηγητής: Παπαδοπούλου Καλλιόπη**

**ΖΑΦΕΙΡΙΟΥ ΖΑΦΕΙΡΗΣ**

**Λάρισα 2014**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Arabidopsis thaliana* είναι ένα μικρό ποώδες φυτό, που ευδοκίμει σε Ασία, Ευρώπη και Βορειοδυτική Αφρική. Το μικρό του μέγεθος βοηθά την καλλιέργεια του σε κλειστούς χώρους και δίνει πολλές χιλιάδες σπόρους. Επιπλέον, η αυτογονιμοποίησή του εξυπηρετεί τα γενετικά πειράματα.

Τα κινκάρια ρολόγια εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς από τα κυανοβακτήρια μέχρι τον άνθρωπο και ρυθμίζουν τη συμπεριφορά τη βιοχημεία και τη φυσιολογία τους. Περίοδος των κινκάρδιων ρυθμών, που αποτελούν υποσύνολο των βιολογικών ρυθμών, είναι ο χρόνος ολοκλήρωσης ενός κύκλου 24 ωρών.

Το *Arabidopsis*, όπως και πολλά φυτά, εμφανίζει ρυθμική κίνηση της κοτυληδόνας και του φύλλου και κινκάρδιο ρυθμό στην επιμήκυνση του υποκοτηλίου (Dowson-Day and Millar, 1999) και της ταξιανθίας (Jouve et al., 1998). Συχνά συναντάται ο έλεγχος μεταγραφής από το κινκάρδιο ρολόι και είναι μεγάλη η λίστα ελέγχου γονιδίων του φυτού, από αυτό.

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η επιτυχής ενσωμάτωση του γονιδίου της AtNOC καθώς και η εμφανής έκφρασή του σε μετασχηματισμένα στελέχη της *Arabidopsis thaliana*. Η AtNOC είναι μια αποαδενυλάση η οποία ρυθμίζεται από τον κινκάρδιο ρυθμό και παράγεται από το γονίδιο της νοκτουρίνης (NOC) και είναι η πρώτη κινκάρδια-ελεγχόμενη αποαδενυλάση στο *Arabidopsis thaliana*. Η νοκτουρίνη παρουσιάζει υψηλό ρυθμό έκφρασης mRNA σε ένα κύκλο φωτός και σε συνεχείς συνθήκες.

Στο πειραματικό κομμάτι αυτής της πτυχιακής, αρχικά, απομονώθηκε το γονίδιο της AtNOC το οποίο υπάρχει σε πλασμιδιακό φορέα και όχι στο φυτικό κύτταρο. Στη συνέχεια, εισήχθη σε βακτήρια *Escherichia coli*. Αυτό έγινε επειδή τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται με ταχείς ρυθμούς ενώ μπορούν να λαμβάνουν πλασμιδιακό DNA σχετικά εύκολα. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τον γρήγορο και αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό του γονιδίου που μας ενδιαφέρει. Στη συνέχεια αγροβακτήρια μετασχηματιστήκαν με τα κλωνοποιημένα πλασμίδια που προήλθαν από την προαναφερθείσα κλωνοποίηση και φέρουν το T-DNA με το γονίδιο της AtNOC.

Τέλος, με εμβάπτιση των ανθέων των στελεχών της *Arabidopsis thaliana* σε διάλυμα μετασχηματισμένων *Agrobacterium*, εισήχθη το T-DNA στο γονιδίωμα του φυτού, και επιτεύχθηκε εν τέλει η ενσωμάτωση του σε κάποια από τα φυτά

## ABSTRACT

The *Arabidopsis thaliana* is a small herbaceous plant that grows in Asia, Europe and North Africa. Its small size helps growing indoors and gives many thousands of seeds. Furthermore, selfing of serving genetic experiments.

The circadian clocks are found in all organisms ` from cyanobacteria to man and regulate the behavior of biochemistry and physiology. Period of circadian rhythms, which are a subset of biological rhythms, is the completion time of a 24 hour cycle.

In *Arabidopsis*, as many plants, displays rhythmic movement of the leaf and cotyledon and circadian rhythm prolonging subcotyledon (Dowson-Day and Millar, 1999) and the inflorescence (Jouve et al., 1998). Often found the transcriptional control of the circadian clock and is a great checklist of plant genes, than this.

The purpose of this thesis is the successful integration of gene AtNOC and the apparent expression in transformed strains of *Arabidopsis thaliana*. The AtNOC a deadenylation which is regulated by the circadian rhythm produced by the gene *noktourin* (NOC) is the first circadian-controlled deadenylase in *Arabidopsis thaliana*. The *noktourin* has a high rate of mRNA expression in a light cycle and constant conditions.

In the experimental part of this thesis, AtNOC gene was isolated and its origin was from a plasmid vector and not the plant cell. Then it was introduced into *Escherichia coli*. This was because these bacteria have the ability to multiply rapidly and may take relatively easily plasmid DNA. This resulted in a quick and efficient amplification of the gene of interest. Then *agrobacteria* transformed with the cloned plasmids derived from the above cloning and carry the T-DNA gene-AtNOC.

Finally, by immersing the flower stems of the solution in *Arabidopsis thaliana* transformed *Agrobacterium*, the inserted T-DNA into the plant genome, and eventually achieved the insertion in some of the plants

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Ποια είναι η *Arabidopsis thaliana*;

Πρόκειται για ένα μικρό ποώδες φυτό, που ευδοκίμει σε Ασία, Ευρώπη και Βορειοδυτική Αφρική. Το φυτό ανακαλύφθηκε το 16ο αιώνα (1577) στα βουνά Harz από τον Johannes Thal, απ' όπου και ο επιθετικός προσδιορισμός *thaliana*, ενώ το όνομά του προήλθε απ' το ελληνικό «Αραβιδόψις» (μοιάζει με το πολεμικό όπλο αραβίδα, λόγω του μεγέθους και του σχήματός του). Έχει μικρό μέγεθος (γύρω στα 25cm), μικρό κύκλο ζωής (2 περίπου μήνες) και μικρό γονιδίωμα (157 εκατομμύρια βάσεις και 5 χρωμοσώματα, με 27 χιλιάδες γονίδια που κωδικοποιούν 35 χιλιάδες πρωτεΐνες). Έτσι, η γενετική χαρτογράφηση και αλληλούχιση του γονιδιώματος είναι εύκολες. Το μικρό του μέγεθος βοηθά την καλλιέργεια του σε κλειστούς χώρους και δίνει πολλές χιλιάδες σπόρους. Επιπλέον, η αυτογονιμοποίησή του εξυπηρετεί τα γενετικά πειράματα.

Η γενετική μεταμόρφωση του *Arabidopsis* είναι πλέον εύκολη υπόθεση με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens*, για την ένθεση DNA στο γονιδίωμα του φυτού (T-DNA insertion). Η περιοχή των εισαγωγών T-DNA καθορίστηκε ήδη για πάνω από 300 χιλιάδες ανεξάρτητες γονιδιακές σειρές. Οι βάσεις δεδομένων έχουν κάνει πλέον εύκολη την πρόσβαση σε πληροφορίες αλλά και την παραγγελία διαγονιδιακών σπόρων.

Τέλος, το φυτό *Arabidopsis thaliana*, αν και δεν έχει «εμπορική» αξία, - στην ουσία θεωρείται ζιζάνιο - , εν τούτοις έχει αποδειχθεί ως ιδανικός οργανισμός για τη μελέτη της ανάπτυξης των φυτών. Επίσης, είναι χρήσιμο και για ανάλυση με μικροσκοπία φωτός, αφού τα νεαρά φυτά στο σύνολό τους και ιδιαίτερα οι ρίζες τους είναι ιδιαίτερα διαφανείς.



**Εικόνα 1:** *Arabidopsis Thaliana*

## Το κερκάδιο ρολόι

Η ημέρα και η νύχτα προκύπτει από την περιστροφή της γης γύρω από τον άξονά της κάθε 24ωρο, οπότε κάθε κομμάτι της επιφάνειάς της προσεγγίζει ή απομακρύνεται από τον ήλιο. Αυτή η διαδικασία όμως επηρεάζει τη φυσιολογία, το μεταβολισμό και τη συμπεριφορά των περισσότερων οργανισμών της μέρας και της νύχτας προκαλώντας βιολογικές ταλαντώσεις (ημερήσιοι ρυθμοί). Οι περισσότεροι οργανισμοί έχουν μια έμφυτη ικανότητα να ρυθμίζουν τη βιολογία τους, ακόμα κι όταν δεν υπάρχουν εξωγενή χρονικά ερεθίσματα. Οι ημερήσιοι ρυθμοί παραμένουν, δείχνοντας ότι παράγονται από ένα ενδογενές ρολόι - αυτό είναι το βιολογικό κερκάδιο ρολόι.

Αν και οι μοριακοί μηχανισμοί λειτουργίας των οργανισμών στη διάσταση του χρόνου παραμένουν άγνωστοι, ωστόσο, εδώ και 30 χρόνια αποκαλύφθηκε η μοριακή βάση του κυτταρικού ρολογιού (Mc Clung, 2009) χάρη στις προσεγγίσεις της μοριακής γενετικής.

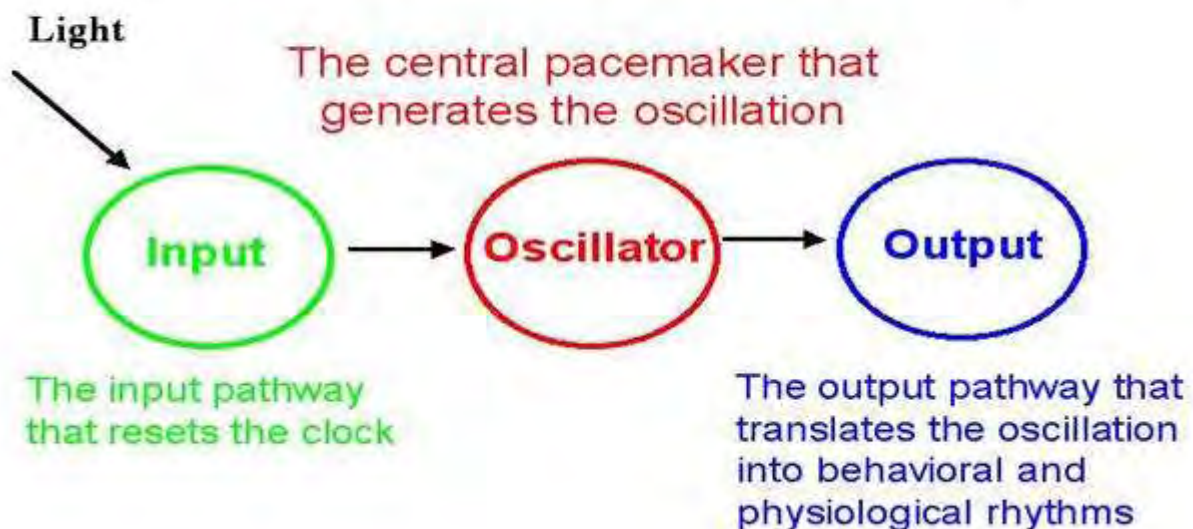
Τα κερκάδια ρολόγια εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς - από τα κυανοβακτήρια μέχρι τον άνθρωπο και ρυθμίζουν τη συμπεριφορά τη βιοχημεία και τη φυσιολογία τους.

Σύμφωνα με μελέτες, ο μοριακός μηχανισμός του ρολογιού είναι συντηρημένος, ακόμα και σε περιπτώσεις που συγκεκριμένα γονίδια δεν είναι.

Ο κεντρικός πυρήνας του μηχανισμού του ρολογιού αποτελείται από ένα βρόχο αρνητικής ανατροφοδότησης. Τα σχετικά πρόσφατα όμως δεδομένα, μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ύπαρξη ενός κικαδίου ρολογιού απαιτεί τη χρησιμοποίηση διαφορετικών επιπέδων ρύθμισης. Για παράδειγμα, η μεταγραφική ενεργοποίηση και η καταστολή κεντρικών γονιδίων του ρολογιού, είναι η βάση του κικαδίου στη *Drosophila* και στα σπονδυλωτά.

