

ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ

ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΣΤΕΓ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟ.ΘΕ.Κ.Α

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η ΘΕΡΜΟΑΝΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΕΣΠΕΡΙΝΗΣ
ΣΤΟ ΦΥΤΟ *Arabidopsis thaliana*

ΤΣΟΜΠΑΝΗ ΓΚΕΝΤΙΑΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΔΕΛΗΣ ΚΩΣΤΑΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2014

ΒΙΟΘΕΡΑ 625

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	-i-
ΚΕΦ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	-1-
ΚΕΦ 2. ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΪ	-2-
2.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΚΙΡΚΑΔΙΟΥ ΡΟΛΟΓΙΟΥ	-2-
2.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΙΡΚΑΔΙΟΥ ΡΥΘΜΟΥ	-3-
2.3 Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ ΡΟΛΟΓΙΟΥ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	-4-
ΚΕΦ 3. ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΪ ΣΤΟ ARABIDOPSIS THALIANA	-7-
3.1 ΤΟ ΦΥΤΟ ARABIDOPSIS THALIANA ΩΣ ΔΟΥΡΕΙΟΣ ΠΙΠΟΣ	-7-
3.2 ΤΟ ΦΥΤΟ ARABIDOPSIS THALIANA ΕΜΦΑΝΙΖΕΙ ΠΟΛΛΟΥΣ ΚΙΡΚΑΔΙΟΥΣ ΡΥΘΜΟΥΣ	-8-
3.3 ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΪ ΣΤΟ ARABIDOPSIS THALIANA	-9-
ΚΕΦ 4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ	-11-
ΚΕΦ 5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	-13-
5.1 ΥΛΙΚΑ	-13-
5.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	-13-
5.3 ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΣΤΑ ΤΡΙΒΛΙΑ	-14-
ΚΕΦ 6. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	-15-
6.1 ΣΚΟΠΟΣ.....	-15-
6.2 ΜΕΤΡΙΣΕΙΣ	-15-
6.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	-17-
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	-18-

ΚΕΦ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φυτά, όπως όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και τα περισσότερα προκαταρυωτικά, έχουν εξελιχθεί με σοφιστικέ μηχανισμούς για την πρόβλεψη των περιβαλλοντικών αλλαγών που προκύπτουν λόγω της περιστροφής της Γης γύρω από τον άξονά της .Ο μηχανισμός αυτός αποκαλείται συνολικά Κιρκαδικό ρολόι. Πολλές πτυχές της φυσιολογίας των φυτών, όπως ο μεταβολισμός και η ανάπτυξη, είναι κάτω από τον έλεγχο, σε ένα μεγάλο βαθμό ,του κιρκαδιανού κανονισμού .

Στην παρούσα μελέτη γίνεται περιγραφή των πλεονεκτημάτων που εντοπίζονται στα φυτά, ιδίως στο *Arabidopsis thaliana*, με χρήση του κιρκάδιου ρολογιού. Τα προσαρμοστικά πλεονεκτήματα του κιρκάδιου ελέγχου, με ιδιαίτερη αναφορά στη ρύθμιση του μεταβολισμού, είναι επίσης ένα αντικείμενο προς εξέταση. Θα πραγματοποιηθεί αναζήτηση των αποδείξεων για την παρουσία πολλαπλών τύπων κιρκάδιου ταλαντωτή που βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων και σε διαφορετικούς ιστούς, ώστε θέτοντάς τους σε λειτουργία ή ενεργοποιώντας τους να προκύψουν τα επιθυμητά αποτελέσματα.

ΚΕΦ 2. ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΙ

2.1 Η περιγραφή του κirkάδιου ρολογιού

Η Γή περιστρέφεται γύρω από τον άξονά της κάθε 24 ώρες και έτσι κάθε κομμάτι της επιφάνειάς της έρχεται κοντά στον Ήλιο ή απομακρύνεται από αυτόν με αποτέλεσμα την ημέρα και τη νύχτα αντίστοιχα. Ο μεταβολισμός, η φυσιολογία και η συμπεριφορά των περισσότερων οργανισμών αλλάζει μεταξύ ημέρας και νύχτας. Αυτές οι βιολογικές ταλαντώσεις γίνονται προφανείς ως ημερήσιοι ρυθμοί. Οι περισσότεροι οργανισμοί έχουν μια έμφυτη ικανότητα να αντιλαμβάνονται το χρόνο. Πράγματι, οι περισσότεροι οργανισμοί δεν ανταποκρίνονται στην ανατολή του Ηλίου αλλά ρυθμίζουν την βιολογία τους σύμφωνα με την αυγή. Οι ημερήσιοι ρυθμοί των οργανισμών παραμένουν, ακόμα και όταν στερούνται εξωγενή χρονικά ερεθίσματα, δείχνοντας ότι παράγονται από ένα ενδογενές βιολογικό κirkάδιο ρολόι. Μέχρι πρόσφατα, οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους οι οργανισμοί λειτουργούν σε αυτή την τέταρτη διάσταση, τον χρόνο, παραμένουν άγνωστοι. Παρόλα αυτά, εδώ και περισσότερο από 30 χρόνια, οι προσεγγίσεις της μοριακής γενετικής αποκάλυψαν τη μοριακή βάση του κirkάδιου ρολογιού (McClung,2009).

Τα κirkάδια ρολόγια έχουν βρεθεί από τα κυανοβακτήρια μέχρι τον άνθρωπο και ρυθμίζουν τη συμπεριφορά, τη φυσιολογία και τη βιοχημεία αυτών των οργανισμών. Μελέτες έδειξαν ότι ο μοριακός μηχανισμός του ρολογιού είναι συντηρημένος ακόμα και σε περιπτώσεις που συγκεκριμένα γονίδια δεν είναι. Αν και ο κεντρικός πυρήνας του μηχανισμού του ρολογιού αποτελείται από μια θηλιά αρνητικής ανατροφοδότησης, σχετικά πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι για να παραχθεί ένα κirkάδιο ρολόι, χρησιμοποιούνται διαφορετικά επίπεδα ρύθμισης. Για παράδειγμα, το ρολόι στη *Drosophila* και στα σπονδυλωτά, βασίζεται στη μεταγραφική ενεργοποίηση και στην καταστολή κεντρικών γονιδίων του ρολογιού. Σήμερα είναι σαφές ότι τα πρωτεϊνικά προϊόντα αυτών των γονιδίων ελέγχονται όχι μόνο σε μεταγραφικό επίπεδο, αλλά και σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο, με φωσφορυλίωση, με αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με ενδοκυτταρικό εντοπισμό και με αποικοδόμηση, γεγονότα που ρυθμίζονται και τα ίδια ρυθμικά.(Baggs and Green, 2003).

