



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ  
ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη ρυθμιστικών στοιχείων ενός φωτοπεριοδικά  
ελεγχόμενου γονιδίου του φασολιού  
(*Phaseolus vulgaris*)»



ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΓΑΛΕΟΥ

Γεωπόνος

Επιβλέπων:  
Καθηγητής Γεώργιος Σκαράκης

Αθήνα, 2011

*“To every thing there is a season and a time  
to every purpose under the heaven:  
A time to be born, and a time to die; a time to plant,  
and a time to pluck up that which is planted...”*

*Ecclesiastes 3:1–3 (Bible, King James Version)*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Γεώργιο Σκαράκη, Καθηγητή και Διευθυντή του εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού του τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γ.Π.Α., ο οποίος ανέλαβε την εποπτεία της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης και συνέβαλλε στην ομαλή διεξαγωγή και περάτωση της εργασίας. Επίσης, επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή από το εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού του τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γ.Π.Α., Ανδρέα Βολουδάκη, για τη βοήθεια και αμέριστη υποστήριξη που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Το εργαστηριακό μέρος της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το εργαστήριο Χρονοβιολογίας του Ινστιτούτου Βιολογίας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», υπεύθυνη του οποίου είναι η Δρ. Αναστασία Προμπονά, την οποία και ευχαριστώ θερμά για τη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε, κατά τη διάρκεια της εργασίας μου εκεί.

Τέλος, δε θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον Dr. Koizumi (Osaka Prefecture University, Ιαπωνία) ο οποίος μου παρείχε το πλασμίδιο pBI221-Luc.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πολλές πτυχές της συμπεριφοράς και της φυσιολογίας, τόσο των φυτών όσο και των ζώων, εμφανίζουν μία 24ωρη ταλάντωση κατά τη διάρκεια κάθε μέρας. Κάποιες από αυτές τις ταλαντώσεις συμβαίνουν ως απόκριση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι κύκλοι ημέρας/νύχτας, και διατηρούνται και κάτω από σταθερές συνθήκες. Οι ρυθμοί αυτοί ονομάζονται κίρκαδικοί (circadian) από το λατινικό *circa dies*, περίπου μία ημέρα. Οι κίρκαδικοί ρυθμοί στα φυτά συμπεριλαμβάνουν την κίνηση φύλλων και πετάλων, το άνοιγμα των στοματίων, καθημερινές ταλαντώσεις σε μεταβολικές δραστηριότητες όπως η αναπνοή και η φωτοσύνθεση και διέπονται από ένα ενδογενές σύστημα καταγραφής του χρόνου, το κίρκαδικό ρολόι, το οποίο χωρίζεται σε τρία δομικά συστατικά. Το πρώτο, τα μονοπάτια εισόδου στον κεντρικό ταλαντωτή, αφορά το πώς οι εξωτερικοί παράγοντες συντονίζουν το δεύτερο συστατικό, δηλαδή τον κεντρικό ταλαντωτή, με το περιβάλλον. Έτσι, δίνεται το έναυσμα στο τρίτο συστατικό του ρολογιού, τα μονοπάτια εξόδου από τον κεντρικό ταλαντωτή, τα οποία είναι οι εμφανείς ρυθμοί κάτω από τον έλεγχο του κίρκαδικού συστήματος. Ο κεντρικός ταλαντωτής συγκροτείται από αυτορυθμιζόμενους βρόγχους θετικής/αρνητικής επανατροφοδότησης (ανάδρασης) που αποτελούνται από συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες. Κάποιοι από τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες που συνιστούν τον κεντρικό ταλαντωτή του πειραματόφυτου *A. thaliana* είναι οι CCA1 (Circadian Clock Associated 1) και LHY (Late elongated HYpocotyl) που αποτελούν τα αρνητικά στοιχεία του βρόγχου και ο APRR1/TOC1 (Arabidopsis Pseudo Response Regulator 1/Timing Of CAB expression 1) ή απλά παράγοντας TOC1, ο οποίος αποτελεί το θετικό παράγοντα του βρόγχου. Ο ορθόλογος παράγοντας του TOC1 από το φασόλι (*PvTOC1*, *Phaseolus vulgaris* Timing Of CAB expression 1) φαίνεται να αποκρίνεται σε φωτεινά ερεθίσματα κατά τη διάρκεια της νύχτας, κάτι το οποίο δεν έχει διαπιστωθεί για τον TOC1 του *A. thaliana*. Παρουσιάζει, λοιπόν, ενδιαφέρον η μελέτη των ρυθμιστικών στοιχείων της έκφρασης του γονιδίου *PvTOC1*, όπως ο υποκινητής του.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να κατασκευαστεί ένα σύστημα αναφοράς για τη μελέτη του υποψήφιου υποκινητή του φωτοπεριοδικά ελεγχόμενου γονιδίου του κίρκαδικού ρολογιού του φασολιού, *PvTOC1*. Για την πραγματοποίηση αυτού του σκοπού, απομονώθηκε, αρχικά, το 5'-άκρο του cDNA του *PvTOC1*. Αυτό αποτέλεσε το πρώτο βήμα για την απομόνωση της 5'-αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου, δηλαδή μίας περιοχής του υποκινητή του *PvTOC1* μήκους 1250 ζευγών βάσεων. Η αλληλουχία που προέκυψε αναλύθηκε *in silico* και εντοπίστηκε σε αυτή σημαντικός αριθμός *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων, τα οποία πιθανά να ευθύνονται για τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Τμήμα της αλληλουχίας του υποψήφιου υποκινητή κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης (τροποποιημένος pBI221-Luc), έτσι ώστε να μπορεί να μελετηθεί η λειτουργία των ρυθμιστικών στοιχείων που εμπεριέχει. Τέλος, κατασκευάστηκε ένα σύστημα αναφοράς πρωτοπλαστών από φύλλα φασολιού, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη λειτουργική μελέτη του τμήματος του *PvTOC1* υποψήφιου υποκινητή που έχει κλωνοποιηθεί σε φορέα έκφρασης. Αυτή η μεθοδολογία μπορεί να εφαρμοστεί και για τη μελέτη και άλλων τμημάτων του υποκινητή του *PvTOC1*, αλλά και ρυθμιστικών στοιχείων άλλων γονιδίων του ρολογιού του φυτού.

## ABSTRACT

Many aspects of the behavior and physiology of plants and animals fluctuate over the course of each day. Some of these fluctuations occur in response to environmental factors, such as light/dark cycles and persist under constant conditions. These rhythms are designated as circadian, from the Latin *circa dies*, which means almost a day. Circadian rhythms in plants include the daily movement of leaves and petals, stomata opening, diurnal oscillations in metabolic functions such as respiration and photosynthesis. They are governed by an endogenous time keeper, the circadian clock, which is divided into three components. The first, the input pathway, is how external cues entrain the second component, the central oscillator, to the environment. This triggers the third component, the output pathways, which are the overt rhythms under the control of the circadian system. The central oscillator is composed of auto-regulatory positive/negative feedback loops based on the activity of specific transcription factors. The main transcription factors that constitute the central oscillator of the plant *A. thaliana* are CCA1 (Circadian Clock Associated 1) and LHY (Late elongated Hypocotyl) which belong to the negative elements of the loop and APRR1/TOC1 (Arabidopsis Pseudo Response Regulator 1/Timing Of CAB expression 1), or simply TOC1 factor, which is the positive element of the loop. The ortholog factor of TOC1 from bean (*PvTOC1*, *Phaseolus vulgaris* Timing Of CAB expression 1) appears to respond to light stimuli during the night period (scotophasis), which has not been shown before for *A. thaliana* TOC1. Therefore, it is important to study the regulatory elements of *PvTOC1* gene expression in order to explore the underlying mechanism.

The aim of the present study was the construction of a reporter system to analyze any putative promoter motifs of the photoperiodically controlled gene of bean, *PvTOC1*. For this purpose, initially, the 5'-end of *PvTOC1* cDNA was cloned. This was followed by the isolation of the 5'- Untranslated Region (5'-UTR) of the gene, corresponding to a part of the *PvTOC1* promoter of 1250 bp length. The obtained sequence was analyzed *in silico* and several *cis*-regulatory elements were detected, which might account for the regulation of *PvTOC1* gene expression under various regimes. Part of the sequence of the postulant promoter was cloned into an expression vector (modified pBI221-Luc), in order to study any putative regulatory elements. Finally, a reporter system was constructed from bean leaf protoplasts, which will be used for the functional analysis of the cloned *PvTOC1* promoter. This methodology can be applied to future studies to analyze different parts of the *PvTOC1* promoter, as well as of regulatory elements of other clock genes of the bean plant.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
<b>1.1. Οι κερκαδικοί ρυθμοί.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2. Το κερκαδικό ρολόι των φυτών.....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Γενικά στοιχεία - Η εξέλιξη των φυτικών κερκαδικών ρολογιών.....	9
1.2.2. Η αρχιτεκτονική του κερκαδικού ρολογιού.....	9
<b>1.3. Τα μονοπάτια εισόδου στον κεντρικό ταλαντωτή.....</b>	<b>11</b>
1.3.1. Συγχρονισμός του ρολογιού.....	11
1.3.2. Φυτοχρώματα (Phytochromes).....	12
<b>1.4. Ο κεντρικός ταλαντωτής του κερκαδικού ρολογιού των φυτών.....</b>	<b>13</b>
1.4.1. Οι μεταγραφικοί παράγοντες CCA1 και LHY.....	14
1.4.2. Ο μεταγραφικός παράγοντας TOC1.....	14
1.4.3. Το κουϊντέτο <i>APRR1/TOC1</i> .....	18
1.4.4. Το μοντέλο του κεντρικού ταλαντωτή.....	19
<b>1.5. Μονοπάτια εξόδου από τον κεντρικό ταλαντωτή (εκροές του κερκαδικού συστήματος).....</b>	<b>23</b>
<b>1.6. Κερκαδικό Ρολόι και Βελτίωση Φυτών.....</b>	<b>24</b>
<b>1.7. Το φασόλι (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) ως πειραματόφυτο.....</b>	<b>26</b>
<b>1.8. Σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας.....</b>	<b>27</b>
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
<b>2.1. Φυτικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης φυτών.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Απομόνωση του 5'-άκρου του cDNA του γονιδίου <i>PvTOC1</i>.....</b>	<b>28</b>
2.2.1. Απομόνωση ολικού RNA.....	28
2.2.2. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription reaction).....	29
2.2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction).....	30
2.2.4. Εξαγωγή DNA από πηκτή αγαρόζης.....	31
2.2.5. Εισαγωγή DNA σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης.....	31
2.2.6. Παρασκευή ηλεκτροδιαπερατών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> DH5a.....	32
2.2.7. Μετασχηματισμός βακτηρίων μέσω ηλεκτροδιάτρησης.....	33
2.2.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (plasmid mini prep).....	34
<b>2.3. Απομόνωση περιοχής του «υποκινητή» του γονιδίου <i>PvTOC1</i>.....</b>	<b>34</b>
2.3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από φύλλα-Μέθοδος CTAB.....	35
2.3.2. Πέψεις γενωμικού DNA.....	36
2.3.3. Προετοιμασία προσαρμοστών.....	36
2.3.4. Συνένωση προσαρμοστών με το κομμένο γενωμικό DNA (Ligation).....	37
2.3.4. Αντιδράσεις PCR για απομόνωση του «υποκινητή» του <i>PvTOC1</i> .....	37
<b>2.4. Κλωνοποίηση τμήματος του «υποκινητή» του γονιδίου <i>PvTOC1</i> σε φορέα έκφρασης.....</b>	<b>39</b>
2.4.1. Αντίδραση PCR για την απομόνωση τμήματος του «υποκινητή» του <i>PvTOC1</i> .....	40
2.4.2. Πέψη του κλώνου [pTZ57R/T+τμήμα «υποκινητή» <i>PvTOC1</i> ] (πέψη I).....	42
2.4.3. Πέψη του φορέα pBI221-Luc (πέψη II).....	42
2.4.4. Συνένωση (ligation) του pBI221-Luc (-35S) με το τμήμα του «υποκινητή» του <i>PvTOC1</i> .....	43
<b>2.5. Κατασκευή συστήματος αναφοράς για τη μελέτη του «υποκινητή».....</b>	<b>43</b>
2.5.1. Απομόνωση πρωτοπλαστών από φύλλα φασολιού.....	44
2.5.2. Παροδικός μετασχηματισμός πρωτοπλαστών μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation).....	45
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46

<b>3.1. Απομόνωση του 5'-άκρου του cDNA του γονιδίου <i>PvTOC1</i></b> .....	46
3.1.1. Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών <i>PvTOC1</i> και <i>AtTOC1</i> .....	50
<b>3.2. Απομόνωση περιοχής του «υποκινητή» του γονιδίου <i>PvTOC1</i></b> .....	50
<b>3.3. Κλωνοποίηση τμήματος του «υποκινητή» του γονιδίου <i>PvTOC1</i> σε φορέα έκφρασης</b> .....	53
<b>3.4. Κατασκευή συστήματος αναφοράς για τη μελέτη του <i>PvTOC1</i> «υποκινητή»</b> .....	56
3.4.1. Απομόνωση πρωτοπλαστών από φύλλα φασολιού .....	56
3.4.2. Ηλεκτροδιάτρηση πρωτοπλαστών .....	57
<b>3.5. Σύνοψη</b> .....	59
<b>4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	60

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Οι κირκαδικοί ρυθμοί.

Πολλές πτυχές της συμπεριφοράς και της φυσιολογίας, τόσο των φυτών όσο και των ζώων, εμφανίζουν μία 24ωρη ταλάντωση (επαναλαμβανόμενο φαινόμενο εναλλαγής μεταξύ δύο ακραίων θέσεων με 24ωρη περίοδο) κατά τη διάρκεια κάθε μέρας. Κάποιες από αυτές τις ταλαντώσεις συμβαίνουν αποκλειστικά ως απόκριση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι κύκλοι ημέρας/νύχτας, και διατηρούνται και κάτω από σταθερές συνθήκες. Τέτοιοι ρυθμοί, των οποίων οι περίοδοι αντιστοιχούν στην περιστροφή της γης γύρω από τον άξονά της (περίπου 24 ώρες) ονομάζονται κირκαδικοί (circadian, από το λατινικό: *circa-dies*, περίπου μία ημέρα).

Οι κირκαδικοί ρυθμοί (circadian rhythms) παρατηρούνται σε ένα ευρύ φάσμα πολύ διαφορετικών μεταξύ τους οργανισμών, από τα κυανοβακτήρια και τους μύκητες μέχρι τα φυτά, τα έντομα και τα θηλαστικά. Ο άνθρωπος, για παράδειγμα, όπως και άλλα ημερόβια θηλαστικά έχει μεγαλύτερο βαθμό ευστροφίας, αυξημένη πίεση αίματος, θερμοκρασία σώματος και νεφρική λειτουργία κατά τη διάρκεια της ημέρας, με μία αυξημένη τάση για ύπνο τη νύχτα. Στα έντομα, το ακμαίο της μύγας βγαίνει από το κουκούλι του σε συγχρονισμό με το ξημέρωμα για να έχει αυξημένες πιθανότητες επιβίωσης (Pittendrigh, 1993). Ακόμα και είδη ψαριών και εντόμων που διαβιούν σε σπηλιές διατηρούν τους ημερήσιους ρυθμούς των προγόνων τους.

Κιρκαδικοί ρυθμοί στα φυτά συμπεριλαμβάνουν την κίνηση φυτικών οργάνων όπως φύλλων και πετάλων, το άνοιγμα των στοματίων, καθημερινές ταλαντώσεις σε μεταβολικές δραστηριότητες όπως η αναπνοή και η φωτοσύνθεση. Οι κირκαδικοί ρυθμοί κυμαίνονται από τους σχετικά μη-εμφανείς, όπως οι ρυθμοί στη φωτοσύνθεση, μέχρι τους συγκριτικά εμφανείς, όπως οι ρυθμοί στην κίνηση των φύλλων των φυτών (Εικ. 1.1) και το άνοιγμα των ανθέων.



**Εικ. 1.1** Κιρκαδική κίνηση των φύλλων στο είδος *Phaseolus vulgaris*. Οι κινήσεις αυτές οφείλονται στην περιοδική αλλαγή των ιδιοτήτων των κυτταρικών μεμβρανών, όπου η μετακίνηση ιόντων  $K^+$  και  $Ca^{2+}$  έχει ως αποτέλεσμα τις αλλαγές της σπαργής των κυττάρων του μίσχου.

Οι κირκαδικοί ρυθμοί χαρακτηρίζονται από ένα σύνολο ιδιοτήτων, πέρα από την 24ωρη περίοδό τους. Αρχικά, υπάρχει ενδογενής διατήρηση του ρυθμού (free running rhythm) κάτω από σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες. Η περίοδος του ρυθμού είναι ανεξάρτητη από τις θερμοκρασιακές αλλαγές. Η αλλαγή φάσης της ταλάντωσης (phase-shift) του ρυθμού προκαλείται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (κυρίως από το φως και δευτερευόντως από τη θερμοκρασία). Ανεξάρτητα με τον οργανισμό, οι κირκαδικοί ρυθμοί εμφανίζονται στο επίπεδο του κυττάρου. Ανάλογα όμως με τον οργανισμό τα κύτταρα διαφορετικών ιστών μπορεί να εκτελούν διαφορετικές ταλαντώσεις. Τέλος, η ύπαρξη ενός συστήματος καταγραφής του χρόνου δίνει τη δυνατότητα στις διάφορες φυσιολογικές διεργασίες να συντονίζονται με βάση τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, τόσο σε επίπεδο οργανισμού όσο και σε επίπεδο πληθυσμού (π.χ. άνθιση, επικονίαση κ.λπ.).



## 1.2. Το κिरκαδικό ρολόι των φυτών

### 1.2.1. Γενικά στοιχεία - Η εξέλιξη των φυτικών κिरκαδικών ρολογιών

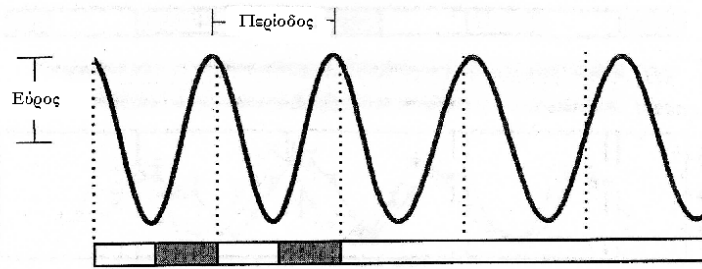
Η φωτοπεριοδική ρύθμιση μίας βιολογικής διαδικασίας σημαίνει απλά ότι αυτή συνδέεται με μία χρονική μέτρηση. Οι οργανισμοί έχουν μία εγγενή χρονική κλίμακα στη διάθεσή τους. Μέρα με τη μέρα, κατά τη διάρκεια του χρόνου, συγκρίνουν την κλίμακα αυτή με το πραγματικό μήκος της ημέρας ή της νύχτας. Όταν το πραγματικό μήκος της ημέρας ή της νύχτας είναι μεγαλύτερο (ή μικρότερο, ανάλογα με την περίπτωση) από την εγγενή χρονική κλίμακα, συμβαίνει μία αλλαγή στη φυσιολογία του οργανισμού. Αυτή είναι μία "φωτοπεριοδική αντίδραση" (photoperiodic response) (Engelman, 2007).

Δεδομένου ότι η φωτοπερίοδος μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του έτους, ένας μηχανικός πιθανόν να χρησιμοποιούσε κάποιου είδους κλεψύδρα ή χρονόμετρο για να κατασκευάσει ένα μετρητή για την εκτίμηση του μήκους της φωτεινής ή της σκοτεινής περιόδου. Εάν μία συγκεκριμένη χρονική περίοδος, η οποία αντιστοιχεί στο μήκος της ημέρας στο οποίο μία διαδικασία πρέπει να λάβει χώρα, έχει περάσει, το χρονόμετρο χτυπάει ή η άμμος της κλεψύδρας έχει συσσωρευτεί στο κάτω μέρος αυτής. Έτσι, θα μπορούσε να ξεκινήσει η φωτοπεριοδική αντίδραση. Παρόλα αυτά, δεν είναι αυτός συνήθως ο τρόπος με τον οποίο οι οργανισμοί μετρούν το μήκος της ημέρας. Αντί για αυτό, όπως είχε προταθεί από τον Bünning (1936), χρησιμοποιούν ένα ρολόι τύπου εκκρεμούς (Engelman, 2007). Το εκκρεμές αυτό αναφέρεται ως το κिरκαδικό ρολόι (circadian clock), το οποίο διέπει τους κिरκαδικούς ρυθμούς ως ο εγγενής βηματοδότης (endogenous pacemaker) των οργανισμών (Gardner *et al.*, 2006).

Για ποιο λόγο όμως τα φυτά ανέπτυξαν ένα τόσο πολύπλοκο, όπως θα φανεί στη συνέχεια, σύστημα καταγραφής του χρόνου; Για να γίνει κατανοητός ο λόγος που ώθησε στη δημιουργία κिरκαδικών ρολογιών στα φυτά είναι απαραίτητο να εξηγηθεί η εξελικτική πίεση που αυτά υφίστανται. Τα φυτά είναι οργανισμοί χωρίς δυνατότητα μετακίνησης, έτσι βρίσκονται σε στενή αλληλεπίδραση με το άμεσο περιβάλλον τους. Η δυνατότητα συγχρονισμού των λειτουργιών του φυτού με τις ημερήσιες εναλλαγές στη θερμοκρασία και το φως παρέχει μεγάλο πλεονέκτημα στα φυτά. Ο Pittendrigh (1993) υπέθεσε ότι η κινητήρια δύναμη πίσω από την εξέλιξη των κिरκαδικών ρολογιών είναι το κληρονομούμενο πλεονέκτημα πρόβλεψης των αντιδράσεων που επηρεάζονται αρνητικά από το φως έτσι ώστε να συμβούν κατά τη διάρκεια της νύχτας. Η πρόβλεψη τακτικών αλλαγών στο περιβάλλον μειώνει την καθυστέρηση μεταξύ μιας αλλαγής στο περιβάλλον και της κατάλληλης μεταβολής στη φυσιολογία του οργανισμού (Harmer *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2001). Στα φυτά, η επαγωγή των μονοπατιών πρόσληψης φωτός πριν το ξημέρωμα επιτρέπει την πλήρη εκμετάλλευση της φωτεινής περιόδου, ενώ η επαγωγή του μηχανισμού απόκρισης σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης λόγω ανεπάρκειας νερού αργά το απόγευμα, μπορεί να προβλέψει και να προετοιμάσει το φυτό (Harmer *et al.*, 2000; Millar *et al.*, 2004).

### 1.2.2. Η αρχιτεκτονική του κिरκαδικού ρολογιού

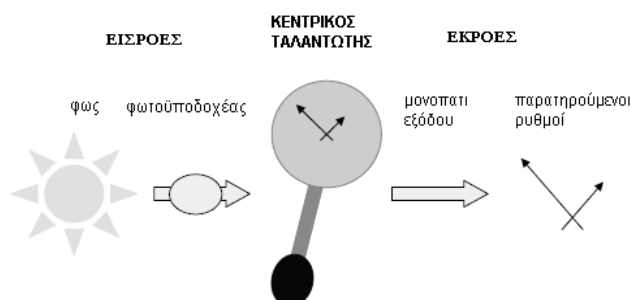
Το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας σχετικά με το κिरκαδικό ρολόι των φυτών έχει διεξαχθεί στο πειραματόφυτο *Arabidopsis thaliana*. Στη συνέχεια της παρούσας εισαγωγής, εάν δε διευκρινίζεται κάτι διαφορετικό, θα εννοείται ότι αναφερόμαστε σε δεδομένα που έχουν προέλθει από τη σχετική έρευνα στο φυτό αυτό.



**Εικ. 1.2.** Παράδειγμα ταλάντωσης: ιδανικός κίρκαδικός ρυθμός (αρχικά σε φωτοπερίοδο [εναλλαγή άσπρου και μαύρου πλαισίου] και στη συνέχεια σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού [συνεχές άσπρο πλαίσιο]). Στο σχήμα φαίνονται και οι βασικές παράμετροι μιας ταλάντωσης: εύρος (amplitude) και περίοδος (period).

Γενικά, οι κίρκαδικές ταλαντώσεις είναι ένα βιοχημικό σύστημα που εναλλάσσεται με έναν κανονικό ρυθμό μεταξύ δύο ακραίων καταστάσεων (Εικ. 1.2). Προσομοιάζει, όπως προαναφέρθηκε, με ένα εκκρεμές που ταλαντώνεται σταθερά μεταξύ δύο αντίθετων θέσεων (Εικ. 1.3). Ως εύρος της ταλάντωσης (amplitude) ορίζεται το ήμισυ της διαφοράς της τιμής του ελαχίστου από την τιμή του μεγίστου. Η περίοδος της ταλάντωσης (period) αναφέρεται ως ο χρόνος που απαιτείται για τη συμπλήρωση ενός πλήρους κύκλου ταλάντωσης (Εικ. 1.2). Το επίπεδο (level) ενός ρυθμού είναι η βάση γύρω από την οποία συμβαίνουν οι ρυθμικές μεταβολές και η φάση (phase) του ρυθμού αναφέρεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του ρυθμού, όπως είναι η μέγιστη ή η ελάχιστη τιμή, σε σχέση με την αντίστοιχη χρονική κλίμακα.

Σε ένα υπεραπλουστευμένο μοντέλο, το οποίο προτάθηκε αρχικά από τον Bünning (1936), το ρολόι χωρίζεται σε τρία δομικά συστατικά (Εικ. 1.3). Το πρώτο, τα μονοπάτια εισόδου στον κεντρικό ταλαντωτή ή εισροές του συστήματος (input pathways), αφορά το πώς οι εξωτερικοί παράγοντες συντονίζουν το δεύτερο συστατικό, δηλαδή τον ενδογενή κεντρικό ταλαντωτή (central oscillator), με το περιβάλλον. Έτσι, δίνεται το έναυσμα στο τρίτο συστατικό του ρολογιού, τα μονοπάτια εξόδου από τον κεντρικό ταλαντωτή ή εκροές (output pathways), τα οποία είναι οι εμφανείς ρυθμοί κάτω από τον έλεγχο του κίρκαδικού συστήματος (Cui, 2007). Παρόλα αυτά, το παραδοσιακό αυτό μοντέλο τριών-συστατικών (Εικ. 1.3) είναι υπεραπλουστευμένο και μία πολύ πιο περίπλοκη εικόνα φαίνεται να αναδύεται, με συστατικά των μονοπατιών εξόδου να ρυθμίζουν το 'βήμα' (pace) του ταλαντωτή και συστατικά των μονοπατιών εισαγωγής να ρυθμίζονται στενά τα ίδια από το ρολόι. Η ύπαρξη πολλαπλών μονοπατιών εισόδου-φωτοϋποδοχέων, καθώς και μονοπατιών εξόδου από τον κεντρικό ταλαντωτή έχουν ως αποτέλεσμα μία επιπλέον κλιμάκωση της πολυπλοκότητας του μοντέλου. Τέλος, μπορεί ακόμα να υπάρχουν και πολλαπλά ρολόγια τα οποία να λειτουργούν εντός του ίδιου του οργανισμού ή ακόμα και μέσα στο ίδιο κύτταρο.



**Εικ. 1.3.** Οργάνωση του κίρκαδικού συστήματος. Η πληροφορία από το φως ακολουθείται από έναν φωτοϋποδοχέα ο οποίος την προωθεί στον κεντρικό ταλαντωτή, συντονίζοντάς τον στη σωστή ώρα της ημέρας. Ο κεντρικός ταλαντωτής, μέσω του μονοπατιού εξόδου ελέγχει τους παρατηρούμενους ρυθμούς (Cui, 2007).

Τα τρία βασικά μέρη του ρολογιού στα οποία αναφερθήκαμε παραπάνω διαχωρίζονται χωρικά μέσα στο κύτταρο. Τα στοιχεία του πρώτου μέρους, οι φωτοϋποδοχείς, βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα αλλά η δράση τους εκδηλώνεται στον πυρήνα. Τα στοιχεία του κεντρικού ταλαντωτή, οι μεταγραφικοί παράγοντες που εκτελούν τις ταλαντώσεις, εδρεύουν στον πυρήνα όπου και εκδηλώνεται η δράση τους. Τέλος, τα στοιχεία του τρίτου μέρους θα εκδηλώσουν τη δράση του κεντρικού ταλαντωτή μέσω βιοχημικών μονοπατιών του φυτού που θα παράγουν συγκεκριμένους φαινοτύπους.

### 1.3. Τα μονοπάτια εισόδου στον κεντρικό ταλαντωτή

#### 1.3.1. Συγχρονισμός του ρολογιού

Τα ρολόγια στα διάφορα Βασίλεια των οργανισμών αποτελούνται από ένα δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων τοποθετημένων σε αλληλοεξαρτώμενους βρόγχους αρνητικής ανάδρασης (negative feedback loops) (Barak *et al.*, 2000; Harmer *et al.*, 2001; Lakin-Thomas *et al.*, 2000). Το ρολόι διατηρεί ένα εσωτερικό μέτρο της παρέλευσης του χρόνου και προγραμματίζει τις φυσιολογικές διεργασίες ώστε να συμβούν στις ενδεικνυόμενες ώρες της ημέρας. Οι κίρκαδικοί ρυθμοί που παράγει το κίρκαδικό ρολόι είναι ενδογενείς, δηλαδή είναι γενετικά ελεγχόμενοι. Αυτό το αποδεικνύει πλήθος μελετών που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία και οι οποίες φανερώνουν ότι ένας κίρκαδικός ρυθμός είναι ικανός να διατηρεί τη φάση της ταλάντωσής του σε σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος. Ωστόσο, για να μπορεί να λειτουργήσει σωστά το κίρκαδικό ρολόι θα πρέπει να έχει ένα μηχανισμό που θα του επιτρέπει να συγχρονίζεται με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και να αυτορυθμίζεται με βάση αυτές. Για να μείνουν συγχρονισμένα με το περιβάλλον τους, τα κίρκαδικά ρολόγια επαναπροσδιορίζονται ή συντονίζονται (entrainment) από συγκεκριμένους παράγοντες οι οποίοι αναμεταδίδουν πληροφορίες σχετικά με την ώρα της ημέρας. Οι "χρονοδότες" ("time-givers" ή *Zeitgebers*) είναι γενικά οι κύκλοι παρουσίας/απουσίας φωτός και οι κύκλοι της θερμοκρασίας, αν και ρυθμοί στη διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων μπορούν επίσης να δράσουν ως σήμα συγχρονισμού σε κάποιους οργανισμούς, όπως τα θηλαστικά (Harmer *et al.*, 2001; Roenneberg και Mellow, 1998).

Ο συγχρονισμός του ρολογιού επιτυγχάνεται προκαλώντας μία σταθερή αλλαγή φάσης μέσω της μεταβολής στα επίπεδα mRNA, πρωτεΐνης και/ή τα επίπεδα δράσης ενός ή περισσότερων στοιχείων του κεντρικού ταλαντωτή. Αυτή η αλλαγή φάσης δεν αλλάζει την εσωτερική ροή των διεργασιών, αλλά την επανατοποθετεί σύμφωνα με την ημερήσια πρόοδο στο περιβάλλον επιτρέποντας, για παράδειγμα, την προσαρμογή ενός οργανισμού στο μεταβαλλόμενο μήκος της ημέρας κατά τις εναλλαγές των εποχών (Devlin, 2002).

Τα κίρκαδικά ρολόγια των διαφόρων οργανισμών ανταποκρίνονται χωρίς καμία εξαίρεση στο φως, το οποίο και είναι το καλύτερα μελετημένο ερέθισμα συγχρονισμού στα φυτά (Devlin, 2002; Somers, 2005). Ο σωστός συγχρονισμός βασίζεται, εν μέρει, στη διαφορετική απόκριση στο φως κατά τη διάρκεια του κύκλου - η απόκριση υφίσταται το λεγόμενο 'gating' (χρονο-εξαρτώμενη απόκριση): ο ταλαντωτής φαίνεται να αποκρίνεται σε ερεθίσματα συγχρονισμού μόνο σε συγκεκριμένες και κατάλληλες ώρες του 24ώρου (Somers, 2005). Το φωτεινό σήμα πρέπει επίσης να είναι σχετικά έντονο και παρατεταμένο (Devlin, 2002), αποτρέποντας έτσι συγχρονισμό από «λανθασμένα» σήματα, όπως το φως του φεγγαριού ή φως από αστραπή.

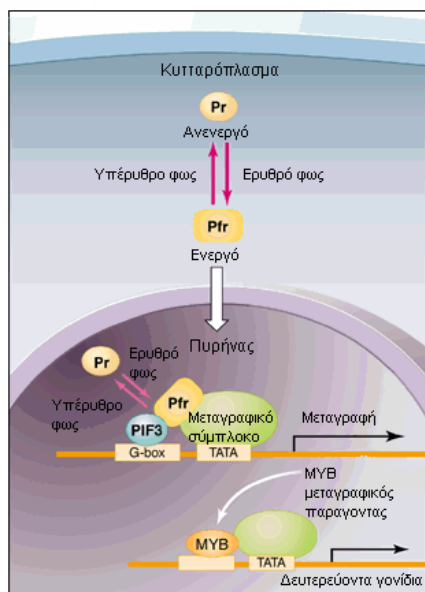
Το ρόλο της αντίληψης (perception) του φωτεινού σήματος αναλαμβάνουν οι φωτοϋποδοχείς (photoreceptors). Στα φυτά υπάρχουν τρεις κύριες οικογένειες φωτοϋποδοχέων: (α) τα φυτοχρώματα (phytochromes), τα οποία απορροφούν στο ερυθρό και υπέρυθρο μήκος φωτός (Quail, 2002), (β) τα κρυπτοχρώματα (cryptochromes) και (γ) οι φωτοτροπίνες (phototropines), που απορροφούν στο μπλε και υπεριώδες φάσμα του φωτός (Whitelam και Devlin, 1998; Christie και Briggs, 2001). Η οικογένεια πρωτεϊνών ZEITLUPE μπορεί επίσης να ανιχνεύσει μπλε και υπεριώδες (UV-A) φως (Imaizumi *et al.*, 2003) και υπάρχουν στοιχεία για την ύπαρξη ενός φωτοϋποδοχέα πράσινου φωτός, αν και η φύση του είναι ακόμα άγνωστη (Folta, 2004).