Σήμερα λοιπόν ξέρουμε, ότι το επίπεδο που ελέγχονται τα πρωτεϊνικά προϊόντα αυτών των κεντρικών γονιδίων δεν είναι μόνο μεταγραφικό, αλλά και μετα-μεταφρασικό, με αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, με αποικοδόμηση, με φωσφορλίωση και με ενδοκυτταρικό εντοπισμό, γεγονότα που ρυθμίζονται και τα ίδια με ρυθμό (Baggs and Green, 2003).

## The Circadian System Model



**Εικόνα 2:** Κικαδικός ρυθμός

## Χαρακτηριστικά του κηκάρδιου ρυθμού

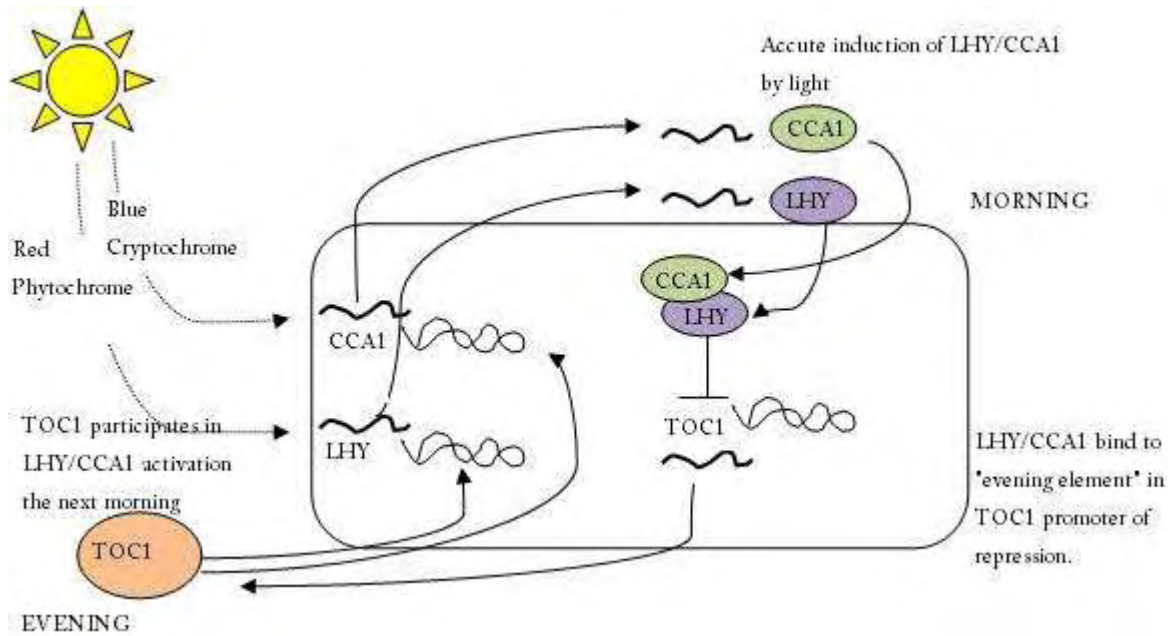
Περίοδος των κηκάρδιων ρυθμών, που αποτελούν υποσύνολο των βιολογικών ρυθμών, είναι ο χρόνος ολοκλήρωσης ενός κύκλου 24 ωρών. Απ' αυτό λοιπόν το χαρακτηριστικό τους ο Franz Halberg το 1959 εμπνεύστηκε τον όρο "circadian" (κηκάρδιος) από τις λατινικές λέξεις "circa" (κύκλος) και "dies" (ημέρα). Δεύτερο χαρακτηριστικό τους είναι η ενδογενής παραγωγή και αυτο-συντήρησή τους που τους καθιστά ανθεκτικούς στις συνεχείς περιβαλλοντικές συνθήκες (συνεχές φώς ή σκοτάδι και συνεχής θερμοκρασία).

Αυτός ο έλεγχος συνθηκών, οδηγεί σε απώλεια συγχρονισμού με τον 24ωρο κύκλο, καθώς ο οργανισμός στερείται εξωτερικών χρονικών ερεθισμάτων. Τρίτο χαρακτηριστικό όλων των κηκάρδιων ρυθμών είναι η σχετική σταθερότητα της περιόδου σε κλίμακα περιβαλλοντικών θερμοκρασιών (Pittendrigh, 1954). Έτσι οι μεταβολές του κυτταρικού μεταβολισμού αφήνουν ανεπηρέαστο το ρολόι.

Ένας οργανισμός, μόνο κάτω από συνθήκες εργαστηρίου, στερείται περιβαλλοντικών χρονικών ερεθισμάτων (κύκλοι φωτός-σκότους και κύκλοι θερμοκρασίας εξαιτίας της εναλλαγής μέρας και νύχτας). Αυτά τα ερεθίσματα, οι αποκαλούμενοι χρονοθέτες, (απ' το γερμανικό όρο zeitgeber· zeit=χρόνος geber=δότης) συγχρονίζουν το ενδογενές σύστημα χρόνου με την περίοδο των 24 ωρών, εναρμονιζόμενοι με την εξωγενή περίοδο περιστροφής της γής.

Τα ερεθίσματα που παράγονται κατά τη διάρκεια της ημέρας, κάνουν δυνατή την επανεκκίνηση του ρολογιού. Έτσι, ενώ ένας παλμός φωτός πριν την αυγή μπορεί να προχωρήσει τη φάση του ρολογιού, ο ίδιος παλμός μετά το σούρουπο θα την καθυστερήσει και αν δοθεί το μεσημέρι δε θα έχει κανένα αποτέλεσμα. Προφανώς λοιπόν το κηκάρδιο ρολόι λειτουργεί με μια δική του ευαισθησία στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (McClung, 2009).





Εικόνα 3: Ρύθμιση κερκαδικού ρυθμού

## Το φυτό *Arabidopsis thaliana* εμφανίζει πολλούς κερκαδικούς ρυθμούς

Το *Arabidopsis*, όπως και πολλά φυτά, εμφανίζει ρυθμική κίνηση της κοτυληδόνας και του φύλλου και κερκαδίο ρυθμό στην επιμήκυνση του υποκοτηλίου (Dowson-Day and Millar, 1999) και της ταξιανθίας (Jouve et al., 1998). Συχνά συναντάται ο έλεγχος μεταγραφής απο το κερκαδίο ρολόι και είναι μεγάλη η λίστα ελέγχου γονιδίων του φυτού, απο αυτό.

Ανάλυση με μικροσυστοιχίες έδειξε τα παρακάτω: το 10% περίπου του συνόλου των γονιδίων *Arabidopsis* ρυθμίζεται στο επίπεδο του mRNA, ενώ ανιχνεύθηκαν πολλά μεταβολικά μονοπάτια που ρυθμίζονται κερκαδία (Harmer et al., 2000; Schaffer et al., 2001). Η ανάλυση έδειξε ότι τα μεταγραφα που ρυθμίζονται κερκαδία έχουν μικρό χρόνο ημιζωής (Gutierrez et al., 2002). Τέλος, πάνω απο το 35% του μεταγραφωσώματος μπορεί να ρυθμιστεί κερκαδία (Michael and McClung, 2003).

Είναι σημαντικό να θυμόμαστε οτι, αν και η μελέτη του κερκαδικού ρυθμού έχει επικεντρωθεί σε συνεχείς συνθήκες, τα φυτά στη φύση αναπτύσσονται σε μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Σε φυτά που αναπτύσσονται κερκαδία, υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση με το

μεταβολισμό των σακχάρων, πράγμα που επηρεάζει σημαντικά την περιοδική γονιδιακή έκφραση (Blasing et al., 2005).

Εξάλλου, πρόσφατα δεδομένα καθιστούν σαφές ότι το κικκάδιο ρολόι διαμορφώνει την ικανότητα απόκρισης σε αβιοτικό στρές, όπως το κρύο (Fowler et al., 2005)(McClung., 2009).

## **Το φυτό Arabidopsis και το κικκάδιο ρολόι του**

Όπως προαναφέρθηκε, τα κικκάδια ρολόγια ρυθμίζουν σε πολλούς οργανισμούς τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά τους. Το περιεχόμενο του ευκαρυωτικού ρολογιού είναι κυτταροπλασματικά σηματοδοτικά μόρια και βρόχοι ανατροφοδότησης με θετικά και αρνητικά στοιχεία για τη γονιδιακή έκφραση. Το ρολόι του Arabidopsis περιλαμβάνει τρεις τουλάχιστον βρόχους ανατροφοδότησης: τον κεντρικό βρόχο (central loop), ένα βρόχο συγχρονισμού με το πρωί κι ένα βρόχο συγχρονισμού με το βράδυ (morning-phased loop, evening-phased loop) (James et al., 2008).

Η βάση του βρόχου ανατροφοδότησης (central loop) είναι η αλληλεπίδραση του TOC1 (Timing Of Cab expression 1), του LHY (Late elongated HYrocotyl) και του CCA1 (Circadian Clock Associated 1) (εικόνα 2). Η βάση του βρόχου ανατροφοδότησης είναι αυτή που καθορίζει την κικκάδια ρυθμικότητα στο Arabidopsis. Τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης των CCA1 και LHY (δύο μεταγραφικοί παράγοντες σχετικοί με τη MYB οικογένεια) εμφανίζουν μέγιστο την αυγή. Όταν υπάρχει υπερέκφραση CCA1 ή LHY οφειλόμενη σε ιδιοσύστατο υποκινητή το αποτέλεσμα είναι ο ένας παράγοντας να ρυθμίζει καθοδικά τον άλλο, κι αυτό οδηγεί σε αρρυθμία. Από τα παραπάνω λοιπόν καταλαβαίνουμε ότι οι συγκεκριμένοι παράγοντες είναι μεν συστατικά ενός βρόχου αρνητικής ανατροφοδότησης, η οποία όμως είναι απολύτως απαραίτητη για την παραγωγή και διατήρηση των κικκάδιων ρυθμών.

Το TOC1 κωδικοποιεί για ένα ρυθμιστή (pseudoregulator) που έχει μέγιστο έκφρασης το σούρουπο. Οι μεταλλάξεις του μικραίνουν την περίοδο όλων των μέχρι τώρα ελεγχμένων κικκάδιων ρυθμών, η αύξηση της δόσης του TOC1 μεγαλώνει την περίοδο των κικκάδιων ταλαντωτών, ενώ η υπερέκφραση του TOC1 από ιδιοσύστατο υποκινητή προκαλεί αρρυθμία. Τα πολλά μοτίβα του TOC1 δείχνουν ότι συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση. Πράγματι, τα επίπεδα του mRNA των παραγόντων CCA1 και LHY μειώνονται στο μετάλλαγμα toc1-2 (πιθανό αλληλόμορφο με μηδενική μετάλλαξη).

Το μετάλλαγμα elf4, που δεν εμφανίζει ρυθμικότητα στο συνεχές φώς και στο συνεχές σκοτάδι, προκαλεί αισθητή μείωση στην έκφραση του CCA1. Το ELF4 (Early Flowering 4) δεν εμφανίζει ομολογία με πρωτεΐνες γνωστής λειτουργίας, η έκφρασή του είναι κυκλική, με φάση

παρόμοια με του TOC1. Αυτό δείχνει ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορεί να συλλειτουργήσουν για να προωθήσουν την έκφραση του CCA1 και του LHY, τα οποία ρυθμίζουν την ίδια τους την έκφρασή καθοδικά προκαλώντας καταστολή της έκφρασης του TOC1. Αυτό γίνεται μέσω της πρόσδεσης του CCA1 και του LHY σε ένα στοιχείο 9 νουκλεοτιδίων που βρίσκεται στον υποκινητή του TOC1 (AAATATCT) και είναι κρίσιμο για την κirkάδια ρύθμιση.

Το evening element (EE) είναι στοιχείο που, όπως ήδη αναφέραμε, αναγνωρίζουν οι παράγοντες CCA1 και LHY στον υποκινητή του TOC1 και εντοπίζεται σε μια ομάδα γονιδίων συγχρονισμένων με το βράδυ. Επίσης, τα EE είναι πανομοιότυπα με την ακολουθία AAAAATCT που ο CCA1 στον υποκινητή του γονιδίου LIGHT HARVESTING CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1, ένα γονίδιο που ρυθμίζεται από το ρολόι με μέγιστο έκφρασης του το πρωί. Υπάρχει πιθανότητα ο CCA1 και ο LHY, εκτός του ότι είναι μέλη ενός βρόχου ανατροφοδότησης για την κirkάδια ρυθμικότητα, να λειτουργούν ως καταστολείς της έκφρασης αρκετών γονιδίων συγχρονισμένων με το βράδυ, για να προωθήσουν την έκφραση γονιδίων συγχρονισμένων με το πρωί. Έτσι, παρέχουν ένα μηχανισμό που συνδέει τον κirkάδιο ταλαντωτή με πολλές βιοχημικές και φυσιολογικές διεργασίες. Από τα φυτά μέχρι τα θηλαστικά, τα κirkάδια ρολόγια, ρυθμίζουν αναπτυξιακές και μεταβολικές διεργασίες, με τον έλεγχο της έκφρασης ρυθμιστικών γονιδίων-κλειδιών (Yanovsky and Kay, 2003).

