

**ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Η ΘΕΡΜΟΑΝΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ
ΕΣΠΕΡΙΝΗΣ ΣΤΟ ΦΥΤΟ ARABIDOPSIS THALIANA**

ΜΑΛΛΙΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

***ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΔΕΛΗΣ ΚΩΣΤΑΣ***

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2013

φ0754



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	- 5 -
ΚΕΦ 2. ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΪ	- 7 -
2.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΚΙΡΚΑΔΙΟΥ ΡΟΛΟΓΙΟΥ	- 7 -
2.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΙΡΚΑΔΙΟΥ ΡΥΘΜΟΥ	- 7 -
2.3 Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ ΡΟΛΟΓΙΟΥ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	- 8 -
ΚΕΦ 3. ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΪ ΣΤΟ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	- 11 -
3.1 Το ΦΥΤΟ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ΕΜΦΑΝΙΖΕΙ ΠΟΛΛΟΥΣ ΚΙΡΚΑΔΙΟΥΣ ΡΥΘΜΟΥΣ	- 11 -
3.2 Το ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΙ ΣΤΟ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	- 11 -
ΚΕΦ 3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ	- 13 -
ΚΕΦ 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 15 -
4.1 ΥΛΙΚΑ	- 15 -
4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	- 15 -
4.3 ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΣΤΑ ΤΡΙΒΛΙΑ	- 16 -
ΚΕΦ 5. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	- 17 -
5.1 ΣΚΟΠΟΣ	- 17 -
5.2 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	- 17 -
5.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	- 18 -
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	- 21 -

ΚΕΦ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φυτά, όπως όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και τα περισσότερα προκαρυωτικά, 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 κιρκαδικού ρολογιού. Τα προσαρμοστικά πλεονεκτήματα του κιρκαδικού ελέγχου, με ιδιαίτερη αναφορά στη ρύθμιση του μεταβολισμού, είναι επίσης ένα αντικείμενο προς εξέταση. Θα πραγματοποιηθεί αναζήτηση των αποδείξεων για την παρουσία πολλαπλών τύπων κιρκαδικού 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 ΡΟΛΟΪ

2.1 Περιγραφή του κirkάδιου ρολογιού

Η Γη περιστρέφεται γύρω από τον άξονά της κάθε 24 ώρες. 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 ήλιου 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 περισσότερα από 30 χρόνια, οι προσεγγίσεις της μοριακής γενετικής αποκάλυψαν τη μοριακή βάση του κυτταρικού κirkάδιου ρολογιού (McClung, 2009).

Τα κirkάδια ρολόγια εντοπίζονται 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, με ενδοκυτταρικό εντοπισμό και με αποικοδόμηση, γεγονότα που ρυθμίζονται και τα ίδια (Baggs and Green, 2003).

2.2 Χαρακτηριστικά κirkάδιου ρυθμού

Οι κirkάδιοι 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” (κirkάδιος) από τις λατινικές λέξεις “circa” (κύκλος) και “dies”(ημέρα).

Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό των κirkάδιων ρυθμών είναι ότι παράγονται ενδογενώς και ότι είναι αυτοσυντηρούμενοι με αποτέλεσμα να αντέχουν σε συνεχείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως σε συνεχές φως 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 κirkάδιων ρυθμών είναι ότι η περίοδος παραμένει σταθερή σε μια κλίμακα περιβαλλοντικών συνθηκών (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 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* (δότες χρόνου) συγχρονίζουν το ενδογενές σύστημα χρόνου με μία 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 από 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 κirkάδιους 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 μα περάσει περίπου ένας αιώνας μέχρι να μετρηθούν με ακρίβεια οι κινήσεις των φύλλων, ώσπου διαπιστώθηκε ότι οι ρυθμοί αυτοί ήταν 24 ωρών, δηλαδή κirkάδιοι, 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/σκότους. 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 κirkάδιο ρυθμό. Οι κirkάδιοι ρυθμοί στα ζώα περιγράφηκαν πολύ αργότερα, σε αρθρόποδα και σε αρουραίους.