### 1.3.2. Φυτοχρώματα (Phytochromes)

Τα φυτοχρώματα είναι από τους πιο καλά μελετημένους φωτοϋποδοχείς των φυτών. Ανακαλύφθηκαν πριν από περισσότερα από 50 χρόνια ως υπεύθυνοι παράγοντες της άνθισης των φυτών μικρής ημέρας (Borthwick *et al.*, 1952). Τα φυτοχρώματα ανήκουν σε μία οικογένεια που αριθμεί πέντε μέλη PHYA-E (Sharrock και Quail, 1989). Με βάση τη σταθερότητα του πρωτεϊνικού μέρους του φυτοχρώματος τα πέντε μέλη μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες. Στην κατηγορία I ανήκουν τα φυτοχρώματα που είναι ευαίσθητα και αποικοδομούνται παρουσία έντονου φωτός (PHYA), ενώ στην κατηγορία II ανήκουν τα μη φωτοευαίσθητα φυτοχρώματα (PHYB-E) (Clough και Vierstra, 1997; Quail, 1997).

Όλα τα μέλη είναι φωτοϋποδοχείς του ορατού φάσματος του φωτός και ανιχνεύονται σε δύο μορφές. Η πρώτη καλείται μορφή P<sub>r</sub> (Phytochrome red form), είναι η ανενεργός μορφή των φυτοχρωμάτων και σε αυτή τη μορφή βιοσυντίθεται το μόριο. Η δεύτερη είναι η P<sub>fr</sub> (Phytochrome far-red form) και είναι η βιολογικά ενεργή μορφή του φωτοϋποδοχέα. Έκθεση στο ερυθρό μήκος κύματος του φωτός (667 nm) έχει ως αποτέλεσμα τη μετάπτωση της P<sub>r</sub> (667) μορφής στη βιολογικά ενεργή P<sub>fr</sub> (730) μορφή που συνοδεύεται τόσο από αλλαγές στη δομή του μορίου όσο και στο μήκος κύματος που απορροφά. Έκθεση σε ακτινοβολία στο υπέρυθρο μήκος κύματος του φωτός (730 nm) μετατρέπει το φυτόχρωμα από τη P<sub>fr</sub> μορφή, ξανά στη βιολογικά ανενεργή P<sub>r</sub> μορφή του.

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 οικογένειες φωτοϋποδοχέων (κρυπτοχρώματα και φωτοτροπίνες). Η καρβοξυτελική περιοχή του μορίου του φυτοχρώματος 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 (basic Helix Loop Helix) παράγοντα, PIF3 (Phytochrome Interacting Factor 3). Τα φυτοχρώματα θεωρούνται ότι είναι κινάσες με φωτοεξαρτώμενη ικανότητα φωσφορυλίωσης. Η δράση τους αυτή, αποδίδεται στην ύπαρξη μιας περιοχής με παραπλήσια δομή με την κινάση της ιστιδίνης (Histidine-Kinase-Related-Domain, HKRD) με αποτέλεσμα να μπορούν να φωσφορυλιώσουν άλλες πρωτεΐνες όταν βρίσκονται στη βιολογικά ενεργή (P<sub>fr</sub>) μορφή τους (Quail, 1997).



**Εικ. 1.4.** Μοντέλο της λειτουργίας του κερκαδικού ρολογιού στα φυτά μέσω της σηματοδότησης του κεντρικού ταλαντωτή από το ενεργοποιημένο φυτόχρωμα B (PHY B). Το φυτόχρωμα B παραμένει στο κυτταρόπλασμα στην ανενεργή (P<sub>r</sub>) μορφή του. Με την επίδραση της ακτινοβολίας στην περιοχή του ερυθρού, το PHY B μεταπίπτει στη βιολογικά ενεργή μορφή του (P<sub>fr</sub>) και εισέρχεται στον πυρήνα. Εκεί αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό παράγοντα PIF3 και το ενεργοποιημένο σύμπλοκο δεσμεύεται στο G-πλαίσιο του υποκινητή των γονιδίων *LHY* και *CCA1*, δύο μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας MYB. Οι πρωτεΐνες *LHY* και *CCA1* δεσμεύονται με τη σειρά τους στον υποκινητή δευτερευόντων (secondary genes) πρωϊνών γονιδίων, όπως τα γονίδια *CAB*, ενεργοποιώντας έτσι τη μεταγραφή τους (Nagatani, 2000).

Το κερκαδικό ρολόι των φυτών σηματοδοτείται από πολλούς φωτοϋποδοχείς οι οποίοι χρησιμοποιούν αρκετά μονοπάτια εισόδου στον κεντρικό ταλαντωτή. Αυτά τα μονοπάτια ακόμα δεν είναι γνωστά, αν και υπάρχουν διάφορες σχετικές προτάσεις. Μία από αυτές συμπεριλαμβάνει τη μεταγωγή του φωτεινού σήματος μέσω του παράγοντα PIF3, μίας πρωτεΐνης που προσδένεται στο DNA, μέλος της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων bHLH (Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Το PHYB όταν εισέλθει στον πυρήνα σχηματίζει σύμπλοκο με τον πυρηνο-εντοπιζόμενο PIF3 ο οποίος είναι ήδη συνδεδεμένος σε G-πλαίσια (G-box) (Ni *et al.*, 1999). Οι αλληλουχίες των G-πλαισίων βρίσκονται σε διάφορα φωτο-επαγόμενα γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων-κεντρικών στοιχείων του ρολογιού όπως τα *CCA1* και *LHY* (Martinez-Garcia *et al.*, 2000). Παρόλα αυτά παραμένει ακόμα άγνωστο ποιοί παράγοντες συμμετέχουν στη σηματοδότηση του κεντρικού ταλαντωτή από το φυτόχρωμα.

#### 1.4. Ο κεντρικός ταλαντωτής του κερκαδικού ρολογιού των φυτών

Ο κεντρικός ταλαντωτής είναι η «καρδιά» του ρολογιού σε κάθε οργανισμό. Οι κεντρικοί ταλαντωτές (Central Oscillators) των οργανισμών δεν είναι τίποτα άλλο από αυτορυθμιζόμενοι βρόγχοι επανατροφοδότησης που αποτελούνται από συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες (Autoregulatory Transcriptional Feedback Loops). Στο κερκαδικό ρολόι των φυτών, κάποιοι από τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα ότι δρουν στον κεντρικό ταλαντωτή του *A. thaliana* είναι οι *CCA1* [Circadian Clock Associated 1 (Wang και 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 παράγοντας *TOC1*, ο οποίος αποτελεί το θετικό παράγοντα του βρόγχου. Οι μεταγραφικοί παράγοντες *CCA1* και *LHY* παρουσιάζουν τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης των mRNAs τους την αυγή, είναι δηλαδή «πρωϊνά» γονίδια. Στον αντίποδα αυτού, ο μεταγραφικός παράγοντας *TOC1* παρουσιάζει το μέγιστο των επιπέδων έκφρασης του mRNA του κατά τη δύση και θεωρείται «απογευματινό γονίδιο».

#### 1.4.1. Οι μεταγραφικοί παράγοντες CCA1 και LHY

Οι παράγοντες CCA1 και LHY ανήκουν στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων Myb, χαρακτηριστικό όλων των μελών της οποίας είναι η συντήρηση του μοτίβου Myb που μεσολαβεί στην πρόσδεση του πρωτεϊνικού μορίου με το DNA. Οι περιοχές Myb των συγκεκριμένων παραγόντων αποτελούνται από 52 αμινοξικά κατάλοιπα η καθεμία, σχηματίζοντας τρισδιάστατη δομή α-έλικας/στροφής/α-έλικας (helix-turn-helix), όπως συμβαίνει και με τους bHLH-μεταγραφικούς παράγοντες, των οποίων τον τρόπο σύνδεσης στο DNA φαίνεται να ακολουθούν: η μία έλικα τοποθετείται κάθετα στη μεγάλη αύλακα του DNA και η δεύτερη έλικα τοποθετείται κάθετα στην πρώτη αλληλεπιδρώντας με το σύμπλοκο μεταγραφής.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τόσο το γονίδιο *LHY* όσο και το *CCA1* είναι «πρωινά». Αυτό σημαίνει ότι σε φυτά *Arabidopsis* αγρίου τύπου (wild type), η 24ωρη ταλάντωση των επιπέδων mRNA τους παρουσιάζει μέγιστο την αυγή. Στη συνέχεια τα επίπεδα mRNA των *LHY/CCA1* 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 τη διάρκεια της νύχτας, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό ως «πρόβλεψη του φωτός» (Light Anticipation), για να κορυφωθούν και πάλι την αυγή.

Σε αποχλωιωτικά φυτά (φυτά τα οποία δεν έχουν εκτεθεί σε φως και δεν παράγουν χλωροφύλλη), 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 τη διαφορά ότι τα απογευματινά γονίδια δεν παρουσιάζουν το φαινόμενο της οξείας απόκρισης κατά την αυγή.

Ακόμα και με απώλεια των *LHY/CCA1*, ο κεντρικός ταλαντωτής είναι ικανός να συνεχίσει να εκτελεί ταλαντώσεις, ίσως εξαιτίας κάποιων δευτερευόντων παραγόντων που δρουν ως 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 περιβάλλοντος και έτσι αυτός φθίνει μετά από 2 κύκλους (Mizoguchi *et al.*, 2002; Alabadi *et al.*, 2002).

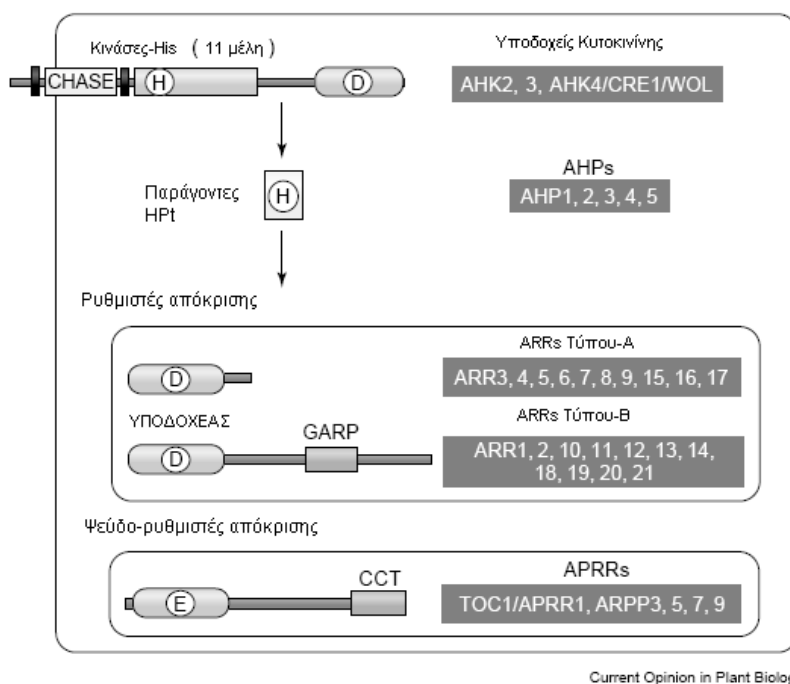
#### 1.4.2. Ο μεταγραφικός παράγοντας TOC1

Ο μεταγραφικός παράγοντας TOC1 χαρακτηρίστηκε μεταγενέστερα των παραγόντων LHY/CCA1, ως στοιχείο του κεντρικού ταλαντωτή στο είδος *A. thaliana*. Το γονίδιο *TOC1* απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε σε μία απόπειρα ανίχνευσης γονιδίων που σχετίζονται με το ρολόι των φυτών (Strayer *et al.*, 2000). Το πείραμα περιελάμβανε μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια και παρατήρηση του φαινοτύπου των φυτών για αλλαγές στην περιοδική έκφραση γνωστών ρυθμικών γονιδίων όπως τα «πρωινά» γονίδια *CAB* (από όπου και πήρε το όνομά του ο παράγοντας, *Timing Of CAB expression 1*). Τα γονίδια *CAB* κωδικοποιούν πρωτεΐνες συλλογής φωτός οι οποίες δεσμεύουν χλωροφύλλη a/b (light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein). Η ελεύθερη και ρυθμική έκφρασή τους αποτελεί έναν καλά μελετημένο δείκτη των κερκαδικών φαινομένων στο φυτό *Arabidopsis*, αφού

αποτελούν, πιθανόν, το μετέπειτα στόχο των περισσότερων μονοπατιών εξόδου από τον κεντρικό ταλαντωτή (Millar *et al.*, 1995).

Επιπλέον πειράματα σε φυτά μετασχηματισμένα με την τεχνολογία της RNA παρεμπόδισης ως προς τον παράγοντα TOC1 (TOC1 RNA interference, RNAi), βρέθηκε ότι τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TOC1* ελαττώθηκαν, με αποτέλεσμα να παρατηρείται σμίκρυνση της περιόδου στο ρυθμό των προαναφερθέντων κερκαδικών γονιδίων (Más *et al.*, 2003). Αντίθετα, TMG (TOC1 Mini Gene technology) φυτά, στα οποία αυξήθηκε η γενετική δόση του *TOC1*, παρουσιάστηκε αύξηση της περιόδου σε ρυθμικά γονίδια (Más *et al.*, 2003).

Από τα παραπάνω στοιχεία διαφαίνεται η μεσολάβηση της πρωτεΐνης TOC1 στην κερκαδική ρύθμιση των γονιδίων μετά την ενεργοποίηση του κεντρικού ταλαντωτή από το φως. Σε αντίθετη περίπτωση, αλλαγές στην ένταση αλλά και στην ποιότητα (φάσμα) του φωτός θα έδιναν διαφορετικό πρότυπο, ωστόσο η έκφραση των γονιδίων *CAB* στα *toc-1* μεταλλαγμένα φυτά είναι η ίδια ανεξάρτητα των εξωτερικών συνθηκών (Somers *et al.*, 1998). Αυτό σημαίνει ότι παρόλο που ο κεντρικός ταλαντωτής σηματοδοτείται κανονικά από τα μονοπάτια εισόδου, εντούτοις κάποιο στοιχείο του δυσλειτουργεί.



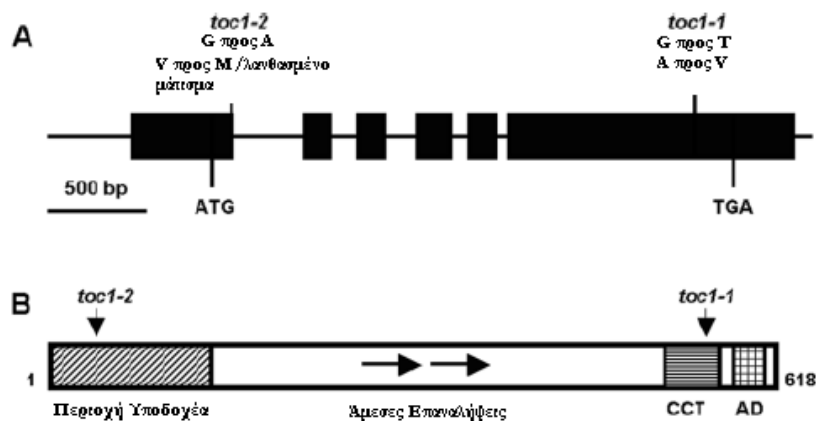
Current Opinion in Plant Biology

**Εικ. 1.5.** Σχηματική αναπαράσταση των μεταφορέων σήματος μέσω φωσφορυλίωσης ιστιδίνης→ασπαραγινικού οξέος (His→Asp) στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Η οικογένεια του TOC1/APRR1 αποτελείται από πέντε ψευδο-ρυθμιστές απόκρισης: το ασπαραγινικό οξύ (D) που προσλαμβάνει τη φωσφορική ομάδα έχει αντικατασταθεί από γλουταμινικό οξύ (E) στην περιοχή υποδοχής των πρωτεϊνών αυτών. Έτσι, οι άτυποι ρυθμιστές απόκρισης (APRRs) μπορεί να μην εμπλέκονται στο κανονικό μονοπάτι φωσφορυλίωσης ιστιδίνης→ασπαραγινικού (Mizuno, 2004).

Ο παράγοντας TOC1 ανήκει στην COL (COnstans-Like) οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων. Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης του περιέχει ένα μοτίβο ίδιο με την περιοχή υποδοχής σήματος που εμπεριέχουν οι ρυθμιστές απόκρισης (Response Regulators, RRs) των συστημάτων μεταγωγής σήματος δύο-συστατικών (two-component signal transduction systems). Η τυπική λειτουργία αυτού του είδους των συστημάτων μεταγωγής σήματος, περιλαμβάνει ως πρώτο

συστατικό μία κινάση-δέκτη (Histidine protein Kinase, HK), η οποία αντιλαμβάνεται αλλαγές στις συνθήκες του περιβάλλοντος και μεταδίδει σήματα με αυτοφωσφορυλίωση ενός συντηρημένου κατάλοιπου ιστιδίνης (Stock *et al.*, 1991). Στη συνέχεια αυτή η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται σε ένα κατάλοιπο ασπαραγινικού οξέος που βρίσκεται στην περιοχή υποδοχής ενός ρυθμιστή απόκρισης, με τελικό αποτέλεσμα μία αλλαγή στη μεταγραφή γονιδίων-στόχων μέσω ενεργοποίησής τους (Stock *et al.*, 1991). Συχνά, στη διαδικασία φωσφορυλίωσης εμπλέκεται ένα ενδιάμεσο μόριο μεταφορέας φωσφορικής ομάδας ο οποίος εμπεριέχει επίσης ιστιδίνη (Histidine-containing Phospho-transmitter, HRt) (Mizuno, 2004). Οι κινάσες-δέκτες των ρυθμιστών απόκρισης στο φυτό *Arabidopsis* έχει φανεί ότι είναι είτε υποδοχείς αιθυλενίου είτε υποδοχείς κυτοκινίνης (Inoue *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001). Στο φυτό *Arabidopsis*, οι ρυθμιστές απόκρισης (*Arabidopsis* Response Regulators, ARRs) κατηγοριοποιούνται βάσει των δομικών τους χαρακτηριστικών σε δύο υποκατηγορίες, τους ARR τύπου-A και τύπου-B (Imamura *et al.*, 1999) (Εικ.1.5).

Ωστόσο, ο παράγοντας TOC1 έχει μία ιδιαιτερότητα και γι' αυτό εντάσσεται στην οικογένεια των ψευδο-ρυθμιστών απόκρισης (*Arabidopsis* Pseudo-Response Regulators, APRRs ή απλά PRRs). Η ιδιαιτερότητά του συνίσταται στο ότι το κρίσιμο κατάλοιπο ασπαραγινικού οξέος της περιοχής υποδοχής το οποίο προσλαμβάνει τη φωσφορική ομάδα, έχει αντικατασταθεί από γλουταμινικό οξύ (Εικ. 1.5) (Makino *et al.*, 2000; Matsushika *et al.*, 2000). Οι άτυποι αυτοί ρυθμιστές απόκρισης, επειδή δεν μπορούν να υποστούν φωσφορυλίωση σε *in vitro* συνθήκες (Matsushika *et al.*, 2000), πιθανόν να μην εμπλέκονται απαραίτητα στο κανονικό μονοπάτι φωσφορυλίωσης ιστιδίνης→ασπαραγινικού. Η οικογένεια των APRRs περιλαμβάνει άλλα τέσσερα μέλη εκτός από τον TOC1 (ή APRR1), τα APRR 3, 5, 7 και 9 (Asakura *et al.*, 2003). Χαρακτηριστικό της οικογένειας των APRRs είναι η παρουσία ενός χαρακτηριστικού μοτίβου CCT στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών τους (Asakura *et al.*, 2003) (Εικ. 1.5).

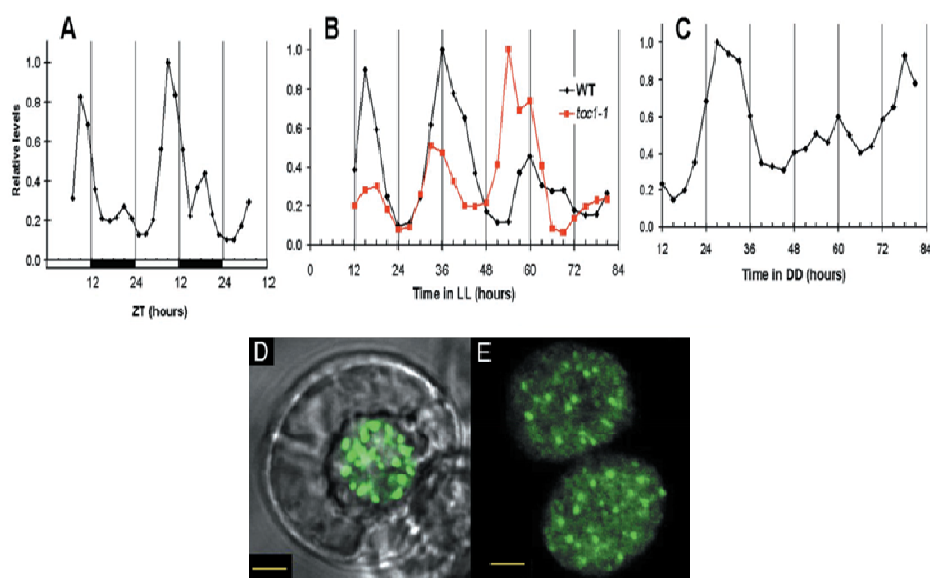


**Εικ. 1.6.** Η δομή του μεταγραφικού παράγοντα TOC1. Α) Οργάνωση του γονιδίου *TOC1*. Τα μαύρα πλαίσια περιλαμβάνουν εξόνια, ενώ οι ενδιάμεσες περιοχές, εσόνια. Φαίνονται επίσης τα κωδικόνια έναρξης και λήξης της μεταγραφής καθώς και τα σημεία των μεταλλάξεων του γονιδίου, που οδήγησαν στην ταυτοποίησή του. Β) Προβλεπόμενη δομή της πρωτεΐνης TOC1. Τα δύο βέλη σηματοδοτούν τη διπλή επανάληψη μιας περιοχής από 47 αμινοξέα. Receiver Domain: Περιοχή Υποδοχής Σήματος, CCT: Constans-Constans-like και TOC1, AD: Acid-rich Domain. Φαίνονται και οι περιοχές μετάλλαξης που οδήγησαν στη μερική απώλεια δράσης της πρωτεΐνης (Strayer *et al.*, 2000).



Το χαρακτηριστικό της οικογένειας COL, στην οποία όπως προαναφέρθηκε ανήκει και ο TOC1, είναι η υψηλή συντήρηση του καρβοξυτελικού άκρου (CCT motif) καθώς και η ύπαρξη δύο αμινοτελικών δακτυλίων ψευδαργύρου [Zinc-Finger domains, που όμως απουσιάζουν από τον παράγοντα TOC1, (Putteril *et al.*, 1995 και 1997; Robert *et al.*, 1998)]. Το μοτίβο CCT στην πρωτεΐνη TOC1 είναι μία περιοχή που αποτελείται από 45 αμινοξέα, πλούσια σε βασικά κατάλοιπα, η οποία εμπεριέχει μία αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού [NLS motif (Putteril *et al.*, 1995)] (Εικ. 1.6). Αμέσως μετά το μοτίβο CCT, εδρεύει η περιοχή AD που είναι πλούσια σε όξινα κατάλοιπα, χαρακτηριστικό γνώρισμα των μεταγραφικών ενεργοποιητών. Στο κέντρο του μορίου της πρωτεΐνης TOC1 υπάρχει μία περιοχή που αποτελείται από μία διπλή, σχεδόν τέλεια, επανάληψη μίας αλληλουχίας 47 αμινοξέων με άγνωστη λειτουργία (Strayer *et al.*, 2000) (Εικ. 1.6).

Η ύπαρξη μοτίβου πυρηνικού εντοπισμού υποδηλώνει ότι ο παράγοντας TOC1 πιθανόν δρα στον πυρήνα. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε και από μικροσκοπία φθορισμού χησιμοποιώντας το χημειοκατασκευασμένο YFP::TOC1 (YFP: Yellow Fluorescent Protein = Κίτρινη Φθορίζουσα Πρωτεΐνη) η οποία έδειξε ότι σε συνθήκες σκοταδιού, ο παράγοντας εντοπίζεται στον πυρήνα.



**Εικ.1.7.** (A-C) Μεταγραφικό προφίλ του *TOC1* όπως προέκυψε από ανάλυση Northern σε εκχύλισμα ολικού RNA. A) Ο ρυθμός της έκφρασης του γονιδίου σε φυτά αγρίου 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 αγρίου τύπου (μαύρη γραμμή) όσο και σε *toc-1* μεταλλαγμένα φυτά (κόκκινη γραμμή) υπό συνθήκες συνεχούς φωτισμού (LL). Ενώ ο ρυθμός αγρίου τύπου διατηρείται κανονικά όπως και στα φυτά υπό σταθερή περίοδο, στα *toc-1* μεταλλαγμένα φυτά η περίοδος του ρυθμού μικραίνει, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη TOC1 συμμετέχει στην επανατροφοδότηση της έκφρασης του γονιδίου *TOC1*. C) Ο ρυθμός έκφρασης του γονιδίου υπό συνθήκες συνεχούς σκότους σε φυτά αγρίου τύπου. Απουσία φωτός, ο κεντρικός ταλαντωτής αδυνατεί να συγχρονιστεί και έτσι τα επίπεδα του παράγοντα ταλαντώνονται ενδογενώς για ένα 24ωρο με διαφορετική φάση σε σύγκριση με τη συνθήκη της φωτοπεριόδου και στη συνέχεια ο ρυθμός φθίνει. (D-E) Μικροσκοπία φθορισμού πρωτοπλαστών μετασχηματισμένων με το ένθεμα YFP::TOC1. Τα βέλη δείχνουν τα πυρηνικά TOC1 συσσωματώματα στον πυρήνα του πρωτοπλάστη. D) Εναπόθεση των πυρηνικών συσσωματωμάτων από μικροσκοπία φθορισμού σε πυρήνα πρωτοπλαστών από μικροσκοπία ορατού φάσματος. E) Μικροσκοπία φθορισμού δύο πυρήνων (Strayer *et al.*, 2000).

Ο πυρηνικός εντοπισμός του TOC1 δε φαίνεται να είναι τυχαίος. Τα YFP::TOC1 χιμαιρικά κατασκευάσματα εντοπίζονταν σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα στον πυρήνα, σχηματίζοντας πυρηνικά συσσωματώματα (Εικ. 1.7: D-E, Strayer *et al.*, 2000). Ανάλογες πυρηνικές δομές (συσσωματώματα) σχηματίζουν και τα μέλη της οικογένειας των φυτοχρωμάτων κατά την είσοδό τους στον πυρήνα και την αλληλεπίδρασή τους με τον PIF3 (bHLH μεταγραφικό παράγοντα) έπειτα από ενεργοποίηση με υπέρυθη ακτινοβολία (Yamaguchi *et al.*, 1999). Ανάλογα, έχει φανεί να αλληλεπιδρά και ο TOC1 παράγοντας με bHLH μεταγραφικούς παράγοντες (PIF4: Phytochrome Interacting Factor 4 και PIL6: Phytochrome Interacting factor-Like 6) και να επηρεάζει την έκφρασή τους, γεγονός που τον εμπλέκει στην ενοποίηση των σημάτων φωτός για τον έλεγχο τόσο των κερκαδικών όσο και των φωτομορφογενετικών διαδικασιών.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο παράγοντας TOC1 είναι ένα «απογευματινό» γονίδιο. Αυτό σημαίνει ότι τα επίπεδα του *TOC1* mRNA σε συνθήκες φωτοπεριόδου (Light/Dark, L/D) παρουσιάζουν μέγιστο προς το τέλος της ημέρας (Εικ. 1.7, A). Όντας απογευματινό γονίδιο, δεν παρουσιάζει το φαινόμενο της «οξείας απόκρισης» το οποίο αναφέρθηκε προηγουμένως για τους παράγοντες LHY/CCA1. Ο ρυθμός είναι καθαρά ενδογενής, καθώς σε συνθήκες συνεχούς φωτός (Light/Light, LL) ο ρυθμός διατηρείται (Εικ. 1.7, B).

Η περίοδος των ταλαντώσεων των επιπέδων mRNA του παράγοντα TOC1 μειώθηκε στα *toc-1* μεταλλαγμένα φυτά, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη TOC1 επανατροφοδοτεί τη μεταγραφή του γονιδίου *TOC1* [Εικ. 1.7, B, (Strayer *et al.*, 2000)]. Σε σταθερές συνθήκες συνεχούς σκοταδιού (Dark/Dark, D/D) ο ρυθμός σε φυτά αγρίου τύπου φθίνει μετά το πρώτο 24ωρο (Εικ. 1.7, C).

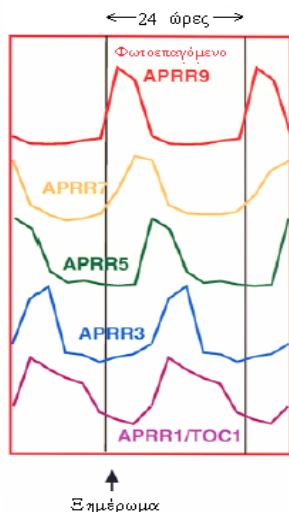
#### 1.4.3. Το κουϊντέτο *APRR1/TOC1*

Στο είδος *A. thaliana* εκτός του παράγοντα TOC1, έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί άλλοι τέσσερις παράγοντες οι οποίοι με βάση τα δομικά μοτίβα τους κατατάσσονται στους ψευδορυθμιστές απόκρισης (Matsushika *et al.*, 2000). Αυτοί οι παράγοντες μαζί με τον TOC1 αποτελούν τη λεγόμενη οικογένεια των ψευδορυθμιστών απόκρισης στο είδος *A. thaliana*, ή αλλιώς το *APRR1/TOC1* κουϊντέτο (Arabidopsis Pseudo Response Regulators).

Εκτός του παράγοντα *APRR1/TOC1*, υπάρχουν και οι *APRR3*, *APRR5*, *APRR7* και *APRR9*. Το ξεχωριστό αυτής της οικογένειας έγκειται στο μεταγραφικό προφίλ των γονιδίων της. Παρόλο που στην οικογένεια αυτή ανήκει και ο παράγοντας TOC1, ένα αποκλειστικά «απογευματινό γονίδιο», τα υπόλοιπα μέλη δεν μοιράζονται το ίδιο μεταγραφικό προφίλ ταλάντωσης. Όλα είναι κερκαδικά ρυθμιζόμενα γονίδια και εκτελούν 24ωρες ταλαντώσεις. Ωστόσο αυτές οι ταλαντώσεις είναι συντονισμένες μεταξύ τους. Ο παράγοντας *APRR9* διαφέρει εντελώς από τον *APRR1/TOC1*. Η 24ωρη ταλάντωση του mRNA του εμφανίζει μέγιστο τις πρώτες πρωινές ώρες και μάλιστα εμφανίζει το φαινόμενο της οξείας απόκρισης (φωτοεπαγόμενο γονίδιο), 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 παράγοντα *APRR7* εμφανίζει μέγιστο ο ρυθμός του παράγοντα *APRR5* και μετά από άλλες δύο με τρεις ώρες παρουσιάζει μέγιστο ο ρυθμός του παράγοντα *APRR3*. Μετά το πέρας δύο με τριών ωρών από το μέγιστο του παράγοντα *APRR3* και ενώ η μέρα πλησιάζει προς το σούρουπο, εμφανίζει το μέγιστο ο παράγοντας *APRR1/TOC1*, όπως έχει ήδη

περιγραφεί (Matsushika *et al.*, 2000). Συνεπώς η χρονική αλληλουχία εμφάνισης του μεγίστου έκφρασης των APRR έχει ως εξής: APRR9 (ξημέρωμα) → APRR7 (πρωί) → APRR5 (μεσημέρι) → APRR3 (απόγευμα) → APRR1/TOC1 (σούρουπο) και περιγράφεται ως «τα κिरκαδικά κύματα του *APRR1/TOC1* κουϊντέτου» (Εικ. 1.8, Matsushika *et al.*, 2000).



**Εικ. 1.8.** Σχηματική αναπαράσταση των κिरκαδικών ρυθμών κυμάτων που παρουσιάζουν τα πέντε μέλη της οικογένειας ψευδορυθμιστών απόκρισης του TOC1/APRR1 (κίρκαδικά κύματα). Πειραματικά δεδομένα από υβριδισμό Northern ποσοτικοποιήθηκαν και αναπαραστάθηκαν σχηματικά. Το μέγιστο επίπεδο mRNA του κάθε παράγοντα αναπαρίσταται κατά προσέγγιση και αυθαίρετα (Makino *et al.*, 2001).

Η μορφή αυτή των κίρκαδικών κυμάτων του TOC1/APRR1 κουϊντέτου οδήγησε τους ερευνητές να υποθέσουν μία διαδοχική ρύθμιση των γονιδίων του κουϊντέτου, με την έννοια ότι ο ένας παράγοντας ρυθμίζει την έκφραση του επόμενου (Matsushika *et al.*, 2000). Παρόλα αυτά, μετέπειτα έρευνες έχουν δείξει ότι δεν ισχύει μια τέτοια απλή γραμμική σχέση, αλλά μάλλον οι παράγοντες αυτοί εμπλέκονται σε πιο περίπλοκους βρόγχους ανατροφοδότησης τόσο μεταξύ τους αλλά και με άλλους παράγοντες-στοιχεία του ρολογιού (Makino *et al.*, 2002).