Σύμφωνα με μελέτες στη *Drosophila*, υπάρχει ένας ανάλογος μηχανισμός με αυτόν του *Arabidopsis*. Τα γονίδια της *Drosophila* που είναι υπεύθυνα για τη λειτουργία του κirkάδιου ρολογιού είναι το PERIOD (PER), το TIMELESS (TIM), το BMAL1 (CYCLE), το CLOCK, το CRYPTOCHROME (CRY) και το DOUBLETIME (DBT). Τα γονίδια CLOCK και BMAL1 κωδικοποιούν για δύο βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες της μορφής έλικας-θηλιάς-έλικας (bHLH)-PAS μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι σχηματίζουν το ετεροδιμερές CLOCK-BMAL1 μέσα στον πυρήνα και προσδένονται σε στοιχεία E-box στους υποκινητές των γονιδίων του ρολογιού ενεργοποιώντας την έκφρασή τους. Τέτοια γονίδια είναι το PER και το TIM τα προϊόντα των οποίων σχηματίζουν το διμερές PER-TIM στο κυτταρόπλασμα και κατόπιν εισέρχονται στον πυρήνα και καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση (εικόνα 3). Στη μύγα, το CRY λειτουργεί κυρίως σαν φωτοϋποδοχέας (προσδένει το ετεροδιμερές PER-TIM) με εξαρτώμενο από το φως τρόπο, διαμεσολαβώντας στην εξαρτώμενη από το φως αποικοδόμηση του TIM.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης μελέτες στη *Drosophila* που αφορούν τη μετα-μεταγραφική και μετα-μεταφραστική ρύθμιση των στοιχείων του κirkάδιου ρολογιού. Προτάθηκαν μοντέλα που προβλέπουν τη σπουδαιότητα της αποικοδόμησης των mRNAs και των πρωτεϊνών του κirkάδιου ρολογιού, στον έλεγχο της περιοδικότητας. Για παράδειγμα, ο βαθμός στον οποίο το ετεροδιμερές PER-TIM καταστέλλει τη γονιδιακή έκφραση, μπορεί να ρυθμιστεί με τη σταθερότητα του PER και του TIM. Το γονίδιο DBT κωδικοποιεί για μια κινάση που μειώνει τη σταθερότητα του μονομερούς PER με τη φωσφορυλίωσή του. Μύγες με απενεργοποιημένο το γονίδιο DBT, συσσωρεύουν υποφωσφορυλιωμένο PER (εικόνα 4) (Cermakian and Sassone-Corsi, 2000).

## Αποαδενυλάσες

Αποαδενυλάσες είναι οι εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολυ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας 5'-AMP. Αν και το κύριο υπόστρωμα των αποαδενυλασών είναι οι 3'-πολυ(A) ουρές, έχει αποδειχθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις αποικοδομούν και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή, αλλά λιγότερο αποτελεσματικά (Goldstrohm and Wickens, 2008). Το βασικό χαρακτηριστικό των γνωστών αποαδενυλασών είναι Mg<sup>2+</sup> - εξαρτώμενα ένζυμα.

Η ποικιλία των συναντώμενων αποαδενυλασών είναι μεγάλη και διαφορετική για κάθε είδος οργανισμού. Για παράδειγμα, ενώ μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και Angel υπάρχουν σε όλους τους ευκαρυώτες, άλλες αποαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες (πχ η Drosophila melanogaster, που στερείται και της PARN και της CAF1Z (Goldstrohm and Wickens, 2008). Υπάρχουν αποαδενυλάσες, οι οποίες στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs, αποδίδοντας έτσι υψηλό βαθμό εξειδίκευσης στο μηχανισμό αποικοδόμησης του mRNA με διακριτές μεν αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες, αποδίδοντας μεγαλύτερη ευελιξία και προσαρμοστικότητα.

## Κατάταξη αποαδενυλασών

Η κατάταξη των αποαδενυλασών εξαρτάται από το αν είναι παρόντα ή απόντα συγκεκριμένα συντηρημένα κατάλοιπα στο καταλυτικό τους κέντρο. Σύμφωνα λοιπόν μ' αυτή τη συνθήκη, οι αποαδενυλάσες κατατάσσονται σε δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες: την DEDD και την EEP. Στην DEDD υπεροικογένεια (ονομάστηκε έτσι από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που συντονίζουν τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> και βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξονουκλεάσης), ανήκουν η αποαδενυλάση POP2 (γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), και οι οικογένειες των PAN2 αποαδενυλασών. Η EEP (exonuclease-endonuclease-phosphatase) οικογένεια περιλαμβάνει αποαδενυλάσες οι οποίες στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His. Τέτοιες αποαδενυλάσες είναι οι Nocturnin, η CCR4 και η Angel.

## Βιολογικός ρόλος αποαδενυλασών

Η βασική λειτουργία των αποαδενυλασών είναι η αποικοδόμηση του συνόλου των μεταγράφων. Ωστόσο μπορούν να αναλάβουν και αρκετούς άλλους εξειδικευμένους και ρυθμιστικούς ρόλους. Συγκεκριμένα, ορισμένες από αυτές είναι σημαντικές για την επιβίωση των οργανισμών, ενώ μεταλλάξεις τους μπορούν να προκαλέσουν ποικιλία φαινοτύπων. Επιπλέον, συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες απαιτούν συγκεκριμένες αποαδενυλάσες. Αυτό αποδεικνύει ότι η ομαλή λειτουργία αυτών των διεργασιών, εξαρτάται απολύτως από τον έλεγχο ορισμένων mRNAs (Goldstrohm and Wickens, 2008; Parke and Song, 2004). Για παράδειγμα, πολλές αποαδενυλάσες, ανάμεσά τους η PARN του *Xenopus laevis* και η CCF-1 του *C.elegans*, είναι σημαντικές κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης και άλλες (όπως η CNOT7 στα ποντίκια) είναι απαραίτητες για τη γονιμότητα και τη μεταβολική ομοιόσταση. Παρατηρήθηκε, ότι ποντίκια που στερούνται *Nocturnin* σε σύγκριση με ποντίκια που τη διαθέτουν, κάτω απ' τις ίδιες συνθήκες διατροφής και συνπεριφοράς, αποκτούν μικρότερο σωματικό βάρος και λίπος.

## Μελετημένες αποαδενυλάσες στο *Arabidopsis thaliana*

Λίγες είναι οι μελέτες που έχουμε υπ' όψιν μας οι οποίες είναι σχετικές με τις αποαδενυλάσες στα φυτά και συγκεκριμένα στο *Arabidopsis thaliana*. Κυρίως έχουν μελετηθεί οι AtPARN και η AtCAF1 ενώ η AtNOC μελετάται περεταίρω μέχρι σήμερα.

AtPARN: Το ομόλογο της πολύ(A)-ειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN) έχει μελετηθεί στο *Arabidopsis*. Η PARN είναι αποαδενυλάση που πρωτοχαρακτηρίστηκε σε θηλαστικά, απουσιάζει όμως από τη ζύμη και τη *Drosophila* (πινακας 3). Η AtPARN εκφρασμένη σε κύτταρα *E.coli*, διαθέτει *in vitro* αποικοδομητική ενεργότητα, που σημαίνει την ύπαρξη συντηρημένων περιοχών και καταλοίπων αμινοξέων, σημαντικών για την καταλυτική ενεργότητα (Reverdatto, 2004). Η N-τελική περιοχή της HuPARN, όπου βρίσκονται οι καταλυτικές περιοχές, μοιάζει με τη N-τελική περιοχή της AtPARN. Γενικά στις PARN η N-τελική περιοχή είναι πιο σημαντική από τη C-τελική για την ενεργότητά της. Επιπλέον οι PARN

διαθέτουν τρεις κρίσιμες Exo-περιοχές που είναι χαρακτηριστικές της οικογένειας των ενζύμων RNAaseD (Chiba et al., 2003). Σύμφωνα με βιοχημικές μελέτες, η PARN εξαρτάται από δισθενή μεταλλικά ιόντα, ενώ η μέγιστη δραστηριότητά της εμφανίζεται με την παρουσία ιόντων  $Mg^{2+}$ , που πιθανόν βρίσκονται στο μοτίβο DEDD του ενεργού κέντρου και παίζουν καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό κατάλυσης.

Επιπρόσθετα, η PARN περιέχει μια σπάνια διατηρημένη RH3 περιοχή, που η δομή της είναι όμοια μ' αυτή της IF3 καρβοξυτελικής περιοχής (Wu et al., 2005). Η RH3 περιοχή, που προσδέεται σε μονόκλινα νουκλεϊκά οξέα πιθανόν επιστρατεύει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA. Η AtPARN, σύμφωνα με πειράματα πρωτεϊνικού εντοπισμού σε φυτικά κύτταρα, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Εξ' άλλου, πειράματα με μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της AtPARN καταδεικνύουν τη σημαντικότητα του γονιδίου της στην πρώιμη ανάπτυξη. Αν και ακόμη δεν έχουν απενεργοποιηθεί (Knockout) σε άλλους οργανισμούς ομόλογα γονίδια της AtPARN, όλες οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η σημασία και η χρησιμότητα του ενζύμου σε πολλούς άλλους πολυκύτταρους οργανισμούς, είναι μεγάλες.

AtCAF1: Η φαινοτυπική ανάλυση των μεταλλαγμάτων *caf1*, που έγινε σε μια σειρά πρότυπων οργανισμών, έκανε απολύτως σαφές ότι η CAF1 είναι ζωτικής σημασίας για ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διαδικασιών. Σύμφωνα με μια μελέτη, βρέθηκε ότι η υπερέκφραση ενός ομολόγου CAF1 της πιπεριάς (*Capsicum annuum* CaCAF1) στη ντομάτα προκαλεί αύξηση της αντίστασης στο παθογόνο *Phytophthora oomycete infestans*. Αντίθετα, η αποσιώπηση της CaCAF1 στο πιπέρι προκαλεί σημαντική καθυστέρηση στην ανάπτυξη του φυτού και μεγαλύτερη ευαισθησία στο παθογόνο *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria*. Στο *Arabidopsis* βρέθηκαν 11 *caf1* γονίδια από τα οποία δύο από αυτά ταυτοποιήθηκαν το *Atcaf1* και το *Atcaf1b* που κατά τα φαινόμενα εντοπίζονται σε ορμονικούς και στρεσογόνους παράγοντες όπως το ιασμονικό οξύ, ο τραυματισμός του φυτού, το κρύο και διάφορα παθογόνα. Τέλος, πειράματα απέδειξαν επίσης ότι τα *Atcaf1* και *Atcaf1b* έχουν ρόλο ελαφρώς επικαλυπτόμενο και μπορούν να στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs (Justin W. Walley et al., 2010).

## **Νοκτουρνίνη (Nocrutnin), μια αποαδενυλάση που ελέγχεται απ' το κιρκάδιο ρολόι**

Το κιρκάδιο ρολόι εκτός από μεταγραφικά και μετα-μεταφραστικά ρυθμίζεται και μετα-μεταγραφικά. Σύμφωνα με τα δεδομένα από το *Arabidopsis*, τη *Drosophila* και θηλαστικά, φαίνεται ότι ο ρόλος των μετα-μεταγραφικών ρυθμιστικών μηχανισμών είναι σημαντικός, ως προς τον έλεγχο της διατήρησης των επιπέδων των mRNAs που σχετίζονται με το κιρκάδιο ρολόι. Αν και δεν υπάρχει γνώση για τη μοριακή φύση του μετα-μεταγραφικού ελέγχου, τα δεδομένα δείχνουν ότι αυτός ο μηχανισμός διαθέτει ο ίδιος ρυθμικότητα.