Το γεγονός ότι οι κirkάδιοι 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 κirkάδιοι, 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 κirkάδιου 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 εναλλαγή των χημικών διεργασιών. Οπότε, προβλέφθηκε ότι το ρολόι θα πρέπει να εξαρτάται από τη θερμοκρασία όπως και οι χημικές διεργασίες. Μέχρι το 1960 οι παρατηρήσεις αυτές επεκτάθηκαν σε πολλά άλλα φυτά αλλά και σε ζώα (Sweeney and Hastings, 1960). Το γεγονός ότι τα ρολόγια δεν ήταν ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία, αλλά παρουσίαζαν μία λιγότερο αναμενόμενη εξάρτηση από αυτήν, υποστήριζε 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 κirkάδιων 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 κirkάδια 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 προωθητικής γενετικής για την ταυτοποίηση συστατικών του κirkάδιου ρολογιού ξεκίνησε τη δεκαετία του 1970. Αν και σήμερα είναι δεδομένο ότι τα κirkάδια ρολόγια συντίθενται από προϊόντα γονιδίων, το γεγονός αυτό αποτέλεσε την πηγή ιδιαίτερης διαμάχης. Το γεγονός ότι οι προσπάθειες της προωθητικής γενετικής θα ήταν άκαρπες αμφισβητήθηκε, γιατί τα ρολόγια ήταν αρκετά πολύπλοκα για να επιδείξουν πολυγονιδιακή κληρονομησιμότητα (Bunning, 1935) και δεν υποκρίπτον εύκολα σε γενετικές προσεγγίσεις. Παρόλα αυτά, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν μεταλλάξεις με μεταβαλλόμενο μήκος περιόδου στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster* (Kanorka 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 (Comming and Wagner, 1968). Πραγματοποιήθηκαν δύο κρίσιμες ανακαλύψεις: αρχικά ο Kloppstech (1985) περιέγραψε στο φασόλι έναν κirkάδιο 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 αποδείχτηκε ότι ένας αριθμός γονιδίων του *Arabidopsis thaliana* υπόκειται σε κερκάδιο έλεγχο (McClung and Kay, 1994), (McClung, 2009).

ΚΕΦ 3. ΤΟ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΪ ΣΤΟ ARABIDOPSIS THALIANA

3.1 Το φωτό *Arabidopsis thaliana* εμφανίζει πολλούς κιρκάδιους ρυθμούς

Όπως πολλά φυτά, έτσι και το *Arabidopsis thaliana* εμφανίζει ρυθμική κίνηση της κοτυλήδονας και του φύλλου, καθώς και κιρκάδιο ρυθμό στην επιμήκυνση του υποκοτυλίου και του ανθώδους μέρους του βλαστού. Ο έλεγχος της μεταγραφής από το κιρκάδιο ρολόι είναι διαδεδομένος, και η λίστα των γονιδίων του φυτού που ελέγχονται από αυτό είναι μεγάλη. Ανάλυση με μικροσυστοιχίες 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 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.

3.2 Το κιρκάδιο ρολόι στο *Arabidopsis thaliana*

Πολλοί οργανισμοί διαθέτουν κιρκάδια 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 φυτό 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 κιρκάδια ρυθμικότητα στο *Arabidopsis* (κεντρική θηλιά), βασίζεται στην αλληλεπίδραση του TOC1 (timing of cab expression 1), του LHY (LATEELONGATED 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 ιδιοσύστατο 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 κιρκάδιων ρυθμών.

Ο TOC1 κωδικοποιεί για έναν ρυθμιστή, του οποίου η έκφραση έχει μέγιστο το σούρουπο. Μεταλλάξεις στον TOC1 μικραίνουν την περίοδο όλων των κιρκάδιων ρυθμών που έχουν ελεγχθεί μέχρι τώρα.

