

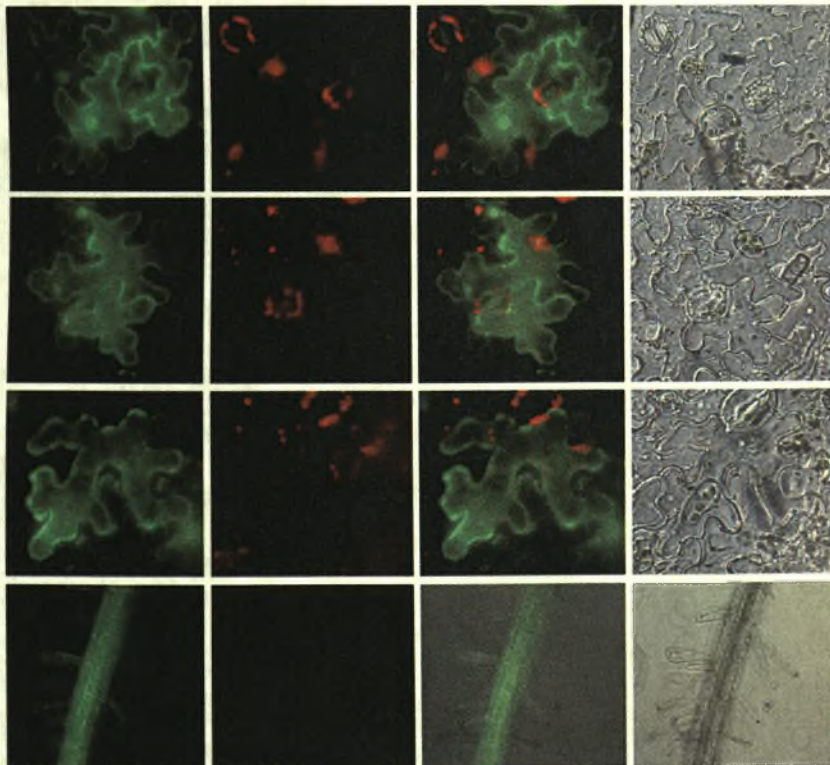
«ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ»

«ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ»

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΠΟΔΙΑ ΒΑΡΒΑΡΑ

«Υποκυτταρικός εντοπισμός δύο ισομορφών της
υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης του φυτού
Medicago truncatula»



ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8104/1

Ημερ. Εισ.: 04-10-2011

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

571.92

ΠΟΔ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000092154

**«Υποκυτταρικός εντοπισμός δύο
ισομορφών της υπεροξειδάσης της
γλουταθειόνης του φυτού
Medicago truncatula»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

➤ **ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ**

Επίκουρος καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

➤ **ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΔΗΣ ΚΟΣΜΑΣ**

Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Ανάπτυξης Φυτών του τμήματος Βιολογίας, τομέας Βοτανικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

➤ **ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ**

Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών Μικροοργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών με υπεύθυνη την επίκουρο καθηγήτρια Παπαδοπούλου Καλλιόπη στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα και στο εργαστήριο Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών με υπεύθυνο τον επίκουρο καθηγητή Χαραλαμπίδη Κοσμά στον τομέα Βοτανικής του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου στην Αθήνα.

Γι' αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχάς την κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη που δέχτηκε να με αναλάβει ως υπεύθυνη της διπλωματικής μου και να πραγματοποιήσει την επιθυμία μου να με στείλει στην Αθήνα για να τελειώσω και το κομμάτι αυτό του μεταπτυχιακού μου. Την ευχαριστώ επίσης για τη βοήθειά της στη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας, τις συμβουλές, την καθοδήγηση, την ενθάρρυνση, την υπομονή της και για την συνεχή επικοινωνία που είχαμε τις τελευταίες ημέρες πριν την κατάθεση της διπλωματικής μου όταν τη χρειαζόμουν περισσότερο.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Χαραλαμπίδη Κοσμά που με δέχτηκε στο εργαστήριό του, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε σε θέματα μοριακής βιολογίας, όπως επίσης και για τις μοριακές τεχνικές πάνω στις οποίες με εκπαίδευσε. Τον ευχαριστώ επίσης για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, το χρόνο που αφιέρωσε στο να με βοηθήσει να πραγματοποιήσω τα πειράματα που απαιτούνταν, το ενδιαφέρον, την υπομονή, τον ευγενικό του τρόπο καθώς και για τη συμβολή του τόσο στο πειραματικό μέρος όσο και στη συγγραφή του κειμένου της διπλωματικής μου.