Η νοκτουρνίνη (ένα γονίδιο που ονομάζεται έτσι επειδή το mRNA της μεταγράφεται σε υψηλά επίπεδα νωρίς τη νύχτα), ταυτοποιήθηκε στο *Xenopus*. Συγκεκριμένα, στον αμφιβληστροειδή του *Xenopus* υπάρχει ένα ενδογενές κιρκάδιο ρολόι, που ρυθμίζει μια σειρά από φυσιολογικές και βιοχημικές διεργασίες. Η νοκτουρνίνη παρουσιάζει υψηλό ρυθμό έκφρασης mRNA σε ένα κύκλο φωτός και σε συνεχείς συνθήκες. Στον αμφιβληστροειδή λοιπόν, το mRNA της νοκτουρνίνης εντοπίζονται στα ραβδία και στα κωνία των φωτούποδοχέων της κυτταρικής στοιβάδας, όπου εντοπίζεται και το κιρκάδιο ρολόι. Αυτό οδηγεί στη ρυθμική απελευθέρωση μελατονίνης καθώς και στην έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων του ρολογιού του *Xenopus*.

Έχει ταυτοποιηθεί ότι το ομόλογο της νοκτουρνίνης στο ποντίκι (*mNoc*), είναι εξαιρετικά συντηρημένο σε επίπεδο αμινοξέων. Κι όμως, αντίθετα με το *Xenopus*, το mRNA της *mNoc* εκφράζεται σ' ένα ευρύ φάσμα ιστών του ποντικού (συκώτι, νεφροί, εγκέφαλος, πνεύμονες, καρδιά και αμφιβληστροειδής). Σε αρκετούς απ' αυτούς τους ιστούς παρατηρήθηκε υψηλή κιρκάδια έκφραση του mRNA της νοκτουρνίνης, με μέγιστο έκφρασης νωρίς τη νύχτα (Baggs and Green, 2003). Η νοκτουρνίνη, που είναι συντηρημένη στους ευκαρυώτες, εκφράζεται στον κύριο βηματοδότη των θηλαστικών που είναι υπερχιασματικός πυρήνας του υποθαλάμου, αλλά δεν έχει ρυθμική έκφραση. Η πρωτεΐνη της νοκτουρνίνης βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (Douris and Green, 2009). Ομόλογά της έχουν κλωνοποιηθεί από τον άνθρωπο, την αγελάδα, το κοτόπουλο και τη *Drosophila*, και πιθανολογείται ότι υπάρχει ομόλογο και στο *Arabidopsis*.

Η νοκτουρνίνη, σύμφωνα με την ανάλυση της βάσης δεδομένων, είναι μια νέα πρωτεΐνη που η ακολουθία της μοιάζει ως προς το C-τελικό άκρο μ' αυτή της πρωτεΐνης Ccr4p του *Sacharomyces cerevisiae* που ταυτοποιήθηκε ως ένας μεταγραφικός συνενεργοποιητής (Baggs and Green, 2003). Ο Ccr4p αν και δεν προσδένει άμεσα το DNA, αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες μέσα από μια περιοχή πλούσια σε λευκίνες. Το N-τελικό άκρο της νοκτουρνίνης έχει μια περιοχή που μοιάζει με φερμουάρ λευκίνης. Τόσο η νοκτουρνίνη όσο και η Ccr4p ανήκουν

σε μια μεγάλη οικογένεια νουκλεασών εξαρτώμενων από μαγνήσιο ( $Mg^{+2}$ ). Μέλη της οικογένειας αυτής όπως η DNAase I, η APE I (DNA-repair apurinic/apirimidinic endonuclease) και η οικογένεια IP5P (inositol polyphosphate 5-phosphatases) διαθέτουν «τσέπες» με παρόμοια κατάλοιπα αμινοξέων συντηρημένα, που είναι σημαντικά για την κατάλυση και σε αυτά εμπεριέχεται η περιοχή πρόσδεσης του  $Mg^{+2}$ . Επίσης, κατόπιν ανάλυσης της αναδίπλωσης με ειδικό λογισμικό φαίνεται ότι η νοκτουρνίνη έχει ομοιότητες στη δομή της με την APE I (Baggs and Green, 2003), μικρές μεν, αλλά που αντιστοιχούν σε κρίσιμες ακολουθίες για τη δομή και τη λειτουργία της οικογένειας των νουκλεασών (Green, 2003). Η C-τελική περιοχή της Ccr4p (που μοιάζει με τη νοκτουρνίνη και άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας των  $Mg^{+2}$ , φαίνεται ότι δρά ως αποαδενυλάση (Baggs and Green, 2003).

Συνοψίζοντας, η νοκτουρνίνη είναι μια 3-εξωριβονουκλεάση με εξειδίκευση στο πολύ(A) και δρά ως αποαδενυλάση, δηλαδή μπορεί να αφαιρεί την πολύ(A)-ουρά από τα mRNA (εικόνα 7). Η αποαδενυλίωση είναι το πρώτο βήμα αποικοδόμησης του mRNA και έχει συμμετοχή στη μεταφραστική αποσιώπηση. Η απώλεια της πολύ(A)-ουράς άλλοτε οδηγεί σε ταχεία αποικοδόμηση του mRNA, με φορά 3'-5', και άλλοτε, με την εξασθένιση του σχηματισμού των κυκλικών πολυσωμάτων, εμποδίζει τη μετάφραση. Μολονότι δε γνωρίζουμε ακόμη πολλά για το ρόλο της νοκτουρνίνης στην αποαδενυλίωση ωστόσο υπάρχουν αποδείξεις ελέγχου της απ' τον κεντρικό ρυθμό δρώντας στο επίπεδο της αποικοδόμησης του mRNA και της μετάφρασης (Douris and Green, 2009).



## ***Agrobacterium* και μεταφορά DNA**

Περισσότερα από ογδόντα χρόνια έχουν περάσει από το πρώτο άρθρο που δημοσιεύθηκε από τους Smith και Townsend, στο οποίο παρουσιάστηκαν μαρτυρίες για την αιτία της δημιουργίας μιας άμορφης, συμπαγούς και μη διαφοροποιημένης μάζας κυττάρων σε γυμνόσπερμα και δικότυλα φυτά. Ο σχηματισμός της μάζας αυτής εξαρτάται από το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*. Είναι ένα Gram-αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο εδάφους και είναι ο μοναδικός παράγοντας που προκαλεί την ευρέως διαδεδομένη ασθένεια της νεοπλασίας των φυτών που ονομάζεται κορονωτός κάλλος (εικόνα 2.1 βιβλίου). Το σύμπτωμα γίνεται αντιληπτό όταν μολυνθεί κάποιος πληγωμένος φυτικός ιστός από το βακτήριο. Στη φύση, οι κάλλοι αυτοί σχηματίζονται από υπέργειο τμήμα του φυτού που εφάπτεται με το έδαφος.

Μετά από μια περίοδο περιορισμένου ενδιαφέροντος από τους ερευνητές για το σύστημα *Agrobacterium* και τον κορονωτό κάλλο, η ερευνητική δραστηριότητα αναζωογονήθηκε όταν έγινε φανερό ότι η δημιουργία του κορονωτού κάλλου διαμορφώνεται εξαιτίας ορισμένων γονιδίων του *Agrobacterium* που μεταφέρονται στο φυτό. Οι αλληλεπιδράσεις του *Agrobacterium* με το φυτικό κύτταρο είναι το μόνο γνωστό παράδειγμα στη φύση που συμβαίνει μεταφορά του DNA μεταξύ δύο βασιλείων (βακτήρια-φυτά). Κατά τη διεργασία αυτή μεταφέρεται DNA από το *Agrobacterium* αγρίου τύπου στο πυρηνικό γονιδίωμα του φυτικού κυττάρου.

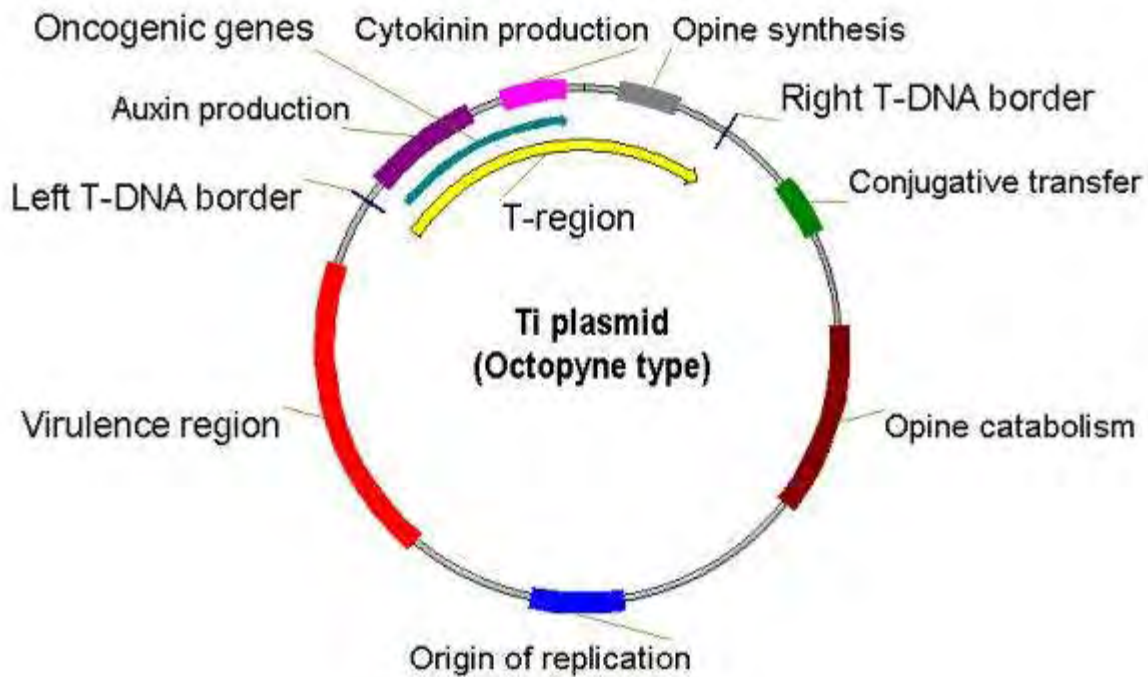


**Εικόνα 4:** *Agrobacterium Tumefaciens*

## Πλασμίδιο Ti (Tumor inducing)

Πριν από είκοσι χρόνια περίπου, μία πολύ σημαντική ανακάλυψη έλαβε χώρα και άλλαξε τις μέχρι τότε εικασίες για τη δημιουργία των παράξενων προαναφερθέντων όγκων στα φυτά. Βρέθηκε ότι τα τοξικά στελέχη του *A. tumefaciens* περιέχουν ένα μεγάλο εξωχρωμοσωμικό στοιχείο, στο οποίο εδράζονται τα γονίδια που εμπλέκονται στην επαγωγή του κορονωτού κάλλου. Το εξωχρωμοσωμικό στοιχείο το οποίο βρέθηκε, αποδείχθηκε ότι είναι ένα πλασμίδιο με εξαιρετικά μεγάλο μέγεθος (<200kb). Εξαιτίας του ρόλου του στην επαγωγή του κορονωτού κάλλου, το πλασμίδιο αυτό ονομάστηκε Ti (Tumor inducing) ογκο-επαγωγικό πλασμίδιο.

Η εισαγωγή του πλασμιδίου Ti σε συγγενή είδη βακτηρίων, όπως στα φυματοεπαγωγικά βακτήρια της ρίζας *Rhizobium trifolii* ή στο βακτήριο που επάγει φυμάτια στα φύλλα *Phyllobacterium myrsinacearum*, οδήγησε στη δημιουργία ογκο-επαγωγικών στελεχών, τονίζοντας έτσι ότι είναι ένα μεγάλο μέρος των τοξικών και καθοριστικών παραγόντων-γονιδίων που εδράζονται πάνω στο πλασμίδιο του *Agrobacterium*, είναι αναγκαία για τη δημιουργία όγκων στα φυτά ξενιστές. Αντίθετα, η εισαγωγή με μετασχηματισμό και η διατήρηση του πλασμιδίου Ti σε απομακρυσμένα άλλα συγγενικά είδη βακτηρίων, όπως το *Escherichia coli* ή το *Pseudomonas aeruginosa*, δεν οδήγησε σε ογκο-επαγωγικά στελέχη, αποδεικνύοντας έτσι ότι και άλλοι παράγοντες-γονίδια, μάλλον χρωμοσωμικής προέλευσης, είναι επίσης σπουδαίοι και ουσιαστικοί για την επαγωγή του κορονωτού κάλλου.