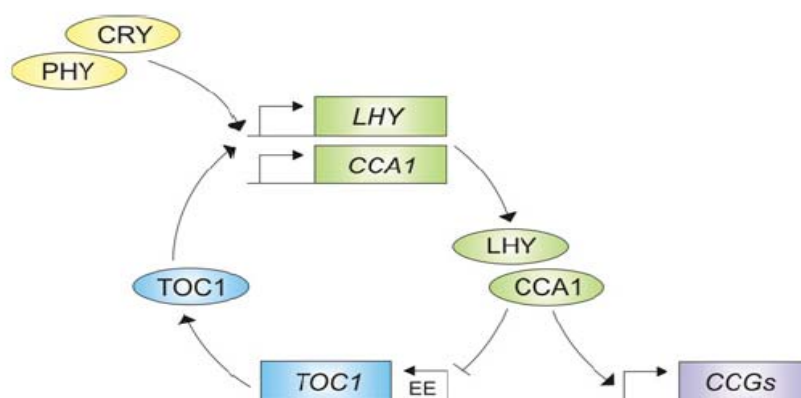
#### 1.4.4. Το μοντέλο του κεντρικού ταλαντωτή

Όπως προαναφέρθηκε, ο κεντρικός ταλαντωτής στο φυτό *A. thaliana* αποτελείται από στοιχεία τοποθετημένα σε αυτορυθμιζόμενους βρόγχους επανατροφοδότησης (autoregulatory feedback loops). Ο πρώτος χαρακτηρισμένος βρόγχος αποτελείται από τους παράγοντες TOC1 και LHY/CCA1 (Εικ. 1.9). Τα γονίδια *CCA1* και *LHY* κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες Myb οι οποίοι παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία στις αλληλουχίες τους και έχουν μερικώς αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες στο ρολόι (Schaffer *et al.*, 1998; Mizoguchi *et al.*, 2002). Υπερέκφραση καθενός εκ των δύο γονιδίων προκαλεί σοβαρή μεταβολή στους παρατηρούμενους ρυθμούς υποδεικνύοντας ότι οι δύο παράγοντες είναι στοιχεία του κεντρικού ταλαντωτή (Schaffer *et al.*, 1998; Alabadi *et al.*, 2002; Mizoguchi *et al.*, 2002). Οι πρωτεΐνες CCA1/LHY προσδένονται στον υποκινητή του *TOC1*, το οποίο είναι επίσης απαραίτητο για τη διατήρηση των κίρκαδικών ρυθμών υπό συνεχές φως ή σκοτάδι (Millar *et al.*, 1995; Somers *et al.*, 1998; Strayer *et al.*, 2000, Alabadi *et al.*, 2002). Ο TOC1 έχει υποτεθεί ότι επάγει την έκφραση αμφότερων των *CCA1/LHY* μέσω ενός άγνωστου μέχρι τώρα μηχανισμού.

Ο βρόγχος επανατροφοδότησης CCA1/LHY-TOC1 έχει προταθεί ότι λειτουργεί ως εξής: Ο CCA1 και ο LHY εκφράζονται ρυθμικά με μέγιστο έκφρασης το (υποκειμενικό) ξημέρωμα. Οι αντίστοιχες πρωτεΐνες τους παράγονται μέσα στις επόμενες 2-3 ώρες και καταστέλλουν την έκφραση του γονιδίου *TOC1*

προσδεδεμένες στο «απογευματινό στοιχείο» (EE-evening element) στον υποκινητή του *TOC1* (Alabadi *et al.*, 2002). Αυτό προκαλεί σταδιακή μείωση στα επίπεδα του *TOC1* και κατά συνέπεια στην παραγωγή των *CCA1/LHY*. Καθώς τα επίπεδα των *CCA1* και *LHY* μειώνονται, η καταστολή της έκφρασης του *TOC1* παύει και ο κύκλος ξαναρχίζει από την αρχή [Εικ. 9, (Alabadi *et al.*, 2001; Hayama και Coupland, 2003; Millar *et al.*, 2004)].

Παρόλα αυτά, αρκετά δεδομένα έχουν προκύψει από τα οποία φαίνεται ότι το παραπάνω μοντέλο για τον κεντρικό ταλαντωτή του ρολογιού των φυτών είναι ανεπαρκές. Αρχικά, διπλά-μεταλλαγμένα φυτά απώλειας δράσης των *cca1/lhy* δεν είναι πλήρως αρρυθμικά (Mizoguchi *et al.*, 2002; Alabadi *et al.*, 2002). Δεύτερον, ρυθμοί στην έκφραση γονιδίων όπως το *ELF3* συνεχίζουν σε μεταλλαγμένα φυτά τα οποία υπερπαραγάγουν συνεχώς *LHY* (Hicks *et al.*, 2001). Τρίτον, το μοντέλο δε μπορεί να εξηγήσει το γιατί αμφότερες η μεταλλαγή και η υπερέκφραση του *TOC1* οδήγησαν σε μείωση της έκφρασης των *CCA1* και *LHY*. Τέλος, δεν έχει αποδειχτεί ότι ο *TOC1* είναι υπεύθυνος άμεσα για τη ρύθμιση της έκφρασης των *CCA1* και *LHY*, ή εάν ισχύει αυτό, με ποιο τρόπο επιτυγχάνεται (Hayama και Coupland, 2003; Millar, 2004). Άρα, και άλλα επιπλέον συστατικά είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του κεντρικού ταλαντωτή.

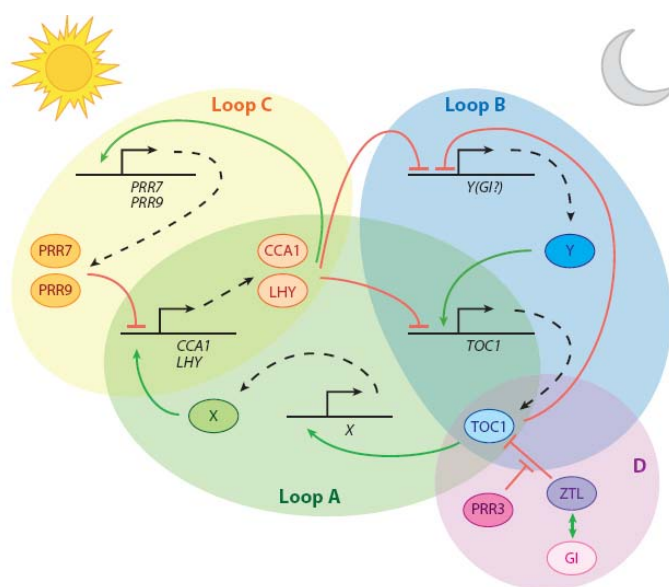


**Εικ. 1.9.** Προτεινόμενη δομή του βρόγχου επαναανατροφοδότησης των *LHY/CCA1* και *TOC1*. Η είσοδος φωτός, μαζί με τον *TOC1*, επάγει την έκφραση των *CCA1* και *LHY*. Ο *CCA1* και ο *LHY* ενεργοποιούν την έκφραση των ελεγχόμενων από το ρολόι γονιδίων (*CCGs*, *Clock Controlled Genes*, αναπαριστώνται με μωβ χρώμα) και καταστέλλουν την έκφραση του *TOC1* (Alabadi *et al.*, 2001), καταστέλλοντας έτσι και την έκφραση των ίδιων των *LHY/CCA1*. Η είσοδος φωτός διαμεσολαβείται από τα φυτοχρώματα (*PHY*) και τα κρυπτοχρώματα (*CRY*). Τα βέλη αναπαριστούν θετικά ρυθμιστικά βήματα, ενώ οι γραμμές που απολήγουν σε κάθετο αναπαριστούν αρνητικές αλληλεπιδράσεις. Τα γονίδια βρίσκονται μέσα σε ορθογώνια και οι πρωτεΐνες σε οβάλ (Gardner *et al.*, 2006).

Ένα μαθηματικό μοντέλο το οποίο περιλαμβάνει άλλα δύο συστατικά έχει προταθεί (Locke *et al.*, 2005a; Locke *et al.*, 2005b). Σε αυτό το μοντέλο, το φως ενεργοποιεί την έκφραση του υποθετικού παράγοντα «Y», ο οποίος επάγει την έκφραση του *TOC1*. Ο *TOC1* δρα μέσω ενός άλλου υποθετικού παράγοντα «X», ώστε να επάγει την έκφραση του *LHY*, και αμφότεροι οι *LHY* και *TOC1* δρουν καταστέλλοντας την έκφραση του *Y* (Εικ. 1.10, Loop B). Αν και η ταυτότητα του *Y* δεν έχει προσδιοριστεί, τόσο μαθηματικά όσο και πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η δράση του μπορεί να περατώνεται από τον παράγοντα *GI* (*GIGANTEA*). Η έκφραση του *GI* ακολουθεί κερκαδικό πρότυπο και έχει ένα ευρύ μέγιστο αργά κατά το υποκειμενικό απόγευμα, ταιριάζοντας με το προβλεπόμενο

προφίλ έκφρασης για το Y. Ο GI επίσης επάγεται ταχύτατα αλλά παροδικά από το φως και οι θέσεις του υποκινητή του εμπεριέχουν αρκετά απογευματινά στοιχεία, απαραίτητα για την LHY-διαμεσολαβούμενη καταστολή (Locke *et al.*, 2005a; Locke *et al.*, 2005b). Υπερέκφραση ή μεταλλαγή του GI επηρεάζει τους κίρκαδικούς ρυθμούς και σε συνεχές σκοτάδι και σε συνεχές φως, κάτι που πιθανόν να σημαίνει ότι ο GI δρα εντός του μηχανισμού του κεντρικού ταλαντωτή του κίρκαδικού ρολογιού (Locke *et al.*, 2005a; Locke *et al.*, 2005b; Mizoguchi *et al.*, 2005).

Σύμφωνα με πιο πρόσφατες πειραματικές έρευνες αλλά και μαθηματικές μελέτες, το δίκτυο των βρόγχων επανατροφοδότησης στον κεντρικό ταλαντωτή του πειραματόφυτου *A. thaliana* φαίνεται να αποτελείται ουσιαστικά από τρεις βρόγχους, τον κεντρικό (Loop A), τον πρωινό (Loop B) και τον απογευματινό (Loop C). Οι βρόγχοι αυτοί συμπεριλαμβάνουν πληθώρα παραγόντων, πέραν αυτών που αναφέρθηκαν παραπάνω (Εικ. 1.10), όπως για παράδειγμα τους PRR3/7/9, ZTL, GI (Harmer, 2009).

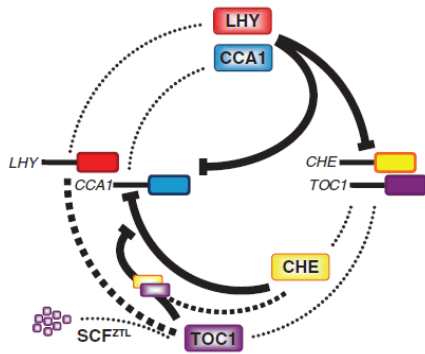


**Εικ. 1.10.** Μοντέλο του ρολογιού στο φυτό *A.thaliana*. Ο πρώτος ταυτοποιημένος βρόγχος επανατροφοδότησης (Loop A) αποτελείται από τους «πρωινούς» παράγοντες CCA1 και LHY, οι οποίοι ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση του TOC1. Ο TOC1 εικάζεται ότι ενεργοποιεί άμεσα ή έμμεσα το συστατικό X, έναν προς το παρόν άγνωστο παράγοντα ο οποίος επάγει την έκφραση των CCA1 και LHY. Ο δεύτερος βρόγχος (Loop B) αποτελείται από δύο ή περισσότερα «απογευματινά» γονίδια: έναν άγνωστο παράγοντα Y και τον TOC1 (πιθανά ο GIGANTEA [GI] να καλύπτει μέρος της δράσης του Y). Ο τρίτος βρόγχος (Loop C), αποτελείται από τα «πρωινά» γονίδια PRR7, PRR9, CCA1 και LHY. Σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ρολογιού παίζουν και οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις (D). Ο ZTL ρυθμίζει αρνητικά την αφθονία της πρωτεΐνης TOC1 και η δράση του ελέγχεται από τους GI και PRR3 (Harmer, 2009).

Στον κεντρικό βρόγχο φαίνεται να ενσωματώνεται ένας πρόσφατα χαρακτηρισμένος παράγοντας, ο CHE (CCA1 HIKING EXPEDITION). Ο παράγοντας αυτός βρέθηκε να προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου CCA1 (όχι όμως στον υποκινητή του LHY) και να τον καταστέλλει, καθώς και να αλληλεπιδρά *in vitro* με τον TOC1. Ο τρόπος δράσης του, έχει προταθεί πως έχει ως εξής: Την αυγή, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των CCA1 και LHY καταστέλλουν τον CHE, αλλά και την ίδια τους την έκφραση. Τα επίπεδα του CHE αυξάνονται, καθώς η ημέρα προχωρά, ώστε να διατηρήσουν τον CCA1 στο ελάχιστο. Μέχρι το τέλος της



ημέρας, ο TOC1 ανταγωνίζεται τον CHE, επαναφέροντας τον κύκλο, ώστε να ξεκινήσει από την αρχή (Pruneda-Paz *et al.*, 2010).



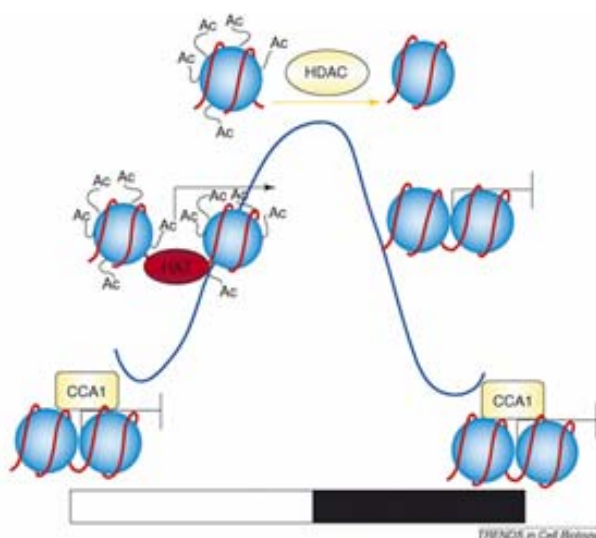
**Εικ. 1.11.** Μοντέλο για τον προτεινόμενο ρόλο του παράγοντα CHE στο ρολόι του φυτού *A. thaliana*. Την αυγή, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των CCA1 και LHY καταστέλλουν τον CHE, αλλά και την ίδια τους την έκφραση. Τα επίπεδα του CHE αυξάνονται, καθώς η ημέρα προχωρά, ώστε να διατηρήσουν τον CCA1 στο ελάχιστο. Μέχρι το τέλος της ημέρας, ο TOC1 ανταγωνίζεται τον CHE, επαναφέροντας τον κύκλο, ώστε να ξεκινήσει από την αρχή (SCF<sup>ZTL</sup>: αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα-διαμεσολαβούμενη από τον παράγοντα ZEITLUPE) (Pruneda-Paz *et al.*, 2010).

#### 1.4.4. Ρύθμιση των γονιδίων του ρολογιού σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο

Τα περισσότερα γονίδια του ρολογιού εμφανίζουν ρυθμούς στα επίπεδα μεταγραφής τους, οι οποίοι ακολουθούνται από ρυθμούς στα επίπεδα των αντίστοιχων πρωτεϊνών τους (Dunlap, 1999; Harmer *et al.*, 2001). Αυτές οι πρωτεΐνες προσδένονται σε υποκινητές άλλων γονιδίων του ρολογιού και δίνουν το έναυσμα για την έναρξη της μεταγραφής αυτών. Οι πρωτεΐνες που προκύπτουν από τα γονίδια αυτά, με τη σειρά τους, δεσμεύονται στους υποκινητές των πρώτων γονιδίων ρυθμίζοντας αρνητικά τη μεταγραφή τους (βρόγχοι θετικής/αρνητικής ανάδρασης). Αυτή η διαδικασία, όπως έχει ήδη αναφερθεί παράγει ρυθμούς σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο και για τα δύο συστατικά (Roenneberg και Merrow, 2000; Harmer *et al.*, 2001; McClung *et al.*, 2002). Παρόλα αυτά, τουλάχιστον ένα από τα συστατικά πρέπει να παρουσιάζει μία σημαντική καθυστέρηση μεταξύ της έκφρασης του mRNA και της έκφρασης της ενεργού πρωτεΐνης έτσι ώστε να διατηρηθεί η 24ωρη περιοδικότητα και να αποφευχθεί η εξασθένιση των ρυθμών (Dunlap, 1999; Harmer *et al.*, 2001; Roenneberg και Merrow, 2003). Η επιβολή τέτοιων καθυστερήσεων και η διατήρηση των ρυθμών μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους ρυθμιστικούς μηχανισμούς σε αρκετά επίπεδα ρύθμισης.

Αρχικά, η ρύθμιση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μεταγραφικό επίπεδο. Αρκετά *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία έχουν ταυτοποιηθεί που συμμετέχουν στην κερκαδική έκφραση. Στο φυτό *Arabidopsis*, αυτά περιλαμβάνουν το «απογευματινό» *cis*-στοιχείο (AAAATATCT) (Harmer *et al.*, 2000) το οποίο εμπεριέχεται στον υποκινητή γονιδίων που εκφράζονται κοντά στο τέλος του απογεύματος και τα CBS (CCA1 Binding Site, AAAAATCT) (Michael και McClung, 2002; Harmer και Kay, 2005) και «πρωϊνό» *cis*-στοιχείο, όπως η αλληλουχία G-box (CACGTG) στον υποκινητή γονιδίων τα οποία εκφράζονται κοντά στο ξημέρωμα (Martinez-Garcia *et al.*, 2000; Monte *et al.*, 2004). Επίσης, στο επίπεδο της μεταγραφικής ρύθμισης έχει φανεί να παίζει σημαντικό ρόλο ένας μηχανισμός ο οποίος περιλαμβάνει αλλαγές στη δομή της χρωματίνης (Perales και Más, 2007). Δοκιμές ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation-ChIP) στο φυτό *A. thaliana* αποκάλυψαν ότι η μεταγραφική κατάσταση του γονιδίου *TOC1* εξαρτάται από τη δυναμική μεταβολή της διαμόρφωσης της χρωματίνης, η οποία ρυθμίζει επακριβώς την 24ωρη ρυθμική ταλάντωση του *TOC1* (Εικ. 1.12). Έτσι, φαίνεται ότι η ταλάντωση του *TOC1* σε επίπεδο έκφρασης ρυθμίζεται από την κατάσταση της δομής της χρωματίνης, η οποία με τη σειρά της, ρυθμίζεται από το μήκος της ημέρας ή τη

φωτοπερίοδο. Η εξάρτηση του εύρους της ταλάντωσης και της φάσης της έκφρασης του *TOC1* από τη χρωματίνη, κάτω από διάφορες φωτοπεριόδους μπορεί να δρα ως κάποιο είδος αισθητήρα του μήκους της ημέρας, παρέχοντας με αυτό τον τρόπο ένα μηχανισμό μέσω του οποίου τα φυτά αντιλαμβάνονται τη φωτοπεριοδική πληροφορία με συνέπεια να προσαρμόζουν τη φυσιολογία και ανάπτυξή τους (Perales και Más, 2007).



**Εικ. 1.12.** Σχηματική αναπαράσταση του ρυθμικού ελέγχου της έκφρασης του *TOC1*. Η καταστολή του *TOC1* το ξημέρωμα εξαρτάται από την κίρκαδική πρόσδεση του CCA1. Μειωμένη πρόσδεση του CCA1 κατά τη διάρκεια της ημέρας επιτρέπει τη μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω ρυθμικών κύκλων ακετυλίωσης ιστονών, οι οποίοι ευνοούν το σχηματισμό μεταγραφικά ενεργών δομών χρωματίνης. Η δράση της απακετυλάσης ιστονών (HDAC) μετά το μέγιστο της έκφρασης του *TOC1* βοηθά τη μετάβαση σε κατασταλτικές για την έκφραση δομές χρωματίνης και συνεισφέρει στη μειούμενη φάση της ταλάντωσης του *TOC1* κοντά στο σούρουπο (Más, 2008).

Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο έχουν παρατηρηθεί ρυθμοί στην αποδόμηση mRNA κάποιων κίρκαδικών γονιδίων, υποδεικνύοντας ότι υπάρχουν ρυθμικές αλλαγές στο χρόνο ημιζωής αυτών των mRNA (Lidder *et al.*, 2005). Ένας άλλος μηχανισμός μετα-μεταγραφικής ρύθμισης ο οποίος μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην παραγωγή ρυθμικών φαινομένων περιλαμβάνει το εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing) μεταγραφημάτων (Staiger *et al.*, 2003).

Στο μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο ρύθμισης, σημαντικό ρόλο μπορεί να διαδραματίσει η εισαγωγή μίας καθυστέρησης μεταξύ της παραγωγής mRNA κάποιων γονιδίων του ρολογιού και των αντίστοιχων πρωτεϊνών τους. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω ελέγχου της αποδόμησης της πρωτεΐνης, κάτι που φαίνεται να είναι μεγάλης σημασίας στη διατήρηση των έντονων κίρκαδικών ταλαντώσεων στα επίπεδα των πρωτεϊνών (Dunlap, 1999; Daniel *et al.*, 2004). Η προοδευτική φωσφορυλίωση πριν από την αποδόμηση φαίνεται να είναι στοιχείο-κλειδί της διαδικασίας, αφού στοχεύει τις πρωτεΐνες προς αποικοδόμηση μέσω του μονοπατιού ουμπικουϊτίνης-πρωτεασώματος (Más *et al.*, 2003). Άλλοι μετα-μεταφραστικοί μηχανισμοί ελέγχου, οι οποίοι επηρεάζουν τη λειτουργία του κίρκαδικού ρολογιού, συμπεριλαμβάνουν τη ρυθμική ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης, τη μεταβολή των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, τη μεταβολή του υποκυτταρικού εντοπισμού και την πολυ(ADP)-ριβοζυλίωση (Harms *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2006).

### 1.5. Μονοπάτια εξόδου από τον κεντρικό ταλαντωτή (εκροές του κίρκαδικού συστήματος)

Το φυτό *A. thaliana* παρουσιάζει πάρα πολλές ρυθμικές εκροές του κίρκαδικού συστήματος (αποτελέσματα, outputs) ή αλλιώς «δείκτες του ρολογιού», και ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων εξαρτώμενων από το ρολόι (Clock-Controlled

Genes, CCGs), με περισσότερο από το 6% του γονιδιώματός του να βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του κερκαδικού ρολογιού (Harmer *et al.*, 2000; Schaffer *et al.*, 2001; Michael και McClung, 2003). Οι εκροές του κεντρικού ταλαντωτή είναι μονοπάτια τα οποία οδηγούν σε φυσιολογικούς και βιοχημικούς ρυθμούς, όπως στη φωτοσύνθεση, την κίνηση των φύλλων, το άνοιγμα και κλείσιμο των στοματίων και την ελικοειδή κίνηση των φυτών (νεύση) (Webb, 1998; Harmer *et al.*, 2001; McClung *et al.*, 2002; Webb, 2003). Είναι αυτοί οι ρυθμοί στις εκροές του ρολογιού οι οποίοι, σε τελική ανάλυση, παρέχουν τα πλεονεκτήματα στην ανάπτυξη και τον ανταγωνισμό που παρέχονται από το ρολόι (Dodd *et al.*, 2005a). Γενικά, τα μονοπάτια μέσω των οποίων η χρονική πληροφορία από τον κεντρικό ταλαντωτή ελέγχει την κυτταρική φυσιολογία δεν έχουν περιγραφεί εκτενώς.

Οι ρυθμοί στα επίπεδα mRNA είναι σχεδόν σίγουρα μία αρχική εκροή (αποτελεσμα) του κερκαδικού ταλαντωτή, αφού αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες που συνιστούν τον πυρήνα του ρολογιού ρυθμίζουν άμεσα την έκφραση των μετέπειτα συστατικών του ίδιου του ρολογιού. Για παράδειγμα, ο CCA1 ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων του συμπλόκου συλλογής φωτός (Mizoguchi *et al.*, 2002) και καταστέλλει την έκφραση αρκετών άλλων γονιδίων, προσδεδεμένος στα απογευματινά στοιχεία των υποκινητών τους (Harmer *et al.*, 2000; Alabadi *et al.*, 2001). Περίπου το 2-16% των mRNA που κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα του φυτού *A. thaliana* έχουν ρυθμούς στα επίπεδά τους. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται τα mRNAs γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην άνθιση, τη σύνθεση φλαβονοειδών, τη σύνθεση λιγνίνης, την κυτταρική επιμήκυνση, το μεταβολισμό του άνθρακα, την αφομοίωση θρεπτικών στοιχείων και τη φωτοσύνθεση (Harmer *et al.*, 2000; Schaffer *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2006).

## 1.6. Κερκαδικό Ρολόι και Βελτίωση Φυτών

Μηχανισμοί εκτός των ρυθμών σε επίπεδο mRNA ή πρωτεϊνών μπορεί να συνδέουν τον κεντρικό ταλαντωτή με ρυθμούς στην κυτταρική φυσιολογία. Τουλάχιστον ένα μονοπάτι εκροής (εξόδου) είναι πιθανό να βασίζεται σε ρυθμούς στη συγκέντρωση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) (Webb, 1998; 2003; Gardner *et al.*, 2005; Dodd *et al.*, 2005b). Στο φυτό *A. thaliana*, η  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  ταλαντώνεται με κερκαδικό ρυθμό σε συνεχή φωτισμό και σε κύκλους φωτός/σκότους. Τα επίπεδα του  $Ca^{2+}$  φτάνουν σε μέγιστο στο μέσο ή αργά το απόγευμα σε συγκεντρώσεις μεταξύ 350 και 700 nmol/l (Johnson *et al.*, 1995; Love *et al.*, 2004). Η φάση και το σχήμα της ταλάντωσης της  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  εξαρτώνται από τη φωτοπερίοδο κατά τη διάρκεια του συγχρονισμού, με το μέγιστο στη  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  να παρατηρείται αργότερα σε φυτά που έχουν συγχρονιστεί σε μεγάλες φωτοπεριόδους σε σχέση με εκείνα που έχουν συγχρονιστεί σε μικρές φωτοπεριόδους. (Love *et al.*, 2004). Το  $Ca^{2+}$  είναι ένα πιθανό δευτερεύον σήμα και έτσι, η κερκαδική ρύθμιση της  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  θα είχε προφανή αποτελέσματα στη φυσιολογία. Αν και οι δράσεις των κερκαδικών ταλαντώσεων του  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  είναι ακόμα άγνωστες, έχει προταθεί ρόλος στην εισροή φωτός, το φωτοπεριόδο, την κίνηση στοματίων και φύλλων και το μεταβολισμό οξέων των φυτών της οικογένειας Crassulaceae (Webb, 1998; Webb, 2003; Gardner *et al.*, 2005; Dodd *et al.*, 2005b; Love *et al.*, 2004).

Ένα καλά προσδιορισμένο μονοπάτι εκροής από το ρολόι του φυτού *Arabidopsis* είναι το μονοπάτι φωτοπεριόδικης αντίδρασης το οποίο ελέγχει τη μετάβαση από τη βλαστική ανάπτυξη στην άνθιση. Το *A. thaliana* είναι ευαίσθητο στο μήκος της ημέρας και ανθίζει νωρίτερα σε μεγάλες ημέρες σε σχέση με τις μικρές ημέρες. Αυτή η αντίδραση ελέγχεται, εν μέρει, από το ρολόι (Hayama και Coupland,



2003), και η ανάλυση μεταλλάξεων έχει προσδιορίσει τον παράγοντα GI (GIGANTEA) ως το συστατικό του ρολογιού το οποίο ελέγχει την επαγωγή της άνθισης (Mizoguchi *et al.*, 2005). Ο GI αλληλεπιδρά με τον SPY (SPINDLY), μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος διαμεσολαβούμενης της γιββερελλίνης (Tseng *et al.*, 2004). Οι GI και SPY επάγουν την κίρκαδική έκφραση του *CO* (*CONSTANS*). Το *CO* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη με δακτύλιο ψευδαργύρου (Zn finger protein), η οποία ενεργοποιείται από το φως. Κάτω από συνθήκες μικρής ημέρας, η έκφραση του *CO* παρουσιάζει μέγιστο κατά τη διάρκεια της νύχτας. Σε μεγάλες ημέρες, όμως, το μέγιστο στην έκφραση του *CO* παρουσιάζεται κατά τη διάρκεια της φωτεινής περιόδου (ημέρα). Αυτό οδηγεί στην παραγωγή ενεργής πρωτεΐνης *CO* η οποία είναι σε θέση να επάγει την έκφραση ενός πιθανού καταστολέα κινάσης, του *FT* (*Flowering locus T*) (Valverde *et al.*, 2004). Όπως και ο *CO*, ο *FT* εκφράζεται ως επί το πλείστον στα φύλλα αλλά τα mRNAs του *FT* μεταναστεύουν στην κορυφή του βλαστού (Huang *et al.*, 2005). Στην κορυφή του βλαστού, ο *FT* αλληλεπιδρά με ένα μεταγραφικό παράγοντα, τον *FD*, έτσι ώστε να επαχθεί η έκφραση και άλλων γονιδίων τα οποία διαμεσολαβούν τη μετάβαση του φυτού στην άνθιση (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005).

Ένα μεγάλο ποσοστό, υπολογίζεται περίπου στο 68%, των ρυθμικά ελεγχόμενων γονιδίων του φυτού *A. thaliana* αντιδρούν επίσης άμεσα στην περιβαλλοντική καταπόνηση (stress) (Kreps *et al.*, 2002). Η ρυθμική έκφραση αυτών των γονιδίων για την πρόβλεψη επικείμενων περιβαλλοντικών αλλαγών μπορεί να προετοιμάσει το φυτό έτσι ώστε να αντέξει μία αναμενόμενη καταπόνηση, ή να κάνει καλύτερη χρήση κάποιου φυσικού πόρου, για να μπορέσει το φυτό με την κίρκαδική ρύθμιση να συμπληρώσει την επακόλουθη αντίδρασή του στην καταπόνηση (Green *et al.*, 2002). Τελευταία, βρέθηκε ότι το *TOC1*, στο *A. thaliana*, λειτουργεί ως μοριακός "διακόπτης" που συνδέει το κίρκαδικό ρολόι με την απόκριση του φυτού στην ξηρασία (Legnaioli *et al.*, 2009). Επίσης, άλλα μέλη της οικογένειας των ψευδορυθμιστών απόκρισης (Pseudo Response Regulators, PRR5, PRR7 και PRR9), τα οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω αποτελούν συστατικά του κεντρικού ταλαντωτή του ρολογιού, φαίνονται να εμπλέκονται στο μηχανισμό πρόβλεψης της καθημερινής καταπόνησης από το ψύχος (Nakamichi *et al.*, 2009).

Ο φωτοπεριοδισμός είναι μία ειδική περίπτωση ελέγχου από το ρολόι στην οποία ένας κίρκαδικός ρυθμός συνδυάζεται με τη σηματοδότηση μέσω φωτός (light signaling). Ο αισθητήρας της φωτοπεριόδου επιτρέπει στα φυτά να ανταποκρίνονται στον ετήσιο κύκλο του μήκους της ημέρας, παράγοντας άνθη, κονδύλους ή ανθεκτικά στο ψύχος μπουμπούκια την κατάλληλη εποχή. Τα ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα του σωστού συγχρονισμού των φυτών με την εποχή είναι σαφή (Hayama και Coupland, 2003).

Το κίρκαδικό ρολόι φαίνεται να έχει μία απαραίτητη συνεισφορά στη φωτοσύνθεση, η οποία θεωρείται ότι αυξάνει την ανάπτυξη και επιβίωση των φυτών, προσδίδοντάς τους έτσι ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στη φύση (Green *et al.*, 2002; Dodd *et al.*, 2005a). Επίσης, από πιο πρόσφατα δεδομένα (Graf *et al.*, 2010) έχει προκύψει ότι η πιθανή σύνδεση μεταξύ του κίρκαδικού ρολογιού και της παραγωγικότητας των φυτών, πιθανόν να έγκειται και στον κίρκαδικό έλεγχο της αφομοίωσης των υδατανθράκων, μέσω του ελέγχου της αποικοδόμησης του αμύλου, κατά τη διάρκεια της νύχτας, από το κίρκαδικό ρολόι (Graf *et al.*, 2010; Graf και Smith, 2011). Έχει βρεθεί ότι προσδίδεται αυξημένη ευρωστία σε φυτά *A. thaliana* από τη φυσικά προκύπτουσα ποικιλομορφία στο κίρκαδικό ρολόι του φυτού (Michael *et al.*, 2003), καθώς και ότι μεταβολές στον κίρκαδικό ρυθμό ελέγχουν την ευρωστία σε υβρίδια και αλλοπολυπλοειδή (Ni *et al.*, 2009).

Όσον αφορά το κίρκαδικό ρολόι, αξίζει να σημειωθεί πως στην πρακτική άσκηση της βελτίωσης των φυτών πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την διαδικασία επιλογής για αύξηση των αποδόσεων των καλλιεργειών. Και αυτό επειδή μπορεί να προκύψουν αλλαγές στη φάση και την περίοδο του ενδογενούς ρολογιού λόγω μίας πιθανής στενής γενετικής σύνδεσης μεταξύ των γενετικών τόπων ελέγχου της φάσης ή/και της περιόδου γονιδίων του ρολογιού και του προς επιλογή χαρακτηριστικού. Το γεγονός αυτό μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στη λειτουργία του ρολογιού οι οποίες πιθανά να καταλήξουν σε μείωση της παραγωγής (Dodd *et al.*, 2005a).