2.2 Χαρακτηριστικά κηκάρδιου ρυθμού

Οι κηκάρδιοι ρυθμοί αποτελούν το υποσύνολο των βιολογικών ρυθμών και έχουν περίοδο που ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί ένας κύκλος 24 ωρών. Αυτό το χαρακτηριστικό τους, ενέπνευσε τον Franz Halberg το 1959 να δημιουργήσει τον όρο "circadian" (κηκάρδιος) από τις λατινικές λέξεις "circa" (κύκλος) και "dies" (ήμερα). Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό των κηκάρδιων ρυθμών είναι ότι παράγονται ενδογενώς και ότι είναι αυτό συντηρούμενοι με αποτέλεσμα να αντέχουν σε συνεχείς περιβαλλοντικές συνθήκες όπως σε συνεχές φώς ή σκοτάδι και σε συνεχή θερμοκρασία. Κάτω από αυτές τις ελεγχόμενες συνθήκες, ο οργανισμός στερείται εξωτερικά χρονικά ερεθίσματα και παρατηρείται απώλεια συγχρονισμού με τον 24ωρο κύκλο. Ένα τρίτο χαρακτηριστικό όλων των κηκάρδιων ρυθμών είναι ότι η περίοδος παραμένει σχετικά σταθερή σε μια κλίμακα περιβαλλοντικών θερμοκρασιών (Pittendrigh, 1954). Σύμφωνα με το τελευταίο, το ρολόι δεν επηρεάζεται από τις μεταβολές στον κυτταρικό μεταβολισμό.

Ένας οργανισμός στερείται τα περιβαλλοντικά χρονικά ερεθίσματα, όπως οι κύκλοι φωτός/σκότους και οι κύκλοι θερμοκρασίας, που προκύπτουν από την εναλλαγή ημέρας σε νύχτα, μόνο σε περιπτώσεις όπως στο εργαστήριο. Αυτά τα περιβαλλοντικά χρονικά ερεθίσματα που ονομάζονται zeitgebers (Γερμανική λέξη που σημαίνει δότες χρόνου) συγχρονίζουν το ενδογενές σύστημα χρόνου με μια περίοδο 24 ωρών, ανταποκρινόμενοι στην εξωγενή περίοδο της περιστροφής της Γης. Κατά τη διάρκεια της ημέρας παράγονται ερεθίσματα, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν την επανεκκίνηση του ρολογιού. Ένας παλμός φωτός πριν την αυγή θα προχωρήσει τη φάση του ρολογιού, όμως ο ίδιος παλμός φωτός μετά το σούρουπο θα την καθυστερήσει. Αν ο ίδιος παλμός φωτός δοθεί το μεσημέρι τότε δεν θα έχει κανένα απολύτως αποτέλεσμα. Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι το ρολόι λειτουργεί με την δική του ευαισθησία απέναντι στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (McClung, 2009).

2.3 Η ιστορία της μελέτης του ρολογιού στα φυτά

Τα πρώτα γραπτά που αναφέρονται σε ημερήσιους ρυθμούς προέρχονται από τον 4ο αιώνα π.χ. Ο Ανδροσθένης περιέγραψε την καθημερινή κίνηση των φύλλων του δέντρου *Tamarindus indicus*, στο νησί Τήλος, στον Περσικό κόλπο, κατά τη διάρκεια της εκστρατείας του Μ. Αλεξάνδρου (Bretzi, 1903). Δεν αναφέρεται ότι η προέλευση αυτών των ρυθμών είναι ενδογενής και πέρασαν πάνω από δύο χιλιετίες ώστε αυτό να δοκιμαστεί πειραματικά. Η βιβλιογραφία για τους κικκάδιους ρυθμούς ξεκίνησε το 1729, όταν ο Γάλλος αστρονόμος de Marain ανέφερε ότι η καθημερινή κίνηση των φύλλων του φυτού ηλιοτρόπιο (πιθανόν το *Mimosa pudica*) έμενε σταθερή στο συνεχές σκοτάδι, δηλώνοντας την ενδογενή της προέλευση (de Marain 1729), Πέρασαν τριάντα χρόνια μέχρι να επαναληφθούν οι παρατηρήσεις του de Marain (Hill, 1757, Duhamel duMonceau, 1759, Zinn, 1759). Οι μελέτες αυτές απέκλεισαν τη θερμοκρασία σαν ένα πιθανό zeitgeber που οδηγεί στη ρυθμική κίνηση των φύλλων.

Χρειάστηκε να περάσει περίπου ένας αιώνας μέχρι να μετρηθούν με ακρίβεια οι κινήσεις των φύλλων, ώσπου διαπιστώθηκε ότι οι ρυθμοί αυτοί ήταν 24 ωρών, δηλαδή κικκάδιοι, προτείνοντας ότι ήταν ενδογενείς και όχι αποκρίσεις στα περιβαλλοντικά χρονικά ερεθίσματα. Ο de Candolle (1832) ισχυρίστηκε ότι η περίοδος του *Mimosa pudica* δεν συγχρονίζεται με τον 24ωρο κύκλο της φύσης, αφού διαρκούσε 22 με 23 ώρες. Επιπλέον, έδειξε ότι ο ρυθμός μπορούσε να αντιστραφεί μεταβάλλοντας την εναλλαγή φωτός/σκοτούς. Κάποιοι συγγραφείς επανέλαβαν και επέκτειναν αυτές τις παρατηρήσεις κατά τον 19ο και τις αρχές του 20ου αιώνα, μελετώντας πάντα την κίνηση των φύλλων των φυτών, που αποτελούσε το μοναδικό γνωστό κικκάδιο ρυθμό. Οι κικκάδιοι ρυθμοί στα ζώα περιγράφηκαν πολύ αργότερα, σε αρθρόποδα και σε αρουραίους .