Επιπρόσθετα, αύξηση στη δόση του TOC1 μεγαλώνει την περίοδο των κιρκάδιων ταλαντωτών, ενώ η υπερέκφρασή του από έναν ιδιοσύστατο 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 κirkάδια 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 κirkάδια ρυθμικότητα, πιθανόν λειτουργούν για να καταστείλουν την έκφραση αρκετών γονιδίων που είναι συγχρονισμένα με το βράδυ και για να προωθήσουν την έκφραση γονιδίων που είναι συγχρονισμένα με το πρωί, παρέχοντας ένα μηχανισμό που συνδέει τον κirkάδιο ταλαντωτή με πολλές βιοχημικές και φυσιολογικές διεργασίες. Τα κirkάδια 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 κirkάδιου 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 γονίδια 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 μετά-μεταγραφική και μετά-μεταφραστική ρύθμιση των στοιχείων του κirkάδιου 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 ετεροδιμές 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 3. 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 ή 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'-nGAAnTTCnnGAAn-3'. Το συγκεκριμένο στοιχείο είναι το πιο διαδεδομένο, υπάρχουν όμως και άλλα με μικρές 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 θερμικού 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),

- ✓ βιολογικοί παράγοντες (φυτά, παθογόνα, ζώα).

ΚΕΦ 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Υλικά

MS (Murashige skoog)

(4,4 gr/lit και 1% άγαρ)

Murashige και Skoog ή (MSO ή MS0) 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.

4.2 Μέθοδοι

4.2.1 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).

4.2.2 Παρασκευή διαλύματος MS

Για την παρασκευή του MS χρησιμοποιούνται 1,5% άγαρ δηλαδή 15 gr/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 τελειώσει η αποστείρωση, αναδεύτηκε το μπουκάλι για να κρύνει 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 τα τριβλία 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, μπήκαν τα τριβλία στους 38 °C για 90 λεπτά, στην συνέχεια στους 22 °C για 2 ώρες και τέλος στους 45 °C για 1 ώρα.

Όταν πέρασε και η 1 ώρα, τότε, 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.

4.3 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 5. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 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*

5.2 Μετρήσεις

Στην ακόλουθη παράγραφο παρουσιάζονται οι μετρήσεις που έγιναν στο περιβάλλον του εργαστηρίου στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Στο πρώτο στάδιο διεξαγωγής του πειράματος, το οποίο πραγματοποιήθηκε στις 16/7/2012, ένας αριθμός μεταλλαγμάτων (*hesp-1*) και σπερμάτων Col-0, τοποθετήθηκαν σε διάφορα τριβλία. Στον Πίνακα 1 φαίνεται το πλήθος των σπερμάτων που τοποθετήθηκαν σε κάθε τριβλίο.

A/A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>hesp-1</i>	8	9	9	11	9	10	10	8	10	7	7	11	10	9	6	10	7
Col-0	8	8	6	6	9	6	9	7	7	7	10	8	7	10	8	7	10

Πίνακας 1. Πλήθος σπερμάτων *hesp-1* και *col-0* που τοποθετήθηκαν αρχικά στα τριβλία.

Στο επόμενο στάδιο του πειράματος, που έλαβε χώρα στις 23/7/2012, τα σπέρματα που φύτεψαν εκτέθηκαν σε υψηλές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, ύστερα από την έκθεση των τριβλίων στη θερμοκρασία των 45 °C, είτε για 60 είτε για 180 λεπτά, έγινε καταμέτρηση των μεταλλαγμάτων (*hesp-1*) και των Col-0 σπερμάτων που επιβίωσαν. Οι μετρήσεις αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

A/A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
min.	60								180								
<i>hesp-1</i>	4	6	8	11	8	10	10	8	5	4	3	4	2	2	2	1	1
Col-0	3	0	4	2	5	2	7	7	1	0	0	1	0	3	0	2	0

Πίνακας 2. Πλήθος σπερμάτων που επιβίωσαν.