### 1.7. Το φασόλι (*Phaseolus vulgaris* L.) ως πειραματόφυτο

Το φυτό *A. thaliana* είναι ένα καλά μελετημένο σύστημα για τις έρευνες στη μοριακή βιολογία των φυτών. Το φασόλι (*Phaseolus vulgaris* L.) αποτελεί καλό πειραματόφυτο γιατί έχει γρήγορη και μη απαιτητική ανάπτυξη, μεγάλα πρωτογενή φύλλα για απομόνωση φυτικού υλικού, μικρό χρόνο γενιάς αλλά δύσκολο μετασχηματισμό. Το φασόλι έχει πενταπλάσιο γονιδίωμα σε σχέση με το φυτό *A. thaliana* και δεν έχει ακόμα αποκωδικοποιηθεί πλήρως. Ανήκει στην οικογένεια των ψυχανθών (Fabaceae) και είναι συγγενικό με τη σόγια, το μπιζέλι, τη μηδική κ.ά. Η μελέτη ενός βιολογικού φαινομένου γίνεται πληρέστερη όταν εστιάζεται σε πολλούς οργανισμούς. Πόσο μάλλον για το βιολογικό ρολόι για το οποίο θέτονται ερωτήματα για τη σημασία του στα φυτά και τα εξελικτικά πλεονεκτήματα του.

Προηγούμενες μελέτες φανέρωσαν σημαντικές διαφορές στο βιολογικό ρολόι του φασολιού σε σχέση με αυτό του *A. thaliana* (Kaldis *et al.*, 2003; Kaldis και Prombona, 2006). Για παράδειγμα, στην οξεία απόκριση, στο φασόλι το πρώτο μέγιστο στα επίπεδα έκφρασης του *PvLHY* (ορθόλογο γονίδιο του *LHY*) παρατηρείται μετά από 6 ώρες από την έκθεση των φυτών στο φως (Kaldis *et al.*, 2003). Αντίθετα, στο φυτό *A. thaliana*, σε παρόμοιες συνθήκες, παρατηρείται περίπου στις 2 ώρες (η εξέλιξη της φωτοεπαγωγής του *LHY* στο φασόλι εξελίσσεται με πιο αργούς ρυθμούς σε σχέση με το *A. thaliana*). Τα επίπεδα του mRNA του *LHY* πέφτουν κατακόρυφα μετά το ξημέρωμα στο φυτό *A. thaliana*, ενώ διατηρούνται σε πλατώ ή αυξάνονται στο φασόλι αναλόγως της φωτοπεριόδου (Kaldis *et al.*, 2003). Επίσης, η πύλη του κίρκαδικού ταλαντωτή (gating effect) φαίνεται να λειτουργεί αντίθετα στο φασόλι σε σχέση με το *A. thaliana*, δηλαδή η πύλη είναι τελείως ανοιχτή στο μέσον της νύχτας (Kaldis *et al.*, 2003; Kaldis και Prombona, 2006). Φαίνεται, λοιπόν, ότι τα δύο είδη (*P. vulgaris* και *A. thaliana*) ακολουθούν διαφορετικές στρατηγικές αναφορικά με την απόκρισή τους στο φως.

Σε αντίθεση με το *A. thaliana*, στο φασόλι το ορθόλογο *PvLHY* επάγεται από το φως κυρίως κατά τη σκοτόφαση (Kaldis *et al.*, 2003) και το ορθόλογο *PvTOCI* φαίνεται να αποκρίνεται θετικά σε φωτεινά ερεθίσματα επίσης τη νύκτα (Γαλέου, Πτυχιακή μελέτη, ΓΠΑ 2009), γεγονός που υποδεικνύει ένα διαφορετικό μηχανισμό ελέγχου του βιολογικού ρολογιού ή μέρους αυτού στα δύο αυτά φυτικά είδη. Είναι γνωστό, από πειράματα στο φυτό *A. thaliana*, ότι το βιολογικό ρολόι ελέγχει την άνθιση (Hayama and Coupland, 2003). Το φασόλι είναι, αναφορικά με την άνθιση, φωτοαναίσθητο, δηλαδή δεν επηρεάζεται από το μήκος της ημερήσιας διάρκειας της φωτοπεριόδου. Δημιουργείται, έτσι, το ερώτημα αν το βιολογικό ρολόι στο φασόλι και γενικότερα στα φωτοαναίσθητα φυτικά είδη συνεισφέρει στην καλύτερη προσαρμοστικότητα ή/και την ευρωστία των φυτών στο περιβάλλον που αναπτύσσονται, παρέχοντάς τους μεγαλύτερη ευελιξία συγχρονισμού και κατ' επέκταση προσαρμογής στα φωτεινά ερεθίσματα του περιβάλλοντος.

Όλες οι παραπάνω διαφορές με το *A. thaliana* κάνουν το φασόλι ένα ενδιαφέρον εναλλακτικό σύστημα για τη μελέτη των κερκαδικών φαινομένων στα φυτά. Ιδιαίτερα, για τη μελέτη και άλλων παραγόντων του ρολογιού, εκτός του *PvLHY* στον οποίο είχε μέχρι τώρα περιοριστεί η έρευνα στο φασόλι, όπως είναι ο *PvTOC1*, που αποτελεί και αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

## 1.8. Σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας

Ανακεφαλαιώνοντας, στο ευρέως μελετώμενο φυτό *A. thaliana*, ο κύριος παράγοντας του κεντρικού ταλαντωτή που συγχρονίζει το βιολογικό ρολόι με το εξωτερικό περιβάλλον είναι το *LHY* (Late Elongated Hypocotyl), ορθόλογο γονίδιο του οποίου αποτελεί το *PvLHY* (*Phaseolus vulgaris* Late Elongated Hypocotyl) του φασολιού (*P. vulgaris*). Στο φασόλι έχει μελετηθεί εκτενώς η ρύθμιση της έκφρασης του παράγοντα *PvLHY* από το φως και το βιολογικό ρολόι και έχει διαπιστωθεί πως τα δύο είδη (*P. vulgaris* και *A. thaliana*) ακολουθούν διαφορετικές στρατηγικές αναφορικά με την απόκρισή τους στο φως (Kaldis *et al.*, 2003; Kaldis και Prombona, 2006).

Στον κυρίως βρόγχο επανατροφοδότησης του *A. thaliana*, το *LHY* αποτελεί το στοιχείο του ταλαντωτή με αρνητική δράση, ενώ ο παράγοντας με θετική δράση είναι ο *TOC1* (Timing Of CAB expression 1). Ο ορθόλογος παράγοντας από το φασόλι (*PvTOC1*, *Phaseolus vulgaris* Timing Of CAB expression 1) φαίνεται να αποκρίνεται σε φωτεινά ερεθίσματα κατά τη διάρκεια της νύχτας (Γαλέου, Πτυχιακή εργασία ΓΠΑ, 2009), κάτι το οποίο δεν έχει διαπιστωθεί για τον *TOC1* του *A. thaliana*.

Παρουσιάζει, λοιπόν, ενδιαφέρον η μελέτη των ρυθμιστικών στοιχείων της έκφρασης του γονιδίου *PvTOC1*, όπως ο υποκινητής του. Οι υποκινητές των γονιδίων του ρολογιού αποτελούν τα σημαντικότερα στοιχεία ελέγχου της έκφρασής τους, καθώς αυτοί καθορίζουν το υπό ποιές συνθήκες (φως, σκοτάδι [βλ. "απογευματινό" στοιχείο, evening element]) το γονίδιο θα εκφραστεί και σε τι βαθμό (φάση του ρυθμού). Η μελέτη των υποκινητών των σημαντικότερων κεντρικών στοιχείων του ρολογιού θα δώσει απάντηση σε ερωτήματα όπως από τι παράγοντες εξαρτάται ο έλεγχος της έκφρασής τους, και θα συμβάλλει στη διαλεύκανση της μοριακής βάσης λειτουργίας και του ρόλου του βιολογικού ρολογιού στη φυσιολογία του φυτού.

Έτσι, σκοπός της εργασίας ήταν η απομόνωση και *in silico* μελέτη του υποκινητή του γονιδίου *PvTOC1* καθώς και η κατασκευή ενός συστήματος αναφοράς σε πρωτοπλάστες φασολιού, το οποίο θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της λειτουργίας των στοιχείων του εν λόγω υποκινητή.

Για το σκοπό αυτό προχωρήσαμε, αρχικά, στην ολοκλήρωση της απομόνωσης της αλληλουχίας του *PvTOC1* cDNA, δουλειά η οποία βρισκόταν ήδη σε εξέλιξη πριν την έναρξη της παρούσας εργασίας. Με την ολοκλήρωση της εύρεσης της πλήρους αλληλουχίας του cDNA, έγινε δυνατή και η απομόνωση και ανάλυση της αλληλουχίας του υποκινητή του *PvTOC1*. Η μελέτη της λειτουργίας των ρυθμιστικών του στοιχείων στο σύστημα αναφοράς των πρωτοπλαστών φασολιού θα δώσει απαντήσεις στα παραπάνω ερωτήματα για τη λειτουργία και το ρόλο στοιχείων του βιολογικού ρολογιού στο φασόλι.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Φυτικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης φυτών

Σπόροι φασολιού (*Phaseolus vulgaris* cv. Red-kidney) φυτεύτηκαν σε λεκάνες με διαβρεγμένο περλίτη (~ 50 σπόροι ανά λεκάνη) και αναπτύχθηκαν στο απόλυτο σκοτάδι για μία εβδομάδα (πότισμα με νερό κάθε δύο μέρες) σε ειδικό κλίβανο ανάπτυξης φυτών, σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (22°C) και υγρασίας (80%). Πριν την έκθεση των φυταρίων στο φως (φωτοπερίοδος: 12 ώρες ημέρα: 12 ώρες νύχτα) αφαιρέθηκαν τα περικάρπιά τους, για να διευκολυνθεί η ανάπτυξή τους. Ως πηγή φωτισμού χρησιμοποιήθηκαν λάμπες φθορισμού και πυρακτώσεως. Η ένταση του φωτισμού ήταν 35  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ .

### 2.2. Απομόνωση του 5'-άκρου του cDNA του γονιδίου *PvTOC1*

Σκοπός αυτής της ενότητας της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του 5'-άκρου του cDNA του γονιδίου *PvTOC1*. Από προηγούμενη ερευνητική δραστηριότητα του εργαστηρίου (Εργ. Χρονοβιολογίας, Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος») είχε απομονωθεί και αλληλουχηθεί το μεγαλύτερο μέρος της αλληλουχίας του cDNA από το γονίδιο του *PvTOC1* και υπολειπόταν τμήμα του 5-άκρου του (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Η εύρεση ολόκληρης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του παράγοντα έκανε δυνατό το χαρακτηρισμό δομικών περιοχών της αντίστοιχης προβλεπόμενης πρωτεΐνης, αλλά και τη σύγκριση με τον ορθόλογο παράγοντα του *A. thaliana* [*AtTOC1*, (βλ. Αποτελέσματα-Συζήτηση, ενότ. 3.1)].

Για το σκοπό αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από φύλλα του φυτού *P. vulgaris*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση RT (Reverse Transcription), για παραγωγή του συμπληρωματικού DNA (cDNA). Χρησιμοποιώντας το προϊόν της αντίδρασης RT ως μήτρα σε αντίδραση PCR (Polymerase Chain Reaction) έγινε δυνατή η ενίσχυση του τμήματος (5'-άκρο) προς απομόνωση, το οποίο εν συνεχεία εισήχθη σε φορέα κλωνοποίησης και αλληλουχήθηκε (προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας).

#### 2.2.1. Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση ολικού RNA από πρωτογενή φύλλα φασολιού (τα πρώτα φύλλα μετά τις κοτυληδόνες) χρησιμοποιήθηκε το RNA plant kit (Macherey-Nagel, Γερμανία) για ολική απομόνωση RNA από φυτά. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες απαλλαγμένες από RNάσες, ακολουθώντας τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

Αρχικά, η συνολική ποσότητα του δείγματος (πρωτογενή φύλλα από 5-10 φυτά ανά δειγματοληψία) μεταφέρθηκε σε πορσελάνινο γουδί και λειοτριβήθηκε μέχρι κονιορτοποιήσεως. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για τη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων. Στο σημείο αυτό, κρίσιμο είναι να μη ξεπαγώσει το δείγμα μέχρι να προστεθεί το διάλυμα λύσης, κάτι που επιτυγχάνεται με την προσθήκη υγρού αζώτου ( $\text{N}_2$ ) στο γουδί σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Σε 350  $\mu\text{l}$  διαλύματος λύσης προστέθηκαν 3,5  $\mu\text{l}$   $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη και μέρος του ομογενοποιημένου δείγματος, περίπου 100 mg, αναμείχθηκε έντονα με vortex μέχρι να διαλυθεί πλήρως. Το διάλυμα αυτό καταστρέφει την κυτταρική μεμβράνη για να απελευθερωθεί το RNA από τα κύτταρα.

Στη συνέχεια, το μείγμα διηθήθηκε μέσα από στήλη, φυγοκεντρώντας, για την απομάκρυνση των κυτταρικών θραυσμάτων. Το διήθημα τοποθετήθηκε σε καθαρό σωληνάκι (erpendorf) όπου προστέθηκαν 350 μl αιθανόλη (70%), ανακατεύοντας με vortex, για τη ρύθμιση των συνθηκών πρόσδεσης του RNA στο φίλτρο της επόμενης στήλης. Το συνολικό μείγμα φορτώθηκε σε στήλη πρόσδεσης και φυγοκεντρήθηκε. Έτσι, το RNA, προσδένεται στη μεμβράνη (silica) της στήλης, η οποία μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάκι όπου προστέθηκαν 350 μl διαλύματος αφαλάτωσης της μεμβράνης κάνοντας τη διαδικασία της πέψης με DNάση πιο αποτελεσματική. Η πέψη με DNάση (ελεύθερη RNασών) πραγματοποιήθηκε φορτώνοντας στη στήλη 95 μl διαλύματος DNάσης και επωάζοντας τα δείγματα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με την πέψη αυτή καταστρέφεται το γενωμικό DNA που έχει προσδεθεί στη μεμβράνη της στήλης μαζί με το RNA.

Ακολούθησε ξέπλυμα της μεμβράνης από την DNάση (διάλυμα απενεργοποίησης DNάσης) και ξεπλύματα της μεμβράνης για τον καθαρισμό της από ξένα προς το RNA συστατικά (π.χ. πρωτεΐνες), επίσης προσδεμένα σε αυτή. Όταν απομακρύνθηκαν και οι χρωστικές που είχαν προσδεθεί στη μεμβράνη (χλωροφύλλες), κάτι που ήταν εμφανές αφού απομακρύνθηκε το πράσινο χρώμα, η μεμβράνη στεγνώθηκε με φυγοκέντρωση και η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο σωληνάκι. Το RNA εκλούστηκε από τη στήλη φορτώνοντας σε αυτή νερό απαλλαγμένο από RNάσες, φυγοκεντρώντας, σε τελικό όγκο περίπου 60 μl.

Τέλος, το διάλυμα φωτομετρήθηκε στα 260 και 280 nm για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της καθαρότητας του ολικού RNA που απομονώθηκε (ND-100 spectrophotometer, Nanodrop Inc., USA). Το βήμα αυτό ήταν απαραίτητο για τον προσδιορισμό του απαιτούμενου όγκου του κάθε δείγματος για τις αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT) που ακολούθησαν.

### 2.2.2. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription reaction, RT)

Η αντίδραση RT χρησιμοποιείται για την παραγωγή cDNA από αρχική μήτρα RNA. Το ένζυμο RT (Reverse Transcriptase) χρησιμοποιεί ως εκμαγείο μόρια RNA και παρουσία εκκινητών με ελεύθερο 3'-OH άκρο, δεοξυτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) και  $Mg^{2+}$ , παράγει cDNA, δηλαδή συμπληρωματικό DNA προς το αρχικό RNA.

Αναμείχθηκαν 2,5 μg ολικού RNA, 1,5 μl dNTPs (10 mM), 1,2 μl (1pmole/μl) εξειδικευμένο ως προς το γονίδιο (*PvTOC1*) εκκινητή (PvTOCup2, βλ. Πιν.2.1) και συμπληρώθηκε νερό επεξεργασμένο με diethyl pyrocarbonate (DEPC) (απαλλαγμένο από RNάσες), μέχρι τα 12,5 μl. Το μείγμα τοποθετήθηκε στους 65°C για 5 λεπτά για να αποδιαταχθεί το RNA στα σημεία που υπήρχαν βρόγχοι. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης (5 x first strand buffer: 250 mM Tris-HCl, pH 8,3 στους 25°C, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 μl DTT (0,1 M) και 1 μl αναστολέα RNασών (RNase inhibitor, Invitrogen, UK). Το μείγμα τοποθετήθηκε στους 25°C για 2 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί ο υβριδισμός των εκκινητών στο RNA. Ακολούθως, προστέθηκε στην αντίδραση 0,7 μl ένζυμου RT (Super-Script™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen, UK) επανατοποθετήθηκε στους 25°C για 10 λεπτά και στη συνέχεια στους 42°C για 50 λεπτά και στους 70°C για 15 λεπτά. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής PTC 100 (MJ Research Inc., USA).

Το προϊόν της RT (cDNA από τη συνολική ποσότητα RNA του κάθε δείγματος), αποθηκεύτηκε στους -20°C, μέχρι τη χρήση του ως υποστρώματος σε ακόλουθες αντιδράσεις PCR.

### 2.2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) αποτελεί μία *in vitro* μέθοδο για την ενζυμική σύνθεση εξειδικευμένων αλληλουχιών DNA με τη χρήση δύο ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές) για την αντιγραφή της μήτρας του DNA μέσω της δράσης του ενζύμου DNA πολυμεράση. Το ζεύγος των εκκινητών σχεδιάζεται με τέτοιο τρόπο ώστε να υβριδίζουν σε θέσεις στις συμπληρωματικές αλυσίδες της μήτρας του δίκλωνου DNA, περικλείοντας την περιοχή της οποίας είναι επιθυμητή η παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων (ενίσχυση περιοχής DNA) και οδηγώντας στη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας ο κάθε εκκινητής επεκτεινόμενος προς την κατεύθυνση του άλλου. Η μέθοδος PCR βασίζεται σε μία σειρά επαναλαμβανόμενων κύκλων κάθε ένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια: Στο πρώτο στάδιο, η δίκλωνη μήτρα DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 92-95 °C. Κατά το δεύτερο στάδιο, η θερμοκρασία μειώνεται σε επίπεδα που επιτρέπουν τον υβριδισμό των εκκινητών στις συμπληρωματικές θέσεις των μονόκλωνων αλυσίδων της μήτρας DNA. Τέλος, στο τρίτο στάδιο, πραγματοποιείται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας μέσω της δράσης του ενζύμου DNA πολυμεράση και με τη χρήση των τεσσάρων δεοξυτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), τα οποία περιλαμβάνονται σε περίσσεια στο μείγμα της αντίδρασης PCR.

Για την πραγματοποίηση της PCR, χρησιμοποιήθηκαν ανά αντίδραση, 1 μl προϊόντος RT αντίδρασης ως υπόστρωμα, 0,3 μl πρόσθιου (forward) εκκινητή [(TOCsoyaRCI, βλ. Πιν. 2.1), (10 pmoles/μl)], 0,3 μl ανάστροφου (reverse) εκκινητή [(PvTOCup3, βλ. Πιν. 2.1), (10 pmoles /μl)], 0,3 μl dNTPs (10 mM), 1,5 μl ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης (10 x Reaction Buffer), 0,15 μl Taq πολυμεράσης (Stratagene, Europe) και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 15 μl. Ο ανάστροφος εκκινητής της αντίδρασης (PvTOCup3, βλ. Πιν.2.1) σχεδιάστηκε βάση της ήδη γνωστής αλληλουχίας του γονιδίου, έτσι ώστε να υβριδίζει πιο κοντά στο 5'-άκρο του cDNA από τον εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση RT. Με τον τρόπο αυτό, μειώνεται η πιθανότητα ενίσχυσης μη-ειδικών τμημάτων DNA. Ο πρόσθιος εκκινητής (TOCsoyaRCI, βλ. Πιν.2.1), ο οποίος έπρεπε να υβριδίζει σε άγνωστη αλληλουχία (5'-άκρο), σχεδιάστηκε βάση της αντίστοιχης γνωστής αλληλουχίας του ορθόλογου γονιδίου στη σόγια (*Glycine max*). Εφόσον η σόγια είναι συγγενές είδος του φασολιού, θα έπρεπε να υπήρχε επαρκής ομοιότητα στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ώστε να υβριδίζει ο εκκινητής. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή PTC-100 (MJ Research Inc., USA), ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. 94°C, 3 λεπτά (αρχική αποδιάταξη υποστρώματος)
2. 94°C, 45 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη)
3. 54°C, 35 δευτερόλεπτα (υβριδισμός εκκινητών)
4. 72°C, 45 δευτερόλεπτα (επιμήκυνση νουκλεοτιδικής αλυσίδας)  
x 30 φορές, τα βήματα 2-4
5. 72°C, 8 λεπτά (τελική επιμήκυνση).

Η ανάλυση των προϊόντων PCR (και ο προσδιορισμός των μοριακών τους μεγεθών) πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης (1,5%, σε διάλυμα 1x TAE). Κατά τη διαδικασία αυτή τα κομμάτια του DNA αναλύονται σε πηκτή αгарόζης κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα τμήματα του DNA εξαιτίας των φωσφορικών ομάδων που φέρουν, έχουν αρνητικό φορτίο και κάτω από την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου κινούνται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο, με ταχύτητα που μεγαλώνει όσο μικραίνει το μέγεθος

του μορίου. Το μέγεθος των προϊόντων της PCR μπορεί να εκτιμηθεί κατά προσέγγιση από την απόσταση που διένυσαν κατά μήκος της πηκτής σε σύγκριση με την απόσταση που διανύουν τμήματα DNA γνωστού μεγέθους κατάλληλου δείκτη (marker) π.χ., γενωμικό DNA του βακτηριοφάγου ΦX174 το οποίο έχει υποστεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Hae*III.

Η οπτικοποίηση της ηλεκτροφόρησης γίνεται μέσω χρώσης της πηκτής αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο δεσμεύεται εκλεκτικά μεταξύ επαλλήλων βάσεων του DNA. Όταν η πηκτή εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) το βρωμιούχο αιθίδιο φθορίζει έντονα, αποδίδοντας μία ακτινοβολία πορτοκαλί χρώματος, κάνοντας έτσι το DNA ορατό.

**Πίνακας 2.1.** Χαρακτηριστικά εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του cDNA του γονιδίου *PvTOC1*.

Εκκινητής	Αλληλουχία	T <sub>m</sub> (°C)	Θέση υβριδισμού στο ORF	Μέγεθος Προϊόντος (bp)
PvTOCup2 (ανάστροφος)	5'-GTATTGGCATCACTGGGGTCTG-3'	61,7	545	-
TOCsoyaRC1 (πρόσθιος)	5'-CGATGTATTTGGCTTCCGG-3'	53,0	-2	467
PvTOCup3 (ανάστροφος)	5'-CCTCCGTCCCCACATGTGCATC-3'	53,0	465	

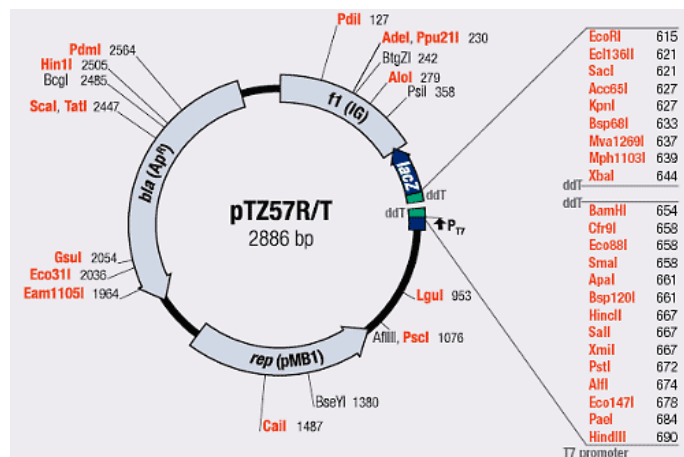
#### 2.2.4. Εξαγωγή DNA από πηκτή αγαρόζης

Για την εξαγωγή τμήματος DNA προς αλληλούχηση από την πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το Nucleo Spin Extract II kit (Macherey-Nagel, Γερμανία) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, κόπηκε από την πηκτή αγαρόζης η κατάλληλη ζώνη με καθαρό νυστέρι και το κομμάτι τοποθετήθηκε σε διάλυμα που περιείχε αγαράση για διάσπαση της αγαρόζης (200 μl διαλύματος για κάθε 100 mg πηκτής). Το μείγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 50°C για 10 λεπτά και στη συνέχεια διηθήθηκε σε στήλη συγκράτησης του DNA, φυγοκεντρώντας. Η στήλη καθαρίστηκε από τα ξένα προς το DNA στοιχεία (υπολείμματα της PCR όπως dNTPs, εκκινητές και πολυμεράση) ξεπλένοντας με κατάλληλο διάλυμα και φυγοκεντρώντας. Επειδή το τελευταίο διάλυμα περιείχε αιθανόλη, η μεμβράνη της στήλης αφέθηκε να στεγνώσει πλήρως πριν την έκλυση του DNA από αυτή. Για την έκλυση χρησιμοποιήθηκε νερό (~35 μl) και το καθαρό DNA, αφού φωτομετρήθηκε για να προσδιοριστεί η ποσότητα που απομονώθηκε, αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Το τμήμα DNA που απομονώθηκε εισήχθη σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης με το οποίο μετασχηματίστηκαν βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* DH5a ως εξής:

#### 2.2.5. Εισαγωγή DNA σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης

Η εισαγωγή τμήματος DNA (ένθεμα) σε πλασμίδιο αποτελεί μία μέθοδο δημιουργίας ανασυνδυασμένων μορίων DNA. Το πλασμίδιο είναι ένας φορέας κλωνοποίησης ο οποίος επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του ένθετου DNA που εισάγεται σε αυτόν. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pTZ57R/T (Fermentas Inc, Καναδάς), ειδικά σχεδιασμένος για την ενσωμάτωση PCR-προϊόντων (Εικ. 2.1).



**Εικ. 2.1.** Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pTZ57R/T (Clark, 1988).

Τα PCR-προϊόντα φέρουν dA άκρα (αλληλουχία DNA που περιέχει αλληπάλληλες βάσεις αδενίνης-A) (ιδιότητα της Taq πολυμεράσης), και ο φορέας φέρει dT άκρα στο σημείο ένθεσης που είναι συμπληρωματικά με αυτά του προϊόντος PCR προς ένθεση (αρχή της συμπληρωματικότητας των νουκλεοτιδικών βάσεων). Τα dA άκρα υβριδίζουν με τα dT επιτρέποντας τη συνένωση του PCR-προϊόντος (ένθεμα) με το φορέα κλωνοποίησης. Η συνένωση αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA-λιγάση που έχει την ιδιότητα να δημιουργεί φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ νουκλεοτιδίων.

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκε το InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas Inc., Καναδάς). Αναμείχθηκαν 1 μl ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης (10X), 4 μl προϊόντος PCR προς ένθεση (2,6 ng/μl), 1 μl πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pTZ57R/T (55 ng) και 0,5 μl DNA-λιγάσης (1 u), σε τελικό όγκο 10 μl. Η αντίδραση συνένωσης πραγματοποιήθηκε στους 22°C για 1 ώρα και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στους -20°C προς αποθήκευση.

#### 2.2.6. Παρασκευή ηλεκτροδιαπερατών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* DH5a

Η παρασκευή ηλεκτροδιαπερατών βακτηριακών κυττάρων αναφέρεται στην πλήρη αφαίρεση των αλάτων του υδατικού περιβάλλοντος των βακτηρίων, ώστε να είναι δυνατός ο μετέπειτα μετασχηματισμός τους μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation).

Μοναδιαία αποικία βακτηριακών κυττάρων *E. coli* DH5a μεταφέρθηκε σε σωλήνα τύπου Falcon (15 ml), ο οποίος περιείχε 10 ml θρεπτικού διαλύματος LB (βλ. παράρτημα). Η βακτηριακή καλλιέργεια αναπτύχθηκε στους 37°C υπό ανάδευση στις 220 rpm (βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης για *E.coli*) για 12 ώρες. Στη συνέχεια μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600 nm (OD<sub>600</sub>) και αφέθηκε να αναπτυχθεί μέχρι να φτάσει σε OD<sub>600</sub>>2,5. Όταν η OD<sub>600</sub> της καλλιέργειας πήρε την επιθυμητή τιμή, 1 ml αυτής αναμείχθηκε με 250 ml ζεστού (37°C) LB (OD<sub>600</sub> ~0,02), αναπτύχθηκε στους 37°C υπό ανάδευση (220 rpm) μέχρι να φτάσει σε OD=0,6 και τοποθετήθηκε στον πάγο ώστε να διακοπεί ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων.

Ακολούθως, τα κύτταρα της παραπάνω καλλιέργειας (OD=0,6) φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά (4000xg, 4°C) και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 250 ml αποστειρωμένο, κρύο νερό και πραγματοποιήθηκε νέα φυγοκέντρηση για 15 λεπτά (5800xg, 4°C). Το υπερκείμενο



απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 125 ml αποστειρωμένο, κρύο νερό. Το εναιώρημα κυττάρων μοιράστηκε σε 4 σωλήνες τύπου Falcon (30 ml), τα οποία φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά (5800xg, 4°C). Αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, 30 ml αποστειρωμένο, κρύο νερό προστέθηκαν σε κάθε σωλήνα επαναδιαλύοντας τα ίζηματα. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 15 λεπτά (5800xg, 4°C), απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος κάθε σωλήνα σε 1,25 ml αποστειρωμένο, κρύο νερό. Το περιεχόμενο των σωλήνων μοιράστηκε σε 4 σωληνάκια τύπου erpendorf, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά (6500xg, 4°C). Το υπερκείμενο κάθε erpendorf απομακρύνθηκε, προστέθηκαν 250 μl 10% αποστειρωμένη γλυκερόλη ανά erpendorf (10 % γλυκερόλη σε νερό, αποστειρωμένη μέσω φίλτρου, όχι σε αυτόκαυστο) και συνενώθηκαν σε σωλήνα τύπου Falcon. Το τελικό διάλυμα βακτηριακών κυττάρων μοιράστηκε σε erpendorf (~ 40 μl/σωλήνα), ψύχθηκε σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκε στους -80°C μέχρι τη χρήση του.

### 2.2.7. Μετασχηματισμός βακτηρίων μέσω ηλεκτροδιάτρησης

Η ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) είναι η διαδικασία κατά την οποία η μεμβράνη κάποιου βακτηριακού κυττάρου που εκτίθεται σε πολύ μικρούς χρονικά (ms) παλμούς υψηλού ηλεκτρικού πεδίου, μπορεί παροδικά να αποσταθεροποιηθεί και να δημιουργήσει «μεμβρανικούς πόρους» οι οποίοι στη συνέχεια κλείνουν. Η εφαρμογή των παλμών του ηλεκτρικού πεδίου πρέπει να είναι τέτοια, ώστε η ηλεκτροδιάτρηση να μη δημιουργεί μόνιμη καταστροφή των κυττάρων. Είναι μια φυσική μέθοδος μετασχηματισμού βακτηρίων με χρήση του ηλεκτρικού πεδίου, για μεταφορά νουκλεϊνικών οξέων (π.χ. πλασμίδιο) στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον.

Το βακτηριακό στέλεχος της *E. coli* που χρησιμοποιήθηκε ήταν το DH5a, τα κύτταρα του οποίου προηγουμένως είχαν καταστεί ηλεκτροδιαπερατά. Πριν τη χρήση τους τα βακτηριακά κύτταρα αφέθηκαν να ξεπαγώσουν για περίπου 10 λεπτά σε πάγο. Το εξωγενές DNA που εισήχθη στα βακτήρια ήταν το προϊόν της αντίδρασης συνένωσης που περιγράφεται παραπάνω (ανασυνδυασμένο πλασμίδιο).

Συγκεκριμένα, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (10 μl) αραιώθηκε με νερό μέχρι τα 30 μl και από αυτά τα 15 μl αναμείχθηκαν με 40 μl βακτήρια *E. coli* DH5a, υπό ασηπτικές συνθήκες. Το μείγμα πλασμιδίου-βακτηρίων μεταφέρθηκε, με χρήση πιπέτας Pasteur, σε ειδική κυψελίδα η οποία τοποθετήθηκε σε συσκευή ηλεκτροδιάτρησης, μέσω της οποίας εφαρμόστηκαν στο μείγμα παλμοί τάσης 1,4 KV. Μετά την εφαρμογή των παλμών προστέθηκαν στην κυψελίδα 945 μl θρεπτικού μέσου LB και μετά από ελαφριά ανάδευση, το μείγμα τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωλήνα τύπου Falcon (15 ml) και αφέθηκε για μία ώρα στους 37°C, υπό ανάδευση στις 220 rpm ώστε να ανακάμψουν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, μετά από φυγοκέντρωση απομακρύνθηκαν 800 μl από το υπερκείμενο (κυρίως θρεπτικό διάλυμα) και το ίζημα (κύτταρα) επαναιωρήθηκε στα υπόλοιπα 200 μl θρεπτικού διαλύματος, τα οποία επιστρώθηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB-άγαρ που περιείχε το αντιβιοτικό αμικιλίνη για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Το πλασμίδιο που εισήχθη στα βακτηριακά κύτταρα μέσω της ηλεκτροδιάτρησης, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικιλίνη ( $Amp^r$ , Εικ. 1). Με αυτόν τον τρόπο, όσα βακτήρια έχουν μετασχηματιστεί από το πλασμίδιο αυτό επιβιώνουν στο θρεπτικό μέσο παρουσία του αντιβιοτικού, ενώ όσα δεν το έχουν προσλάβει πεθαίνουν, επιτρέποντας έτσι την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων. Τα βακτήρια που επιβιώνουν σχηματίζουν μοναδιαίες αποικίες, καθεμία από τις οποίες προέρχεται από ένα αρχικό βακτηριακό κύτταρο.