Επίσης, ευχαριστώ τον κύριο Καρπούζα Δημήτρη ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής, τον κύριο Ρούση Αντρέα για τις πρακτικές του συμβουλές, το διδάσκοντα ΠΔ 407 Κώστα Δελή για την πραγματοποίηση των *in silico* αναλύσεων και την υποψήφια διδάκτορα Μύρτζιου Γιάννα που με εμπιστεύτηκε και μου παραχώρησε τον πειραματικό χειρισμό του συγκεκριμένου κομματιού της διδακτορικής της διατριβής.

Ευχαριστώ τους υποψήφιους διδάκτορες Ζωγραφίδη Άρη και Καπόλα Γιώργο, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μινοπέτρου Μάρθα, την προπτυχιακή φοιτήτρια Μπερή Δέσποινα καθώς και όλα τα παιδιά του εργαστηρίου Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την πρακτική τους βοήθεια αλλά και για το ευχάριστο κλίμα που διαμόρφωναν στον εργαστηριακό χώρο.

Τέλος, ένα ευχαριστώ αξίζουν φυσικά οι μόνιμοι και σταθεροί χορηγοί ηθικής αλλά και οικονομικής υποστήριξης που είναι οι γονείς και η οικογένειά μου, αλλά και η αγαπημένη μου φίλη, συμφοιτήτρια και μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ρουσίδου Κωσταντίνα τόσο για την ηθική όσο και για την έμπρακτη συμπαράστασή της όλα τα χρόνια των σπουδών μου στο Πανεπιστήμιο αλλά και τις τελευταίες ημέρες πριν την κατάθεση της διπλωματικής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. Εισαγωγή	7
I.1. Οξειδωτική καταπόνηση στα φυτά.	8
I.1.1. Ενεργές μορφές οξυγόνου (ROs).	8
I.1.1.1. Παραγωγή των ROs στα φυτικά κύτταρα.	9
I.1.1.2. Ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός στα φυτικά κύτταρα.	10
I.1.1.3. Αποφεύγοντας την παραγωγή ROs στα φυτικά κύτταρα.	13
I.2. NO και οξειδωτική καταπόνηση.	14
I.3. Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPXs).	15
I.4. <i>Medicago truncatula</i> .	17
I.5. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> και μεταφορά DNA.	18
I.5.1. Δυαδικό σύστημα μεταφοράς στο <i>Agrobacterium</i> .	20
I.6. Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP.	21
I.7. Ο <i>Cauliflower mosaic virus</i> (CaMV) 35S υποκινητής.	23
I.8. Μικροσκοπία Φθορισμού.	23
Σκοπός	25
II. Υλικά και μέθοδοι	27
II.1. Φυτικό υλικό	28
II.2. Συνθήκες καλλιέργειας	29
II.3. Διαδικασία κλωνοποίησης των υπό μελέτη ακολουθιών.	30
II.3.1. Κλωνοποίηση των δύο ισομορφών της GPX6, short και long.	30
II.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction)	30
II.4.1. PCR ενίσχυση των δύο ισομορφών της GPX6.	31
II.4.2. PCR ενίσχυση του CaMV35S υποκινητή	32
II.4.3. PCR ενίσχυση τμήματος του φορέα p35SEGFP-N1	33
II.5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	33
II.5.1. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR και πέψεων	34
II.6. Καθαρισμός των επιθυμητών κομματιών DNA (gel extraction και PCR clean up)	34
II.7. Πέψεις με ένζυμα περιορισμού	34
II.7.1. Πέψεις φορέων και ενθεμάτων (ή ένθετων τμημάτων)	35
II.7.2. Διαγνωστικές πέψεις	36
II.8. Αντίδραση σύνδεσης (ligation)	37
II.8.1. Αντιδράσεις σύνδεσης τμημάτων ενθεμάτων και γραμμικών φορέων.	38