Το γεγονός ότι οι κικκάδιοι ρυθμοί, στην κίνηση των φύλλων, ήταν ενδογενείς αμφισβητήθηκε. Ο Pfeffer (1873), για παράδειγμα, υποψιάστηκε ότι το φως που <<γλιστράει>> μέσα σε σκοτεινά δωμάτια επεμβαίνει σε αυτές τις μελέτες, ματαιώνοντας τις προσπάθειες να παραχθούν συνεχείς συνθήκες, και ακυρώνει τους ισχυρισμούς ότι οι ρυθμοί αυτοί έχουν ενδογενή προέλευση. Το ότι οι ρυθμοί ήταν κικκάδιοι, και όχι ακριβώς 24ωροι, ήταν ένα πολύ σημαντικό σημείο γιατί αποτελούσε την καλύτερη απόδειξη, μέχρι που έγιναν πειράματα στο μύκητα *Neurospora crassa* (Sulzman, 1984). Πιστοποιήθηκε τότε ότι οι ρυθμοί ήταν πράγματι ενδογενείς και δεν οδηγούνταν από κάποιο λεπτό και μη ανισχεύσιμο γεωφυσικό ερέθισμα που συνδέεται με την περιστροφή της Γης γύρω από τον άξονά της. Ένα τρίτο σημαντικό κριτήριο του κικκάδιου ρυθμού είναι η εξισορρόπηση της θερμοκρασίας, αν και πέρασε αρκετός καιρός ώσπου να εκτιμηθεί αυτό το χαρακτηριστικό. Η λογική της μελέτης της εξάρτησης του μήκους της περιόδου από τη θερμοκρασία προκύπτει από την προσδοκία ότι ο μηχανισμός του ρολογιού βασίζεται στην

εναλλαγιάτων χημικών διεργασιών. Οπότε, προβλέφθηκε ότι το ρολόι θα πρέπει να εξαρτάται από τη θερμοκρασία όπως και οι χημικές διεργασίες. Μέχρι το 1960 παρατηρήσεις αυτές επεκτάθηκαν σε πολλά άλλα φυτά αλλά και ζώα (Sweeney and Hastings, 1960). Το γεγονός ότι τα ρολόγια δεν ήταν ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία, αλλά παρουσίαζαν μία λιγότερο αναμενόμενη εξάρτηση από αυτήν, υποστήριξε σθεναρά την ιδέα ενός μηχανισμού εξισορρόπησης θερμοκρασίας που ήταν ατελής. Ένας τέτοιος μηχανισμός μπορούσε να μεταβάλλει το μήκος της περιόδου ανάλογα με τη θερμοκρασία.

Το 1880, οι Charles και Francis Darwin πρότειναν την κληρονομησιμότητα των κερκάδιων ρυθμών (Darwin and Darwin, 1880). Αυτό μελετήθηκε αρχικά, κατά τη δεκαετία του 1930, με δύο στρατηγικές. Στην πρώτη, φυτά και ζώα μεγάλωσαν σε συνεχείς συνθήκες για πολλαπλές γενεές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι φρουτόμυγες που διατήρησαν σταθερούς ρυθμούς για 700 γενεές εκτρεφόμενες σε συνεχείς συνθήκες (reviewed in Johnson, 2005). Στη δεύτερη, σποριόφυτα ή ζώα εκτέθηκαν σε κύκλους που διέφεραν από τον 24ωρο, ώστε να μεταβληθεί το μήκος της περιόδου κατά τη διάρκεια των νέων αυτών κύκλων. Όμως, μετά την απελευθέρωση τους σε συνεχείς συνθήκες αποκαταστάθηκε η ενδογενής κερκάδια περίοδος (Bunning, 1973). Η κληρονόμηση του μήκους της περιόδου στους απογόνους, που προέκυψαν από διασταύρωση γονέων με διακριτά μήκη περιόδου, αναφέρθηκε πρώτα στο *Phaseolus*. Τα υβρίδια είχαν μήκος περιόδου ενδιάμεσο των γονέων (Bunning, 1932, 1935).

Η ανάλυση με τη βοήθεια της πρωοθητικής γενετικής για την ταυτοποίηση συστατικών του κερκάδιου ρολογιού ξεκίνησε τη δεκαετία του 1970. Αν και σήμερα είναι δεδομένο ότι τα κερκάδια ρολόγια συντίθεται από προϊόντα γονιδίων, το γεγονός αυτό αποτέλεσε την πηγή ιδιαίτερης διαμάχης. Το γεγονός ότι οι προσπάθειες της πρωοθητικής γενετικής θα ήταν άκαρπες αμφισβητήθηκε, γιατί τα ρολόγια ήταν αρκετά πολύπλοκα για να επιδείξουν πολυγονιδιακή κληρονομησιμότητα (Bunning, 1935) και δεν υποκύπτουν εύκολα σε γενετικές προσεγγίσεις. Παρόλα αυτά, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν μεταλλάξεις με μεταβαλλόμενο μήκος περιόδου στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster* (Kanopka and Benzer, 1971), στο φύκος *Chlamydomonas reinhardtii* (Bruce, 1972) και στο μύκητα *Neurospora crassa* (Feldman and Hoyle, 1973). Χρειάστηκε περισσότερο από μια δεκαετία μέχρι να κλωνοποιηθεί το πρώτο γονίδιο του ρολογιού, το γονίδιο *period* (*per*) στη *Drosophila* (Bargiello and Young, 1984) και πέντε χρόνια μέχρι να κλωνοποιηθεί το δεύτερο, το γονίδιο *frequency* στο *Neurospora* (McClung, 1989).

Στα φυτά διαπιστώθηκε ότι ο ρυθμός της κίνησης των φύλλων ήταν μόνο ένας ανάμεσα στους πολλούς ρυθμούς, συμπεριλαμβανομένης της γονιμοποίησης, της ανάπτυξης, της ενζυμικής

ενεργότητας, της κίνησης των στομάτων, της φωτοσύνθεσης, της εκπομπής αρώματος και του ανοίγματος των ανθέων (coming and Wagner, 1968). Πραγματοποιήθηκαν δύο κρίσιμες ανακαλύψεις' αρχικά ο Kloppstech (1985) περιέγραψε στο φασόλι έναν κικκάδιο ρυθμό τριών μεταγραφών, που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA. Αυτή η παρατήρηση αντιγράφηκε και επεκτάθηκε στο σιτάρι. Όμως, τόσο το φασόλι, όσο και το σιτάρι, δεν ήταν κατάλληλα για κατευθυνόμενη κλωνοποίηση γονιδίου. Αντίθετα, το *Arabidopsis thaliana* προέκυψε ως ένα ισχυρό σύστημα, στο οποίο είναι δυνατό να συνδυαστεί ανάλυση με προωθητική γενετική με τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης γονιδίου (Somerville and Koornneef, 2002). Σύντομα αποδείχθηκε ότι ένας αριθμός γονιδίων του *Arabidopsis thaliana* υπόκειται σε κικκάδιο έλεγχο (McClung and Kay, 1994), (McClung, 2009).