Με βάση αυτές τις μετρήσεις, προέκυψαν τα αντίστοιχα επί τοις εκατό ποσοστά βιωσιμότητας που φαίνονται στον Πίνακα 3.

°C	Λεπτά	Μεταλλάγματα (<i>hesp-1</i>)	Col-0
45	60	90,14%	62%
45	180	34,21%	10,45%

Πίνακας 3. Ποσοστά βιωσιμότητας (%) για τα δύο είδη σπερμάτων.

hesp1

Col-0



Εικόνα. Μεταλλάγματα *hesp1* και αγρίου τύπου φυτά Col-0 4 μία εβδομάδα μετά τη θερμική καταπόνηση.

5.3 Συμπεράσματα

Παρατηρώντας τα ποσοστά του Πίνακα 2, είναι εύκολο και εύλογο να συμπεράνει κανείς ότι τα μεταλλάγματα (*hesp-1*) έχουν μεγαλύτερο ποσοστό βιωσιμότητας 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.

Συγκεκριμένα, για χρόνο 60 λεπτών, το ποσοστό βιωσιμότητας των μεταλλαγαμάτων είναι 90,14%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα σπέρματα Columbia (Col-0) είναι 62%. Συγκρίνοντας τους δύο αριθμούς, παρατηρεί κανείς ότι το ποσοστό βιωσιμότητας των μεταλλαγαμάτων είναι 45,39% μεγαλύτερο από το ποσοστό βιωσιμότητας των σπερμάτων Col-0. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι το πλήθος των μεταλλαγαμάτων που επιβίωσαν είναι σχεδόν (λίγο παραπάνω από) 45% μεγαλύτερο από το πλήθος των σπερμάτων Col-0 που επιβίωσαν.

Επιπλέον, για χρόνο ίσο με 180 λεπτά παρατηρούνται ανάλογα αποτελέσματα. Ειδικότερα, το ποσοστό βιωσιμότητας των μεταλλαγαμάτων είναι 34,21%, ενώ αυτό των σπερμάτων Col-0 είναι 10,45%. Είναι φανερό ότι τα ποσοστά βιωσιμότητας και για τα δύο είδη σπερμάτων είναι, σε αυτή την περίπτωση, αρκετά μικρότερα σε σχέση με αυτά για το χρόνο των 60 λεπτών. Ωστόσο, γίνεται αντιληπτό ότι για χρόνο 180 λεπτών τα μεταλλάγματα έχουν τριπλάσιο ποσοστό βιωσιμότητας απ'ότι τα Col-0 σπέρματα.

Πράγματι, λοιπόν, διαπιστώνεται ότι τα μεταλλάγματα ανταποκρίθηκαν καλύτερα στις συνθήκες του πειράματος, αφού τα ποσοστά βιωσιμότητάς τους ήταν αρκετά μεγαλύτερα από αυτά των Col-0. Αυτό συμβαίνει διότι τα Col-0 σπέρματα δεν αντέχουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε υψηλές θερμοκρασίες. Μάλιστα, είναι προφανές ότι το ποσοστό βιωσιμότητας των τριβλίων με σπέρματα Col-0 που παρέμειναν σε θερμοκρασία 45 °C για τριπλάσιο χρονικό διάστημα (180 λεπτά) ήταν κατά πολύ μικρότερο από το αντίστοιχο ποσοστό για τα τριβλία που εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 45 °C για 60 λεπτά. Σε κάθε

περίπτωση, αποδείχτηκε ότι τα μεταλλάγματα (*hesp-1*) είναι περισσότερο ανθεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες απ'ότι τα σπέρματα Col-0.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [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 homeostasis in Arabidopsis thaliana by the clock regulator time for coffee*, 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.