II.9. Μετασχηματισμός (transformation) βακτηριακών κυττάρων.	38
II.9.1. Μετασχηματισμός (transformation) βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> .	39
II.9.1.1. Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> .	39
II.9.1.2. Μετασχηματισμός DH5a με pGEM T-easy.	
II.9.1.3. Μετασχηματισμός DH10B με p35SEGFP-N1, pCambia35SEGFP, pCambia35SGPX6(short)EGFP και pCambia35SGPX6(long)EGFP.	39 40
II.9.2. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	40
II.9.2.1. Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>A. tumefaciens</i> GV3101:pMP90.	
II.9.2.2. Μετασχηματισμός GV3101:pMP90 με pCambia35SEGFP, pCambia35SGPX6(short)EGFP και pCambia35SGPX6(long)EGFP.	40 41
II.10. Υγρές καλλιέργειες βακτηρίων	41
II.11. Απομόνωση πλασμιδίων	41
II.11.1. Boiling preps	42
II.11.2. Mini preps	42
II.12. Στοκ γλυκερόλης	42
II.13. Αλληλούχιση τμημάτων DNA	42
II.14. Παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού.	
II.14.1. Παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού <i>Nicotiana benthamiana</i> με <i>A. tumefaciens</i> GV3101:pMP90 με pCambia35SEGFP, pCambia35SGPX6(short)EGFP και pCambia35SGPX6(long)EGFP.	43 43
II.15. Σταθερός μετασχηματισμός <i>Arabidopsis thaliana</i> .	
II.15.1. Σταθερός μετασχηματισμός <i>A.thaliana</i> με <i>A. tumefaciens</i> GV3101:pMP90 με pCambia35SGPX6(short)EGFP και pCambia35SGPX6(long)EGFP.	44
II.16. Διαδικασία χρώσης μιτοχονδρίων στις ρίζες μετασχηματισμένων φυτών <i>A.thaliana</i> με Mitotracker.	44 46
II.17. Μικροσκοπία φθορισμού.	46
II.18. Πλασμιδιακοί φορείς	46
II.19. Διαλύματα	
II.19.1. Θρεπτικά μέσα και αντιδραστήρια για τη δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και το μετασχηματισμό τους.	49 49
II.19.2. Διαλύματα και θρεπτικά μέσα μετασχηματισμού φυτών <i>A.thaliana</i> .	50
II.19.3. Διάλυμα STET	51
II.19.4. Διαλύματα για τον Παροδικό μετασχηματισμό φύλλων καπνού	51
II.19.5. Διαλύματα χρώσης MitoTracker Orange CMTMRos	52

III. Αποτελέσματα	53
III.1. Κλωνοποίηση των δύο ισομορφών του γονιδίου της <i>GPX6</i> .	54
III.2. Δημιουργία κατασκευής μεταφραστικής σύντηξης ισομορφών της <i>GPX6</i> με το γονίδιο αναφοράς <i>GFP</i> .	57
III.2.1. Δημιουργία ενδιάμεσου φορέα p35SEGFP-N1.	57
III.2.2. Δημιουργία του ανασυνδιασμένου πλασμιδιακού φορέα pCambia2201:35S:EGFP.	60
III.2.3. Κλωνοποίηση των δύο cDNAs της <i>GPX6</i> στον ανασυνδιασμένο φορέα pCambia2201:35S:EGFP.	63
III.3. Υποκυτταρικός εντοπισμός των ισομορφών της <i>GPX6</i> σε <i>N.benthamiana</i> .	64
III.4. <i>GFP-GPX6</i> έκφραση στο ριζικό σύστημα του φυτού <i>A.thaliana</i> .	67
IV. Συμπεράσματα-Συζήτηση	69
V. Βιβλιογραφία	72

I.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1. Οξειδωτική καταπόνηση στα φυτά.