Το τρυβλίο επώαστηκε για 16 τουλάχιστον ώρες στους 37°C, μέχρι που βακτηριακές αποικίες του *E. coli* έγιναν εμφανείς στην επιφάνεια του τρυβλίου. Δέκα ευδιάκριτες και καλά αναπτυγμένες αποικίες επιλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν η κάθε μία σε ξεχωριστό σωλήνα Falcon (15 ml) που περιείχε 5 ml LB και 5 μl αμπικιλίνη (100 mg/ml). Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης 37°C υπό ανάδευση στις 220 rpm για 16 ώρες. Από τις καλλιέργειες αυτές απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA όπως περιγράφεται παρακάτω. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για 10 αποικίες και όχι μόνο για μία, διότι υπάρχει πιθανότητα το πλασμίδιο που θα έχουν προσλάβει τα κύτταρα να μην έχει ενσωματώσει ένθεμα DNA το οποίο μας ενδιέφερε να πολλαπλασιάσουμε.

#### 2.2.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (plasmid mini prep)

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις προαναφερθείσες κυτταροκαλλιέργειες πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Germany). 4,5 ml από κάθε καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 250 μl διαλύματος το οποίο περιείχε RNάσηA (P<sub>1</sub>), προστέθηκαν 250 μl διαλύματος λύσης (P<sub>2</sub>) και αναμείχθηκαν με απαλούς χειρισμούς, καθώς και 350 μl διαλύματος για την ουδετεροποίηση του μείγματος (N<sub>3</sub>). Στη συνέχεια το μείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά και το υπερκείμενο που περιείχε το πλασμιδιακό DNA διηθήθηκε σε στήλη συγκράτησης του DNA, φυγοκεντρώντας για 1 λεπτό. Στη στήλη φορτώθηκε διάλυμα για καθαρισμό της μεμβράνης συγκράτησης του DNA και φυγοκεντρήθηκε. Αφού τοποθετήθηκε σε καθαρό πλαστικό σωλήνακι (ependorf), το καθαρό πλασμιδιακό DNA εκλούστηκε φορτώνοντας στη στήλη 50 μl νερό και φυγοκεντρώντας για 1 λεπτό. Τέλος, το προϊόν της απομόνωσης φωτομετρήθηκε όπως ανωτέρω για να προσδιοριστεί η ποσότητα πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

Για να εξεταστεί το ποια από τα 10 δείγματα πλασμιδιακού DNA εμπειρίχαν το ένθεμα DNA προς αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με υπόστρωμα το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε (1 αντίδραση/δείγμα) με εκκινητές οι οποίοι ενίσχυαν την αλληλουχία του ενθέματος [TOCsoyaRCI (πρόσθιος), PnTOCup3 (ανάστροφος), βλ. Πιν. 2.1]. Από τα 10 δείγματα που εξετάστηκαν τα 2 βρέθηκαν θετικά (η PCR έδωσε καθαρή ζώνη ενίσχυσης, άρα εμπειρίχαν το ένθεμα DNA).

Το πλασμιδιακό DNA ενός από τα θετικά δείγματα αποτέλεσε το υπόστρωμα για αντίδραση αλληλούχησης η οποία πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Biogenomica (Ελλάδα). Το τμήμα το οποίο αλληλουχήθηκε, αντιστοιχούσε στο DNA (ένθεμα) που είχε εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης σε προηγούμενο βήμα. Με τον τρόπο αυτό βρέθηκε η άγνωστη αλληλουχία του 5'-άκρου του *PnTOCI* cDNA (βλ. Αποτελέσματα, ενότ. 3.1).

### 2.3. Απομόνωση περιοχής του «υποκινητή» του γονιδίου *PnTOCI*

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε για την απομόνωση του υποκινητή του γονιδίου *PnTOCI*. Η συνηθισμένη μέθοδος για την απομόνωση των υποκινητών είναι η κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης και η σάρωση των κλώνων με ανιχνευτή ένα 5' κομμάτι από το γνωστό cDNA. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μέθοδοι, βασισμένες στη PCR αναπτύσσονται με σκοπό τη γρηγορότερη απομόνωση των υποκινητών ή γενικότερα κομματιών

DNA που γειτνιάζουν με κάποιο κομμάτι γνωστής αλληλουχίας. Μία τέτοια τεχνική χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική **PCR με χρήση προσαρμοστή** [Adaptor mediated PCR, (Zhang και Gurr, 2000)]. Στην τεχνική αυτή, γενωμικό DNA, κομμένο με κάποια περιοριστική ενδονουκλεάση, ενώνεται με κάποιο ειδικό για το ένζυμο προσαρμοστή (μικρό σε μήκος, δίκλωνο DNA, γνωστής αλληλουχίας για την οποία μπορεί να σχεδιαστεί εκκινητής PCR) με αποτέλεσμα η αντίδραση πολυμερισμού να δουλεύει με ένα εκκινητή σχεδιασμένο για τον αντάπτορα και ένα για το γνωστό cDNA.

Ο προσαρμοστής αποτελείται από δύο συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία μπορούν να κολλούν με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργούνται κολλητικά άκρα που μπορούν να ενωθούν με άκρα DNA που έχουν δημιουργηθεί από την κοπή του DNA με συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ένζυμα που δεν αφήνουν κολλώδη άκρα, αλλά τυφλά άκρα (blunt ends), όπως έγινε και στην παρούσα μελέτη. Για την απομόνωση του υποκινητή απαιτούνται τουλάχιστον δύο αντιδράσεις PCR, χρησιμοποιώντας στη δεύτερη εκκινητές λίγο πιο εσωτερικά σε σχέση με την πρώτη αντίδραση PCR. Συνεπώς, το πρώτο βήμα για την εφαρμογή της μεθόδου είναι η απομόνωση γενωμικού DNA από το φυτό.

### 2.3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από φύλλα-Μέθοδος CTAB (Saghai-Marooof *et al.*, 1984)

Λειοτριβήθηκε φρέσκος ιστός από φύλλα φασολιού (0,5-1,5 g) με 7,5 ml 2X CTAB διαλύματος απομόνωσης (100 mM Tris-Cl, pH=8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 0,2% β-μερκαπτοαιθανόλη), προθερμασμένο στους 60°C, σε επίσης προθερμασμένο γουδί. Το μείγμα επωάστηκε στους 60°C σε πλαστικό σωλήνα τύπου Falcon των 50 ml, υπό διαρκή ανάδευση. Στο μείγμα προστέθηκε ίσος όγκος μείγματος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και αναμειχθηκε ήπια. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Απομακρύνθηκε η υδατική φάση και σε αυτή προστέθηκαν 2/3 του όγκου της, κρύα ισοπροπανόλη. Μετά από ήπια ανάδευση, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 2500 rpm για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε (20 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου) σε 25 ml διαλύματος πλύσης (76% αιθανόλη, 10 mM NH<sub>4</sub>Ac). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 3 λεπτά, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα στεγνώθηκε σε κλίβανο ξηρού αέρα για 10-15 λεπτά. Το στεγνωμένο ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 ml διαλύματος επαναιώρησης (10 mM NH<sub>4</sub>Ac, 0,25 mM EDTA), σε αυτό προστέθηκαν 4 μl RNase A (10 μg/ml) και επωάστηκε για 30 λεπτά στους 37°C.

Στο διάλυμα προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης:χλωροφορμίου (1:1), αναδεύτηκε ήπια και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Η υδατική φάση απομακρύνθηκε, προστέθηκε σε αυτή NaCl σε τελική συγκέντρωση 1 M και τοποθετήθηκε στον πάγο. Το παραπάνω διάλυμα μοιράστηκε σε πλαστικούς σωλήνες τύπου erpendorf και φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 10 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρά erpendorf και ακολούθησε κατακρίμνηση του DNA προσθέτοντας 2X όγκους αιθανόλης 100% και επωάζοντας στους -20 °C, για όλο το βράδυ (~16 ώρες). Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα ξεπλύθηκε με 500 μl αιθανόλη 70%. Ακολούθησε σύντομη φυγοκέντρηση (5-10 λεπτά) στις 13000 rpm στους 4 °C, απομάκρυνση του υπερκειμένου και στέγνωμα του ιζήματος. Το τελικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε

συνολικά ~500 µl νερό και ποσοτικοποιήθηκε φωτομετρικά η συγκέντρωση του γενωμικού DNA (~200 µg/g νωπού βάρους του αρχικού ιστού).

### 2.3.2. Πέψεις γενωμικού DNA

Ένα περιοριστικό ένζυμο (ή περιοριστική ενδονουκλεάση) είναι ένα ένζυμο που κόβει δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναγνώρισης, γνωστές ως θέσεις περιορισμού. Οι θέσεις αυτές ποικίλουν από 4-8 νουκλεοτίδια και είναι κατά βάση παλίνδρομα. Τα τμήματα DNA που παράγονται μετά από επεξεργασία με κάποια περιοριστική ενδονουκλεάση (πέψη) μπορεί να έχουν είτε 3' ή 5' μονόκλωνα άκρα (sticky ends) είτε τυφλά άκρα (blunt ends).

Το DNA που απομονώθηκε από φύλλα του φυτού κόπηκε με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού ή και συνδυασμό αυτών (διπλές πέψεις). Τα κομμάτια DNA που προκύπτουν με τη χρήση ενζύμων που αφήνουν τυφλά άκρα μπορούν να ενωθούν στη συνέχεια με οποιαδήποτε άλλα κομμάτια DNA με επίσης τυφλά άκρα (όπως και οι προσαρμοστές που χρησιμοποιήθηκαν). Οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν με τα παρακάτω ένζυμα ή συνδυασμό ενζύμων:

1. *Hae*III
2. *Hinc*II
3. *EcoRV*
4. *Sca*I
5. *Ssp*I
6. *Dra*I/*Pvu*II
7. *EcoRV*/*Pvu*II
8. *EcoRV*/*Hinc*II
9. *Sca*I/*EcoRV*

Σε κάθε περίπτωση, κόπηκαν 15 µg γενωμικού DNA, με 100 u από κάθε ένζυμο και 1X τελική συγκέντρωση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, σε τελικό όγκο 100-150 µl (37°C, ~16 ώρες). Ακολούθησε καθαρισμός των πέψεων μέσω εκχύλισης DNA με ίσο όγκο φαινόλη:χλωροφόρμιο (1:1) και κατακρήμνισης με αιθανόλη (βλ. παραπάνω, ενότητα 2.3.1.). Το τελικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50 µl νερό και προσδιορίστηκε φωτομετρικά η συγκέντρωση του DNA (200-300 ng/µl).

### 2.3.3. Προετοιμασία προσαρμοστών

Οι προσαρμοστές που χρησιμοποιήθηκαν είναι, ουσιαστικά, συμπληρωματικά μεταξύ τους, μη πλήρως επικαλυπτόμενα, ολιγονουκλεοτίδια και ονομάζονται AD1 και AD2:

**AD1 :** 3' GCACCACCGGTTAA 5'  
**AD2:** 5' GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTGGCC 3'

Τα ολιγονουκλεοτίδια για να λειτουργήσουν ως προσαρμοστής πρέπει, αρχικά, να υβριδίσουν μεταξύ τους. Αυτό έγινε αναμιγνύοντας 500 pmol AD1 και 500 pmol AD2 σε τελικό όγκο 20 µl και αποδιατάσσοντάς τους στους 92°C για 2 λεπτά. Το μείγμα αφέθηκε μέχρι η θερμοκρασία να πέσει σε θερμοκρασία δωματίου και μετά τοποθετήθηκε στον πάγο.

Οι προσαρμοστές είχαν σχεδιαστεί αρχικά για *EcoRI*, ώστε όταν υβριδίζουν να αφήνουν 5'-άκρα AATT. Τα ίδια άκρα αφήνει και η πέψη με το ένζυμο αυτό και συνεπώς με τη βοήθεια του ενζύμου λιγάση μπορούν να ενωθούν ο προσαρμοστής με

κάθε κομμάτι γενωμικού DNA που θα προέκυπτε από πέψη με *EcoRI*. Για να υπάρξει, όμως, μεγαλύτερη ποικιλία περιπτώσεων και συνδυασμών ενζύμων, χρησιμοποιώντας τους διαθέσιμους προσαρμοστές πραγματοποιήθηκε αντίδραση συμπλήρωσης των 5'-άκρων των υβριδισμένων προσαρμοστών (fill-in). Στα 20 μl από την παραπάνω αντίδραση υβριδισμού προστέθηκαν 1 mM dATP, 1 mM dTTP, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης (10X *EcoRI* buffer), 1 μl πολυμεράση Klenow (5 u/μl, New England Biolabs, Η.Π.Α.), σε τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 25°C για 15-20 λεπτά και ακολούθησε αδρανοποίηση του ενζύμου στους 70°C για 15 λεπτά.

#### 2.3.4. Συνένωση προσαρμοστών με το κομμένο γενωμικό DNA (Ligation)

Στη συνέχεια, το παραπάνω μείγμα (αντίδραση fill-in) συνενώθηκε με το κομμένο γενωμικό DNA, μέσω αντίδρασης συνένωσης (ligation). Για κάθε περίπτωση πέψης (1-9), 1-1.5 μg καθαρισμένης πέψης αναμείχθηκαν με 15 μl από την αντίδραση συμπλήρωσης (fill-in). Σε αυτά προστέθηκαν 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης (5X HT ligase buffer) και 0.5 μl HT λιγάση (10 u/μl, HT Biotechnology LTD, Αγγλία), σε τελικό όγκο 25 μl. Οι αντιδράσεις συνένωσης πραγματοποιήθηκαν στους 12-15°C για όλη τη νύχτα (~16 ώρες). Στη συνέχεια αραιώθηκαν στα 200 μl τελικό όγκο η κάθε μία, για να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα στις παρακάτω αντιδράσεις PCR.

#### 2.3.4. Αντιδράσεις PCR για απομόνωση του «υποκινητή» του *PvTOC1*

Στις αντιδράσεις PCR είναι πολλοί οι παράγοντες που επηρεάζουν το αποτέλεσμα και συχνά απαιτείται μεγάλη προσπάθεια για τη βελτιστοποίηση της αντίδρασης. Αυτό είναι συχνό φαινόμενο για τις περιπτώσεις που έχουμε πολλά ανομοιογενή μόρια π.χ. γενωμικό DNA και θέλουμε με την αντίδραση να απομονώσουμε ένα επιθυμητό προϊόν. Το πρόβλημα γίνεται εντονότερο όταν ο ένας από τους δύο εκκινητές που χρησιμοποιούνται μπορεί και κολλά σε όλα τα μόρια (εδώ στους προσαρμοστές) και η διάκριση γίνεται μόνο με τον ειδικό για το γονίδιο εκκινητή. Για τις περιπτώσεις αυτές έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα PCR που αυξάνουν την εξειδίκευση των προϊόντων. Η «step down», λοιπόν, PCR (ή αλλιώς touchdown) ανήκει σε αυτή την κατηγορία. Η διαφορά με τη κοινή PCR είναι πως η πρόσδεση των εκκινητών στη μήτρα του DNA δεν γίνεται σε μια θερμοκρασία και σε ένα κοινό κύκλο. Η θερμοκρασία πρόσδεσης αρχίζει από πολύ ψηλές τιμές και με τη πάροδο λίγων κύκλων μειώνεται σταδιακά μέχρι μια ορισμένη θερμοκρασία, η οποία και χρησιμοποιείται στους υπόλοιπους κύκλους. Έτσι, έχοντας κάποιο ειδικό για το γονίδιο εκκινητή με υψηλή θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ), ευνοείται στους πρώτους κύκλους η εξειδικευμένη πρόσδεσή του και συνεπώς μειώνονται τα μη ειδικά προϊόντα. Στους επόμενους κύκλους που η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη μπορεί να προσδεθεί και ο εκκινητής του προσαρμοστή και συνεπώς το προϊόν θα αυξηθεί σχεδόν εκθετικά.

Οι αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν ακολουθούν το γενικότερο παρακάτω σχήμα. Η αλληλουχία των εκκινητών, τόσο των ειδικών για το γονίδιο, όσο και των ειδικών για τον προσαρμοστή (LTdown και LTdownB) οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την τμηματική απομόνωση 1250 bp (ζευγών βάσεων) από τον υποκινητή του γονιδίου *PvTOC1* (βλ. Αποτελέσματα, παραγρ. 3.2), παρατίθενται στον πίνακα 2.2. Γενικά, στις πρώτες PCR χρησιμοποιούνται οι εξωτερικοί εκκινητές και στις δεύτερες (nested PCR), οι πιο εσωτερικοί αυτών. Οι αρχικές PCR

πραγματοποιήθηκαν με εκκινητές (εξωτερικό και εσωτερικό) που υβριδίζουν κοντά στο γνωστό 5'-άκρο του γονιδίου *PvTOC1* (βλ. Αποτελέσματα, παραγρ. 3.1), ανωροϊκά του οποίου αναμένεται να βρίσκεται ο υποκινητής του [5'-αμετάφραστη περιοχή (5'-UTR)].

### 1<sup>η</sup> PCR

Υπόστρωμα	: 5 μl από τα 200 μl της αντίδρασης συνένωσης
Εξωτερικός εκκινητής-ειδικός για το γονίδιο	: 1 μl (10 pmol /μl)
Εξωτερικός εκκινητής-ειδικός για τον προσαρμοστή (LTdown)	: 1 μl (10 pmol /μl)
dNTPs ( 2.5 mM )	: 2 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (10X)	: 2.5 μl
Taq πολυμεράση (5u/μl)	: 0.15 μl
H <sub>2</sub> O: μέχρι τα 25 μl τελικό όγκο	

#### Πρόγραμμα:

1. 94°C, 3 λεπτά
2. 94°C, 25 δευτερόλεπτα
3. 72°C, 3 λεπτά x 6 φορές, τα βήματα 2-3
4. 94°C, 25 δευτερόλεπτα
5. 55-63°C, 3 λεπτά x 31 φορές, τα βήματα 4-5
6. 67°C, 7 λεπτά

Η θερμοκρασία του βήματος 5 εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) των ειδικών για το γονίδιο εκκινητών (βλ. πίν. 2.2, στήλη: θερμοκρασία υβριδισμού). Στο τέλος της αντίδρασης, 1 μl της 1<sup>ης</sup> PCR αραιώθηκε (με H<sub>2</sub>O) σε τελικό όγκο 50 μl και αυτό χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στη 2<sup>η</sup> PCR.

### 2<sup>η</sup> PCR

Υπόστρωμα	: 5 μl (1 <sup>η</sup> PCR)
Εσωτερικός εκκινητής-ειδικός για το γονίδιο	: 1 μl (10 pmol /μl)
Εσωτερικός εκκινητής-ειδικός για τον προσαρμοστή (LTdownB )	: 1 μl (10 pmol /μl)
dNTPs (2.5 mM)	: 4 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (10X)	: 5 μl
Taq πολυμεράση (5u/μl)	: 0.3 μl
H <sub>2</sub> O: μέχρι τα 50 μl τελικό όγκο.	

#### Πρόγραμμα:

1. 94°C, 3 λεπτά
2. 94°C, 25 δευτερόλεπτα
3. 72°C, 3 λεπτά x 4 φορές, τα βήματα 2-3
4. 94°C, 25 δευτερόλεπτα
5. 56-64°C, 3 λεπτά x 19 φορές, τα βήματα 4-5
6. 67°C, 7 λεπτά

Η θερμοκρασία του βήματος 5 εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) των ειδικών για το γονίδιο εκκινητών (βλ. πίν. 2.2, στήλη: θερμοκρασία υβριδισμού).

**Πίνακας 2.2.** Χαρακτηριστικά εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1*.

Εκκινητής		T <sub>m</sub> (°C)	Θέση Υβριδισμού (*)	Θερμοκρασία Υβριδισμού (°C)	Αλληλουχία Εκκινητή (5'→3')
Ειδικοί προς τον προσαρμοστή (πρόσθιοι)					
Εξωτερικός	LTdown	53	-	-	GTAATACGACTCACTATAGGGC
Εσωτερικός	LTdownB	53	-	-	ACTATAGGGCACGCGTGGT
Ειδικοί προς το γονίδιο (ανάστροφοι)					
Εξωτερικός	TOCex1R1	55	93	58	CACCTTACTTCTATCAATGAACCCA
Εσωτερικός	TOCex1R2	56	86	60	CTTCTATCAATGAACCCATCACCAC
Εξωτερικός	PvTOCup-608R	60,8	-300	63	AGCGAAGCATGGTAACCTCAG
Εσωτερικός	PvTOCup-591R	61,3	-317	64	TCAGGTTTGTGTGTTTGGGAG
Εξωτερικός	PvTOCup-533R	61,3	-375	63	GGTTGGGTAAAGGGAGAGGC
Εσωτερικός	PvTOCup-37R	47	-871	56	ATTTTTACTATGGATTAAGATAT
Εξωτερικός	PvTOCup-37R	47	-871	55	ATTTTTACTATGGATTAAGATAT
Εσωτερικός	PvTOC1171R1	47,1	-971	57	ACATTTTACCTATTATGAGATT

(\*) Ως '1' ορίζεται η Αδενίνη (A) του κωδικονίου έναρξης (ATG) του Ανοικτού Πλαισίου Ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) του γονιδίου *PvTOC1*.

Τα προϊόντα των 2<sup>ov</sup> PCR ηλεκτροφορήθηκαν (βλ. παραγρ. 2.2.3). Στις περιπτώσεις που το αποτέλεσμα ήταν κάποια σχετικά καθαρή ζώνη επαρκώς μεγάλου μεγέθους (>300 bp), τότε η ζώνη αυτή κόπηκε και εξήχθη από την πηκτή αгарόζης (βλ. παραγρ. 2.2.4). Ακολούθησε η εισαγωγή του τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης (pTZ57R/T, βλ. παραγρ. 2.2.5) και στη συνέχεια μετασχηματίστηκαν βακτήρια *E.coli* DH5α με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, μέσω ηλεκτροδιάτρησης (βλ. παραγρ. 2.2.7). Από τους θετικούς κλώνους απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA (βλ. παραγρ. 2.2.8), το οποίο εστάλη για αλληλούχηση του ενθέματος (τμήμα του υποκινητή που είχε εισαχθεί στο πλασμίδιο με όλη την παραπάνω μεθοδολογία). Νέοι εκκινητές (εξωτερικός και εσωτερικός) σχεδιάζονταν κάθε φορά κοντά στο 5'-άκρο της προκύπτουσας αλληλουχίας, και η διαδικασία (από 1<sup>η</sup> PCR μέχρι και αλληλούχηση του νέου τμήματος DNA) επαναλαμβανόταν. Με τον τρόπο αυτό, έγινε γνωστό, τμηματικά, μεγάλο μέρος της αλληλουχίας του «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1* (1250 bp από την 5'-UTR, βλ. Αποτελέσματα, ενότ. 3.2).

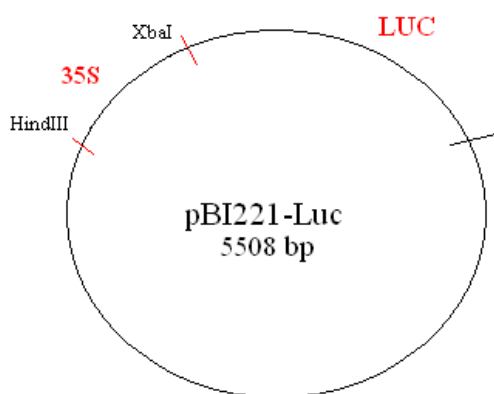
#### 2.4. Κλωνοποίηση τμήματος του «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1* σε φορέα έκφρασης

Όσον αφορά τη μελέτη των υποκινητών, πολύ σημαντική είναι η χρήση των γονιδίων αναφοράς (reporter genes) σε μεταγραφικές συβτήξεις (transcriptional fusions). Γονίδια αναφοράς είναι η ακετυλο-τρανσφεράση της χλωραμφαινικόλης (CAT), η συνθάση της νοπαλίνης (NOS), η β-γλυκουρονιδάση (GUS), η λουσιφεράση (LUC), η πρωτεΐνη πράσινου φθορισμού (GFP) κ.ά. Με τη μεταγραφική σύντηξη αλληλουχίας DNA (πιθανού υποκινητή) με τα γονίδια αναφοράς γίνεται εύκολη η ανίχνευση π.χ. με ενζυμική δοκιμή, φθορισμό, φωταύγεια της ενζυματικής δράσης και με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώνεται η λειτουργία της αλληλουχίας ως υποκινητή. Η ταυτότητα του υποκινητή καθορίζει το αν η πρωτεΐνη θα παράγεται, αλλά και πότε και πόσο θα παράγεται σε σχέση με κάποιον άλλο

υποκινητή. Έτσι, στη περίπτωση του *PvTOC1*, σε ένα τέτοιο σύστημα ανάλυσης υποκινητών θα μπορούσε να βρεθεί ποια στοιχεία του υποκινητή είναι αυτά που ευθύνονται για την έκφραση, την κερκαδική ρύθμιση ή και την απόκριση στο φως.

Μετά την απομόνωση μεγάλου μέρους του υποκινητή του γονιδίου *PvTOC1* και βιοπληροφορική ανάλυση αυτού (βλ. Αποτελέσματα, ενότ. 3.2), εντοπίστηκαν διάφορες αλληλουχίες DNA - πιθανά *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία. Ως μία αρχική προσέγγιση, για τη μελλοντική μελέτη των στοιχείων αυτών του υποκινητή, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση τμήματος του «υποκινητή» αρχικά σε φορέα κλωνοποίησης και στη συνέχεια σε κατάλληλο φορέα έκφρασης. Επιλέχθηκε τμήμα του «υποκινητή» το οποίο βρέθηκε να περιέχει (βάση της *in silico* ανάλυσης, βλ. Αποτελέσματα, ενότ. 3.2) δύο αλληλουχίες - πιθανά «απογευματινά στοιχεία» (EE-Evening Elements), τα οποία σε άλλα φυτά έχουν βρεθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ρυθμικής έκφρασης του γονιδίου *TOC1* και κατ'επέκταση στη λειτουργία του στον κεντρικό ταλαντωτή του κερκαδικού ρολογιού (βλ. Εισαγωγή, ενότ. 1.4.4).

Ο φορέας έκφρασης που επιλέχθηκε για την κλωνοποίηση του επιθυμητού τμήματος του «υποκινητή» του *PvTOC1*, ήταν ο pBI221-Luc, ευγενική προσφορά του Dr. Koizumi (Osaka Prefecture University, Ιαπωνία). Ο φορέας αυτός είχε τροποποιηθεί, έτσι ώστε αντί για το γονίδιο αναφοράς GUS (β-γλυκουρονιδάση) που περιείχε ο αρχικός φορέας pBI221 (Acc: AF502128), να φέρει ως γονίδιο αναφοράς το LUC (γονίδιο που κωδικοποιεί τη λουσιφεράση) (Iwata *et al.*, 2005). Επίσης, η έκφραση του γονιδίου LUC βρίσκεται υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή 35S του ιού του μωσαϊκού του κουνουπιδιού (CaMV, Cauliflower Mosaic Virus) (Iwata *et al.*, 2005).



**Εικ. 2.2.** Σχηματική απεικόνιση του φορέα έκφρασης pBI221-Luc. Φαίνονται οι θέσεις περιορισμού (μοναδιαίες) των ενζύμων *Hind*III και *Xba*I πάνω στο φορέα, καθώς και η σχετική θέση του υποκινητή 35S και του γονιδίου της λουσιφεράσης (LUC).

Η χρήση του ανωτέρω πλασμιδίου έγκειται στην αντικατάσταση του υποκινητή 35S με το προς μελέτη τμήμα του «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1*, ώστε να μπορεί να μελετηθεί μελλοντικά η λειτουργικότητά του, ελέγχοντας το εάν και κατά πόσο μπορεί να λειτουργήσει ως υποκινητής, επάγοντας την έκφραση του γονιδίου LUC. Για να γίνει αυτό εφικτό, έπρεπε να απομονωθεί, αυτούσιο, το επιθυμητό τμήμα του «υποκινητή» από γενωμικό DNA με τα επιθυμητά άκρα.

#### 2.4.1. Αντίδραση PCR για την απομόνωση τμήματος του «υποκινητή» του *PvTOC1*

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με υπόστρωμα γενωμικό DNA από φύλλα φασολιού (μέθοδος CTAB, βλ. ενότ. 2.3.1) και εκκινητές που ενισχύουν ειδικά το προς κλωνοποίηση τμήμα του υποκινητή. Οι εκκινητές αυτοί φέρουν στο 5'-άκρο



τους θέσει περιορισμού για τα ένζυμα με τα οποία είχε επιλεγθεί να γίνει η κλωνοποίηση στο φορέα pBI221-Luc (*Hind*III και *Xba*I) (βλ. Πίν. 2.3). Το πρωτόκολλο της PCR που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

Υπόστρωμα	: 100 ng γενωμικό DNA
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	: 8 μl (4mM)
10X ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (χωρίς MgCl <sub>2</sub> )	: 5 μl
Πρόσθιος εκκινητής (priHind-F) (10 pmoles/μl)	: 2 μl
Ανάστροφος εκκινητής (priXbaI-R) (10 pmoles/μl)	: 2 μl
dNTPs (10mM)	: 1 μl
Taq πολυμεράση (5u/μl)	: 0,3 μl
H <sub>2</sub> O: μέχρι τα 50 μl τελικό όγκο.	

Πρόγραμμα:

1. 94°C, 1 λεπτό
2. 94°C, 30 δευτερόλεπτα
3. 53°C, 30 δευτερόλεπτα
4. 72°C, 1 λεπτό x 2 φορές, τα βήματα 2-4
5. 94°C, 30 δευτερόλεπτα
6. 70°C, 1,5 λεπτά x 35 φορές, τα βήματα 5-6
7. 72°C, 30 λεπτά

**Πίν. 2.3.** Χαρακτηριστικά εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση τμήματος του «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1*.

Εκκινητής	T <sub>m</sub>	Θέση (*)	Προϊόν	Αλληλουχία (5'→3')
priHind-F (πρόσθιος)	67.8	-1197	695	CCCAAGCTTACATAATTAGGTTAACGTATTCA
priXba-R (ανάστροφος)	67.8	-532		TGCTCTAGATTCTCATTCAACCAAAATGTT

(\*) Ως '1' ορίζεται η Αδενίνη (A) του κωδικονίου έναρξης (ATG) του Ανοικτού Πλαισίου Ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) του γονιδίου *PvTOC1*.

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης, από την οποία κόπηκε η ζώνη που αντιστοιχούσε στο τμήμα του «υποκινητή» προς ενίσχυση (~700 bp) και πραγματοποιήθηκε εξαγωγή της από την πηκτή (βλ. ενότ., 2.2.4). Ακολούθησε εισαγωγή του τμήματος DNA στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pTZ57R/T μέσω αντίδρασης συνένωσης (ligation, βλ. ενότ. 2.2.5). Συγκεκριμένα, στην περίπτωση αυτή, για την αντίδραση συνένωσης χρησιμοποιήθηκαν 55 ng φορέα pTZ57R/T και 40 ng από το καθαρισμένο από την πηκτή DNA (ένθεμα: τμήμα «υποκινητή» *PvTOC1*). Με το προϊόν της παραπάνω αντίδρασης συνένωσης μετασχηματίστηκαν βακτήρια *E.coli* DH5a, μέσω ηλεκτροδιάτρησης (βλ. ενότ. 2.2.7). Από τους θετικούς κλώνους απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA (βλ. ενότ. 2.2.8), το οποίο εστάλη για αλληλούχηση του ενθέματος (βλ. Αποτελέσματα, ενότ. 3.3).

Ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκε να εισαχθεί το τμήμα του «υποκινητή» στον φορέα κλωνοποίησης pTZ57R/T προτού εισαχθεί στον φορέα έκφρασης pBI221-Luc, ήταν ότι για να εισαχθεί στο δεύτερο πλασμιδίο έκφρασης χρειάζεται να έχει κοπέι με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού στις άκρες του. Οι θέσεις περιορισμού αυτών των ενζύμων, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, έχουν προστεθεί στις άκρες του τμήματος του «υποκινητή» μέσω της αντίδρασης PCR (κατάλληλοι εκκινητές βλ. Πίν. 2.3). Ακριβώς, όμως, επειδή βρίσκονται στην άκρη του τμήματος DNA, αφενός υπάρχει δυσκολία στο να πραγματοποιηθεί πλήρης πέψη (τα περιοριστικά ένζυμα

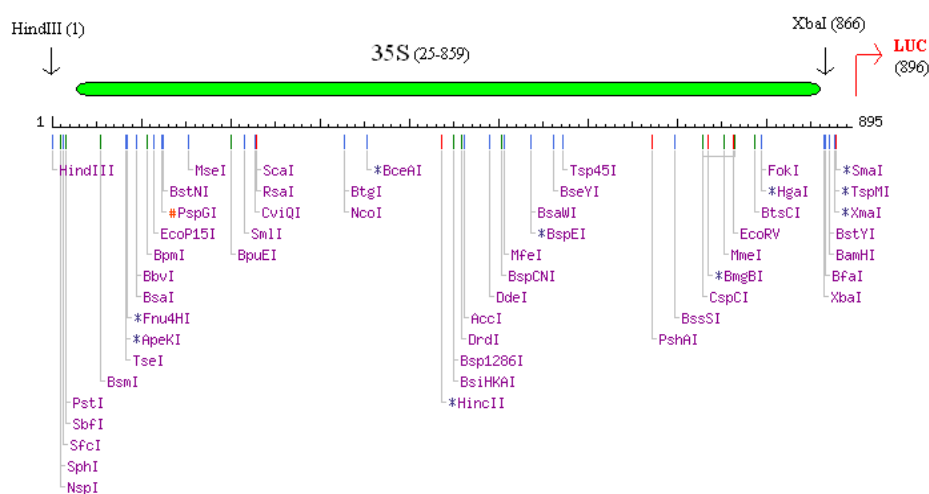
δυσκολεύονται να κόψουν κοντά στα άκρα του DNA), αφετέρου, δεν υπάρχει τρόπος να ελεγχθεί το κατά πόσο ήταν επιτυχής η πέψη. Έτσι, εφόσον βρίσκεται πλέον κλωνοποιημένο στο φορέα pTZ57R/T, μπορεί εύκολα να κοπεί από εκεί με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.

#### 2.4.2. Πέψη του κλώνου [pTZ57R/T+τμήμα «υποκινητή» *PvTOC1*] (πέψη I)

Πραγματοποιήθηκε πέψη του παραπάνω κλώνου (pTZ57R/T+695 bp τμήμα «υποκινητή» *PvTOC1*), με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα (*HindIII* και *XbaI*-διπλή πέψη) ως εξής: 5 µg πλασμιδιακού DNA, 50 u από κάθε ένζυμο, 1X τελική συγκέντρωση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης (1mM Tris-Cl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaCl, 0.1 mM DTT - pH 7,9), 1X BSA (Bovine Serum Albumin, συγκέντρωση στο 10X: 1mg/ml) σε τελικό όγκο 100 µl (37°C, ~3 ώρες). Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορήθηκε και πραγματοποιήθηκε εξαγωγή από την πηκτική αгарόζης της ζώνης DNA που αντιστοιχούσε στο ένθεμα (τμήμα «υποκινητή» *PvTOC1*, ~700 bp), η οποία καθαρίστηκε από την πηκτική (βλ. ενότ. 2.2.4) και η ποσότητα DNA που προέκυψε προσδιορίστηκε φωτομετρικά (10 ng/µl).

#### 2.4.3. Πέψη του φορέα pBI221-Luc (πέψη II)

Αντίστοιχη πέψη πραγματοποιήθηκε και για το φορέα pBI221-Luc: 5 µg πλασμιδιακού DNA, 50 u από κάθε ένζυμο (*HindIII* και *XbaI*), 1X τελική συγκέντρωση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης (1 mM Tris-Cl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaCl, 0.1 mM DTT - pH 7,9), 1X BSA (Bovine Serum Albumin, συγκέντρωση στο 10X: 1 mg/ml) σε τελικό όγκο 100 µl (37°C, ~3 ώρες). Μέσω αυτής της πέψης ο φορέας pBI221-Luc κόβεται σε δύο κομμάτια: ένα μεγέθους 866 bp, το οποίο αντιστοιχεί στον υποκινητή 35S που θέλουμε να αφαιρέσουμε (βλ. Εικ. 2.3) και ένα μεγέθους 4,6 Kb που αντιστοιχεί στον υπόλοιπο φορέα (pBI221-Luc, χωρίς τον 35S) με άκρα *HindIII/XbaI*, τον οποίο και επιθυμούμε να απομονώσουμε. Έτσι, το προϊόν της πέψης, ηλεκτροφορήθηκε, κόπηκε από την πηκτική αгарόζης η ζώνη του φορέα έκφρασης (4,6 Kb) και καθαρίστηκε από την πηκτική (βλ. ενότ. 2.2.4) και η ποσότητα DNA προσδιορίστηκε φωτομετρικά (60 ng/µl).



**Εικ. 2.3.** Χάρτης περιορισμού τμήματος του φορέα pBI221-Luc. Φαίνονται οι θέσεις περιορισμού για τα ένζυμα *HindIII* (κόβει στη θέση 1 του φορέα) και *XbaI* (κόβει στη θέση 866 του φορέα). Έτσι, μέσω πέψης με τα συγκεκριμένα ένζυμα αφαιρείται πλήρως από το φορέα το τμήμα που αντιστοιχεί στον υποκινητή 35S (θέση: 25-859) (το γονίδιο αναφοράς LUC ξεκινά από τη θέση 896).

#### 2.4.4. Συνένωση (ligation) του pBI221-Luc (-35S) με το τμήμα του «υποκινητή» του *PvTOCI*

Τα τελικά, καθαρισμένα προϊόντα από τις παραπάνω πέψεις (πέψη I: τμήμα του «υποκινητή» του *PvTOCI* και πέψη II: φορέας έκφρασης pBI221-Luc, χωρίς τον υποκινητή 35S) είχαν συμπληρωματικά κομμένα άκρα (*Hind*III και *Xba*I). Κατά συνέπεια, το τελευταίο βήμα για την κλωνοποίηση του τμήματος του «υποκινητή» του *PvTOCI* στο φορέα pBI221-Luc ήταν η συνένωση αυτών των δύο προϊόντων πέψης. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε αναμιγνύοντας 30 ng από την πέψη I με 60 ng από την πέψη II, 0,2 μl T<sub>4</sub> λιγάση (10 u/μl, Takara, Ιαπωνία), 1X ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (66 mM Tris-HCl pH 7.6, 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.1 mM ATP), σε τελικό όγκο 10 μl (22°C, 4 ώρες). Το προϊόν της αντίδρασης συνένωσης (ligation) καθαρίστηκε μέσω κατακρήμνισης DNA, προσθέτοντας 2X όγκους αιθανόλης 100% και επωάζοντας στους -20° C, για όλο το βράδυ (~16 ώρες). Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα ξεπλύθηκε με 500 μl αιθανόλη 70%. Ακολούθησε σύντομη φυγοκέντρηση (5-10 λεπτά) στις 13000 rpm στους 4°C, απομάκρυνση του υπερκειμένου και στέγνωμα του ιζήματος. Το τελικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε συνολικά 10 μl νερό, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για να μετασχηματιστούν βακτήρια *E. coli* DH5a μέσω ηλεκτροδιάτρησης (βλ. ενότ. 2.2.7).

#### 2.5. Κατασκευή συστήματος αναφοράς για τη μελέτη του «υποκινητή»

Η ανάλυση των ρυθμιστικών στοιχείων του υποκινητή απαιτεί την ύπαρξη ενός συστήματος αναφοράς. Στο μέρος αυτό παρουσιάζεται η μελέτη για την κατασκευή ενός συστήματος παροδικής έκφρασης βασισμένο σε φυτικούς πρωτοπλάστες από φύλλα. Ουσιαστικά, μελετήθηκε η δυνατότητα απομόνωσης και μετασχηματισμού πρωτοπλαστών με σκοπό το σύστημα να είναι έτοιμο να υποδεχτεί μελλοντικά τον υποκινητή *PvTOCI* (ή κομμάτια αυτού).

#### Οι πρωτοπλάστες ως συστήματα παροδικής έκφρασης

Η μεταφορά DNA σε ένα φυτικό κύτταρο είναι μια διαδικασία σημαντική για τη μελέτη της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Τεχνικές για άμεση μεταφορά DNA και παροδική έκφραση παρέχουν εναλλακτική λύση στη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών όπου έχουμε σταθερό μετασχηματισμό. Αν και η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών είναι πια εφικτή και ενίοτε εύκολη, αυτό δεν ισχύει για το φασόλι. Έτσι, οι πρωτοπλάστες του φασολιού αποτελούν μία καλή εναλλακτική λύση για την *in vivo* μελέτη του υποκινητή του *PvTOCI*, χωρίς να καταφύγει κανείς σε ετερόλογο σύστημα αναφοράς.

Οι πρωτοπλάστες των φυτών, δηλαδή κύτταρα χωρίς κυτταρικό τοίχωμα, αποτελούν δεκτικά συστήματα για ξένο DNA και έχουν χρησιμοποιηθεί για μελέτες υποκινητών, για μελέτες κυτταρικής εντόπισης της θέσης διαφόρων πρωτεϊνών, σε πειράματα φυσιολογίας μελετώντας απόκριση στην παρουσία ορμονών, στη μεταγωγή μηνυμάτων κ.ά. (Sheen, 2001).

Επειδή η απομόνωση των πρωτοπλαστών απαιτεί ενζυμική απομάκρυνση του κυτταρικού τοιχώματος, υπάρχει η εσφαλμένη εντύπωση ότι πρόκειται για κύτταρα που έχουν υποστεί μη αντιστρεπτή καταπόνηση και συνεπώς οδηγούνται προς το θάνατο. Αντιθέτως, όταν η απομόνωση έχει γίνει σωστά, όπως και η διατήρησή τους, τα κύτταρα έχουν τις ίδιες κυτταρικές, βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες.

Διατηρούν δε τη βιωσιμότητά τους για πάνω από 48 ώρες μέσα σε ένα απλό διάλυμα μαννιτόλης (Sheen, 2001).

### 2.5.1. Απομόνωση πρωτοπλαστών από φύλλα φασολιού

Για την απομόνωση πρωτοπλαστών χρησιμοποιούνται ένζυμα του εμπορίου που προέρχονται από μύκητες (π.χ. το *Rhizopus sp.*) που αποικοδομούν τα συστατικά του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η κυτταρινάση Onozuka R10 (Cellulase Onozuka R10, Serva electrophoresis, Γερμανία) και το maceroenzyme R10 (Serva electrophoresis, Γερμανία). Οι κυτταρινάσες είναι μείγμα ενζύμων που διασπούν κυρίως κυτταρίνη καθώς και ημικυτταρίνες και πηκτινικές ενώσεις. Το maceroenzyme είναι μείγμα πηκτινασών. Στους απομονωμένους πρωτοπλάστες πρέπει να αναπληρωθεί η πίεση του τοιχώματος από μια οσμωτικά ενεργό ουσία, π.χ. μαννιτόλη (μεταβολικά ανενεργός ουσία). Το ιδανικό οσμωτικό δυναμικό ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία του ιστού και το είδος του.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή φύλλα φασολιού (1-2 g) 12-15 ημερών (βλ. ενότ. 2.1). Το κεντρικό νεύρο αφαιρέθηκε και τα φύλλα ξεπλύθηκαν καλά με αποστειρωμένο νερό. Αφού αφαιρέθηκε με ένα ξυράφι όσο μεγαλύτερο μέρος της κάτω επιδερμίδας του φύλλου ήταν δυνατό, τα φύλλα τεμαχίστηκαν σε λωρίδες περίπου 2 mm και μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη, όπου είχε προστεθεί το διάλυμα πέψης [1% Cellulase Onozuka R10, 0,3% Macerozyme R10, 0,4 M μαννιτόλη, 5 mM Mes, pH 5,7, 20 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> και 0,1% BSA (20 ml για 1g φύλλα)].

Η πέψη πραγματοποιήθηκε για 5 ώρες στο σκοτάδι, υπό ελαφριά ανάδευση (30-50 rpm), στους 30°C, στο διάλυμα πέψης που από υποκίτρινο καταλήγει πράσινο μετά την απελευθέρωση των πρωτοπλαστών. Μετά την επώαση παρατηρούνται στα φύλλα μικρές οπές, ενδεικτικό ότι τα ένζυμα έδρασαν καλά.

Μετά το πέρας της πέψης, ο ιστός πιέστηκε ελαφρά με μία γυάλινη ράβδο, ώστε να απελευθερωθούν οι πρωτοπλάστες. Το διάλυμα διηθήθηκε από νάilon γάζα (διαμέτρου πόρων 79 μm), η οποία είχε προηγουμένως διαβραχεί σε διάλυμα πέψης-χωρίς ένζυμα. Το διάλυμα των πρωτοπλαστών τοποθετήθηκε σε σωλήνα τύπου Falcon των 50 ml και φυγοκεντρήθηκε (80xg, 5 λεπτά, 4-12°C). Στο ίζημα προστέθηκαν ~5 ml διαλύματος πέψης - χωρίς ένζυμα και επαναιωρήθηκε αναδεύοντας ελαφριά.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επίπλευση του παρασκευάσματος σε κλίση συγκέντρωσης σακχαρόζης (sucrose density gradient) για διαχωρισμό των άθικτων πρωτοπλαστών από τους σπασμένους και τα κυτταρικά θραύσματα. Σε σωλήνα τύπου Falcon των 15 ml τοποθετήθηκαν 4 ml σακχαρόζης συγκέντρωσης 1 M. Πάνω από τη σακχαρόζη προστέθηκε, προσεκτικά, υπό κλίση, το διάλυμα των πρωτοπλαστών, ώστε να δημιουργηθούν δύο διακριτές φάσεις. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση (100xg, 10 λεπτά, 4-12°C). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να έχει δημιουργηθεί μία παχιά ζώνη στη διαχωριστική επιφάνεια σακχαρόζης-διαλύματος πρωτοπλαστών, η οποία και περιέχει τους άθικτους πρωτοπλάστες (βλ. Αποτελέσματα, ενότ. 3.4). Ως ίζημα πέφτουν οι σπασμένοι πρωτοπλάστες και τα κυτταρικά θραύσματα. Η ζώνη με τους άθικτους πρωτοπλάστες διαχωρίστηκε και παραλήφθηκε δείγμα για μέτρηση του αριθμού των ζωντανών πρωτοπλαστών. Η μέτρηση ζωτικότητας πραγματοποιείται μέσω χρώσης με trypan blue (0.5% w/v), μια χρωστική η οποία βάφει τα νεκρά κύτταρα (5 μl trypan blue και 5 μl διαλύματος πρωτοπλαστών) και μέτρησης σε αιματοκυτταρόμετρο ( $3-5 \times 10^6$  πρωτοπλάστες/g ιστού).

Στο διάλυμα των άθικτων πρωτοπλαστών που απομονώθηκαν από το προηγούμενο βήμα προστέθηκε διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης (0,4 M μαννιτόλη, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) τουλάχιστον 2-3 φορές τον όγκο του διαλύματος που περιέχει τους πρωτοπλάστες. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε (80xg, 5 λεπτά, 4-12°C) και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης, ώστε να έχουμε 1x10<sup>6</sup> πρωτοπλάστες/ml.

#### 2.5.2. Παροδικός μετασχηματισμός πρωτοπλαστών μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)

Για τις δοκιμές ηλεκτροδιάτρησης πρωτοπλαστών από φύλλα φασολιού χρησιμοποιήθηκε φορέας έκφρασης ο οποίος φέρει ως γονίδιο αναφοράς, το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), ο pSAT-GFP (Acc: AY818382). Το GFP είναι το πιο εύχρηστο γονίδιο αναφοράς για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι πέρα από το μετασχηματισμό αρκεί ένα μικροσκόπιο φθορισμού για να ανιχνευτεί το αποτέλεσμα. Έτσι, στο παρόν τμήμα της εργασίας επιλέχθηκε το GFP ως γονίδιο αναφοράς, για να είναι δυνατός ο γρήγορος και εύκολος προσδιορισμός της απόδοσης του μετασχηματισμού των πρωτοπλαστών μέσω ηλεκτροδιάτρησης.

Η αρχή της μεθόδου της ηλεκτροδιάτρησης έχει περιγραφεί σε προηγούμενη ενότητα (βλ. ενότ. 2.2.7), ως μέθοδος μετασχηματισμού βακτηρίων *E. coli*. Για την ηλεκτροδιάτρηση των πρωτοπλαστών χρησιμοποιήθηκε συσκευή ηλεκτροδιάτρησης ECM<sup>®</sup>399 (BTX<sup>®</sup> Harvard Apparatus, Η.Π.Α.) με χαρακτηριστικά πυκνωτή στη ρύθμιση LV (Low Voltage): αντίσταση R: 150 Ω και χωρητικότητα C: 1050 μF.

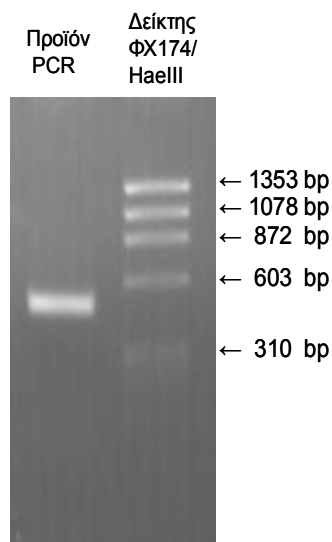
Ως διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιήθηκε ένα απλό διάλυμα μαννιτόλης (0.4 M μαννιτόλη, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) και πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για τη συνθήκη της ηλεκτροδιάτρησης (ουσιαστικά για τη τάση του πεδίου, V, έτσι ώστε να παρατηρείται ελάχιστη θνησιμότητα των πρωτοπλαστών).

Γενικά η διαδικασία ηλεκτροδιάτρησης των πρωτοπλαστών για το μετασχηματισμό τους με το πλασμίδιο pSAT-GFP είχε ως εξής: σε 800 μl δείγματος πρωτοπλαστών (1x10<sup>6</sup> κυτ/ml) προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος DNA (20-30 μg πλασμιδίου pSAT-GFP). Το μείγμα αναδεύτηκε και παρέμεινε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου αναδεύοντας ελαφρά κάθε 5 λεπτά. Στη συνέχεια, το δείγμα μεταφέρθηκε σε κυψελίδα (ανοίγματος 4 mm) η οποία ακολούθως τοποθετήθηκε στον πάγο για 5 λεπτά. Δόθηκε ο παλμός (50-200 V), η κυψελίδα ανακινήθηκε ελαφρά και αφέθηκε στον πάγο. Το δείγμα παρέμεινε για 5 λεπτά στον πάγο, προστέθηκε σε αυτό αμπικιλίνη (1 μg/ml) για να αποτραπεί η ανάπτυξη μικροβίων και τέλος, μεταφέρθηκε σε πλαστικό τρυβλίο 12 θέσεων (12-well plate). Το τρυβλίο τοποθετήθηκε στο σκοτάδι, στους 22-25°C για 24-48 ώρες μέχρι την παρατήρηση του δείγματος σε μικροσκόπιο φθορισμού (ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού Axiovet, Zeiss, Η.Π.Α.).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1. Απομόνωση του 5'-άκρου του cDNA του γονιδίου *PvTOC1*

Από προηγούμενη ερευνητική δραστηριότητα του εργαστηρίου Χρονοβιολογίας (Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος») είχε απομονωθεί το μεγαλύτερο μέρος του *PvTOC1* cDNA (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Η απομόνωση του πλήρους μήκους του cDNA του γονιδίου *PvTOC1* ολοκληρώθηκε στην παρούσα μελέτη με την απομόνωση του 5'-άκρου του, το οποίο υπολειπόταν. Αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω PCR, σε cDNA που είχε παραχθεί από ολικό mRNA φύλλων φασολιού, με εκκινητές έναν ανάστροφο (PvTOCup3) ο οποίος υβριδίζει στην ήδη γνωστή αλληλουχία του γονιδίου και έναν πρόσθιο (TOCsoyaRCI), ο οποίος υβριδίζει σε μη-γνωστή αλληλουχία (5'-άκρο), σχεδιασμένος με βάση την αντίστοιχη περιοχή της γνωστής αλληλουχίας του ορθόλογου γονιδίου στο συγγενικό με το φασόλι φυτό, τη σόγια (*Glycine max*) (βλ. ενότ. 2.2).



**Εικ. 3.1.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR και δείκτη ΦΧ (δείκτης ΦΧ: γενωμικό DNA βακτηριοφάγου ΦΧ174 κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο *HaeIII*).

Από την εικόνα 3.1 φαίνεται ότι το προϊόν PCR είναι μήκους περίπου 450 bp. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο φορέα κλωνοποίησης (pTZ57R/T), δημιουργώντας έναν κλώνο με ένθεμα 0,467 Kb (Εικ. 3.1). Η αλληλουχία του κλώνου αναλύθηκε μέσω αλληλούχησης με εκκινητή T7 και το αποτέλεσμα παρατίθεται στην εικόνα 3.2.

Φορέας pTZ57R/T	εκκινητής TOCsoyaRCI	ένθεμα
GCTCGCGTCGAGGGCCGGGATCGATT	<b>CGATGTA</b>	TTTGGCTTCCGGCGAGGAGATTAATTT - 60
GAAATATAAGTGGGGGTGGAAATCATGGGAAGAGTGGTGATGGGTTTCATTGATAAG		- 120
TAAAGGTGCGGATTTTGTGTGCGATAACGATTCCAAACAGTTCTCAAAGAGGTTTTCCACACT		- 180
TCTTTTGGGGTGTTCATTATCAGGTGACCTTAGTAAAGTCCGCGAGACAGGTAATTGACGC		- 240
ACTGAATGCAGAGGGGCAACATATAGGTATCATACTGGCTGAACTTGACCTTCCAAACAAA		- 300
AAAAGGCATGAAGATGTTGAAGTACATAGCACGGGATAAAGAGTTTCGCAGAAATCCCTGT		- 360
TATAATGATGCCGCACAAAGATGAGGTATCCGTTGTTGTTAAAGTGCTTGAGACTTGGAGC		- 420
TGCTGACTATCTAGTAAAAGCCCTTACGTACTAATGAACTATTAATTTGTG	<b>GATGCACAT</b>	- 480
<b>GTGGGGACGGAGG</b>		εκκινητής <b>PvTOCup3</b>

**Εικ. 3.2.** Αλληλουχία του ενθέματος 0.467 Kb του 5'-άκρου του cDNA του γονιδίου *PvTOC1*. Φαίνεται η νοηματική αλληλουχία με εκκινητή T7.

Στην παραπάνω αλληλουχία (Εικ. 3.2) παρατηρείται πως έχει αλληλουχηθεί μέρος του φορέα κλωνοποίησης pTZ57R/T, ο οποίος είχε χρησιμοποιηθεί για την κλωνοποίηση του ενθέματος, καθώς η αλληλούχηση έγινε με εκκινητή T7, ο οποίος υβριδίζει στο φορέα. Επίσης, φαίνεται η αλληλουχία των εκκινητών που είχαν χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση PCR, καθώς εμπεριέχονται στο κλωνοποιημένο ένθεμα και οι οποίοι έχουν επισημανθεί με κόκκινο χρώμα (πρόσθιος: TOCsoyaRCI και ανάστροφος: PnTOCup3). Και οι δύο παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι έχει αλληλουχηθεί το επιθυμητό τμήμα DNA.

*In silico* μετάφραση της παραπάνω νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στην αντίστοιχη αμινοξική πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα EXPASY (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>) (Εικ. 3.3). Δεδομένου του ότι η αλληλουχία που κλωνοποιήθηκε αντιστοιχούσε στο άγνωστο 5'-άκρο του *PnTOCI* cDNA, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η νουκλεοτιδική τριπλέτα atg του εκκινητή (Εικ.3.3, έντονη γραφή) αντιστοιχεί σε εναρκτήριο κωδικόνιο (αρχή μετάφρασης).

5'→3' Φορέας	εκκινητής TOCsoyaRCI	ένθεμα
ctcgcgctcgaaggccgggatcgatt	<b>cgatgtatttggcttccggc</b>	gaggagattaattttg
L A S R A G I D S	<b>M Y L A S G E E I N L</b>	
aatatagaaagtgggggtggaaatcatgggaagagtggatgggttcattgatagaagt		
N I E S G G G N H G K S G D G F I D R S		
aaggtgctggattttgttgtgctgataacgattccaacagttctcaagaggttttcacactt		
K V R I L L C D N D S N S S Q E V F T L		
cttttgggggtgttcttatcaggtgaccttagtaaaagtcgccgagacaggtaattgacgca		
L L G C S Y Q V T L V K S P R Q V I D A		
ctgaatgcagaggggcaacatataggtatcatactggctgaacttgaccttccaacaaaa		
L N A E G Q H I G I I L A E L D L P T K		
aagggcatgaagatgttgaagtacatagcacgggataaagagtttcgcagaatccctgtt		
K G M K M L K Y I A R D K E F R R I P V		
ataatgatgtccgcacaaagatgaggtatccgttgttgaagtgtgacttgagacttgagact		
I M M S A Q D E V S V V V K C L R L G A		
gctgactatctagtaaagcccttacgtactaatgaactattaatgttggatgcacatg		
A D Y L V K P L R T N E L L N L W M H M		
<b>tggggacggagg</b>	<b>(εκκινητής PnTOCup3)</b>	
W G R R		

**Εικ. 3.3.** Αποτελέσματα *in silico* μετάφρασης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που απεικονίζεται στην εικόνα 3.2, μέσω EXPASY (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>).

Επίσης, μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση ομοιότητας πρωτεϊνών με το πρόγραμμα BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Το πρόγραμμα αυτό παρέχει τη δυνατότητα σύγκρισης αμινοξικών αλληλουχιών με αντίστοιχες αμινοξικές αλληλουχίες πρωτεϊνών-προϊόντων γονιδίων, ήδη γνωστών και καταχωρημένων σε παγκόσμια βάση δεδομένων, καθώς και τα ποσοστά ομοιότητας των εν λόγω αλληλουχιών. Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας που προέκυψε παραπάνω από το πρόγραμμα EXPASY (αντίστοιχη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενθέματος κλώνου 0,467 Kb). Τα αποτελέσματα της σύγκρισης αλληλουχιών μέσω BLASTp παρατίθενται στη συνέχεια (Εικ. 3.4).

GENE ID: 836259 TOC1   <b>TOC1 (TIMING OF CAB1 1)</b> ; transcription regulator [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] (Over 10 PubMed links)			
Score = 227 bits (578), Expect = 2e-58, Method: Compositional matrix adjust.			
Identities = 110/134 (82%), Positives = 115/134 (85%), Gaps = 0/134 (0%)			
Query	22	KSGDGFIDRSKVRILLCDNDSNSSQEVFTLLGCSYQVTLVKSPRQVIDALNAEGQHIGI	81
		K GDGFIDRS+VRILLCDNDS S EVFTLL CSYQVT VKS RQVIDALNAEG I I	
Sbjct	8	KGGDGFIDRSRVRILLCDNDSSTSLGEVFTLLSECSYQVTAVKSARQVIDALNAEGPDIDI	67
Query	82	ILAEIDLPTKKGKMKMLKYIARDKEFRRIIPVIMMSAQDEVSVVVKCLRLGAADYLVKPLRT	141
		ILAE+DLP KGMKML+YI RDK+ RRIPVIMMS QDEV VVVKCL+LGAADYLVKPLRT	
Sbjct	68	ILAEIDLPMAGMKMLRYITRDKDLRRIPVIMMSRQDEVPPVVVKCLKLGAAADYLVKPLRT	127
Query	142	NELLNLWMMHWGRR	155
		NELLNLW HMW RR	
Sbjct	128	NELLNLWTHMWRRR	141
<b>gb AAQ73525.1  timing of CAB expression 1 [<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>]</b> Length=544			
Score = 227 bits (578), Expect = 2e-58, Method: Compositional matrix adjust.			
Identities = 107/142 (75%), Positives = 121/142 (85%), Gaps = 0/142 (0%)			
Query	14	ESGGGMHGKSGDGFIDRSKVRILLCDNDSNSSQEVFTLLGCSYQVTLVKSPRQVIDALN	73
		+ GG ++ + D FIDRSKVRILLCDNDS S +EVF LL CSYQVT V+S RQVIDALN	
Sbjct	10	DEGGPSNARGSDPFIDRSKVRILLCDNDSKSCCEEVFGLLSNCSYQVTAVRSARQVIDALN	69
Query	74	AEGQHIGIILAEIDLPTKKGKMKMLKYIARDKEFRRIIPVIMMSAQDEVSVVVKCLRLGAAD	133
		AEG I IIL+E+DLPTKKG+KMKMLKYI RD++ +RIPVIMMS QDEVSVVVKCLRLGAAD	
Sbjct	70	AEGPDIDIILSEVDLPTKKGKMKMLKYIMRDRDLQRIIPVIMMSAQDEVSLVVKCLRLGAAD	129
Query	134	YLVKPLRTNELLNLWMMHWGRR	155
		YLVKPLRTNE+LNLW HMW RR	
Sbjct	130	YLVKPLRTNEMNLWTHMWRRR	151

**Εικ. 3.4.** Αποτελέσματα σύγκρισης αμινοξικής αλληλουχίας που φαίνεται στην Εικόνα 3.3 με παγκόσμια βάση δεδομένων μέσω BLASTp (Identities=ποσοστό ταυτοσημότητας, Positives=ποσοστό ομοιότητας, Query=αλληλουχία φασολιού προς σύγκριση, Sbjct=γνωστή, καταχωρημένη αλληλουχία).

Στην παραπάνω στοίχιση (Εικ. 3.4), παρατηρείται μεγάλη ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία του τμήματος προς σύγκριση ('μεταφρασμένη' αλληλουχία κλωνοποιημένου τμήματος cDNA που αλληλουχήθηκε., Query) και των αμινοξικών αλληλουχιών που έχουν προέλθει από τα γονίδια *Timing of CAB expression 1 (TOC1)* του *A. thaliana* και *TOC1* του *Mesembryanthemum crystallinum* (Sbjct).

Συγκεκριμένα, η αλληλουχία του τμήματος προς σύγκριση είναι ταυτόσημη με την αντίστοιχη αλληλουχία του *TOC1* του *A. thaliana* κατά 82%. Εάν ληφθεί υπόψη και η αντιστοίχιση μεταξύ αμινοξέων με παρόμοιες ιδιότητες, το επίπεδο ομοιότητας ανεβαίνει στο 85%. Η ομοιότητα εκτείνεται από το 22<sup>ο</sup> μέχρι το 155<sup>ο</sup> αμινοξύ της αλληλουχίας προς σύγκριση και από το 8<sup>ο</sup> μέχρι το 141<sup>ο</sup> αμινοξύ της αλληλουχίας του *TOC1* του *A. thaliana*, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ομοιότητα των δύο τμημάτων βρίσκεται στο 5'-άκρο των αντίστοιχων γονιδίων, αλλά αυτό του φασολιού (τμήμα προς σύγκριση) έχει μεγαλύτερο 5'-άκρο σε σχέση με του *A. thaliana* (Εικ. 3.5). Πρέπει να αναφερθεί εδώ πως ως 1<sup>ο</sup> αμινοξύ για την αλληλουχία του φασολιού προς σύγκριση έχει ληφθεί η μεθειονίνη (M), η οποία αντιστοιχεί στο πρώτο κωδικόνιο atg της αλληλουχίας του ενθέματος που αλληλουχήθηκε εδώ (Εικ. 3.3, έντονη γραφή).



Το τμήμα προς σύγκριση (από το φασόλι) είναι κατά 75% ταυτόσημο με την αλληλουχία του TOC1 από το φυτό *M. crystallinum*. Συμπεριλαμβάνοντας και τις ομοιότητες μεταξύ αμινοξέων με παρόμοιες ιδιότητες, το ποσοστό ομοιότητας ανεβαίνει στο 85% (Εικ. 3.4). Επίσης, στην περίπτωση αυτή η ομοιότητα των δύο τμημάτων εκτείνεται περίπου στην ίδια θέση της αλληλουχίας (14°-155° αμινοξυ αλληλουχίας φασολιού και 10°-151° αμινοξυ αλληλουχίας *M. crystallinum*), υποδεικνύοντας ομοιότητα στο 5'-άκρο των αντίστοιχων γονιδίων από τα δύο φυτά.