ΚΕΦ. 3 ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΪ ΣΤΟ *ARABIDOPSIS THALIANA*

3.1 Το φυτό *Arabidopsis thaliana* ως Δούρειος ίππος

Το *Arabidopsis thaliana* είναι ένα μικρό ανθοφόρο φυτό αυτόχθον που το εντοπίζουμε στην Ευρώπη, στην Ασία, και στη βορειοδυτική Αφρική. Έχει σύντομο κύκλο ζωής. Το *Arabidopsis thaliana* έχει ένα μάλλον μικρό γονιδίωμα, μόλις 157Mbp (megabase ζεύγη) , τώρα είναι γνωστό ότι ανήκει στα φυτά του γένους *Genlisea*, Τάξης Lamiales, με *Genlisea margaretae*, είναι σαρκοβόρο φυτό, το δείχνει το μέγεθος του γονιδιώματος του 63,4 Mbp. Το *Arabidopsis* είναι ένα δημοφιλές εργαλείο για την κατανόηση της μοριακής βιολογίας πολλών φυτικών γονιδιακών χαρακτηριστικών, συμπεριλαμβανομένων των λουλουδιών ανάπτυξης και ανίχνευσης φωτός .

3.2 Το φυτό *Arabidopsis thaliana* εμφανίζει πολλούς κιρκάδιους ρυθμούς

Όπως πολλά φυτά, έτσι και το *Arabidopsis thaliana* εμφανίζει ρυθμική κίνηση της κοτυληδόνας και του φυτού, καθώς και κιρκάδιο ρυθμό στην επιμήκυνση του υποκοτυλίου και του ανθώδους μέρους του βλαστού. Ο έλεγχος της μεταγραφής από το κιρκάδιο ρολόι είναι διαδομένος, και η λίστα των γονιδίων του φυτού που ελέγχονται από αυτό είναι μεγάλη. Ανάλυση με μικροσυτοιχίες έδειξε ότι περίπου το 10% του συνόλου των γονιδίων *Arabidopsis* ρυθμίζεται στο επίπεδο του mRNA και έχουν ανιχνευθεί πολλά μεταβολικά μονοπάτια που ρυθμίζονται κιρκάδια. Αν και η μελέτη του κιρκάδιου ρυθμού έχει εστιαστεί σε συνεχείς συνθήκες, είναι σημαντικό να θυμάται κανείς ότι τα φυτά στη φύση αναπτύσσονται σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Σε αυτά τα φυτά που αναπτύσσονται με ημερήσιους κύκλους, παρατηρείται μία σημαντική αλληλεπίδραση με το μεταβολισμό των σακχάρων, που επηρεάζει σημαντικά την περιοδική γονιδιακή έκφραση. Επιπρόσθετα, σχετικά πρόσφατα δεδομένα διασαφηνίζουν ότι το κιρκάδιο ρολόι διαμορφώνει την ικανότητα απόκρισης σε αβιοτικό στρες, όπως το κρύο.

3.3 Το κερκάδιο ρολόι στο *Arabidopsis thaliana*

Πολλοί οργανισμοί διαθέτουν κερκάδια ρολόγια, τα οποία ρυθμίζουν τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά τους. Το ευκαρυωτικό ρολόι περιλαμβάνει θηλιές ανατροφοδότησης για τη γονιδιακή έκφραση, με αρνητικά και θετικά στοιχεία και κυτταροπλασματικά σηματοδοτικά μόρια. Στο μοντέλο *Arabidopsis*, ο μηχανισμός του ρολογιού θεωρείται ότι περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις θηλιές ανατροφοδότησης: την κεντρική θηλιά, τη θηλιά που είναι συγχρονισμένη με το πρωί και τη θηλιά που είναι συγχρονισμένη με το βράδυ.

Πρόσφατα προτάθηκε ότι η θηλιά ανατροφοδότησης, η οποία είναι κρίσιμη για την κερκάδια ρυθμικότητα στο *Arabidopsis* (κεντρική θηλιά), βασίζεται στην αλληλεπίδραση του TOC1 (timing of cab expression 1), του LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL) και του CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1). Οι CCA1 και LHY είναι δύο μεταγραφικοί παράγοντες, σχετικοί με την MYB οικογένεια, των οποίων τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης εμφανίζουν μέγιστο την αυγή. Η υπερέκφραση του CCA1 ή του LHY από έναν ιδιόσυστατο υποκινητή έχει ως αποτέλεσμα ο ένας παράγοντας να ρυθμίζει καθοδικά τον άλλο, πράγμα που οδηγεί σε αρρυθμία. Το παραπάνω φανερώνει πως οι παράγοντες αυτοί αποτελούν συστατικά μιας θηλιάς αρνητικής ανατροφοδότησης, που είναι απαραίτητη για την παραγωγή και τη διατήρηση των κερκάδιων ρυθμών. Ο TOC1 κωδικοποιεί για έναν ρυθμιστή, του οποίου η έκφραση έχει μέγιστο το σούρουπο. Μεταλλάξεις στον TOC1 μικραίνουν την περίοδο όλων των κερκάδιων ρυθμών που έχουν ελεγχθεί μέχρι τώρα. Επιπρόσθετα, αύξηση στη δόση του TOC1 μεγαλώνει την περίοδο των κερκάδιων ταλαντωτών, ενώ η υπερέκφρασή του από έναν ιδιόσυστατο υποκινητή προκαλεί αρρυθμία. Ο TOC1 έχει αρκετά μοτίβα που δείχνουν ότι συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση και πράγματι, τα επίπεδα του mRNA των παραγόντων CCA1 και LHY μειώνονται, στο μετάλλαγμα *toc1-2*. Η έκφραση του CCA1 μειώνεται αξιοσημείωτα στο μετάλλαγμα *elf4*, το οποίο δεν εμφανίζει ρυθμικότητα τόσο στο συνεχές φως, όσο και στο συνεχές σκοτάδι. Το *elf4* (early flowering 4) δεν εμφανίζει ομολογία με πρωτεΐνες γνωστής λειτουργίας, αλλά η έκφρασή του είναι κυκλική με φάση που είναι παρόμοια με αυτή του TOC1, πράγμα που δείχνει ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορεί να λειτουργούν μαζί για να προωθήσουν την έκφραση του CCA1 και το LHY. Το CCA1 και το LHY ρυθμίζουν καθοδικά την ίδια τους έκφραση, καταστέλλοντας την έκφραση του TOC1. Αυτό συμβαίνει μέσω της πρόσδεσής τους σε ένα στοιχείο 9 νουκλεοτιδίων που βρίσκεται στον υποκινητή του TOC1, το οποίο είναι κρίσιμο για την κερκάδια ρύθμιση.