Η οξειδωτική καταπόνηση προκαλείται από την έλλειψη ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROs) και την βιολογική ικανότητα των συστημάτων να αποτοξινώνονται άμεσα από αυτά τα δραστικά ενδιάμεσα ή να επιδιορθώνουν εύκολα την προκαλούμενη βλάβη. Όλες οι μορφές ζωής διατηρούν, μέσω της δράσης μιας σειράς ενζύμων, ένα αναγωγικό περιβάλλον μέσα στα κύτταρά τους. Διαταραχές σε αυτή τη φυσιολογική αναγωγική κατάσταση μπορούν να προκαλέσουν τοξικά αποτελέσματα μέσω της παραγωγής υπεροξειδίων και ελευθέρων ριζών που προκαλούν βλάβη σε όλα τα συστατικά του κυττάρου συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA [1].

I.1.1. Ενεργές μορφές οξυγόνου (ROs).

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROs) είναι εν μέρει ανηγμένες μορφές ατμοσφαιρικού οξυγόνου (O_2). Τυπικά προκαλούνται από τη διέγερση του στοιχειακού οξυγόνου (O_2) για το σχηματισμό μονήρους οξυγόνου (O_2^{\cdot}) ή από τη μεταφορά ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων στο στοιχειακό οξυγόνο για το σχηματισμό μίας υπεροξειδικής ρίζας ($O_2^{\cdot-}$), υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) ή μία ρίζας υδροξυλίου (HO^{\cdot}). Σε αντίθεση με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, οι ROs είναι πολύ δραστικές, τοξικές και ικανές να οξειδώνουν απεριόριστα διάφορα κυτταρικά συστατικά με αποτέλεσμα την οξειδωτική καταστροφή των κυττάρων [2-5].

Αυτό συμφωνεί με την παραδοσιακή άποψη που θεωρεί τις ROs ως αναπόφευκτα παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού [2]. Εντούτοις, τα πρόσφατα χρόνια, έχει προσδιοριστεί ένας καινούριος ρόλος των ROs ως σηματοδοτικά μόρια στα φυτά για τον έλεγχο και τη ρύθμιση βιολογικών διαδικασιών όπως την αύξηση, τον κυτταρικό κύκλο, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, την ορμονική σηματοδότηση, τις απαντήσεις σε βιοτική και αβιοτική καταπόνηση και την ανάπτυξη [6-16].

I.1.1.1. Παραγωγή των ROs στα φυτικά κύτταρα.

Υπάρχουν πολλές πιθανές πηγές ROs στα φυτά. Μερικές είναι αντιδράσεις που εμπλέκονται στο φυσιολογικό μεταβολισμό, όπως η φωτοσύνθεση και η αναπνοή [2], ενώ άλλες ανήκουν σε μονοπάτια που ενισχύονται κατά την οξειδωτική καταπόνηση, όπως η γλυκολυτική οξειδάση στα υπεροξειδιοσώματα κατά τη διάρκεια της φωτοαναπνοής. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί νέες πηγές ROs στα φυτά που περιλαμβάνουν τις οξειδάσες του NADPH, τις αμινοοξειδάσες και τις υπεροξειδάσες του κυτταρικού τοιχώματος. Αυτές ρυθμίζονται αυστηρά και συμμετέχουν στην παραγωγή ROs κατά τη διάρκεια διαδικασιών όπως ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (PCD) και η άμυνα έναντι παθογόνων [3,5,17].