Εικόνα 5: Τι πλασμίδιο

## T-DNA και Διαγονιδιακά φυτά

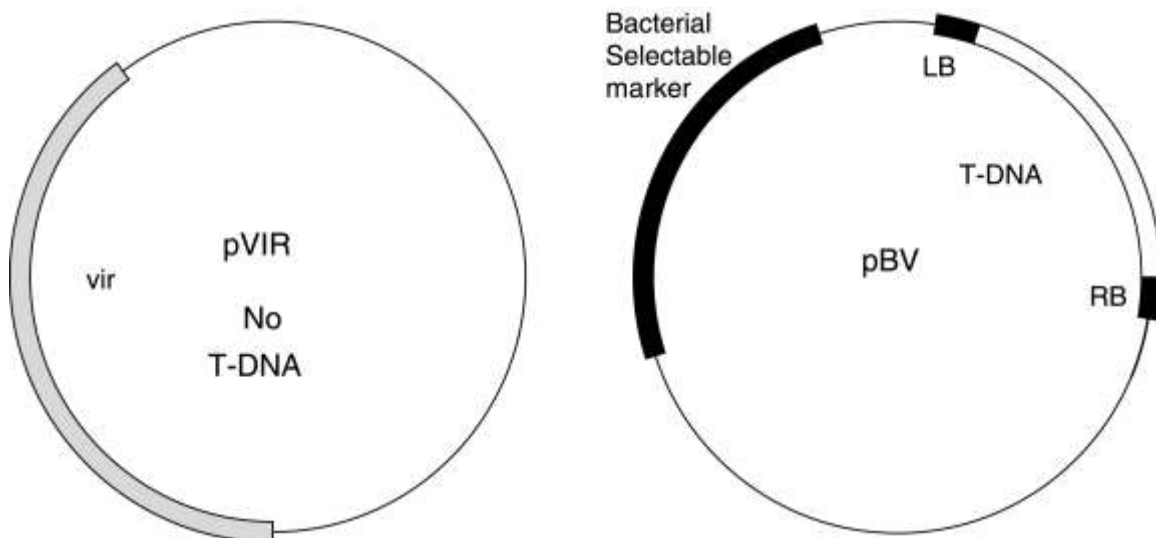
Το πλασμίδιο Ti δεν μεταφέρεται ολόκληρο στα φυτικά κύτταρα αλλά μόνο μια περιοχή του (μήκους περίπου 20 kb), που ονομάζεται T-DNA (Transfer DNA). Η περιοχή αυτή μεταφέρεται στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων και επάγει τη δημιουργία όγκων. Αν και κανένα άλλο τμήμα του πλασμιδίου Ti, εκτός του T-DNA, δεν κινητοποιείται και δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα των φυτών, για πολύ καιρό υπήρχε η άποψη ότι ολόκληρο το πλασμίδιο Ti εισερχόταν μέσω του *Agrobacterium* στο φυτικό κύτταρο. Μετά από αναλύσεις κατά Southern βρέθηκε ότι μόνο η περιοχή T-DNA του πλασμιδίου Ti ενσωματώνεται στο γονιδίωμα των φυτών. Οι αναλύσεις λειτουργικότητας των γονιδίων που εδράζονται στο πλασμίδιο Ti με διάφορες μεταλλάξεις, δείχνουν ότι το T-DNA δεν είναι ένα αυθαίρετο κομμάτι DNA αλλά μια εντελώς προκαθορισμένη περιοχή του πλασμιδίου Ti. Το τμήμα αυτό προσδίδει νέες φυσιολογικές λειτουργίες και χαρακτηριστικά στα φυτικά κύτταρα και είναι απορίας άξιον το γεγονός ότι παρόλο το μικρό μέγεθος του T-DNA σε σχέση με το υπόλοιπο

φυτικό γονιδίωμα, μπορεί να εξουσιάζει όλο το βιολογικό μηχανισμό του κυττάρου και να αλλάζει ριζικά τη φυσιολογία και την οντότητα του κυττάρου αυτού.

Για τη μεταφορά του T-DNA στο φυτικό κύτταρο είναι αναγκαία η περιοχή *vir* (virulence), η οποία κωδικοποιεί μια σειρά πρωτεϊνών που βοηθούν σημαντικά τη μεταφορά αυτή και είναι γνωστό ότι η περιοχή αυτή δε μετακινείται αλλά ούτε και ενσωματώνεται ποτέ μέσα στο γονιδίωμα των μετασχηματισμένων φυτικών κυττάρων. Γενικά τρία είναι τα συστατικά που χρειάζονται για τη μεταφορά του T-DNA ή οποιουδήποτε άλλου DNA μέσω του συστήματος του *Agrobacterium*: τα συνοριακά που περιβάλλουν το T-DNA (επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 24bp) και ειδικά το δεξί συνοριακό, τα γονίδια *vir* και τα γονίδια *chv* τα οποία βρίσκονται στο γενωμικό DNA του *Agrobacterium*.

Τα γονίδια *chv* ( chromosomal virulence) βρίσκονται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου και αποτελούν ξεχωριστή οντότητα σε σχέση με τα T-DNA και *vir* γονίδια τα οποία βρίσκονται πάνω στο πλασμίδιο Ti και τα δύο (σχέση *cis*) που σημαίνει ότι βρίσκονται σε σχέση *trans* με αυτά και παρόλα αυτά είναι λειτουργικά και συμβάλουν στο μετασχηματισμό.

Γενετικές και μοριακές αναλύσεις έδειξαν ότι το T-DNA δε χρειάζεται να είναι φυσικά συνδεδεμένο με την περιοχή *vir* πάνω στο ίδιο πλασμίδιο. Μπορούν να διατηρούνται σε ανεξάρτητα ρεπλικόνια αλλά ταυτόχρονα να είναι εφικτή η μεταφορά του T-DNA στο φυτικό γονιδίωμα. Ωστόσο η πολυγονιδιακή περιοχή *vir* πρέπει να διατηρείται οπωσδήποτε μέσα στο βακτηριακό κύτταρο μαζί με τα χρωμοσωμικά γονίδια *chv*, με κάποιο τρόπο, για να μπορούν όλα μαζί να συνεισφέρουν στη δημιουργία του κατάλληλου μηχανισμού για τη μεταφορά του T-DNA.



**Εικόνα 6:** δυαδικό σύστημα μεταφοράς

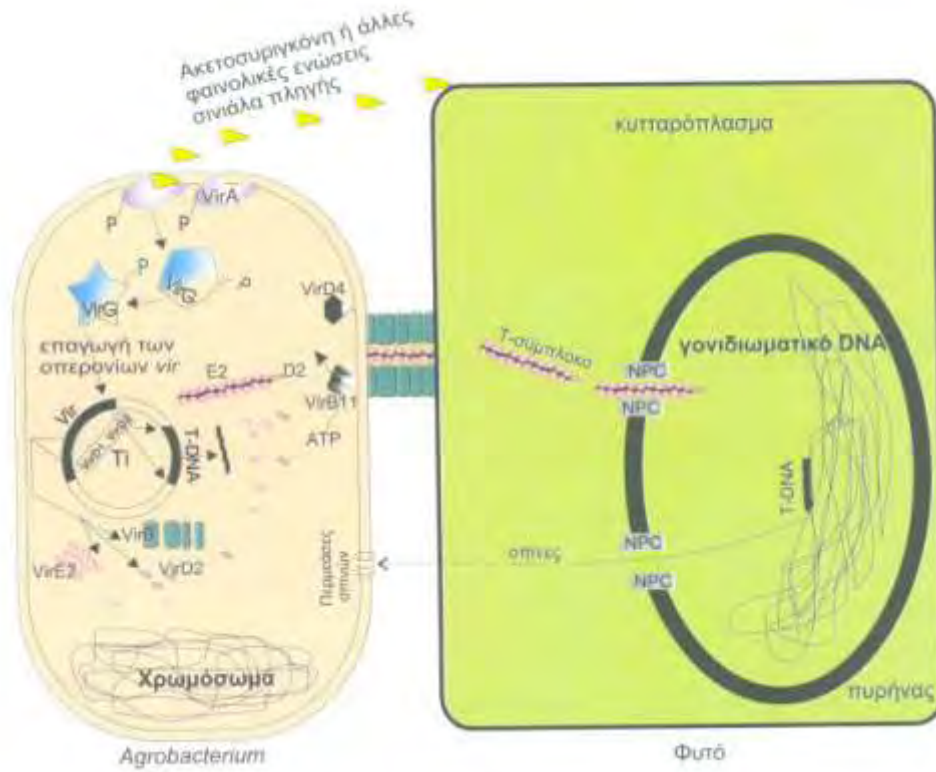
## Διαδικό σύστημα μεταφοράς

Η νέα γενιά φορέων αποφεύγει όλους τους δύσκολους χειρισμούς που απαιτούσαν προγενέστερες μέθοδοι. Το διαδικό σύστημα εξελίχθηκε με βάση το γεγονός ότι η *vir* περιοχή, όπως αναφέρθηκε, αν και απαιτείται για τη μεταφορά της περιοχής του T-DNA, δε χρειάζεται να είναι φυσικά συνδεδεμένη με το T-DNA. Έτσι αναπτύχθηκαν συστήματα δύο πλασμιδίων, στα οποία το ένα, το πλασμίδιο T<sub>i</sub>, να εφοδιάζει μόνο τις *vir* λειτουργίες και το άλλο, ο φορέας μεταφοράς, να παρέχει τους δείκτες επιλογής ή ξένα γονίδια, περιβαλλόμενα μόνο από τα T-DNA επαναλαμβανόμενα συνοριακά. Το πλασμίδιο T<sub>i</sub> στο διαδικό σύστημα περιέχει τα γονίδια τοξικότητας *vir*, και μια αρχή αντιγραφής (*oriA*), αλλά δεν περιέχει τα T-DNA επαναλαμβανόμενα συνοριακά.

Συνήθως το πλασμίδιο μεταφοράς περιέχει τουλάχιστον ένα (το δεξιό) επαναλαμβανόμενο συνοριακό, μια αρχή αντιγραφής ευρέως φάσματος ξενιστών (*oriV*, *oriT*), ώστε να αντιγράφεται, λειτουργίες κινητοποίησης των πλασμιδίων (*trfA*), καθώς και ένα γονίδιο επιλογής ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό (πχ αμικιλίνη). Ένα τέτοιο πλασμίδιο παρέχει τη δυνατότητα εφαρμογής μοριακών χειρισμών (εισαγωγή κάποιου τμήματος DNA, τροποποίηση κάποιου γονιδίου, δημιουργία χιμαιρικού γονιδίου κλπ) χρησιμοποιώντας το σύστημα του *E. Coli* (όπου είναι πολύ πιο εύκολο). Ακολούθως το πλασμίδιο μεταφέρεται στο *Agrobacterium*. Για την ελάτωση του μεγέθους του πλασμιδίου αυτού είναι δυνατόν οι λειτουργίες της κινητοποίησης (*trfA*) να μετεφερθούν είτε στο χρωμόσωμα είτε στο πλασμίδιο T<sub>i</sub> του *Agrobacterium*. Επιπρόσθετα, τα πλασμίδια αυτά συνήθως περιέχουν τεχνητές πολυδύναμες θέσεις κλωνοποίησης και κωδικοποιούν κάποιο μάρτυρα επιλογής των μετασχηματισμένων φυτικών κυττάρων. Μετά τη σύζευξη και τα δύο πλασμίδια συνυπάρχουν μέσα στο *Agrobacterium* κάτω από επιλεκτική πίεση.