	1				50
PvTOC1	MYLASGEEIN	LNIESGGGNH	GKSGDGFIDR	SKVRILLCDN	DSNSSQEVFT
AtTOC1	.....	...MDLNGE	CKGGDGFIDR	SRVRILLCDN	DSTSLGEVFT
Consensus	.....	...mdggn	cKGGDGFIDR	SrVRILLCDN	DsNslqEVFT
	51				100
PvTOC1	LLGCSYQVT	LVKSPRQVID	ALNAEGQHIG	IILAELDLPT	KKGMKMLKYI
AtTOC1	LLSECSYQVT	AVKSARQVID	ALNAEGPDID	IILAELDLPM	AKGMKMLRYI
Consensus	LLleCSYQVT	avKSaRQVID	ALNAEGqId	IILAEiDLPM	aKGMKMLrYI
	101				150
PvTOC1	ARDKEFRRI	VIMMSAQDEV	SVVVKCLRLG	AADYLVKPLR	TNELLNLMWH
AtTOC1	TRDKDLRRI	VIMMSRQDEV	PVVVKCLKLG	AADYLVKPLR	TNELLNLMWTH
Consensus	aRDk#lRRRI	VIMMSaQDEV	pVVVKCLrLG	AADYLVKPLR	TNELLNLMWmH
	151				200
PvTOC1	MWGRRMLGL	VEKNILSYEF	DIVASDPSDA	NTNSTLFS	DTDDKSKRSN
AtTOC1	MWRRRMLGL	AEKNMLSYDF	DLVGSQSDP	NTNSTLFS	DTDDRSLRST
Consensus	MWrRRMLGL	aEKNiLSY#F	DiVaSdQSDa	NTNSTnLFS	DTDDrSlRSn
	201				250
PvTOC1	NPEVGLPVQ	EQESSIA...	.....IGA	.....	.AVVEPLDAH
AtTOC1	NPQRGNLSHQ	ENEWSVATAP	VHARDGGLGA	DGTATSSLAV	TAIEPPLDHL
Consensus	NP#rGnlsqQ	E#EsS!A...	.....iGA	.....	.A!eePLDah
	251				300
PvTOC1	ASEHRPDVDG	FNDHRTAHFS	SGPKKSELRI	GESSAFFTCV	KASILKSNFE
AtTOC1	AGSHHEPMK	.RNSNPAQFS	SAPKKSRLLKI	GESSAFFTYV	KSTVLRITNGQ
Consensus	AgeHredmd.	.r#hrpAqFS	SaPKKSrLrI	GESSAFFTcV	Kas!LrsNg#
	301				350
PvTOC1	GVNVVDNNGA	AHVR..MEAM	HQACAQQGVN	DLQT..RENG	ETCESQSQDD
AtTOC1	DPPLVDGNGS	LHLHRGLAEK	FQVVASEG	NTKQARRATP	KSTVLRITNGQ
Consensus	dppnVDnNGa	aHlr..\$aak	hQacAq#G!N	#lqq..Rang	escelrs#d#
	351				400
PvTOC1	LPSCSSVPDS	LSIERSCTPP	ASMEVSP...	...QKHKDKN	...FHQGMVH
AtTOC1	DPPLVNGNGS	HHLHRGAAEK	FQVVASEG	NTKQAHRSRG	TEQYHSQGET
Consensus	dPpscngnds	hhieRgaaek	aqmeaSe...	...QaHrdn	...%Hqggeh
	401				450
PvTOC1	PRNGT...HC	SEHEVSGMAS	QHTYPY.YIS	GGFN..HVMM	PSS.....
AtTOC1	LQNGASYPHS	LERSRTLPTS	MESHGRNYQE	GNMNIPQVAM	NRSKDSSQVD
Consensus	lrNGa...Hc	lErersgmas	qeshgr.Yqe	GnmN..qVaM	nrS.....
	451				500
PvTOC1	.....AQ	MYHQKNMQDL	QNHSAAMIA	QYSH.LPQGG	P.HGTGMASF
AtTOC1	GSFGSAPNAY	PYYMHGVMNQ	VMMQSAAMMP	QYGHQIPHQC	PNHPNGMTGY
Consensus	.....Aq	mYhqhnmq#q	qnhqSAAMia	QYgH.iPqcq	P.HgnGMag%
	501				550
PvTOC1	PYY..PMSIC	LQPGQVPQP.	.....HSW	PSFGSSSSSE	AKLSKVDRRE
AtTOC1	PYYHHPMNTS	LQHSQMSLQN	GQMSMVHHSW	SPAGNPPSNE	VRVNLDRRE
Consensus	PYY..PMnic	LQhgQmpqq.	.....HSW	ppaGnppSnE	arlnKlDRRE
	551				600
PvTOC1	AALMKFRQKR	KERCDFKKIR	YVNRKRLAER	RPRVRGQ	FVRKLNANM
AtTOC1	EALLKFRKR	NQRCDFKKIR	YVNRKRLAER	RPRVKGQ	FVRKMNGVNV
Consensus	aAL\$KFRrKR	n#RCDFKKIR	YVNRKRLAER	RPRVrGQ	FVRK\$NGaNm
	601			637	
PvTOC1	DLNGQPASID	YDEDDDEEDE	DDQGARDSSP	EDA....	
AtTOC1	DLNGQPSAD	YDEEEEEEEE	EEENRDSSP	QDDALGT	
Consensus	DLNGQPASaD	YD####E#E	##e#eARDSSP	#Da....	

**Εικ. 3.5.** Σύγκριση και στοιχισή των αμινοξικών αλληλουχιών των PvTOC1 και AtTOC1. Κεφαλαία γράμματα: περιοχή ρυθμιστών-απόκρισης, Ροζ γράμματα: κρίσιμα αμινοξέα αλλαγμένα από Asp (D) στους αληθινούς ρυθμιστές απόκρισης σε Asn (N) ή Glu (E), Υπογραμμισμένα γράμματα: περιοχή CCT, πλάγια γράμματα στο C-άκρο: περιοχή AD (χαρακτηριστική μεταγραφικών ενεργοποιητών). (Σύμβολα: !: οποιοδήποτε από τα I V, \$: οποιοδήποτε από τα L, M, %: οποιοδήποτε από τα F, Y, #: οποιοδήποτε από τα N, D, Q, E, B, Z).

### 3.1.1. Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών PnTOC1 και AtTOC1

Αντίστοιχη επεξεργασία (μετάφραση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στην αντίστοιχη αμινοξική μέσω EXPASY) έχει πραγματοποιηθεί και στα δεδομένα από προηγούμενη ερευνητική εργασία του εργαστηρίου, όσον αφορά στο υπόλοιπο τμήμα του *PnTOC1* cDNA (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Συγκεντρώνοντας μαζί τα προηγούμενα δεδομένα και τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έγινε δυνατή η σύγκριση της συνολικής αναμενόμενης αλληλουχίας της πρωτεΐνης PnTOC1, όπως προέκυψε από μετάφραση μέσω EXPASY, με την αντίστοιχη του *A. thaliana* (AtTOC1). Η σύγκριση και στοίχιση των δύο αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε, στην περίπτωση αυτή με το πρόγραμμα Multalin [<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> (Corpet, 1988)] (Εικ. 3.5).

Από τη στοίχιση αυτή (Εικ. 3.5) προκύπτουν διάφορα συμπεράσματα. Αρχικά, το N-άκρο του PnTOC1 φαίνεται να είναι αρκετά μεγαλύτερο από το αντίστοιχο του AtTOC1. Συγκεκριμένα, το PnTOC1 είναι κατά 14 αμινοξικά κατάλοιπα μεγαλύτερο του AtTOC1. Στο PnTOC1 παρατηρείται μία περιοχή ρυθμιστών-απόκρισης παρόμοια με αυτή του AtTOC1. Τα κρίσιμα αμινοξέα τα οποία αλλάζουν από Asp (D), στους τυπικούς ρυθμιστές απόκρισης σε Asn (N) ή Glu (E) στους ψευδο-ρυθμιστές, είναι συντηρημένα μεταξύ των *P. vulgaris* και *A. thaliana*. Επίσης συντηρημένη είναι η περιοχή CCT (χαρακτηριστική των APRRs και γενικά των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας COL). Τέλος, στο C-άκρο τόσο του PnTOC1 όσο και του AtTOC1 παρατηρείται μία αμινοξική περιοχή (AD) χαρακτηριστική για μεταγραφικούς ενεργοποιητές.

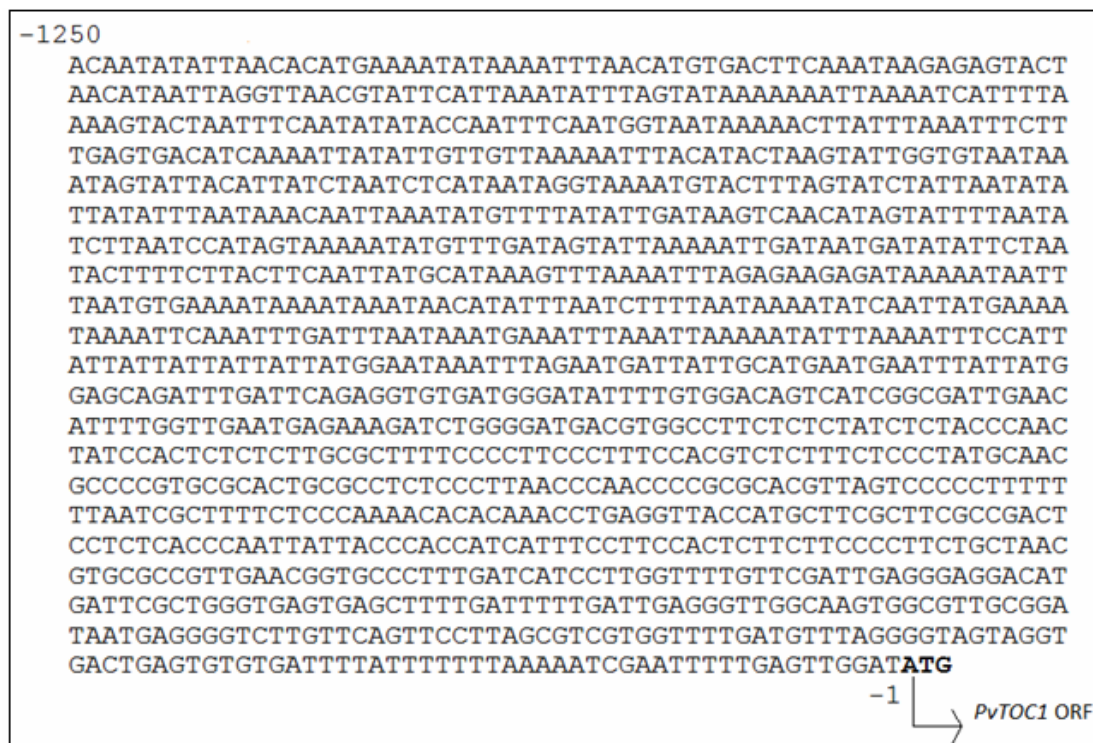
Η ολοκλήρωση της αλληλούχησης του cDNA του γονιδίου *PnTOC1*, έδωσε -εκτός των προαναφερθέντων- και το εφελτήριο για την απομόνωση του «υποκινητή» του γονιδίου (βλ. ενότ. 3.2). Οι πρώτοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του υποκινητή του *PnTOC1* (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, Πιν. 2.2), σχεδιάστηκαν από την πλέον γνωστή αλληλουχία του 5'-άκρου του cDNA του γονιδίου, του οποίου η απομόνωση περιγράφηκε στην παρούσα ενότητα.

### 3.2. Απομόνωση περιοχής του «υποκινητή» του γονιδίου *PnTOC1*

Από προηγούμενα ερευνητικά δεδομένα έχει φανεί ότι ακολουθούνται διαφορετικές στρατηγικές, αναφορικά με την απόκριση στο φως, ανάμεσα στα στοιχεία του ρολογιού PnLHY από το φασόλι και LHY από το *A. thaliana* (Kaldis *et al.*, 2003; Kaldis και Prombona, 2006). Όπως αναλύθηκε και νωρίτερα (βλ. Εισαγωγή, ενότ. 1.4.4) στον κεντρικό βρόγχο επανατροφοδότησης του κεντρικού ταλαντωτή του κερκαδικού ρολογιού του *A. thaliana* βρίσκεται και ο παράγοντας TOC1. Όσον αφορά τον ορθόλογό του παράγοντα από το φασόλι (PnTOC1) ο οποίος είναι και αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας, υπάρχουν ενδείξεις ότι αποκρίνεται θετικά σε φωτεινά ερεθίσματα τη νύκτα (Γαλέου, Πτυχιακή μελέτη, ΓΠΑ, 2009), κάτι που δεν έχει παρατηρηθεί στον AtTOC1. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ένα διαφορετικό μηχανισμό ελέγχου του βιολογικού ρολογιού ή μέρους αυτού στα δύο αυτά φυτικά είδη. Όπως ήδη αναφέρθηκε (βλ. ενότ. 1.8., Σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας), και ισχύει γενικά για όλα τα γονίδια, οι υποκινητές των γονιδίων του ρολογιού αποτελούν τα σημαντικότερα στοιχεία ελέγχου της έκφρασής τους, καθώς αυτοί κυρίως καθορίζουν υπό ποιές συνθήκες (φως, σκοτάδι [βλ. "απογευματινό" στοιχείο, evening element]) το γονίδιο θα εκφραστεί και σε τι επίπεδα (φάση του ρυθμού). Για να κατανοήσουμε λοιπόν τους μηχανισμούς που οδηγούν σε διαφορετική στρατηγική προσαρμογής των φυτών στη φωτοπερίοδο,

είναι απαραίτητο να μελετήσουμε τα ρυθμιστικά στοιχεία της έκφρασης των γονιδίων αυτών. Για το σκοπό αυτό προχωρήσαμε στην απομόνωση και ανάλυση της αλληλουχίας του «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1*.

Η απομόνωση μεγάλου μέρους της 5'-αμετάφραστης περιοχής του *PvTOC1* (5'-UTR), η οποία πιθανά να αντιστοιχεί στον υποκινητή του γονιδίου ή σε μέρος αυτού (η βιολογική επιβεβαίωση αναμένεται), πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της PCR με τη χρήση προσαρμοστή (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, ενότ. 2.3). Με τη μεθοδολογία αυτή απομονώθηκαν και αλληλουχήθηκαν 1250 ζεύγη βάσεων (bp) αναρροϊκά του κωδικονίου έναρξης του γονιδίου *PvTOC1* (Εικ. 3.6), περιοχή όπου αναμένονται να εδράζονται τα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία είναι υπεύθυνα για την έκφραση του (υποκινητής του γονιδίου).



**Εικ. 3.6.** Αλληλουχία (1250 bp) του υποκινητή του γονιδίου *PvTOC1*. Φαίνεται η αλληλουχία από τη θέση -1 μέχρι τη -1250. Ως θέση +1 ορίζεται η Αδενίνη (A) του κωδικονίου έναρξης (ATG, έντονη γραφή) του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης [Open Reading Frame (ORF)] του γονιδίου *PvTOC1*.

Για τη βιοπληροφορική (*in silico*) ανάλυση της διαθέσιμης αλληλουχίας του υποκινητή χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων plantCARE [<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>], (Lescot *et al.*, 2002)]. Η βάση δεδομένων αυτή περιέχει πληθώρα καταχωρήσεων *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων υποκινητών που έχουν βρεθεί να λειτουργούν σε διάφορα φυτικά είδη και παρέχει τη δυνατότητα στο χρήστη να ελέγξει μία δεδομένη νουκλεοτιδική αλληλουχία για πιθανά *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία σε αυτή. Με τον τρόπο αυτό ελέγχθηκε και η διαθέσιμη αλληλουχία του «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1* (Εικ. 3.6). Μερικά από τα πιο ενδιαφέροντα από τα πιθανά *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία που εντοπιστήκαν μέσω αυτής της ανάλυσης παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικ. 3.7).



**Εικ. 3.7.** Πιθανά *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία στον «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1*. Χρήση της βάσης δεδομένων plantCARE [<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>], (Lescot *et al.*, 2002)].

Από την παραπάνω εικόνα (Εικ. 3.7) φαίνεται πως στην αλληλουχία που έχει απομονωθεί από την 5'-UTR του γονιδίου *PvTOC1* εδράζονται αρκετά μοτίβα (*cis*-ρυθμιστικά στοιχεία) τα οποία έχουν δείχθει να λειτουργούν σε υποκινητές γονιδίων διαφόρων φυτικών ειδών. Αρχικά, εντοπίστηκαν δύο αλληλουχίες-πιθανά «απογευματινά στοιχεία» (Evening Elements, συγκεκριμένα οι αλληλουχίες AAATATCT και AAAATATC, βλ. Εικ. 3.7) τα οποία έχουν βρεθεί ότι λειτουργούν ως «απογευματινά στοιχεία» σε υποκινητές ρυθμικών γονιδίων από το φυτό *A. thaliana* (Michael *et al.*, 2008b), οδηγώντας την έκφρασή τους ώστε να παρουσιάζει το μέγιστο της έκφρασης το απόγευμα. Πιθανά, στα στοιχεία αυτά να οφείλεται και η ύπαρξη μέγιστων επιπέδων έκφρασης κατά τις απογευματινές ώρες και στο *PvTOC1* (Γαλέου, Πτυχιακή μελέτη, ΓΠΑ 2009).

Εκτός των «απογευματινών στοιχείων», στην αλληλουχία αυτή εντοπίστηκαν και άλλα πιθανά *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία, όπως για παράδειγμα το «στοιχείο-HUD» (HUD element, CACATG, Εικ. 3.7). Το στοιχείο αυτό έχει αναφερθεί ότι βρίσκεται, σε αρκετές επαναλήψεις, σε υποκινητές γονιδίων από φυτά, τα οποία εκφράζονται ρυθμικά και μάλιστα σχετίζονται με την επαγωγή τους από φυτορμόνες (Michael *et al.*, 20008a; Priest *et al.*, 2009). Στον παράγοντα TOC1 του *A. thaliana* έχει αναφερθεί ήδη μία περίπτωση συσχέτισης της γονιδιακής του έκφρασης με φυτορμόνες και συγκεκριμένα με το αψισικό οξύ-ABA (Legnaioli *et al.*, 2009). Πιθανά το στοιχείο αυτό στον «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1* να εμπλέκει και τον παράγοντα *PvTOC1* από το φασόλι σε κάποια αλληλεπίδραση με μονοπάτια που σχετίζονται με φυτορμόνες. Επίσης, το στοιχείο-Hex (Hex element, TGACGTGG, Εικ. 3.7) έχει ταυτοποιηθεί και στο *A. thaliana* και αναφέρεται ότι ενέχεται στην επαγωγή της έκφρασης από φωτεινά σήματα (Michael και McClung, 2002). Πιθανόν η απόκριση σε φωτεινά ερεθίσματα που έχει παρατηρηθεί στον παράγοντα *PvTOC1* (Γαλέου, Πτυχιακή εργασία ΓΠΑ, 2009) να σχετίζεται με την ύπαρξη αυτού του στοιχείου στον «υποκινητή» του.



Από τα παραπάνω παρατηρούμε πως στην 5'-UTR του γονιδίου *PvTOC1* εδράζονται αρκετά πιθανά *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία, με λειτουργίες ίσως παρόμοιες αλλά ίσως και διαφορετικές από τα μέχρι τώρα αναφερθέντα για τον παράγοντα AtTOC1. Συμπερασματικά, το απομονωμένο τμήμα DNA μήκους 1250 ζευγών βάσεων από την 5'-αμετάφραστη περιοχή, πιθανότατα να λειτουργεί ως υποκινητής ή να αποτελεί τμήμα του υποκινητή του γονιδίου *PvTOC1*.

### 3.3. Κλωνοποίηση τμήματος του «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1* σε φορέα έκφρασης

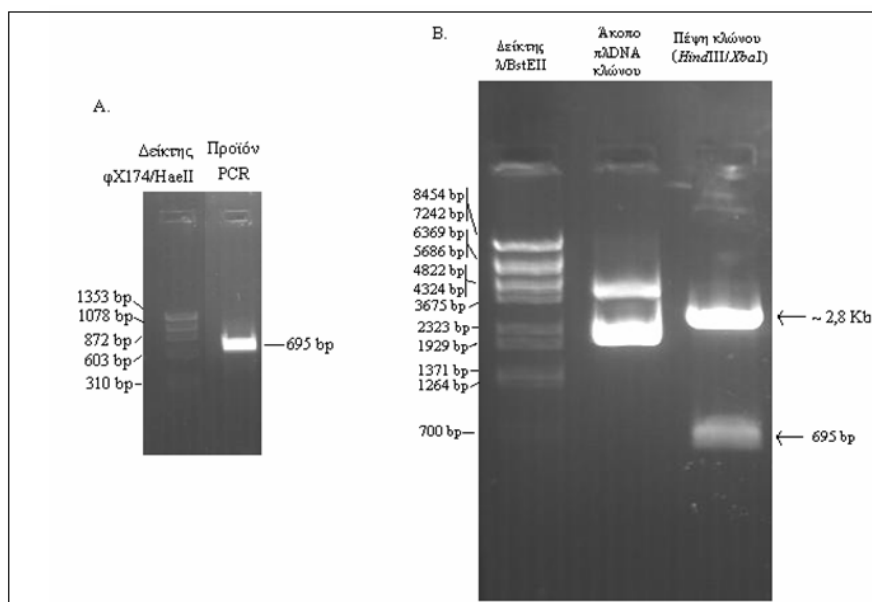
Αφού ολοκληρώθηκε η αλληλούχηση της 5' αμετάφραστης περιοχής (5'-UTR) του γονιδίου *PvTOC1*, η οποία εικάζεται ότι περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου (βλ. ενότ. 3.2), προχωρήσαμε στην κλωνοποίηση ενός τμήματος της αλληλουχίας αυτής σε φορέα έκφρασης, ώστε να μελετηθεί η λειτουργία του. Αρχικά, επιλέχθηκε το τμήμα της αλληλουχίας το οποίο περιέχει τα πιθανά «απογευματινά στοιχεία» (EE-evening elements), αλλά όχι τα άλλα πιθανά *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία (π.χ. τα HUD και Hex), ώστε να διαπιστωθεί για κάθε ένα από τα ταυτοποιημένα στοιχεία ξεχωριστά η λειτουργικότητά τους (Εικ. 3.8). Η ίδια μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση αυτού του τμήματος του «υποκινητή», μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά και για την κλωνοποίηση άλλων τμημάτων τη λειτουργία των οποίων επιθυμούμε να μελετήσουμε. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, ενότ. 2.4). Το επιθυμητό τμήμα DNA από τον «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1* απομονώθηκε μέσω PCR από γενωμικό DNA από φύλλα φασολιού, χρησιμοποιώντας εκκινητές στα άκρα των οποίων είχαν προστεθεί οι θέσεις περιορισμού των ενζύμων *Hind*III και *Xba*I. Οι συγκεκριμένες θέσεις περιορισμού επιλέχθηκαν για τη στοχευμένη κλωνοποίηση του τμήματος DNA στον φορέα έκφρασης pBI221-Luc (βλ. Υλικά και μέθοδοι, ενότ. 2.4).



**Εικ. 3.8.** Αλληλουχία του «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1*. Ως θέση +1 ορίζεται η A του κωδικονίου έναρξης του (ORF) του γονιδίου. Σημειώνεται το προϊόν PCR που προκύπτει με εκκινητές τους priHind-F και priXba-R (σε τετράγωνα).

Στην εικόνα 3.8 φαίνεται το τμήμα του «υποκινητή» που επιλέχτηκε για ενίσχυση ως προϊόν της εν λόγω PCR. Οι θέσεις που υβριδίζουν οι εκκινητές έχουν σημειωθεί σε τετράγωνα και είναι εμφανές πως με τον τρόπο αυτό απομονώνεται το κομμάτι του «υποκινητή» που περιέχει μόνο τα «απογευματινά στοιχεία» (μπλε χρώμα), αλλά όχι π.χ. τα στοιχεία HUD (μωβ) ή Hex (πράσινο).

Το τμήμα DNA μήκους 695 bp που ενισχύθηκε μέσω της PCR (Εικ. 3.9.A) εισήχθη, αρχικά, στον ενδιάμεσο φορέα κλωνοποίησης για προϊόντα PCR (T-vector) pTZ57R/T (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, ενότ. 2.4.1). Ο ανασυνδυασμένος φορέας εισήχθη στη συνέχεια σε βακτήρια *E. coli* και οι κλώνοι που προέκυψαν ελέγχθηκαν μέσω πέψης του πλασμιδιακού DNA τους με τα περιοριστικά ένζυμα *Hind*III και *Xba*I. Το αποτέλεσμα της πέψης για έναν από τους θετικούς κλώνους φαίνεται παρακάτω στην εικόνα 3.9.B. Πρέπει να σημειωθεί πως τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν, κόβουν εκτός από το ένθεμα (το καθένα στη μία άκρη του ενθέματος) και το φορέα pTZ57R/T (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, Εικ. 2.1), καθώς περιέχονται στην MCS (multiple cloning site) στην οποία εισάγεται και το PCR προϊόν. Συγκεκριμένα, κόβουν εκατέρωθεν του ενθέματος, αλλά σε πολύ μικρή απόσταση από τη θέση εισαγωγής του (μερικά ζεύγη βάσεων). Κατά συνέπεια, από τη συγκεκριμένη πέψη δημιουργούνται μόνο δύο ζώνες, που αντιστοιχούν η μεγαλύτερη στο φορέα (2886 bp) και η μικρότερη στο ένθεμα (τμήμα υποκινητή *PvTOC1*, 695 bp) (Εικ. 3.9.B). Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται πως η κλωνοποίηση του τμήματος του υποκινητή του *PvTOC1* ήταν επιτυχής. Για εξακρίβωση του παραπάνω αποτελέσματος ο εν λόγω κλώνος αλληλουχίστηκε με εκκινητή (T7) ο οποίος υβριδίζει στο φορέα λίγο πριν τη θέση εισαγωγής του ενθέματος (Εικ. 3.10). Από την αλληλούχηση επαληθεύτηκε πως στο φορέα pTZ57R/T είχε κλωνοποιηθεί το αναμενόμενο τμήμα του «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1* (Εικ. 3.10).

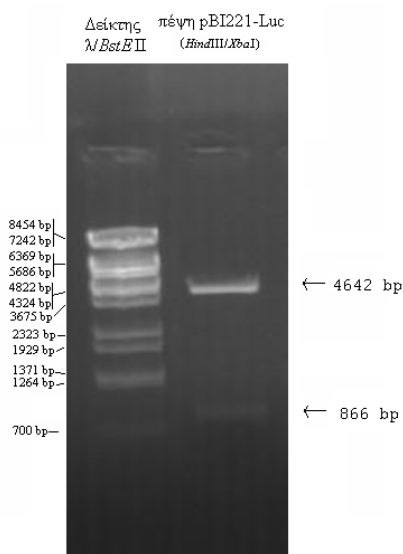


**Εικ. 3.9.** Α) Προϊόν PCR από γενωμικό DNA με εκκινητές τους priHind-F και priXba-R (διαδρομή 2, 695bp). Η πρώτη διαδρομή αντιστοιχεί στο δείκτη φX174/*Hae*III. Β) Πέψη πλασμιδιακού DNA κλώνου [pTZ57R/T + τμήμα «υποκινητή» *PvTOC1*] με τα περιοριστικά ένζυμα *Hind*III και *Xba*I (διαδρομή 3). Η πρώτη διαδρομή αντιστοιχεί στο δείκτη λ/*Bst*EII, και η δεύτερη στο αντίστοιχο άκοπο πλασμιδιακό DNA.

φορέας pTZ57R/T priHind-F  
 CGYYWYSΔgGCTCTGcaGTGCGACGGGCCCGGGATCCGATTCC**CAAGCTTACATAATTAGG**  
**TTAACGTAATTCAT**TAAATATTTARAAWAAAAAAAAATAAAAATCATTTTAAAAAGTACTAATT  
 TCAATATATACCAAATTTCAAATGGTAAATAAAAACTTATTTAAATTTCTTTGAGTGACATCA  
 AAAATTATATTGTTGTTAAAAATTTACATACATAAGTATTGGTGTAAWAAATAGTATTACAT  
 TATCTAAATCTCATAAATAGGTAAAAATGTACTTTAGTATCTATTAATATATTATATTAAATA  
 AACAAATTAATATGTTTTATATTGATAAGTCAACATAKTATTTTAAATATCTTAAATCCATA  
 RTAAAAATATGTTTGTATAGTATTAAAAATGATAAATGATAATTTCTAATACTTTCTTAC ένθεμα  
 TTCAAATATGCATAAAAGTTTAAAAATTTAGAGAAAGAGATAAAAAATAATTTAATGTGAAAAAT  
 AAAATAAAATAACATATTTAAATCTTTTAAATAAAAAATATCAAATTATGAAAAATAAAATTCAAAT  
 TTGATTTAAATAAAATGAAAATTTAAATTAAAAAATTTTAAATTTCCATTATTATTATTATT  
 ATTATGGAAATAAATTTAGAAATGATTATTGCATGAATGAATTTATTATGGAGCAGATTTGA  
 TTCAGAGGTGTGATGGGATATTTGTGGACAGTCATCGCGGATT**GAA**CATT**TGGTTGAA**  
**TGAGAAATCTAGAGCA**AAATCTAGATGCATTGCGGAGGTACCGAGCTCGAATTCACTGGCCG  
 priXba-R φορέας pTZ57R/T

**Εικ. 3.10.** Αλληλουχία του ενθέματος του κλώνου [pTZ57R/T + τμήμα «υποκινητή» PnTOC1]. Φαίνεται η νοηματική αλληλουχία με εκκινητή T7.

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην κλωνοποίηση του τμήματος DNA που αντιστοιχεί στο τμήμα του «υποκινητή» του *PnTOC1*, η οποία προέκυψε από την παραπάνω πέψη (βλ. Εικ. 3.9.B, ζώνη των 695 bp) στο φορέα έκφρασης pBI221-Luc, ο οποίος περιέχει το γονίδιο της λουσιφεράσης ως γονίδιο αναφοράς υπό τον έλεγχο του υποκινητή 35S (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, Εικ. 2.2 και Εικ. 2.3). Προκειμένου να μελετηθεί το τμήμα του υποψηφίου *PnTOC1* υποκινητή, πρέπει να αντικατασταθεί ο 35S υποκινητής με το υπό μελέτη τμήμα. Γι' αυτό το σκοπό έγινε πέψη του pBI221-Luc με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα (*HindIII* και *XbaI*), τα οποία κόβουν τον εν λόγω φορέα σε δύο κομμάτια. Το προϊόν της πέψης (Εικ. 3.11) που αντιστοιχεί στο φορέα pBI221-Luc από τον οποίο έχει αφαιρεθεί ο 35S (4642 bp) εξήχθη από την πηκτή και καθαρίστηκε. Τα δύο τμήματα DNA -το τμήμα του «υποκινητή» του *PnTOC1* και ο φορέας pBI221-Luc χωρίς τον 35S- έχουν συμπληρωματικά άκρα *HindIII* και *XbaI*. Έτσι, πραγματοποιήθηκε συνένωση αυτών των δύο τμημάτων για την απόκτηση ανασυνδυασμένου φορέα pBI221-Luc στον οποίο η έκφραση της λουσιφεράσης καθοδηγείται από το επιλεγμένο τμήμα του *PnTOC1* «υποκινητή». Το προϊόν της αντίδρασης συνένωσης (ligation, βλ. Υλικά και Μέθοδοι, ενότ. 2.4.4) εισήχθη σε βακτήρια *E. coli* και υπολείπεται η ανάλυση των κλώνων για την απόκτηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.



**Εικ. 3.11.** Πέψη πλασμιδιακού DNA από το φορέα pBI221-Luc με τα περιοριστικά ένζυμα *HindIII* και *XbaI* (διαδρομή 2). Η διαδρομή 1 αντιστοιχεί στο δείκτη *N.BstEII*.

Ο φορέας αυτός (pBI221 Luc+τμήμα «υποκινητή» *PvTOC1*) κατασκευάζεται με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως σύστημα αναφοράς για τη μελέτη της λειτουργίας του τμήματος του υποκινητή το οποίο, πλέον, θα οδηγεί την έκφραση του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης (LUC). Έτσι, επιμολύνοντας κατάλληλο κυτταρικό σύστημα (πρωτοπλάστες, βλ. παρακάτω, ενότ. 3.4) με το φορέα αυτό θα μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για τη λειτουργικότητα του υποψήφιου υποκινητή, δηλ. το κατά πόσον ή κάτω από ποιά συνθήκη αυτός λειτουργεί.

Με την παραπάνω μεθοδολογία μπορούν να κλωνοποιηθούν μελλοντικά και άλλα τμήματα της μέχρι τώρα διαθέσιμης αλληλουχίας του *PvTOC1* «υποκινητή», στη θέση του 35S στο φορέα pBI221-Luc, ώστε να μελετηθεί η λειτουργία όλων των επιμέρους στοιχείων του.

### 3.4. Κατασκευή συστήματος αναφοράς για τη μελέτη του *PvTOC1* «υποκινητή»

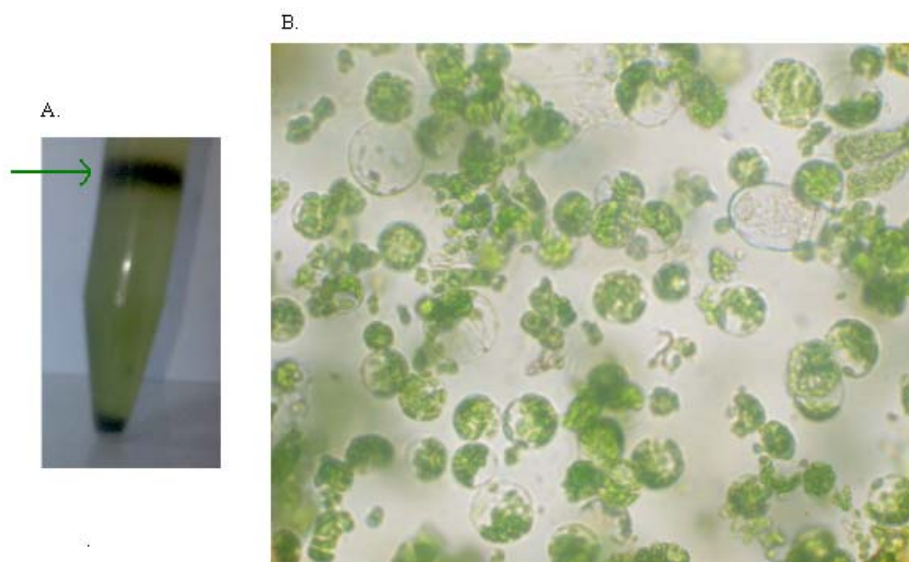
#### 3.4.1. Απομόνωση πρωτοπλαστών από φύλλα φασολιού

Το σύστημα αναφοράς των πρωτοπλαστών από φύλλα φασολιού κατασκευάστηκε με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των ρυθμιστικών στοιχείων του «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1* (βλ. ενότ. 3.4). Οι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν μέσω πέψης με κατάλληλα κυτταρινολυτικά και πηκτινολυτικά ένζυμα από πρωτογενή φύλλα φασολιού. Για το διαχωρισμό των άθικτων πρωτοπλαστών, από τους σπασμένους και τα κυτταρικά θραύσματα πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμές. Δοκιμάστηκε η επίπλευση σε διάλυμα διαβαθμισμένης συγκέντρωσης σακχαρόζης (sucrose gradient). Από τις δοκιμές αυτές βρέθηκε ότι οι άθικτοι πρωτοπλάστες επέπλεαν σε διάλυμα σακχαρόζης 1M, αφήνοντας τους σπασμένους πρωτοπλάστες και τα κυτταρικά θραύσματα να το διαπεράσουν (Εικ. 3.12). Έτσι, ο διαχωρισμός των άθικτων πρωτοπλαστών πραγματοποιήθηκε επιτυχώς μέσω επίπλευσης σε διάλυμα σακχαρόζης 1M (Εικ. 3.13.A). Η παχιά ζώνη που σχηματίζεται πάνω από τη φάση της σακχαρόζης αντιστοιχεί στους άθικτους πρωτοπλάστες και το ίζημα στα κυτταρικά θραύσματα και τους σπασμένους πρωτοπλάστες. Η παρατήρηση των πρωτοπλαστών γίνεται σε οπτικό μικροσκόπιο (Εικ. 3.13.B). Η σφαιρική μορφή των πρωτοπλαστών είναι ένδειξη βιωσιμότητας αυτών (Εικ. 3.13.B).