Οργανίδια με αυξημένη μεταβολική οξειδωτική δραστηριότητα ή με ένα έντονο ρυθμό ροής ηλεκτρονίων, όπως οι χλωροπλάστες, τα μιτοχόνδρια και τα μικροσωμάτια, αποτελούν μία σημαντική πηγή παραγωγής ROs στα φυτικά κύτταρα. Μαζί με ένα μεγάλο αριθμό οξειδασών, το φυτικό κύτταρο είναι κατάλληλα εξοπλισμένο για μία άφθονη αλλά και εύκαμπτη παραγωγή ROs. Στους χλωροπλάστες η πρωταρχική πηγή παραγωγής ROs είναι η αντίδραση Mehler [2]. Η παραγωγή των ROs από αυτή την πηγή εντείνεται στα φυτά από καταστάσεις που περιορίζουν τη σταθερότητα του CO₂, όπως η καταπόνηση που προκαλείται από την ξηρασία, την αλατότητα, τις ακραίες τιμές θερμοκρασιών όπως επίσης και από τον συνδυασμό αυτών των καταστάσεων με την καταπόνηση που προκαλείται από τον έντονο φωτισμό. Στα C₃ φυτά, καταστάσεις περιορισμένου CO₂ μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι της φωτοαναπνοής [18]. Ως μέρος αυτού του μονοπατιού, το H₂O₂ παράγεται στα υπεροξειδιοσώματα από την ενζυμική δραστηριότητα της οξειδάσης του γλυκολικού. Η παραγωγή του H₂O₂ στα μικροσωμάτια μπορεί επίσης να συμβεί κατά τη διάρκεια του καταβολισμού των λιπιδίων σαν επιπρόσθετο προϊόν της οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Στα μιτοχόνδρια, η υπερβολική αναγωγή, που συμβαίνει κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων της αναπνευστικής αλυσίδας, είναι η κύρια πηγή παραγωγής O₂⁻ σε καταστάσεις καταπόνησης [19]. Επιπρόσθετες πηγές ROs στα φυτικά κύτταρα περιλαμβάνουν τις αντιδράσεις αποτοξίνωσης που καταλύονται από τα κυτοχρώματα στο κυτταρόπλασμα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο [20].

Επειδή οι ROs είναι τοξικές, αλλά συμμετέχουν επίσης σε γεγονότα σηματοδότησης, τα φυτικά κύτταρα χρειάζονται τουλάχιστον δύο διαφορετικούς μηχανισμούς για τη ρύθμιση της ενδοκυτταρική τους συγκεντρώσεις: έναν που να επιτρέπει τη σωστή ρύθμιση του κατώτερου επιπέδου των ROs για σηματοδοτικούς σκοπούς, και έναν που να επιτρέπει την αποτοξίνωση από τις ROs που πλεονάζουν, ειδικά κατά τη διάρκεια της καταπόνησης. Επιπλέον, τα είδη των ROs που παράγονται και η ισορροπία μεταξύ των επιπέδων της σταθερής κατάστασης των διαφόρων ROs μπορεί να είναι επίσης σημαντική. Αυτές καθορίζονται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων μηχανισμών παραγωγής και εξουδετέρωσης των ROs και μπορεί να αλλάξουν δραστικά ανάλογα με την φυσιολογική κατάσταση του φυτού και την ενσωμάτωση διαφόρων περιβαλλοντικών, αναπτυξιακών και βιοχημικών ερεθισμάτων [9].

1.1.1.2. Ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός στα φυτικά κύτταρα.