Το στοιχείο που αναγνωρίζουν οι παράγοντες CCA1 και LHY στον υποκινητή του TOC1 υπάρχει σε μια ομάδα γονιδίων συγχρονισμένων με το βράδυ και είναι γνωστό ως evening-element

(EE). Πέραν του ότι ο CCA1 και LHY είναι μέλη μιας θηλιάς ανατροφοδότησης για την κερκάδια ρυθμικότητα, πιθανόν λειτουργούν για να καταστείλουν την έκφραση αρκετών γονιδίων που είναι συγχρονισμένα με το βράδυ και για προωθήσουν την έκφραση γονιδίων που είναι συγχρονισμένα με το πρωί, παρέχοντας ένα μηχανισμό που συνδέει τον κερκάδιο ταλαντωτή με πολλές βιοχημικές και φυσιολογικές διεργασίες. Τα κερκάδια ρολόγια, από τα φυτά μέχρι τα θηλαστικά, ρυθμίζουν τις μεταβολικές και αναπτυξιακές δραστηριότητες, ελέγχοντας την έκφραση ρυθμιστικών γονιδίων-κλειδιών.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη *Drosophila* αποκάλυψαν έναν ανάλογο μηχανισμό με αυτόν στο *Arabidopsis*. Τα γονίδια της *Drosophila* που φαίνεται να είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του κερκάδιου ρολογιού είναι το *period*, το *timeless*, το *small*, το *clock*, το *cryptochrome*, και το *doubletime*. Τα γονίδια *clock* και *small* κωδικοποιούν για δύο βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι σχηματίζουν το CLOCK-BMALL1 μέσα στον πυρήνα και προσδένονται σε στοιχεία E-box στους υποκινητές των γονιδίων του ρολογιού ενεργοποιώντας την έκφρασή τους. Τέτοια είναι το *per* και το *tim*. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών σχηματίζουν το διμερές PER-TIM στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια εισέρχονται στον πυρήνα όπου και καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση.

Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν μελέτες στη *drosophila* που αφορούν τη μεταγραφική και μετα-μεταφραστική ρύθμιση των στοιχείων του κερκάδιου ρολογιού. Προτάθηκαν μοντέλα που προβλέπουν ότι η αποικοδόμηση των mRNAs και των πρωτεϊνών του ρολογιού είναι κρίσιμη στον έλεγχο της περιοδικότητας. Για παράδειγμα, ο βαθμός στον οποίο καταστέλλεται η γονιδιακή έκφραση από το ετεροδιμέρες PER-TIM μπορεί να ρυθμιστεί μέσω της σταθερότητας του PER και του TIM.

Από τα παραπάνω, είναι φανερό πως η ρύθμιση της έκφρασης των mRNAs των TIM και PER καθορίζεται από το χρόνο της ζωής τους, και κατ'επέκταση, από τη ρύθμιση της αποικοδόμησης των mRNAs αυτών.

ΚΕΦ. 4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ

Ως καταπόνηση αναφέρεται η επίδραση δυσμενών παραγόντων του περιβάλλοντος οι οποίοι τείνουν να παρεμποδίσουν τη κανονική λειτουργία φυσιολογικών μηχανισμών. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η καταπόνηση εκτιμάται μέσω του παραγόμενου γεωργικού προϊόντος, της επιβίωσης του φυτού, τη συσσώρευση βιομάζας ή του ρυθμού αφομοίωσης (θρεπτικών συστατικών ή CO₂). Η παρουσία παραγόντων καταπόνησης στο περιβάλλον ενός φυτικού οργανισμού δεν παρουσιάζει συνήθως ομοιόμορφη κατανομή στο χώρο και στο χρόνο. Οι καταπονήσεις παίζουν σημαντικό ρόλο σε επίπεδο γεωργικής παραγωγής (περίπου 20%-30% απώλειες).

Οι παράγοντες θερμικής καταπόνησης ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων θερμικού σοκ. Η αυξημένη έκφραση των θερμοεπαγόμενων γονιδίων οδηγεί στην ραγδαία συγκέντρωση των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, HSPs. Παρά το γεγονός ότι οι παράγοντες αυτοί ποικίλουν αρκετά σε μέγεθος η αλληλουχία, η βασική τους δομή και ο τρόπος αναγνώρισης του προαγωγέα είναι συντηρημένα στο ευκαρυωτικό βασίλειο.

Σε φυσιολογικές συνθήκες οι παράγοντες θερμικού σοκ βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση ως μονομερή. Έχει αναφερθεί ότι η εμφάνιση ασυνήθιστων πρωτεϊνών μετά από κάποια μορφή καταπόνησης ενεργοποιεί τους HSFs που σχηματίζουν έτσι τριμερείς δομές. Η σύνδεση των τριμερών HSFs γίνεται σε συγκεκριμένες περιοχές του προαγωγέα των γονιδίων των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, που ονομάζονται στοιχεία θερμικής καταπόνησης. Τα στοιχεία αυτά αποτελούνται από επαναλήψεις της κεντρικής αλληλουχίας 5'-nGAAn-3' ή της συμπληρωματικής αλληλουχίας 5'-nTTCn-3'. Για μια επιτυχή σύνδεση είναι απαραίτητες τουλάχιστον τρεις τέτοιες επαναλήψεις στη μορφή 5'-nGAAnnTTCnnGAAn-3'. Το συγκεκριμένο στοιχείο είναι το πιο διαδεδομένο, υπάρχουν όμως παραλλαγές. Στο γονιδίωμα του φυτού *Arabidopsis thaliana* έχουν εντοπισθεί 21 γονίδια που κωδικοποιούν για HSFs, γεγονός που υποδεικνύει την πολύπλοκη φύση της απόκρισης στην υψηλή θερμοκρασία.