**Εικ. 3.12.** Επίπλευση πρωτοπλαστών σε διάλυμα διαβαθμισμένης συγκέντρωσης σακχαρόζης (sucrose gradient)





**Εικ. 3.13.** Απομόνωση πρωτοπλαστών από φύλλα φασολιού. Α) Καθαρισμός πρωτοπλαστών μέσω επίπλευσης σε διάλυμα σακχαρόζης 1M. Η ζώνη πάνω από τη φάση της σακχαρόζης (βέλος) αντιστοιχεί στους άθικτους πρωτοπλάστες (βέλος). Β) Πρωτοπλάστες από φύλλα φασολιού. Παρατήρηση σε απλό μικροσκόπιο φθορισμού (μεγέθυνση 100X).

Για τη διατήρηση των άθικτων πρωτοπλαστών δοκιμάστηκε μία ποικιλία διαλυμάτων (Πιν. 3.1) και επιλέχθηκε το διάλυμα στο οποίο παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη βιωσιμότητα πρωτοπλαστών για 48 ώρες. Έτσι, επιλέχθηκε το διάλυμα μαννιτόλης (0,4M μαννιτόλη, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ), στο οποίο οι πρωτοπλάστες διατηρούνται σε καλή κατάσταση για τουλάχιστον 48 ώρες (~90% ζωντανοί). Στις 72 ώρες παρατηρούνται περισσότεροι νεκροί πρωτοπλάστες (<70% ζωντανοί) και την τέταρτη ημέρα περισσότεροι από τους μισούς ήταν νεκροί. Οι 48 ώρες, όμως, στις οποίες παραμένουν στην πλειοψηφία τους (~90%) ζωντανοί είναι αρκετές για τα πειράματα παροδικού μετασχηματισμού για τα οποία προορίζονται. Το ίδιο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε και ως διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης στη συνέχεια (βλ. ενότ 3.4.2).

**Πίνακας 3.1.** Βιωσιμότητα πρωτοπλαστών σε διάφορα διαλύματα διατήρησης στο δεύτερο 24ωρο (48 ώρες μετά την απομόνωση).

Διάλυμα διατήρησης	Ποσοστό ζωντανών πρωτοπλαστών <sup>(*)</sup>
0,4 M μαννιτόλη, 5mM $\text{CaCl}_2$	90 %
0,4 M μαννιτόλη, 5 mM $\text{CaCl}_2$ , 5 mM Mes pH 5,7	70-80 %
5 mM γλυκόζη, 150 mM NaCl, 125 mM $\text{CaCl}_2$ , 5 mM KCl, 2 mM Mes pH 5,7	50 %
0,4 M σορβιτόλη, 5 mM $\text{CaCl}_2$ , 5 mM Mes pH 5,7	60 %

<sup>(\*)</sup> Ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας των πρωτοπλαστών έγινε μέσω χρώσης με trypan blue και μέτρησης σε αιματοκυτταρόμετρο.

#### 3.4.2. Ηλεκτροδιάτρηση πρωτοπλαστών

Για τον παροδικό μετασχηματισμό των πρωτοπλαστών με πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation). Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ηλεκτροδιάτρησης (χωρίς την προσθήκη DNA) για τον

καθορισμό του εύρους της τάσης του παλμού (Volts) που μπορεί να εφαρμοστεί στο διάλυμα πρωτοπλαστών ώστε να παραμείνουν οι περισσότεροι πρωτοπλάστες ζωντανοί (Πιν. 3.2). Οι συνθήκες οι οποίες επιλέχθηκαν από τις δοκιμές αυτές για τα μετέπειτα πειράματα μετασχηματισμού, ήταν αυτές των 50 V και των 100 V, όπου παρατηρήθηκε και η μικρότερη θνησιμότητα (Πιν. 3.2).

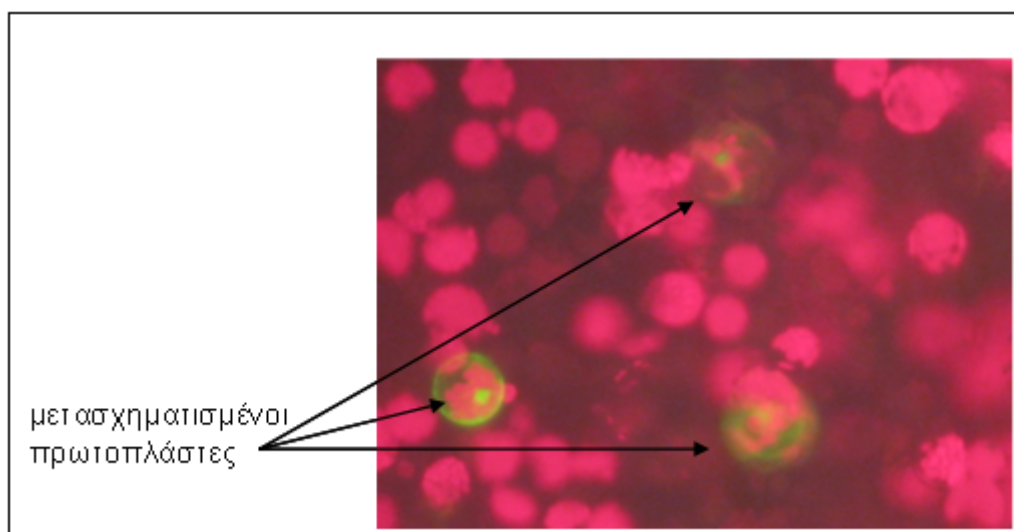
**Πιν. 3.2.** Δοκιμές τάσης παλμού για την ηλεκτροδιάτρηση πρωτοπλαστών φασολιού.

Τάση παλμού (V)	Ποσοστό ζωντανών πρωτοπλαστών φασολιού <sup>(*)</sup>
50	90 %
100	70 %
150	30 %
200	10 %
300	όλοι νεκροί

<sup>(\*)</sup> Ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας των πρωτοπλαστών έγινε μέσω χρώσης με trypan blue και μέτρησης σε αιματοκυτταρόμετρο.

Έγινε χρήση της συσκευής ηλεκτροδιάτρησης ECM<sup>®</sup>399 (BTX<sup>®</sup> Harvard Apparatus, Η.Π.Α.)

Στις δύο συνθήκες με τα μικρότερα ποσοστά θνησιμότητας πρωτοπλαστών (50 και 100V), πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός πρωτοπλαστών με το πλασμίδιο pSAT-GFP που εκφράζει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), η οποία ανιχνεύεται με σχετική ευκολία σε μικροσκόπιο φθορισμού. Η περίπτωση στην οποία παρατηρήθηκε επιτυχής μετασχηματισμός πρωτοπλαστών ήταν στα 100 V, αλλά σε μικρό ποσοστό (<10%). Στην εικόνα 3.13 παρουσιάζονται παροδικά μετασχηματισμένοι πρωτοπλάστες. Η GFP φθορίζει με πράσινο χρώμα όταν διεγείρεται με UV (υπεριώδες) φως, ενώ το κόκκινο χρώμα οφείλεται στον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης. Παρά το έντονο κόκκινο χρώμα, η έκφραση της GFP φαίνεται να είναι σε αρκετά υψηλά επίπεδα, ώστε να είναι εμφανής ο μετασχηματισμός των πρωτοπλαστών και στο μικροσκόπιο (Εικ. 3.14).



**Εικ. 3.14.** Πρωτοπλάστες από φύλλα φασολιού όπως φαίνονται σε μικροσκόπιο φθορισμού (μεγέθυνση 100X). Οι μετασχηματισμένοι πρωτοπλάστες που εκφράζουν την GFP φθορίζουν πράσινοι και έχουν σημειωθεί με βέλος. Το κόκκινο χρώμα οφείλεται στον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης.

Παρά το μικρό ποσοστό μετασχηματισμού, το γεγονός ότι παρατηρήθηκαν μετασχηματισμένοι πρωτοπλάστες είναι μία πολύ θετική παρατήρηση, δεδομένου του ότι το φασόλι είναι ένα δύσκολο ως προς το μετασχηματισμό του φυτό (Cadle-Davidson και Jahn, 2005). Η απόδοση αυτή είναι πιθανόν να επιδέχεται βελτιστοποίηση, με διάφορους χειρισμούς οι οποίοι εφαρμόζονται σε άλλα φυτικά είδη. Για παράδειγμα θα μπορούσε να εφαρμοστεί θερμικό σοκ στους πρωτοπλάστες πριν την ηλεκτροδιάτρηση. Επίσης, μία άλλη πιθανότητα είναι να βοηθήσει η εφαρμογή περισσοτέρων του ενός παλμών (των 100 V) ή ακόμα και η προσθήκη DNA-φορέα (π.χ. salmon sperm DNA). Όλες αυτές οι δοκιμές σχεδιάζεται να εφαρμοστούν στο άμεσο μέλλον.

Το σύστημα των πρωτοπλαστών που κατασκευάστηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του «υποκινητή» του γονιδίου *PvTOC1*, μετασχηματίζοντας τους πρωτοπλάστες με το φορέα έκφρασης στον οποίο βρίσκεται το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του τμήματος του *PvTOC1* «υποκινητή» προς μελέτη (βλ. ενοτ. 3.3). Παρόμοια μεθοδολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη και άλλων τμημάτων του εν λόγω ή και άλλων υποκινητών από γονίδια του ρολογιού του φασολιού.

### 3.5. Σύνοψη

Συνοψίζοντας, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να κατασκευαστεί ένα σύστημα αναφοράς σε πρωτοπλάστες φασολιού για τη μελέτη του υποκινητή ενός φωτοπεριοδικού γονιδίου του φασολιού, του *PvTOC1*. Για την πραγματοποίηση αυτού του σκοπού, απομονώθηκε, αρχικά, το 5'-άκρο του cDNA του γονιδίου *PvTOC1*. Αυτό απετέλεσε το πρώτο βήμα για την απομόνωση της 5'-αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου, δηλαδή της περιοχής του υποκινητή του *PvTOC1* μήκους 1250 ζευγών βάσεων. Η αλληλουχία που προέκυψε αναλύθηκε *in silico* και εντοπίστηκε σε αυτή σημαντικός αριθμός *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων, τα οποία πιθανά να ευθύνονται για τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου υπό διαφορετικές συνθήκες. Τμήμα της αλληλουχίας του «υποκινητή» κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης, έτσι ώστε να μπορεί να μελετηθεί η λειτουργία των ρυθμιστικών στοιχείων που εμπεριέχει. Τέλος, κατασκευάστηκε ένα σύστημα αναφοράς πρωτοπλαστών από φύλλα φασολιού, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη λειτουργική μελέτη του τμήματος του *PvTOC1* «υποκινητή» που έχει κλωνοποιηθεί σε φορέα έκφρασης (τροποποιημένος pBI221-Luc). Αυτή η μεθοδολογία μπορεί να εφαρμοστεί και για τη μελέτη και άλλων τμημάτων του «υποκινητή» του *PvTOC1*, αλλά και άλλων γονιδίων του ρολογιού του φυτού.

Όπως αναλύθηκε εκτενώς και στην εισαγωγή της εργασίας, το βιολογικό ρολόι ρυθμίζει διάφορες πτυχές της φυσιολογίας και της ανάπτυξης των φυτών. Ένα καλά ρυθμισμένο -με το εξωτερικό του περιβάλλον- ενδογενές βιολογικό ρολόι παρέχει στα φυτά προσαρμοστικά πλεονεκτήματα. Αφού στο φασόλι έχουν βρεθεί διαφορές ως προς την απόκριση σε φωτεινά ερεθίσματα σε σχέση με το ευρέως μελετούμενο πειραματόφυτο *A. thaliana*, η μοριακή ανάλυση των ρυθμιστικών στοιχείων γονιδίων του ρολογιού του φασολιού μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες ως προς τις διαφορετικές στρατηγικές προσαρμογής στο εξωτερικό περιβάλλον. Η αξιοποίηση τέτοιων μοριακών μελετών μπορεί να οδηγήσει σε βελτιωμένες αποδόσεις, το οποίο αποτελεί και κύριο στόχο της γενετικής βελτίωσης πολλών καλλιεργούμενων ειδών.

## 4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe M., Kobayashi Y., Yamamoto S., Daimon Y., Yamaguchi A., Ikeda Y., Ichinoki H., Nogaguchi M., Goto K., Araki T.; 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309:1052-1056.
- Alabadi D., Oyama T., Yanovsky M.J., Harmon F.G., Más P. and Kay S.A.; 2001. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 293:880-883.
- Alabadi D., Yanovsky M.J., Más P., Harmer S.L., Kay S.A.; 2002. Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Current Biology* 12:757-761.
- Asakura Y., Hagino T., Ohta Y., Aoki K., Yonekura-Sakakibara K., Deji A., Yamaya T., Sugiyama T., Sakakibara H.; 2003. Molecular characterization of His-Asp phosphorelay signaling factors in maize leaves: implications of the signal divergence by cytokinin-inducible response regulators in the cytosol and the nuclei. *Plant Mol. Biol.* 52:331-341.
- Barak S., Tobin E.M., Andronis C., Sugano S., Green R.M.; 2000. All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. *Trends Plant Sci.* 5:517-522.
- Borthwick H.A., Hendricks S.B., Parker M.W., Toole E.H., Toole V.K.; 1952. A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38:662-666.
- Bünning E.; 1936. Die endogene Tagerhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Ber Dtsch. Ges.* 54: 590-607.
- Cadle M.M. and M.M. Jahn; 2005. Resistance confers against bean common mosaic virus by the incompletely dominant I locus of *Phaseolus vulgaris* is active at the single cell level. *Arch. Virol.* 150:2601-2608.
- Christie J.M. and Briggs W.R.; 2001. Blue light sensing in higher plants. *J. Biol. Chem.* 276:11457-11460.
- Clark, J.M.; 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases, *Nucl. Acids Res.*, 16:9677-9686.
- Clough R.C., Vierstra R.D.; 1997. Phytochrome degradation. *Plant Cell Environ.* 20:713-721.
- Corpet F.; 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16(22): 10881-10890.
- Cuin T.-A.; 2007. Rhythms in Plants: Phenomenology, Mechanisms, and Adaptive Significance. Molecular aspects of the *Arabidopsis* circadian clock. S, Mancuso and Shabala (Eds.), © Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Daniel X., Sugano S., Tobin E.M.; 2004. CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for its circadian oscillation function in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101:3292-3297.
- Devlin P.F.; 2002. Signs of time: environmental input to the circadian clock. *Journal of Experimental Botany*; 53:1535-1550.
- Ding Z., Doyle M.R., Amasino R.M., Davis S.J.; 2007. A complex genetic interaction between *Arabidopsis thaliana* TOC1 and CCA1/LHY in driving the circadian clock and in output regulation. *Genetics* 176:1501-1510.
- Dodd A.N., Salathia N., Hall A., Tóth E.-K., Nagy F., Hibberg J.M., Millar A.J., Webb A.A.R.; 2005(a). Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival and competitive advantage. *Science* 309 630-633.
- Dodd A.N. Love J. Webb A.A.R.; 2005(b). The plant clock shows its metal: the circadian regulation of cytosolic free Ca<sup>2+</sup>. *Trends Plant Sci.* 10:15-21.
- Dunlap J.C.; 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96:271-290.
- Edwards K.D., Anderson P.E., Hall A., Salthia N.S., Locke J.C.W., Lynn J.R., Straume M., Smith J.Q., Millar A.J.; 2006. FLOWERING LOCUS C mediates natural variation in the high-temperature response of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 18:639-650.
- Engelmann W.; 2007. Rhythms in Plants: Phenomenology, Mechanisms, and Adaptive Significance. How plants identify season by using a circadian clock. S, Mancuso and Shabala (Eds.) © Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Folta K.M.; 2004. Green light stimulates early stem elongation, antagonizing light-mediated growth inhibition. *Plant Physiol.* 135:1407-1416.
- Gardner M.J., Dodd A.N., Hotta C.T., Sanders D, Webb A.A.R.; 2005. Circadian regulation of Ca<sup>2+</sup> signalling. *Annu. Plant Rev.* 21:191-210.
- Gardner M.J., Hubbard K.E., Hotta C.T., Dodd A.N., Webb A.A.R.; 2006. How plants tell the time. *Biochem. J.* 397:15-24.
- Graf A., Schlereth A., Stitt M. and Smith A.M.; 2010. Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *PNAS* 107:9458-9463.

- Graf A. and Smith A.M.; 2011. Starch and the clock: the dark side of plant productivity. *Trends in Plant Science* 16(3):1-7.
- Green R.M., Tingay S., Wang Z.Y., Tobin E.M.; 2002. Circadian rhythms confer higher level of fitness to *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.* 129:576-584.
- Harmer S.L., Hogenesch L.B., Straume M., Chang H.S., Han B., Zhu T., Wang X., Kreps J.A., Kay S.A.; 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290:2110-2113.
- Harmer S.L., Panda S., Kay S.A.; 2001. Molecular bases of circadian rhythms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:215-253.
- Harmer S.L. and Kay S.A.; 2005. Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of translation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:1926-1940.
- Harmer S.L.; 2009. The circadian system in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:357-377.
- Harms E., Kivimae S., Young M.W., Saez L.; 2004. Posttranscriptional and posttranslational regulation of clock genes. *J. Biol Rhythms* 19:361-373.
- Hayama R., Coupland G.; 2003. Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:13-19.
- Heim M.A., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B., Bailey P.C.; 2003. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* 20:735-747.
- Hicks K.A., Albertson T.M., Wagner D.R.; 2001. EARLY FLOWERING 3 encodes a novel protein than regulates circadian clock function and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:1281-1292.
- Huang T., Bohlenius H., Eriksson S., Percy F., Nilsson O.; 2005. The mRNA of the *Arabidopsis* gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science*; 309:1694-1696.
- Imaizumi T., Tran H.G., Schultz T.F., Briggs W.R., Kay S.A.; 2003. FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signaling in *Arabidopsis*. *Nature* 426:302-306.
- Imamura A., Hanaki N., Nakamura A., Suzuki T., Taniguchi M., Kiba T., Ueguchi C., Sugiyama T., Mizuno T.; 1999. Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol.* 40:733-742.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T.; 2001. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409:1060-1063.
- Iwata Y. and Koizumi N.; 2005. An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *PNAS* 102(14): 5280-5285.
- Johnson C.H.; 2001. Endogenous timekeepers in photosynthetic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* 63:695-728.
- Johnson C.H., Knight M.R., Kondo T., Masson P., Sedbook J., Haley A. Trewavas A.; 1995. Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science* 269:1863-1865.
- Kaldis A.D., Kousidis P., Kesanopoulos K., Prombona A.; 2003. Light and circadian regulation in the expression of LHY and Lhcb genes in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol. Biol.* 52:981-997.
- Kaldis A.D. and Prombona A.; 2006. Synergy between the light-induced acute response and the circadian cycle: a new mechanism for the synchronization of the *Phaseolus vulgaris* clock to light. *Plant Mol. Biol.* 61:883-895.
- Koukkari W.L. and Sothorn R.B.; 2006. Introducing biological rhythms. A primer on the temporal organization of life, with implications for health, society, reproduction and the natural environment. College of Biological Sciences University of Minnesota St. Paul, MN, USA. ISBN-13: 978-1-4020-3691-0.
- Kreps J.A., Wu Y.J., Chang H.S., Zhu T., Wang X., Harper J.F.; 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in respond to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* 130:2129-2141.
- Lakin-Thomas P.L.; 2000. Circadian rhythms: new functions for old genes? *Trends Genet.* 16:135-142.
- Legnaioli T., Cuevas J, Mas P. 2009. TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. *EMBO J.* 28: 3745-3757.
- Lescot, M., Déhais, P., Moreau, Y., De Moor, B., Rouzé P. and Rombauts, S; 2002. PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences *Nucleic Acids Res.*, Database issue 30(1):325-327.
- Lidder P., Gutiérrez R.A., Salomé P.A., McClung C.R., Green P.J.; 2005. Circadian control of mRNA stability: association with DST-mediated mRNA decay. *Plant Physiol.* 138:2374-2385.
- Locke J.C.W., Millar A.J., Turner M.S.; 2005a. Modeling genetic network with noisy and varied experimental data: the circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *J. Theor. Biol.* 234:383-393.

- Locke J.C.W., Southern M.M., Kozma-Bognár L., Hibberd V., Brown P.E., Turner M.S., Millar A.J.; 2005b. Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Mol. Syst. Biol.* doi:10.1038/msb4100018.
- Locke J.C.W., Kozma-Bognár L., Could P.D., Feher B., Kevei E., Nagy F., Turner M.S., Hall A., Millar A.J.; 2006. Experimental validation of a predicted feedback loop in the multi-oscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Syst. Biol.* 2:59
- Love L., Dodd A.N., Webb A.A.R.; 2004. Circadian and diurnal calcium oscillations encode photoperiodic information in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:956-966.
- Makino S., Kiba T., Imamura A., Hanaki N., Nakamura A., Suzuki T., Taniguchi M., Ueguchi C., Sugiyama T., Mizuno T.; 2000. Gene encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 41:791-803.
- Makino S., Matsushika A., Kojima M., Oda Y., Mizuno T.; 2001. Light response of the circadian waves of the APRR1/TOC1 quintet: when does the quintet starts singing rhythmically in *Arabidopsis*? *Plant Cell Physiol.* 42(3):334-339.
- Makino S., Matsushika A., Kojima M., Yamashino T., Mizuno T.; 2002. The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: 1, Characterization with APRR1-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol.* 43:58-69.
- Martinez-Garcia J.F., Huq E., Quail P.H.; 2000. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288:859-863.
- Màs P., Alabadi D., Yanovsky M.J., Oyama T., Kay S.A.; 2003. Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:223-236.
- Màs P.; 2008. Circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*: time beyond transcription. *Trends in Cell Biology* 18:273-281.
- Matsushika A., Makino S., Kojima M., Mizuno T.; 2000. Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol.* 41:1002-1012.
- McClung C.R., Salomé S.A., Michael T.P.; 2002. The *Arabidopsis* circadian system. In *The Arabidopsis Book* (Somerville C.R. and Meyerowitz E.M., eds.) American Society of Plant Biologists Rockville doi:10.1199/tab.0044
- Meyer S., Saez L., Young M.W.; 2006. PER-TIM interactions in living *Drosophila* cells; an interval timer for the circadian clock. *Science* 311:226-229.
- Michael T.P., Salomé P.A., Yu H.J., Spencer T.R., Sharp E.L., McPeck M.A., Alonso J.M., Ecker J.R., McClung C.R.; 2003. Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock. *Science* 302:1049-1053.
- Michael T.P., McClung C.R.; 2002. Phase-specific circadian clock regulatory elements in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 130:627-638.
- Michael T.P., McClung C.R.; 2003. Enhancer trapping reveals widespread circadian clock-transcriptional control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 1132:629-639.
- Michael T.P., Breton G., Hazen S.P., Priest H., Mockler T.C., Kay S.A. and Chory J.; 2008(a). A morning specific phytohormone gene expression program underlying rhythmic plant growth. *PLoS Biol.* 6:e225.
- Michael T.P., Mockler T.C., Breton G., McEntee C., Byer A., Trout J.D., Hazen S.P., Shen R., Priest H.D., Sullivan C.M., Givan S.A., Yanovsky M., Hong F., Kay S.A., Chory J.; 2008(b). Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genet.* 4(2):e14.
- Millar A.J., Carré I.A., Strayer C.A., Chua N.H., Kay S.A.; 1995. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* 267:1161-1163.
- Millar A.J.; 2004. Input signals to circadian clock. *J. Exp. Bot.* 55:277-283.
- Mizoguchi T., Wheatley K., Hanzawa Y., Wright L., Mizoguchi M., Song H.-R., Carré I.A., Coupland G.; 2002. LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 2:629-641.
- Mizoguchi T., Wright L., Fujiwara S., Cremer F., Lee K., Onouchi H., Mouradov A., Fowler S., Kamada H., Putterill J., Coupland G.; 2005. Distinct roles of GIGANTEA in promoting flowering and regulating circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:2255-2270.
- Mizuno T.; 2004. Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:499-505.
- Monte E., Tepperman J.M., Al-Sady B., Kaczorowski K.A., Alonso J.M., Ecker J.R., Li X., Zhang Y., Quail P.H.; 2004. The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3 acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:16091-16098.
- Nagatani A.; 2000. Lighting up the nucleus. *Science* 288:821-822.



- Nakamichi N., Kusano M., Fukushima A., Kita M., Ito S., Yamashino T., Saito K., Sakakibara H., and Mizuno T.; 2009. Transcript profiling of an *Arabidopsis PSEUDO RESPONSE REGULATOR* arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant Cell Physiol.* 50(3):447-462.
- Ni M., Tapperman J.M., Quail P.H.; 1999. Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* 400:781-784.
- Ni Z., Kim E.-D., Ha M., Lackey E., Liu J., Zhang Y., Sun Q., Chen Z.J.; 2009. Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* 457:327-331.
- Perales M. Más P.; 2007. A functional link between rhythmic changes in chromatin structure and the *Arabidopsis* biological clock. *Plant Cell* 19:2111-2123.
- Pittendrigh C.S.; 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55:17-54.
- Priest H.D., Filichkin S.A. and Mockler T.C.; 2009. *cis*-Regulatory elements in plant cell signaling. *Cur. Opin. in Plant Biol.* 12:643-649.
- Prunedo-Paz J.L., Breton C., Para A. and Kay S.A.; 2009. A functional genomics approach reveals CHE as a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 323:1481-1485.
- Putterill J., Robson F., Lee K., Simon R., Coupland G.; 1995. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80:847-857.
- Quail P.H.; 1997. An emerging molecular map of the photochromes. *Plant Cell Environ.* 20:657-666.
- Quail P.H.; 2002. Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr. Opin Cell Biol.* 14:180-188.
- Robert L.S., Robson F., Sharpe A., Lydiat D., Coupland G.; 1998. Conserved structure and function of the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS* in *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 37:763-772.
- Roenneberg T. and Merrow M.; 1998. Molecular circadian oscillators: an alternative hypothesis. *J. Biol. Rhythms* 13:167-179.
- Roenneberg T. and Merrow M.; 2000. Circadian light input: omnes viae Romam ducunt. *Curr. Biol.* 10:742-745.
- Roenneberg T. and Merrow M.; 2003. The network of time: understanding the molecular circadian system. *Curr. Biol.* 13:198-207.
- Saghai-Marouf M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W.; 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *PNAS* 81(24):8014-8018.
- Schaffer R., Ramsay N., Samach A., Corden S., Putterill J., Carre I.A. and Coupland G.; 1998. *LATE ELONGATED HYPOCOTYL*, an *Arabidopsis* gene encoding a MYB transcription factor, regulates circadian rhythmicity and photoperiodic responses. *Cell* 93:1219-1229.
- Schaffer R., Landgraf J., Accerbi M., Simon V., Larson M., Wisman E.; 2001. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:113-123.
- Sharrock R.A. and Quail P.H.; 1989. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Gene Dev.* 3:1745-1757.
- Sheen J.; 2001. Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiol.* 127: 1466-1475.
- Somers D.E., Webb A.A.R., Pearson M., Kay S.A.; 1998. The short period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125:485-494.
- Somers D.E.; 2005. Entrainment of the circadian clock. In: Hall AJW, McWatters HG (eds). *Endogenous plant rhythms*. Blackwell Oxford pp:85-106.
- Staiger D., Zecca L., Kirk D.A.W., Apel K., Eckstein L.; 2003. The circadian clock regulated RNA-binding protein *AtGRP7* autoregulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA. *Plant J.* 33:361-371.
- Stock A.M., Stock J.B., Mottonen J.M.; 1991. Signal transduction in bacteria. *Nature* 344:395-400.
- Strayer C., Oyama T., Schultz T.F., Raman R., Somers D.E., Más P., Panda S., Kreps J.A., Kay S.A., 2000. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, 289: 768-771.
- Toledo-Ortiz G., Hug E., Quail P.H.; 2003. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15:1749-1770.

- Tseng T.-S., Salomé P.A., McClung C.R., Olszewski N.E.; 2004. SPINDLY and GIGANTEA interact and act in *Arabidopsis thaliana* pathways involved in light responses, flowering and rhythms in cotyledon movements. *Plant Cell* 16:1550-1563.
- Valverde F., Mouradov A., Soppe W., Ravenscroft D., Samach A., Coupland G.; 2004. Photoreceptor regulation of CONSTANS protein and mechanism of photoperiodic flowering. *Science* 303:1003-1006.
- 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.
- Webb A.A.R.; 1998. Stomatal rhythms in biological rhythms and photoperiodism in plants. Lumsden P.J. and Millar A.J. eds pp. 69-79, Bios Scientific Publications, Oxford.
- Webb A.A.R.; 2003. The physiology of circadian rhythms in plants. *New Phytol.* 160:281-303.
- Whitelam G.C. and Devlin P.F.; 1998. Light signalling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 36:125-133.
- Wigge P.A., Kim M.C., Jaeger K.E., Busch W., Schmid M., Lohmann J.U., Weigel D.; 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309:1056-1059.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Mizuno T.; 2001. The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokininbinding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol.* 42:1017-1023.
- Yamaguchi R., Nakamura M., Michizuki N., Kay S.A. and Nagatani A.; 1999. Light-dependent translocation of the phytochrome B-GSP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *The journal of Cell Biology* 145:437-445.
- Yamashino T., Matsushika A., Fujimori T., Sato S., Kato T., Tabata S., Mizuno T.; 2003. A link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 44(6):619-629.
- Zhang Z. and Gurr S.J.; 2000. Walking into the unknown : a step down PCR based technique leading to the direct sequence analysis of flanking genomic DNA. *Gene* 253:145-150.
- Zeilinger M.N., Farre E.M., Taylor S.R., Kay S.A., Doyle F.J.; 2006. A novel computational model of the circadian clock in *Arabidopsis* that incorporates PRR7 and PRR9. *Mol. Syst. Biol.* 2:58.
- Γαλέου Α.; 2009. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του PνTOC1 ρυθμιστικού στοιχείου του φωτοπεριοδισμού στο φασόλι, Πτυχιακή μελέτη, ΓΠΑ.

#### Ηλεκτρονικά προγράμματα και δικτυακοί τόποι

BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

EXPASY (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>)

Multalin version 5.4.1 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)

PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)



**Παράρτημα.** Συστατικά ρυθμιστικών/θρεπτικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ</b>	
<i>Διάλυμα</i>	<i>Συστατικά</i>
<b>RT</b>	
first-strand buffer (5x)	250 mM Tris-HCl, pH 8,3 στους 25 °C, 375 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>Ηλεκτροφόρηση DNA</b>	
TAE (50x)	Για 1 L: 50 mM Tris acetate, (242 g Tris base, 57,1 ml οξικό οξύ), 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, τελικό pH: 8,0-9,0
<b>Απομόνωση πλασμιδιακού DNA</b>	
P <sub>1</sub> (QIAprep Spin Miniprep kit)	50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 mg/ml RNάσηA
P <sub>2</sub> (διάλυμα λύσης, QIAprep Spin Miniprep kit)	0,2 N NaOH, 1% SDS
N <sub>3</sub> (QIAprep Spin Miniprep kit)	Για 10 ml: 7,5 ml οξικό κάλιο, 1,15 ml οξικό οξύ, 13 ml νερό
<b>Ανάπτυξη βακτηρίων</b>	
LB (Luria Broth)	Για 1 L: 10 g bacto-tryptone, 5 g bacto yeast extract, 5 g NaCl, νερό ως το 1 L, τελικό pH: 7,0
LB-Άγαρ (+αμπικιλίνη) (για τρυβλία)	Για 1 L: 10 g bacto-tryptone, 5 g bacto yeast extract, 5 g NaCl, 14 g yeast extract -agar, 10 mg αμπικιλίνη, νερό ως το 1 L, τελικό pH: 7,0
<b>Απομόνωση γενωμικού DNA (CTAB)</b>	
2X διάλυμα απομόνωσης CTAB	100 mM Tris-Cl, pH=8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 0, % β-μερκαπτοαιθανόλη
Διάλυμα πλύσης	76% αιθανόλη, 10 mM NH <sub>4</sub> Ac
Διάλυμα επαναιώρησης	10 mM NH <sub>4</sub> Ac, 0,25 mM EDTA
<b>Πέψη πλασμιδιακού DNA</b>	
10x NEB2 buffer	10 mM Tris-Cl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCl, 1 mM DTT pH 7,9
<b>Ligation</b>	
10x T <sub>4</sub> ligation buffer (Takara)	660 mM Tris-HCl pH 7.6, 66 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM DTT, 1 mM ATP
<b>Απομόνωση πρωτοπλαστών</b>	
Διάλυμα πέψης	1% Cellulase Onozuka R10, 0,3% Macerozyme R10, 0,4 M μαννιτόλη, 5 mM Mes, pH 5,7, 20 mM KCl, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,1% BSA
<b>Ηλεκτροδιάτρηση πρωτοπλαστών</b>	
Διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης	0.4 M μαννιτόλη, 5 mM CaCl <sub>2</sub>