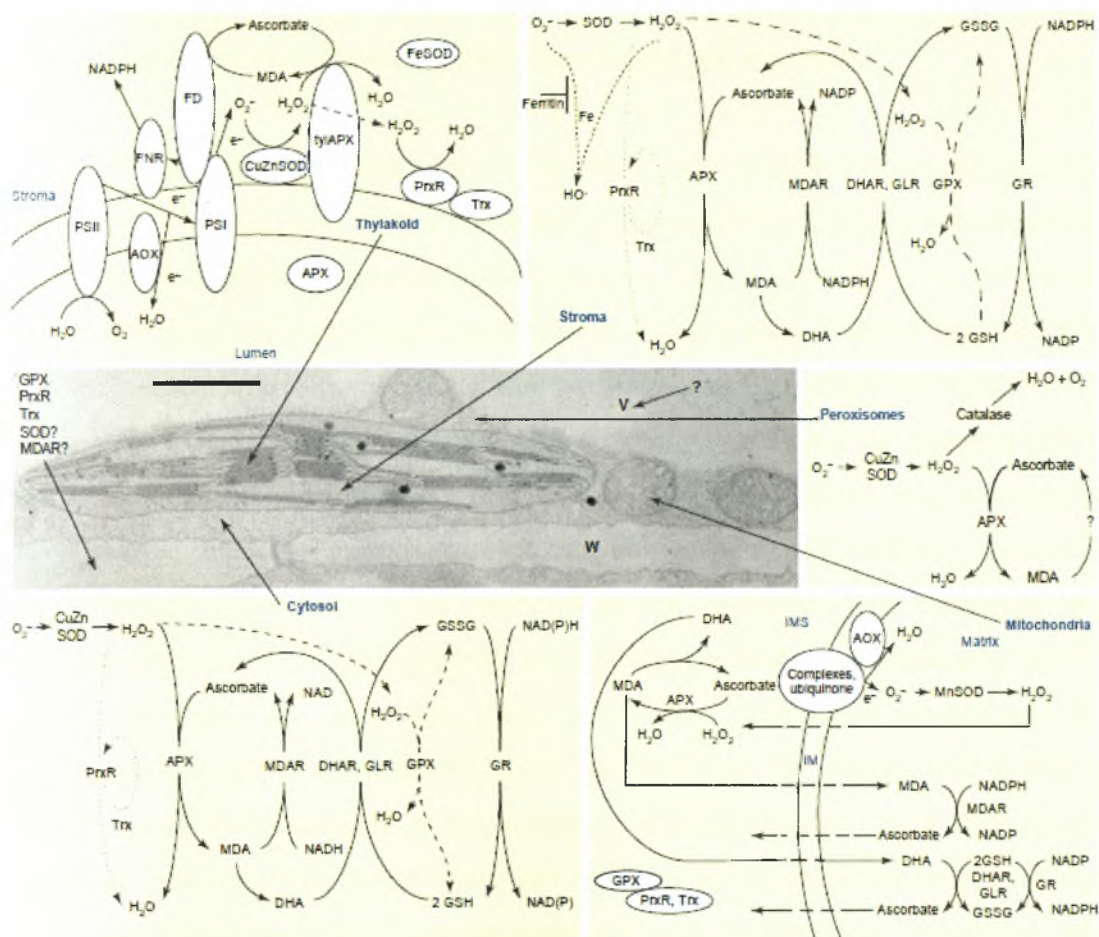
Ο ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός στα φυτικά κύτταρα περιλαμβάνει την υπεροξειδική δυσμουτάση (SOD), την υπεροξειδάση του ασκορβικού (APX), την καταλάση (CAT), την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και την υπεροξειρεδοξίνη (PtxR). Αυτά τα ένζυμα, μαζί με το ασκορβικό οξύ και τη γλουταθειόνη [21], παρέχουν στα κύτταρα ένα αντιοξειδωτικό μηχανισμό υψηλής απόδοσης ενάντια στις υπεροξειδικές ρίζες (O_2^-) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

Οι O_2^- στους χλωροπλάστες μετατρέπονται από τη δισμουτάση της υπεροξικής ρίζας - SOD (superoxide dismutase) που εντοπίζεται εκεί σε H_2O_2 . Στη συνέχεια με τη βοήθεια της υπεροξειδάσης του ασκορβικού - APX (ascorbate peroxidase) των χλωροπλαστών και μεταβολή του ασκορβικού οξέος (AsA) σε μονοδεϋδροασκορβικό οξύ (MDA) το H_2O_2 μετατρέπεται σε νερό. Η παραπάνω μεταβολική πορεία από την παραγωγή της ρίζας οξυγόνου μέχρι την μετατροπή της σε νερό ονομάζεται αντίδραση Mehler. Στους χλωροπλάστες παράγεται και η ένωση φωσφογλυκολικό με τη συμβολή του NADPH και τη βοήθεια του ενζύμου Rubisco. Η ένωση αυτή μεταφέρεται στα υπεροξειδιοσωμάτια και μέσω της οξειδάσης του γλυκολικού μετατρέπεται σε γλυοξυλικό με την παραγωγή H_2O_2 το οποίο μετατρέπεται σε νερό με τη βοήθεια της καταλάσης που εντοπίζεται εκεί (Εικόνα

1.1). Η παραπάνω διαδικασία περιγράφεται γενικά ως φωτοαναπνοή (photorespiration).