Οι φορείς αυτοί μπορούν να διατηρούνται μέσα στο *Agrobacterium*. Η παρουσία του πλασμιδίου T<sub>i</sub> (χωρίς το T-DNA) μέσα στο *Agrobacterium* είναι απαραίτητη γιατί εφοδιάζει όλες τις απαραίτητες λειτουργίες της περιοχής *vir* σε κατάσταση *trans*. Κατά τη μόλυνση του φυτού απ' το *Agrobacterium*, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από την περιοχή *vir* του πλασμιδίου T<sub>i</sub> αλληλεπιδρούν με τα T-DNA συνοριακά του πλασμιδίου μεταφοράς σε κατάσταση *trans*, κινητοποιούν το T-DNA, μεταφέρουν το DNA που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα επαναλαμβανόμενα T-DNA συνοριακά και τελικά το εισάγουν στο γονιδίωμα του φυτού. Λόγω του μικρού μεγέθους του πλασμιδίου αυτού, μεγάλα τμήματα του DNA είναι δυνατά να κλωνοποιηθούν και ακολούθως να εισαχθούν μέσα στο γονιδίωμα φυτικών κυττάρων. Τέτοιον φορείς μεταφοράς έχουν αναπτυχθεί και περιέχουν ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά όπως εκφραστικά μηνύματα (προαγωγείς ή ληκτικές ακολουθίες) των DNA γονιδίων, προαγωγείς

συστατικών γονιδίων που αναγνωρίζονται από τα φυτά, ειδικές θέσεις κλωνοποίησης για σύντηξη σε επίπεδο μεταγραφής και μετάφρασης.



Εικόνα 7: Μόλυνση φυτικού κυττάρου από Agrobacterium Tumefaciens

## Η μελέτη του AtNOC από το *Arabidopsis thaliana* μέχρι σήμερα

Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα είναι πολυάριθμες. Όσον αφορά τη ρύθμιση του κερκάδιου ρυθμού από αποαδενυλάσες και συγκεκριμένα την AtNOC, αυτή μελετήθηκε εκτενώς στη διπλωματική εργασία της Αναστασίας Τοματσίδου του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν παράγοντες με ομολογία με την AtNOC και στη συνέχεια έγινε επιλογή ενός από τους τρεις παράγοντες όπου και έγινε βιοχημικός χαρακτηρισμός. Μελετήθηκε η κινητική του ενζύμου σε διαφορετικές συνθήκες για να βρεθούν οι καλύτερες συνθήκες λειτουργίας του (pH 6,5 & T 25°). Εν συνεχεία μελετήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου απουσία και σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις  $Mg^{2+}$  διότι οι αποαδενυλάσες είναι ένζυμα που γενικά χρησιμοποιούν Mg(II). Παρατηρήθηκε ότι απουσία  $Mg^{2+}$  η ενεργότητα του ενζύμου είναι σχεδόν μηδενική, γεγονός που δείχνει πως τα ιόντα μαγνησίου είναι απαραίτητα για να δράσει το ένζυμο. Τέλος εξετάστηκε η εξειδίκευση του ενζύμου στην αποικοδόμηση πολύ(A) και βρέθηκε ότι η AtNOC είναι μια πολύ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση.

Όσον αφορά τη ρύθμιση της έκφρασης από τον κερκάδιο ρυθμό, βρέθηκε ότι η AtNOC ακολουθεί την κατατομή έκφρασης του γονιδίου TOC1, παρουσιάζοντας μέγιστο έκφρασης λίγο πριν σταματήσει η έκθεση στο φως.

Η σημαντικότητα της ανακάλυψης και της μελέτης της AtNOC είναι ιδιαίτερα σημαντική μιας και είναι η πρώτη της οποίας η έκφραση σχετίζεται με τον κερκάδιο ρυθμό.

## Σκοπός

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η επιτυχής ενσωμάτωση του γονιδίου της AtNOC καθώς και η εμφανής έκφρασή του σε μετασχηματισμένα στελέχη της *Arabidopsis thaliana*. Αρχικά, θα απομονωθεί το γονίδιο της AtNOC. Στη συνέχεια, θα εισαχθεί σε βακτήρια *Escherichia coli* για γρήγορη και εύκολη κλωνοποίηση και κατόπιν, αγροβακτήρια θα μετασχηματιστούν με τα κλωνοποιημένα πλασμίδια που προήλθαν από την προαναφερθείσα κλωνοποίηση και φέρουν το T-DNA με το γονίδιο της AtNOC. Τέλος, με εμφάνιση των ανθέων των στελεχών της *Arabidopsis thaliana* σε διάλυμα μετασχηματισμένων *Agrobacterium*, θα γίνει προσπάθεια να εισαχθεί το T-DNA στο γονιδίωμα του φυτού, ώστε να επιτευχθεί εν τέλει η ενσωμάτωση και η επιθυμητή υπερέκφραση της AtNOC



## Υλικά και μέθοδοι

### Κλωνοποίηση και μετασχηματισμός του φυτού

Το pET15b πλασμίδιο με την αλληλουχία HESP χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές HESPSall-F και HESPbstEII-R. Η ενισχυμένη αλληλουχία υπέστη πέψη με Sall / BstEII και προσδέθηκε στο pCambia35SeGFPn (pCambia 2201). Τα κύτταρα του *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 μετασχηματίζονται με τη κατασκευή pCambia35SeGFPn- HESP. Φυτά *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) οικοτύπου Columbia-0 χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό του γονιδίου με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens* με τη μεσολάβηση της μεθόδου floral dip (Clough και Bent, 1998). Ανεξάρτητες διαγονιδιακές σειρές από την F2 γενιά ελήφθησαν σε εκλεκτικό μέσο που περιέχει καναμυκίνη MS και μεταφέρθηκαν σε γλάστρες με χώμα σε ένα θάλαμο ανάπτυξης. Το γονιδιωματικό DNA εκχυλίστηκε από 16, 20 ημερών φυτά, ανθεκτικά σε καναμυκίνη και χρησιμοποιήθηκε σε PCR με 35S-F και 35S-R εκκινητές για τον προσδιορισμό της εισαγωγής T-DNA σε διαγονιδιακές σειρές.

### Πέψη δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων με ένζυμα περιορισμού

Οι πέψεις δειγμάτων DNA με ένζυμα περιορισμού πραγματοποιούνται σε όγκους που κυμαίνονται από 20 μl έως 100 μl, ανάλογα με την ποσότητα του DNA που υποβάλλεται σε πέψη.

1. Σε σωλήνα erpendorf τοποθετείται το δείγμα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για τη δράση του ενζύμου, Rnάση A αν το δείγμα περιέχει RNA και, τέλος, dH<sub>2</sub>O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Μια τυπική αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 30 μl περιλαμβάνει :
  - Δείγμα DNA 1-5 μl
  - 10X ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 3 μl
  - Rnάση A (2,5 mg/ml) 1 μl
  - dH<sub>2</sub>O έως τελικό όγκο 29 μl
2. Προστίθεται 1 μl ενδονουκλεάση περιορισμού. Συνήθως, χρησιμοποιείται μια μονάδα ενζύμου (1 unit) ανά μικρογραμμάριο δείγματος DNA.
3. Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 3 με 4 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία.
4. Μετά το πέρας της διαδικασίας τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

## Υποκλωνοποίηση τμήματος νουκλεϊνικών οξέων σε πλασμιδιακό φορέα

### Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος

Ο πλασμιδιακός φορέας και το ένθεμα υποβάλλονται σε πέψη με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού και καθαρίζονται με φαινόλη.

### Ενσωμάτωση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα

Στην αντίδραση ενσωμάτωσης, η αναλογία των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και του τμήματος DNA που πρόκειται να ενσωματωθεί στο πλασμιδιακό φορέα εξαρτάται από το σχετικό μέγεθός τους. Η συνολική συγκέντρωση και των δύο δε πρέπει να ξεπερνάει τα 10 ng / μl. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν η T4 DNA λιγάση της εταιρίας Promega και η T4 DNA λιγάση της εταιρίας Takara.

### **Οδηγίες κατασκευαστή για χρήση της λιγάσης της εταιρίας Promega:**

- Μηχανική ανάδευση του διαλύματος 2X rapid ligation buffer.
- Σε σωλήνα erpendorf 0.5 ml αναμινύονται τα παρακάτω

2X rapid ligation buffer	5 μl
50 ng πλασμιδιακού φορέα	1 μl
Ένθεμα DNA	X μl
T4 DNA λιγάση (3 Weiss units / μl)	1 μl
dH <sub>2</sub> O	Μέχρις όγκου 10 μl

- Ανάδευση της αντίδρασης με πιπέτα.
- Επώαση της αντίδρασης 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Εναλλακτικά επώαση για 16 ώρες στους 4°C.

## Μετασηματισμός «ικανών» κυττάρων *Escherichia coli*

- Σωλήνας errendorf που περιέχει 100 μl δεκτικά κύτταρα του στελέχους DH5a ξεπαγώνουν στο πάγο.
- Στα δεκτικά κύτταρα μεταφέρονται 10-100 ng πλασμιδίου ή της πλασμιδιακής κατασκευής.
- Το δείγμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά.
- Υποβάλλουμε τα κύτταρα σε θερμική καταπόνηση για 1 λεπτό στους 42°C, προκειμένου να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου.
- Προστίθενται 200 μl υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 50 – 60 λεπτά.
- Τα κύτταρα στρωματώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων.
- Η επώαση των τρυβλίων πραγματοποιείται για 16 ώρες στους 37°C.
- Η φύλαξη των τρυβλίων γίνεται στο ψυγείο στους 4°C.
- >> LB : Για την παρασκευή ενός λίτρου διαλύματος προστίθενται : 10 g Bactotryptone, 10 g yeast extract, 5 g NaCl. Για την παρασκευή θρεπτικού μέσου τρυβλίων προστίθενται στα παραπάνω 15g άγαρ. Το θρεπτικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται στους 4°C.

## Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Πρωτόκολλο απομονωσης NucleoSpin Plasmid, Macherey – Nagel

1. Μετά από φυγοκέντρηση 1.5 ml υγρής καλλιέργειας, τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα A1 που περιέχει Rnάση A.
2. Προστίθενται 250 μl διαλύματος κυτταρικής λύσης A2 και πραγματοποιείται ελαφρά ανακίνηση του φυγοκεντρικού σωλήνα (errendorf) και επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προστίθενται επιπλέον 300 μl διαλύματος ουδετεροποίησης A3 και το errendorf αναδεύεται 4-6 φορές. Το εναιώρημα θολώνει.

4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5-10 λεπτά στα 10.000 rpm, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένα λευκό ίζημα.
5. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται με πιπέτα σε στήλη φυγοκέντρησης.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 10.000 rpm και απορρίπτεται το υγρό που έχει διέλθει από το φίλτρο.
7. Η στήλη ξεπλένεται με 500 μl διαλύματος AW, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 50°C, ακολουθεί φυγοκέντρηση 1 λεπτό στα 10.000 rpm και απορρίπτεται το υγρό που έχει διέλθει από το φίλτρο.
8. Η στήλη ξεπλένεται με 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος A4 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
9. Το διερχόμενο από το φίλτρο υγρό απορρίπτεται και επαναφυγοκεντρείται για 1 λεπτό μέχρι να απαλειφθεί το υπολειπόμενο διάλυμα ξηπλύματος. Εάν παραμείνει αιθανόλη από το διάλυμα A4 ίσως παρεμποδιστούν περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
10. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό φυγοκεντρικό σωλήνα 1,5 ml. Προκειμένου να ληφθεί το DNA, προστίθεται διάλυμα 50 μl AE (5 mM Tris-HCl, pH 8.5) ή νερό. Το διάλυμα έκλουσης αφήνεται για 1 λεπτό και, τέλος, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό, οπότε και λαμβάνεται το καθαρό πλασμιδιακό DNA.

## **Καλιέργεια *Agrobacterium tumefaciens***

Το στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* που χρησιμοποιήθηκε είναι το GV3101 με Ti το pM90 (pTiC58ΔT-DNA) με ανθεκτικότητα στη ριφαμυκίνη και γκενταμυκίνη. Το στέλεχος είναι ήδη μετασχηματισμένο και φέρει τον δυαδικό φορέα pBIN και γονίδιο αναφορά το GUS υπό τον έλεγχο του 35S προαγωγέα.

1. Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε LB θρεπτικό μέσο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και για την επιλογή του δυαδικού φορέα (Καναμυκίνη σε συγκέντρωση 50mg/L στους 28°C, σε 250rpm για 18-24h (O.D.600 περίπου 1.8-2).
2. Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου στις 5500g.
3. Επαναδιαλύονται σε διάλυμα MS, 5% σακχαρόζης/ 0,05% Silwet L77 (1M διάλυμα) και σε συγκέντρωση O.D.600= 0,1-0,5. Απαιτείται διάλυμα 200-300ml για την εμφύσηση 2-5 γλαστρών.