Τα στοιχεία σοκ δομικά συντελούνται από:

- μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA,
- μια περιοχή ολιγομερισμού,
- μια αλληλουχία σινιάλο πυρηνικής τοποθέτησης, και
- το C- καρβόξυ τελικό άκρο

Οι παράγοντες καταπόνησης χωρίζονται σε:

- αβιοτικοί παράγοντες:

- φυσικοί (ακτινοβολία, θερμοκρασία, υδατικό περιβάλλον, μηχανικές βλάβες),
- χημικοί (θρεπτικά συστατικά, αέριο περιβάλλον),
- ανθρωπογενείς (ρύπανση, υποβάθμιση εδαφών, φυτοφάρμακα),

- βιοτικοί παράγοντες (φυτά, παθογόνα, ζώα)

ΚΕΦ.5 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Υλικά

MS (Murashige skoog)

(4,4 gr/lit και 1% άγαρ)

Murashige και Skoog ή (MSO ή MSO) είναι ένα μέσο ανάπτυξης φυτών που χρησιμοποιείται στα εργαστήρια για την καλλιέργεια φυτικών κυττάρων. Το MSO εφευρέθηκε από τους επιστήμονες των φυτών Toshio Murashige και Folke K. Skoog το 1962 κατά την αναζήτηση του Murashige για ένα νέο ρυθμιστικό της ανάπτυξης των φυτών. Μαζί με τις τροποποιήσεις του είναι το συνηθέστερο χρησιμοποιούμενο μέσο σε πειράματα καλλιέργειας φυτικών ιστών σε εργαστήριο.

5.2 Μέθοδοι

5.2.1 Αποστείρωση σπερμάτων *Arabidopsis thaliana*

Για την ανάπτυξη των φυτών κάτω από ασηπτικές συνθήκες, σπέρματα του *Arabidopsis thaliana* ενυδατώνονται για 24 ώρες στους 4 °C και, στη συνέχεια, αποστειρώνονται σε διάλυμα 70% αιθανόλης, ακολουθούμενο από διάλυμα 20% χλωρίνης. Στη συνέχεια μεταφέρονται κάτω από ασηπτικές συνθήκες 30 σπέρματα του *Arabidopsis thaliana* σε κάθε τριβλίο, παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου. Τα τριβλία τοποθετούνται σε θάλαμο ανάπτυξης κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 22 °C, υγρασία 40% και φωτοπερίοδος 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι).

5.2.2 Παρασκευή διαλύματος MS

Για την παρασκευή του MS χρησιμοποιούνται 1,5% άγαρ δηλαδή 15gr/lit και MS 4,4% gr/lit.

Τοποθετείται σε δοχείο το άγαρ και το MS και προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι το 1 lit.

Αποστειρώνεται το διάλυμα αφού πρώτα τοποθετηθεί μέσα στο δοχείο ένας μαγνήτης.

Αφού τελείωσε η αποστείρωση, αναδεύτηκε το μπουκάλι για να κρυώσει το διάλυμα. Ο μαγνήτης που βρισκόταν στο μπουκάλι βοήθησε ώστε να υπάρχει ομοιόμορφη θερμοκρασία μέσα σε αυτό.

Μόλις κρύωσε το διάλυμα, τοποθετήθηκε στα τριβλία 20 ml θρεπτικού υποστρώματος μέσα σε θάλαμο, με το οποίο επιτυγχάνονται αποστειρωμένες συνθήκες. Αφήνουμε να στερεοποιηθούν. Τα τριβλία μπορεί να διατηρηθούν για περίπου 2 εβδομάδες στους 4 °C. Τοποθετούνται προσεκτικά τα σπέρματα στα τριβλία Petri με τη βοήθεια πιπέτας και αφήνονται ανοιχτά να στεγνώσουν (περίπου 30 λεπτά). Στη συνέχεια σφραγίζονται με ταινία parafilm και μεταφέρονται σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών (4 °C) για 6 ημέρες.

Μετά το πέρας των 6 ημερών, τα τριβλία μπήκαν στους 38 °C για 90 λεπτά, συνέχεια στους 22°C για 2 ώρες και τέλος στους 45 °C για μια ώρα. Όταν πέρασε και η 1 ώρα, τα τριβλία μπήκαν τα μισά στους 45 °C για 60 λεπτά και τα άλλα μισά για 180 λεπτά.

Τέλος, για διάστημα 5 ημερών, μετρήθηκαν καθημερινά πόσα σπέρματα έζησαν και πόσα πέθαναν.