Στα μιτοχόνδρια παράγονται O_2^- από τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADPH στο FAD μάλλον από κάποια φλαβοπρωτεΐνη στο σύμπλεγμα I, κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από την ουβικινόνη στο κυτόχρωμα b και από το σύμπλεγμα III στο κυτόχρωμα c. Ένα ένζυμο που μειώνει την παραγωγή ROs είναι η εναλλακτική οξειδάση (AOX), η οποία δέχεται ένα μέρος των ηλεκτρονίων που μεταφέρονται από την ουβικινόνη στο cyt b και τα χρησιμοποιεί για την μετατροπή του οξυγόνου σε νερό (Εικόνα 1.1). Έχει βρεθεί από μελέτες πως η AOX ανταποκρίνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 και υπερεκφράζεται. Σε αντίθετη περίπτωση τα επίπεδά της είναι χαμηλά.

ROs υπάρχουν και μέσα στο κυτταρόπλασμα. Η κυτταροπλασματική SOD, μετατρέπει τις O_2^- σε H_2O_2 . Η APX με μετατροπή του AsA σε MDA μεταβολίζει το H_2O_2 σε νερό. Την ίδια μεταβολική διεργασία εκτελεί και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης - GPX (glutathione peroxidase) με τη διαφορά ότι μετατρέπει την ανηγμένη γλουταθειόνη - GSH (glutathione) σε οξειδωμένη γλουταθειόνη - GSSG. Τα ένζυμα αναγωγάση του μονοδεύδροασκορβικού - MDAR και αναγωγάση της γλουταθειόνης - GR (glutathione reductase) αναλαμβάνουν να επαναφέρουν τα MDA και GSSG στην αρχική τους μορφή σε AsA και GSH αντίστοιχα με ταυτόχρονη μετατροπή του NADPH σε $NADP^+$. Το ένζυμο αναγωγάση του δευδροασκορβικού οξέος - DHAR είναι υπεύθυνο για την ταυτόχρονη μεταβολή του DHA σε AsA και του GSSG σε GSH πάλι με κατανάλωση ενός ηλεκτρονίου και μετατροπή του NADPH σε $NADP^+$ (Εικόνα 1.1).