## **Μετασηματισμός κυττάρων αγροβακτηρίου.**

1. Ο σωλήνας που περιέχει 100 μl δεκτικά κύτταρα αγροβακτηρίου τοποθετείται στο πάγο και τα κύτταρα ξεπαγώνουν εκεί.
2. Ακολουθεί προσθήκη 1 μg πλασμιδίου στα δεκτικά κύτταρα και πραγματοποιείται επώαση για 5 λεπτά στους 37° C.
3. Προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου LB και ακολουθεί επώαση στους 28° C για 4 ώρες με ήπια ανάδευση.
4. Φυγοκέντρηση για 30 sec στα 4.000 rpm και απόρριψη του υπερκείμενου.
5. Επαναδιάλυση του ιζήματος με 100 μl LB και στρώσιμο των κυττάρων σε τρυβλία με τα κατάλληλα αντιβιοτικά.
6. Τα τρυβλία επωάζονται στους 28° C για 2 – 3 ημέρες.

## **Μόλυνση των Φυτών**

1. Εμβαπτίστηκε το υπέργειο μέρος των φυτών στο εναιώρημα *Agrobacterium* για 2-3 min. Πρέπει να είναι ορατή η επικάλυψη του φυτού από ένα λεπτό φιλμ υγρού.
2. Στεγνώσαμε απαλά και σύντομα με χαρτί και τα φυτά καλύφθηκαν με μεμβράνη, έτσι ώστε να διατηρηθεί η υγρασία, για 16-24 ώρες.
3. Τα φυτά μεταφέρθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης για άλλες 3-5 βδομάδες μέχρις ότου τα κεράτια αποξηρανθούν και αποκτήσουν καφέ χρώμα. Οι σπόροι συλλέχτηκαν και φυλάκτηκαν στους 4oC.



**Εικόνα 8:** Εμβάπτιση φυτών *Arabidopsis thaliana* σε εναιώρημα *Agrobacterium tumefaciens*

### **Το φυτικό υλικό και οι συνθήκες ανάπτυξης**

Οι σπόροι του *Arabidopsis thaliana* (Cultivar Col) αποστειρώθηκαν επιφανειακά για 2 λεπτά σε διάλυμα αιθανόλης 70% και για 10 λεπτά σε 5% NaOCl - 0,02% Tween 20 και ξεπλύθηκαν αρκετές φορές με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Σπόροι επιστρώθηκαν σε τριβλία που περιέχουν Murashige Skoog (MS) μέσο και 1% άγαρ και τοποθετήθηκαν στους 4 ° C στο σκοτάδι για 24 ώρες. Στη συνέχεια οι πλάκες μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με σταθερή θερμοκρασία 22°C υπό φωτοπερίοδο 12/12 ωρών φωτός / σκότους, στους 150 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Για τη μελέτη του κικκάδιου ρυθμού, οι σπόροι προετοιμάστηκαν πριν το φύτεμα όπως περιγράφηκε και τα υπέργεια μέρη των φυτών συλλέχθηκαν σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα μετά από επτά ημέρες και χρησιμοποιήθηκαν για τη συνολική εκχύλιση DNA.

## Επιλογή των πιθανών μετασηματισμένων φυτών

1. Αποστηρώθηκαν οι σπόροι σε 70% αιθανόλη για 30-60 sec και κατόπιν σε 30% χλωρίνη εμπορίου. Ξεπλύθηκαν καλά με αποστειρωμένο νερό.
2. Ετοιμάστηκαν τρυβλία με 1/2x MS θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, 0,8% άγαρ και 50μg/ml καναμυκίνη. Προστέθηκε vancomycin σε συγκέντρωση 500mg/L για τον έλεγχο ανάπτυξης βακτηρίων. Στέγνωσαν καλά τα τρυβλία, αφήνοντας ανοιχτά τα καπάκια για 20-30 λεπτά.
3. Απλώθηκαν ομοιόμορφα οι αποστειρωμένοι σπόροι σε πυκνότητα περίπου 100-150 σπόροι ανά τρυβλίο αναμιγνύοντας τους σπόρους με 2,5ml 0,05% αγαρόζης. Χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό τρυβλίο για κάθε φυτό.
4. Τα τρυβλία έκλεισαν με Parafilm. Έμειναν στους 4oC για μια ημέρα και κατόπιν μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης υπό συνεχές φως (50-100 μEinsteins /m<sup>2</sup>\*sec) για 7-10 ημέρες. Τα μετασηματισμένα φυτά αναπτύσσονται ως πράσινα φυτάρια.
5. Μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο επιλογής με 1,5% Phytigel, το οποίο θα επιτρέψει να επιμηκυνθούν οι ρίζες των φυτών και θα ελαττωθούν τα πιθανά σφάλματα επιλογής.
6. Τα μετασηματισμένα φυτά μεταφέρθηκαν σε έδαφος.

## Βλάστηση φυτών σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών

Τα φυτά *Arabidopsis thaliana* αναπτύσσονται μέχρι το στάδιο της άνθησης σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με τεχνητό φωτισμό (>250 μEinsteins /m<sup>2</sup>\*sec), φωτοπερίοδο 8h ημέρα 16h σκοτάδι για τον πρώτο μήνα του βιολογικού τους κύκλου και 18h ημέρα και 6h σκοτάδι μέχρι την άνθηση και μετά το μετασηματισμό, θερμοκρασία ημέρας 22oC και θερμοκρασία νύχτας 20oC.

Σπόροι φυτού φυτεύονται σε γλάστρες με οργανικό υπόστρωμα κατάλληλο για την ανάπτυξη των φυτών, καλά διαβρεγμένο με νερό βρύσης. Τα φυτά ποτίζονται με νερό.

Οι πρώτοι ανθηκοί οφθαλμοί που εμφανίζονται, αποκόπτονται έτσι ώστε να καταργηθεί η επάκρια κυριαρχία και να προωθηθεί μια πιο συγχρονισμένη ανθοφορία των δευτερογενών οφθαλμών. Τα φυτά είναι έτοιμα για γενετικό μετασηματισμό 4-6 ημέρες αργότερα. Ιδανικά τα φυτά φέρουν λίγα ώριμα και πολλά ανώριμα άνθη.

## Απομόνωση γονιδωματικού DNA με τη μέθοδο CTAB

- Λειοτριβηση του φυτικού ιστού με υγρό άζωτο μέχρι ο ιστός να κονιορτοποιηθεί.
- Προσθήκη 100 μl διαλύματος CTAB, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 65°C και στο οποίο έχει γίνει προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης 1% v/v.
- Ακολουθεί επώαση στους 65°C για 15 λεπτά.
- Προσθήκη 150 μl χλωροφορμίου και 1/25 του όγκου ισοαμυλική αλκοόλη και ακολουθεί καλή ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 13.000 rpm και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erppendorf.
- Προσθήκη 0.8 του όγκου ισοπροπανόλη, καλή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 13.000 rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 500 μl παγωμένης 70% αιθανόλης.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 13.000 rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του DNA σε ddH<sub>2</sub>O.

>> CTAB : 1% CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide), 50 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris pH 8.0, 0.5% Tween, 1,4 M NaCl.

## Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αгарόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται, με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Αν πρέπει να διαχωριστούν γραμμικά δίκλινα μόρια, η σχέση που συνδέει την κινητικότητα των μορίων με το μέγεθός τους είναι ημιλογαριθμική. Η κινητικότητα μη γραμμικών μορίων εντός του ηλεκτρικού πεδίου της πηκτής δεν είναι άμεση συνάρτηση του μεγέθους τους, αλλά εξαρτάται και από τη διαμόρφωσή τους στο χώρο. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αгарόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αгарόζη, για παράδειγμα σε 0,8% συγκέντρωση αгарόζης μπορούν να διαχωριστούν, ανάλογα με



το μοριακό τους βάρος, τμήματα του DNA που κυμαίνονται από 1 έως 12 kb (Χατζόπουλος, 2001). Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής :

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (συνήθως 1%) προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει.
- Στην λιωμένη αγαρόζη προστίθεται 0,001% v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αφήνεται να κρυώσει.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως στην πηκτή βυθίζεται ειδική "χτένα" που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων. Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής 10X DLB.
- Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή απομακρύνεται η "χτένα" και τοποθετείται στο δοχείο ηλεκτροφόρησης, το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE.
- Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 V/cm.

>> TAE : 50X TAE : 24.2% (w/v) Tris (BDH), 57.1 ml/l  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (BDH), 100 ml/l 0.5 M EDTA (Serva)

>> Βρωμιούχο αιθίδιο : παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε απιονισμένο νερό και διατηρείται στους 4°C. Η συγκέντρωσή του στην πηκτή της αγαρόζης είναι 0,5 μg/ml.

>> 10X DLB : 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη

## Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

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

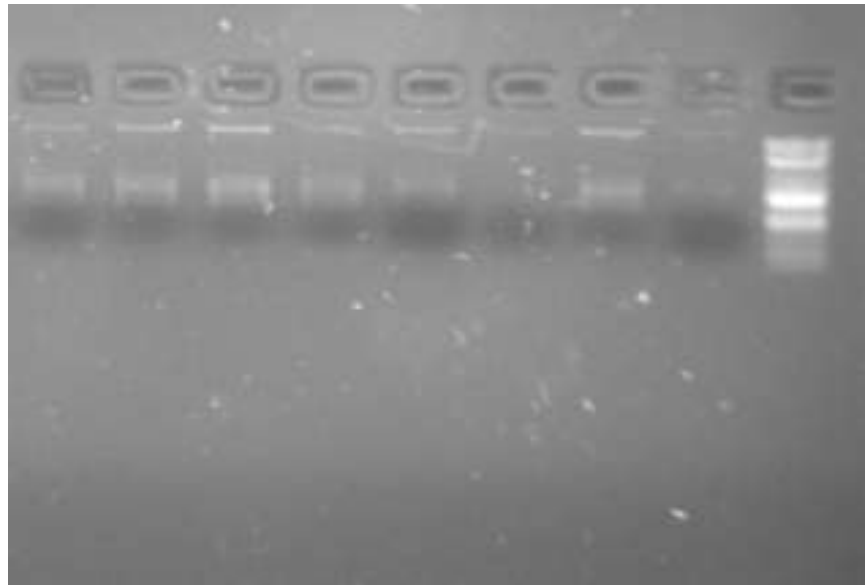
- Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93 – 95°C) ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation step).
- Θερμοκρασία υβριδισμού (annealing step), προκειμένου οι εκκινητές να υβριδίσουν με το DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητά του σε G και C. Ο απλούστερος τρόπος υπολογισμού της θερμοκρασίας του εκκινητή είναι μέσω του τύπου  $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$ . Η θερμοκρασία του υβριδισμού είναι τελικά 5°C κάτω από τον μέσο όρο των τιμών  $T_m$  των δύο εκκινητών της αντίδρασης.
- Θερμοκρασία επιμήκυνσης ή πολυμερισμού (extension step) στους 72°C. Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος λαμβάνει χώρα η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, με τη δράση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω επαναλαμβάνεται για 25 – 35 κύκλους συνήθως. Κατά τη διάρκεια των κύκλων η παραγωγή των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό, εφόσον βέβαια δεν παρουσιαστούν περιοριστικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα έλλειψη νουκλεοτιδίων. Μετά το πέρας της αντίδρασης το προϊόν ενίσχυσης αναλύεται ή χρησιμοποιείται για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες. Η PCR βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς και, τελευταία, έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της παραπάνω βασικής αντίδρασης. Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη παραλλαγή είναι η RT-PCR, κατά την οποία χρησιμοποιείται - ως μήτρα για ενίσχυση - RNA, το οποίο πρώτα μεταγράφεται σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse transcriptase, κεφάλαιο 4). Για μια τυπική αντίδραση ενίσχυσης (τελικού όγκου 50 μl) αναμιγνύονται:

Μήτρα DNA	1 µl
Ορθόδρομος εκκινητής 5 µM	5 µl
Οπισθόδρομος εκκινητής 5 µM	5 µl
dNTPs (10mM το κάθε ένα)	1 µl
Taq DNA πολυμεράση	1 µl (1 unit/µl)
10X ρυθμιστικό διάλυμα	5 µl
dH <sub>2</sub> O	Μέχρις όγκου 50 µl