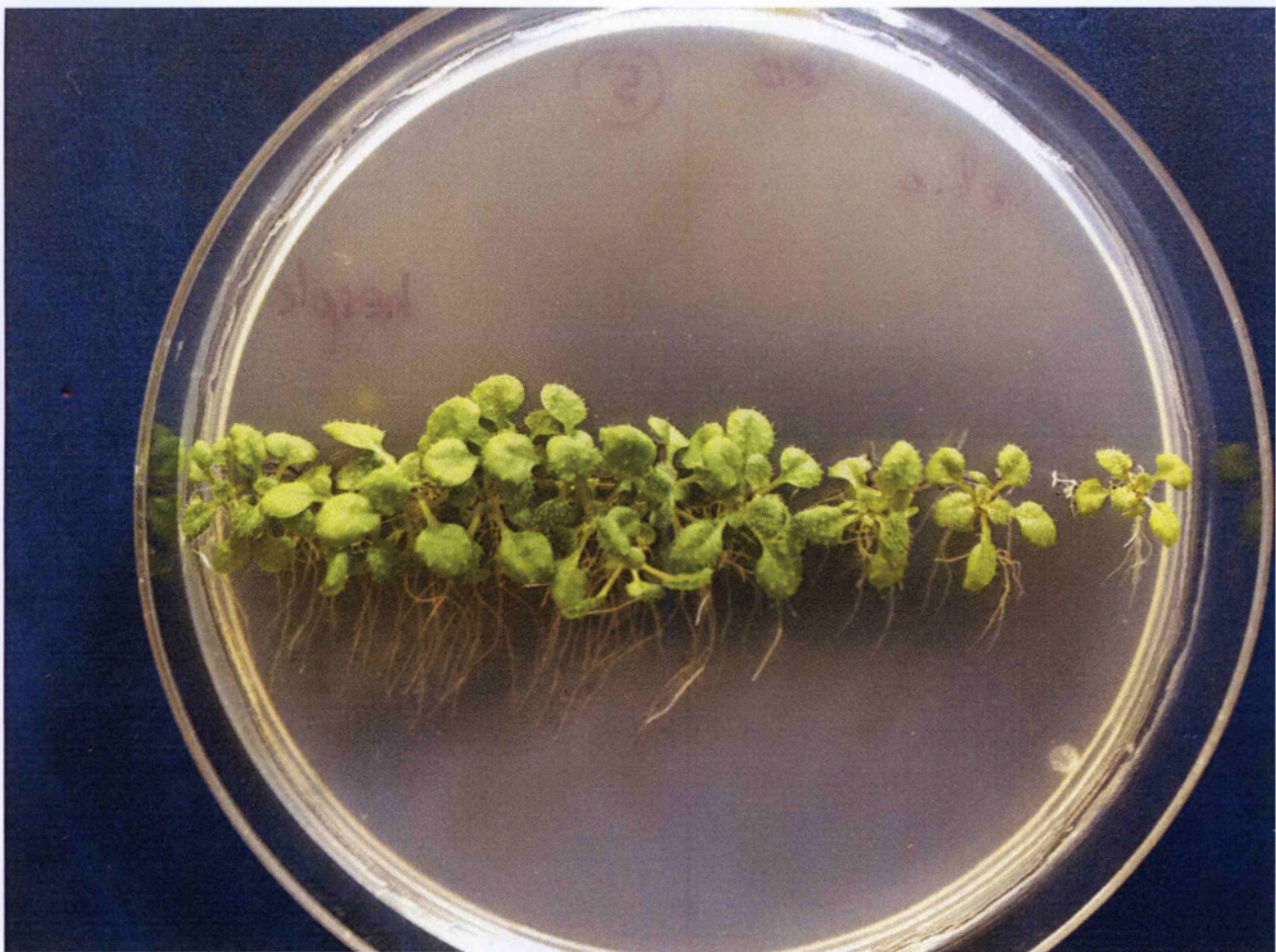
5.3 Τοποθέτηση σπερμάτων στα τριβλία

Αφού το διάλυμα του MS που υπήρχε στα τριβλία σταθεροποιήθηκε, πήραμε τα 17 τριβλία και με μαρκαδόρο τα χωρίστηκαν στη μέση. Αυτό το κάναμε διότι στη μισή πλευρά του τριβλίου τοποθετήθηκαν τα Col-0 σπέρματα και στην άλλη μισή τοποθετήθηκαν τα μεταλλάγματα (*hesp-1*). Για την σωστή τοποθέτηση των σπερμάτων στα τριβλία χρησιμοποιήθηκε πιπέτα. Σε κάθε τριβλίο μπήκαν 5 σπέρματα *hesp-1* στη μια πλευρά του τριβλίου και 5 σπέρματα Col-0 στην άλλη πλευρά, τα οποία ήταν όλα τους αποστειρωμένα.

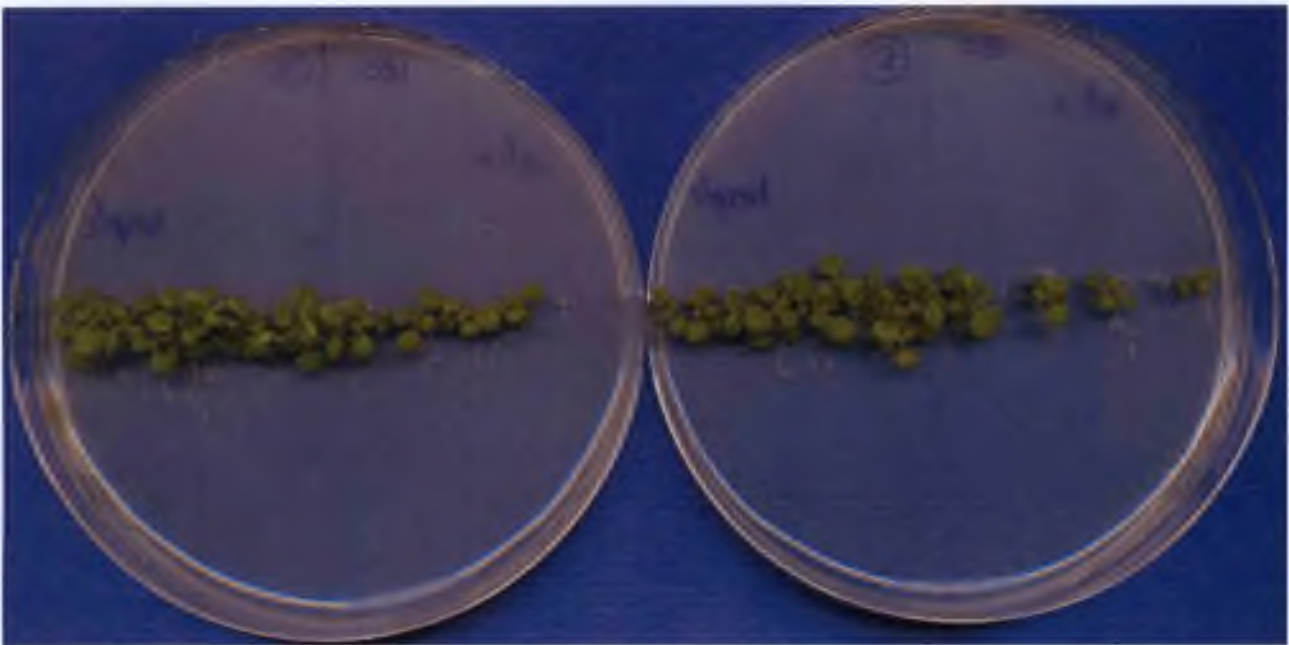
ΚΕΦ.6 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Σκοπός

Ο σκοπός του συγκεκριμένου εργαστηριακού πειράματος και, κατ' επέκταση, της παρούσας πτυχιακής εργασίας, είναι να διαπιστωθεί πόσα σπέρματα από αυτά που έχουν τοποθετηθεί στα τριβλία θα επιζήσουν. Επίσης, είναι σημαντικό να εξακριβώσουμε ποια σπέρματα είναι πιο ανθεκτικά στην θερμική καταπόνηση, τα Col-0 ή τα μεταλλάγματα *hesp-1*.