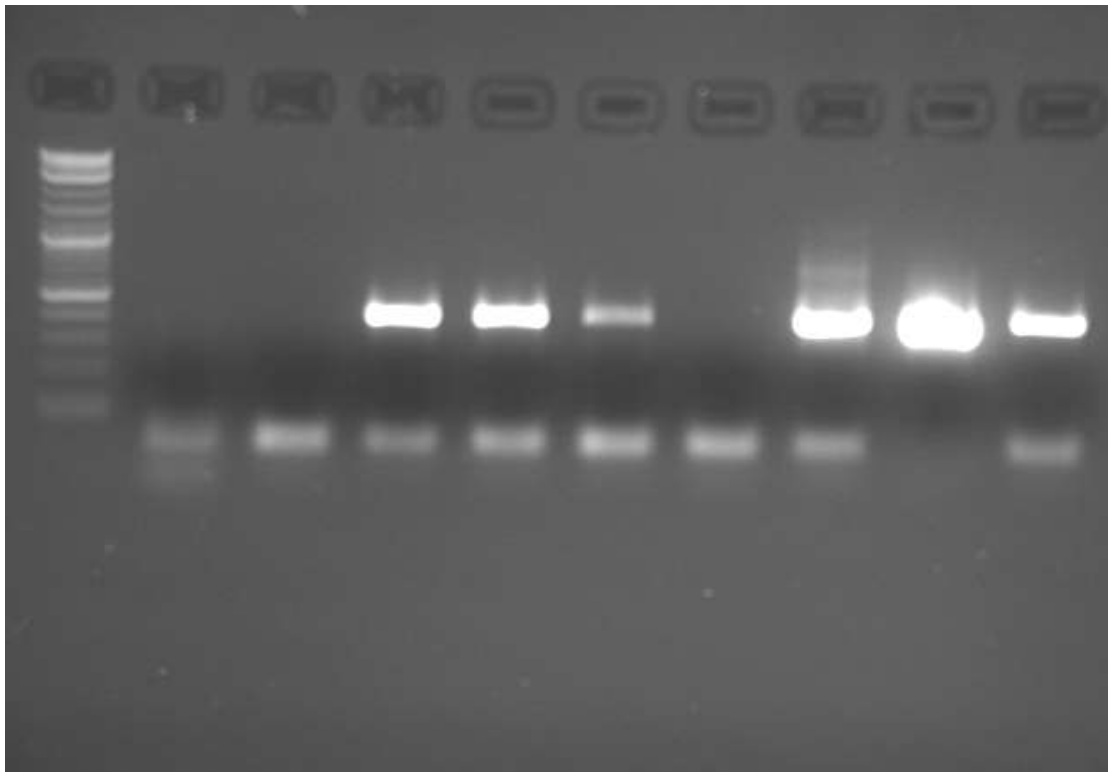
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα φυτά αφού φτάσανε σε ένα κρίσιμο στάδιο ανάπτυξης, ήταν έτοιμα για να γίνει λήψη γονιδιωματικού DNA. Η επιλογή αυτή των μετασχηματισμένων φυτών έγινε με βάση την ανθεκτικότητά τους στην καναμυκίνη, η οποία μαρτυρά εν μέρει την ενσωμάτωση του επιθυμητού T-DNA. Το γενομικό DNA απομονώθηκε από τα φύλλα των φυτών. Με τη μέθοδο της λειοτρίβισης τα φύλλα ομογενοποιήθηκαν και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γονιδιωματικού DNA όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Στη συνέχεια το γονιδιωματικό DNA ηλεκτροφορήθηκε με σκοπό να φανεί η ποιότητα του. Όπως φαίνεται στην παρακάτω φωτογραφία όλα τα δείγματα είχαν καλή ποιότητα γονιδιωματικού DNA. Η πρώτη μπάντα που φαίνεται κάτω από τα πηγαδάκια αντιστοιχεί στο γονιδιωματικό DNA ενώ οι αχνές μπάντες που βρίσκονται από κάτω αντιστοιχούν σε ριβοσωμικό RNA.



Γονιδιωματικό DNA από τα φυτά.

Στη συνέχεια στο γονιδιωματικό DNA από κάθε φυτό ενισχύθηκε με PCR με σκοπό να πολλαπλασιαστεί το τμήμα του DNA που αντιστοιχεί στο T-DNA που εμπεριέχει το μη φυτικής προέλευσης γονίδιο της AtNOC. Στη συνέχεια τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν και πήραμε την παρακάτω εικόνα. Αυτό που παρατηρούμε είναι ότι στα 6 από τα 9 δείγματα εντοπίστηκε το T-DNA που εισήχθη με δυαδικό φορέα, χωρίς βέβαια αυτό να σημαίνει ότι επιτυγχάνεται και η επιθυμητή υπερέκφραση, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί μόνο με real time PCR του cDNA που προέρχεται από το ριβοσωμικό RNA.



PCR για ανίχνευση μετασηματισμένων φυτών.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η επιτυχής ενσωμάτωση γονιδίου της AtNOC και επάγει την υπερέκφραση της AtNOC καθώς και η εμφανής έκφρασή του σε μετασχηματισμένα στελέχη της *Arabidopsis thaliana*. Αρχικά, απομονώθηκε το γονίδιο της AtNOC το οποίο υπάρχει σε πλασμιδιακό φορέα και όχι στο φυτικό κύτταρο. Στη συνέχεια, εισήχθη σε βακτήρια *Escherichia coli*. Αυτό έγινε επειδή τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται με ταχείς ρυθμούς ενώ μπορούν να λαμβάνουν πλασμιδιακό DNA σχετικά εύκολα. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τον γρήγορο και αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό του γονιδίου που μας ενδιαφέρει. Στη συνέχεια αγροβακτήρια μετασχηματιστήκαν με τα κλωνοποιημένα πλασμίδια που προήλθαν από την προαναφερθείσα κλωνοποίηση και φέρουν το T-DNA με το γονίδιο της AtNOC. Το *Agrobacterium* έχει την ικανότητα να προσβάλει κύτταρα του φυτού και να μεταφέρει με μεγάλη επιτυχία γονίδια του T-DNA στο φυτό ξενιστή και κατ επέκταση και το γονίδιο AtNOC. Τέλος, με εμφύσηση των ανθέων των στελεχών της *Arabidopsis thaliana* σε διάλυμα μετασχηματισμένων *Agrobacterium*, εισήχθη το T-DNA στο γονιδίωμα του φυτού, και επιτεύχθηκε εν τέλει η ενσωμάτωση του σε κάποια από τα φυτά. Το επόμενο βήμα είναι η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της AtNOC. Για να πραγματοποιηθεί κάτι τέτοιο θα πρέπει να προσδιοριστεί η έκφρασή του σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιώντας real-time PCR. Για να γίνει αυτό πρέπει να απομονωθεί το ριβοσωμικό RNA των κυττάρων και να μετατραπεί σε cDNA. Στη συνέχεια στο cDNA θα πραγματοποιηθεί η real-time PCR και θα προσδιοριστεί η υπερέκφραση ή όχι της AtNOC.

Η AtNOC ρυθμίζεται από τον κηρκάδιο ρυθμό και το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί επιπρόσθετα είναι η πρώτη αποαδενυλάση που σχετίζεται με αυτόν. Η φυσιολογικοί και βιολογικοί ρυθμοί των φυτών ακολουθούν 24ωρες διακυμάνσεις οι οποίες πραγματοποιούνται σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια του κύκλου ημέρας/ νύχτας (Dunlap, 1999). Παράδειγμα τέτοιων διεργασιών είναι το άνοιγμα και το κλείσιμο των στοματιών, οι κινήσεις των ανθέων και των φύλλων καθώς και ο χρόνος της άνθησης (Mas, 2005). Οι μεταβολές αυτές, οι οποίες οφείλονται στην προσαρμογή των φυτών στη σημαντική αλλαγή των συνθηκών μεταξύ ημέρας και νύχτας, υποδεικνύουν σημαντικές αλλαγές που πραγματοποιούνται στο επίπεδο της έκφρασης των γονιδίων (Dunlap, 1999). Πολλοί

μεταγραφικοί παράγοντες έχουν χαρακτηριστεί για την συμμετοχή τους στην ενεργοποίηση γονιδίων σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα του 24ωρου (Mas, 2005). Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να εισάγουμε το γονίδιο της αποαδενυλάσης AtNOC σε φυτά *Arabidopsis Thaliana* με τελικό σκοπό να δημιουργηθούν διαγονιδιακά φυτά που θα έχουν την ικανότητα να παράγουν την συγκεκριμένη αποαδενυλάση. Στη συνέχεια τα φυτά αυτά θα είναι χρήσιμα για την περαιτέρω μελέτη τόσο της δράσης της AtNOC όσο και των ιδιοτήτων της που μπορούν να επηρεάσουν τον κirkάδιο ρυθμό.

Οι μελλοντικές προοπτικές του θέματος είναι πολλές και ενδιαφέρουσες. Κάποιες από αυτές περιλαμβάνουν την μελέτη του φαινοτύπου μεταλλαγμένων φυτών *Arabidopsis Thaliana* που δεν εκφράζουν την AtNOC. Επίσης σημαντική είναι και η μελέτη των επιπτώσεων που πιθανόν να έχει απώλεια της AtNOC στον φυτικό οργανισμό καθώς και η μελέτη της κατανομής της έκφρασης παραγόντων που ρυθμίζονται από τον κirkάδιο ρυθμό απουσία της AtNOC.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson J.S.J., Parker R., *EMBO J.* 1998; 17: 1497-1506
- Åström, J., Åström A., Virtanen A., *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 18154-18159
- Baggs JE., Green CB., *Current Biology* 2003; 13: 189-198
- Belostotsky DA., Sieburth LE., *Current Opinion in Plant Biology* 2009; 12: 96-102
- Besharse JC., *PNAS* 2007; 104: 9888-9893
- Cermakian N., Sassone- Corsi P., *Nature* 2000; 1: 59-67
- Cheng Y., Liu W., Yan Y., Zhou H., *Protein and Peptide Letters* 2006; 13: 125-128
- Chen C.Y. et al., *Cell* 2001; 107, 451-464
- Chiba Y., Johnson MA., Lidder P., Vogel JT., Van Erp H., Green PJ., *Gene* 2004; 328: 95-102
- Dodson R.E., Shapiro D.J., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2002; 72: 129-164
- Douris N., Green CB., *Annals of Medicine* 2008; 40: 622-626
- Dunlap J.C., *Cell* 1999; 96: 271-290
- Dykxhoorn D.M., Novina C.D., Sharp, P.A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4: 457-467
- Garneau N., Wilusz J., Wilusz, C., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8: 113-126
- Green CB., *Journal of Neuroendocrinology* 2003; 15: 350-354
- Green CB., Douris N., Kojima S., Strayer CA., Fogerty J., Lourim D., Keller SR., Greiner-Stoeffele T., Grunow M., Hahn U., *Analytical Biochemistry* 1996; 240: 24-28
- Houseley J., Tollervey D., *Cell* 2009; 136: 763-776
- Hoof van A., Parker R., *Cell* 1999
- Hunter-Ensor M., Ousley A., Sehgal A., *Cell* 1996; 84: 677-685
- James AB., Monreal JA., Nimmo GA., Kelly CL., Herzyk P., Jenkins G., Nimmo HG., *Science* 2008; 322: 1832-1835
- Körner CG., *EMBO J.* 1998; 17: 5427-5437
- Liu X., Green CB., *Molecular and Cellular Biology* 2002; 22: 7501-7511
- Liu H., Rodgers N.D., Jiao X., Kiledjian M., *EMBO J.* 2002; 21: 4699-4708
- Maquat L.E., Carmichael, G.G., *Cell* 2000; 26: 173-176
- McClung RC, *Plant Cell* 2006; 18: 792-803
- Meyer S., Temme C., Wahle E., *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2004; 39:197-216
- Mitchell P., Tollervey D., *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001; 13: 320-325
- Mukherjee D. et al., *EMBO J.* 2002; 21: 165-174
- Més P., *Int.J. Dev. Biol.* 2005; 49: 491-500
- Tucker M., Parker R., *Annu. Rev. Biochem.* 2000; 69: 571-595
- Wang Z., Kiledjian M., *Cell* 2001; 107: 751-762
- Wu M., Reuter M., Lilie H., Liu Y., Wahle E., Song H., *EMBO Journal* 2005; 24: 4082-4093
- Yamashita A., *Nature Structural & Molecular Biology* 2005;12: 1054-1063
- Yanovsky MJ., Kay SA., *Nature* 2003; 4: 265-275