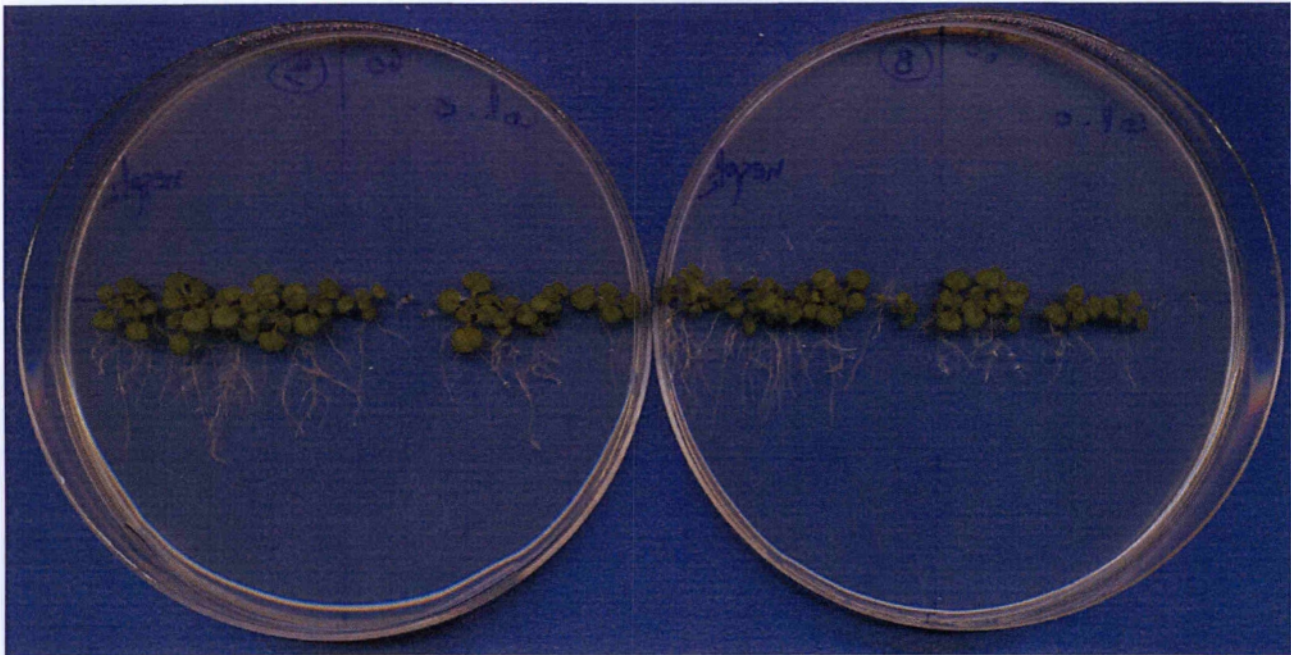
Εικόνα 1. Αριστερά βρίσκονται τα μεταλλάγματα *hesp1-1* και δεξιά τα αγρίου τύπου φυτά. Τα φυτά έχουν υποστεί θερμική καταπόνηση για 180min στους 45°C.



Εικόνα 2. Φυτά τα οποία έχουν υποστεί θερμική καταπόνηση για 180min στους 45°C. Αριστερά και στα δύο τρυβλία βρίσκονται τα *hesp1-1* και δεξιά τα φυτά αγρίου τύπου



Εικόνα 3. Αριστερά βρίσκονται τα μεταλλάγματα *hesp1-1* και δεξιά τα αγρίου τύπου φυτά. Τα φυτά έχουν υποστεί θερμική καταπόνηση για 60min στους 45°C.



Εικόνα 4. Φυτά τα οποία έχουν υποστεί θερμική καταπόνηση για 60 min στους 45°C. Αριστερά και στα δύο τρυβλία βρίσκονται τα *hesp1-1* και δεξιά τα φυτά αγρίου τύπου

6.3 Συμπεράσματα

1. Παρατηρώντας τις εικόνες 1, 2, είναι εύκολο και εύλογο να συμπεράνει κανείς ότι τα μεταλλάγματα (*hesp1-1*) έχουν καλύτερη ανταπόκριση στη θερμική καταπόνηση από τα σπέρματα Col-0 (wild type). Το συμπέρασμα αυτό επεκτείνεται και ισχύει και για τους δύο χρόνους, τόσο για τα 60, όσο και για τα 180 λεπτά.
2. Η παρεμπόδιση ανάπτυξης της ρίζας είναι ανάλογη του χρόνου παραμονής στους 45°C.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Alabadi, D., Oyama T., Yanovsky M.J., Harmon, F.G., Mas,P., and Kay,S.A., *Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the arabidopsis thaliana circadian clock*, 2001.
- [2] Convington, M.F., Maloof, J.N., Straume, M., Kay, S.A., and Harmer, S.L., *Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development*, 2008.
- [3] Douris, N., and Green, C.B., *NOC out of fat: a short review of the circadian deadenylase Nocturnin*, 2008.
- [4] Duc, C., Cellier, F., Lobreaux, S., Briat, J.F., and Gaymard, F., *Regulation of iron homeoastasis in Arabidopsis thaliana by the clock regulator time for coffe*, 2009.
- [5] Gardner, M.J., Hubbard, K, E., Hotta C.T. Dodd, A.N., and Webb, A.A., *How plants tell the time*, 2006.
- [6] Goldstrohm, A.C. and Wickens, M., *Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control*, 2008.
- [7] Creen, R.M., Tingay, S., Wang, Z.Y., and Tobil, E.M., *Circadian rhythms confer a higher level of fitness to Arabidopsis plants*, 2002.
- [8] Harmer, S., *Plant biology in the fourth dimension*, 2010.
- [9] Harmer, S.L., Panda, S., and Key, S.A., *Molecular bases of circadian rhythms*, 2001.
- [10] Houseley, J., and Tollervey, D., *The many pathways of RNA degradation*, 2009.
- [11] Lidder, P, Gutierrez, R.A. Salome, P.A. McClung, C.R. and Green, P.J., *Circadian control of messenger RNA stability. Association with a sepuence-specific messenger RNA decay pathway*, 2005.

[12] Mas, P., *Circadian clock function in Arabidopsis thaliana: time beyond transcription*, 2008.

[13] McClung, C.R., *Plant circadian rhythms*, 2006.

[14] Schaffer, R. Landgraf, J., Accerbi, M, Simon, V., Larson, M. and Wisman, E., *Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in Arabidopsis*, 2001.

[15] Webb, A.A.R., *The psysiology of circadian rhythms in plants*, 2003