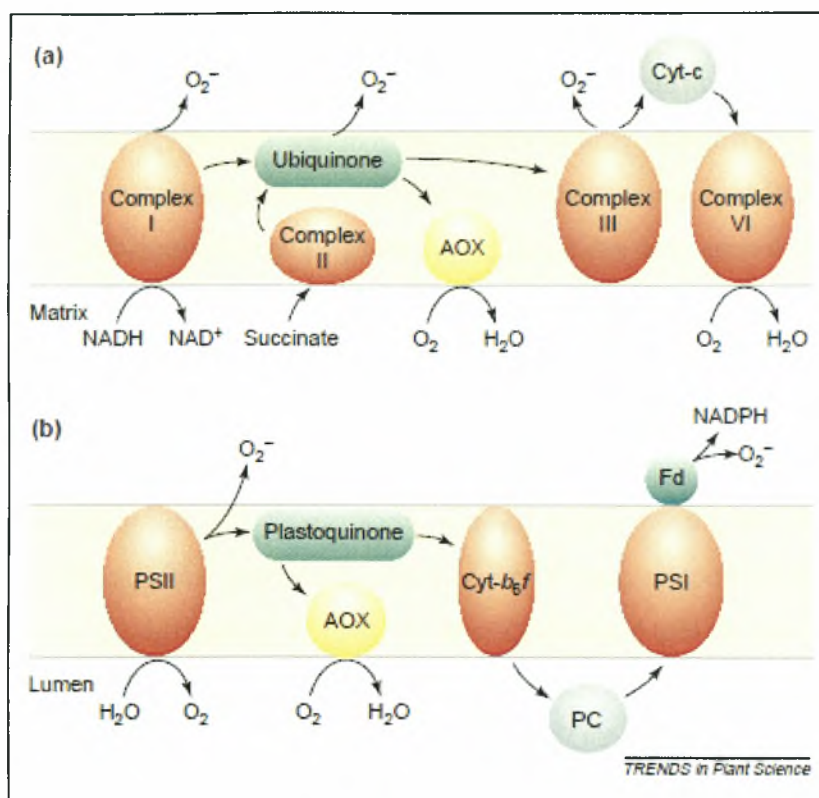


Εικόνα 1.1. Εντοπισμός των μονοπατιών εξουδετέρωσης των ROS στα κύτταρα των φυτών. Μία μικρογραφία ενός τμήματος φυτικού κυττάρου χρησιμοποιείται για να περιγράψει τους σχετικούς όγκους των διαφορετικών κυτταρικών συστατικών και τον φυσικό τους διαχωρισμό (μέση αριστερά). Φαίνονται τα ενζυμικά μονοπάτια που είναι υπεύθυνα για την αποτοξίνωση των ROS. Ο κύκλος νερού-νερού αποτοξινώνει από την O₂⁻ και το H₂O₂, και η εναλλακτική οξειδάση (AOX) μειώνει το ρυθμό παραγωγής των O₂⁻ στα θυλακοειδή [πάνω αριστερά σε μερικά φυτά η σίδηρο υπεροξειδική δυσμουτάση (iron superoxide dismutase, FeSOD) ίσως αντικαθιστά την CuZnSOD στο χλωροπλάστη]. Οι ROS που διαφεύγουν από αυτόν το κύκλο και/ή παράγονται στο στρώμα, υπόκεινται αποτοξίνωση από την SOD και τον κύκλο ασκορβικού-γλουταθειόνης στο στρώμα. Η υπεροξειρεδοξίνη (PtxR) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) εμπλέκονται επίσης στην απομάκρυνση του H₂O₂ στο στρώμα (πάνω δεξιά). Οι ROS που παράγονται στα υπεροξειδισώματα κατά τη διάρκεια της φωτοαναπνοής, της οξείδωσης των λιπαρών οξέων ή άλλων αντιδράσεων εξουδετερώνονται από τις SOD, καταλάση (CAT) και ασκορβική υπεροξειδάση (APX) (μέση δεξιά). Η SOD και τα άλλα συστατικά του κύκλου ασκορβικού-γλουταθειόνης βρίσκονται και στα μιτοχόνδρια. Επιπρόσθετα, στα μιτοχόνδρια, την οξειδωτική καταστροφή προλαμβάνει η AOX (κάτω δεξιά). Το κυτταρόπλασμα, κατ' αρχήν, περιλαμβάνει το ίδιο σύνολο ενζύμων που βρίσκονται και στο στρώμα (κάτω αριστερά). Εντούτοις, αυτά κωδικοποιούνται από ένα διαφορετικό σύνολο γονιδίων και η βασική δραστηριότητα του κύκλου του σιδήρου στο κυτταρόπλασμα που είναι υπεύθυνη για την πρόληψη του σχηματισμού των HO· ριζών είναι άγνωστη. Τα ενζυμικά συστατικά που είναι υπεύθυνα για την αποτοξίνωση των ROS στον αποπλάστη και στο κυτταρικό τοίχωμα (W) είναι μόνο μερικώς γνωστά, και τα μονοπάτια εξουδετέρωσης των ROS στο χυμοτόπιο (V) είναι άγνωστα. Τα ένζυμα που είναι δεσμευμένα στη μεμβράνη αναπαρίστανται με άσπρο, τα μονοπάτια της GPX υποδεικνύονται με διακεκομμένες γραμμές και τα μονοπάτια της PtxR υποδεικνύονται με στικτές γραμμές στο στρώμα και το κυτταρόπλασμα. Αν και τα μονοπάτια, στα διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα, είναι κυρίως διαχωρισμένα το ένα από το άλλο, το H₂O₂ μπορεί εύκολα να διαχυθεί διαμέσου των μεμβρανών και τα αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη και το ασκορβικό οξύ (ανηγμένα ή οξειδωμένα) μπορούν να μεταφερθούν μεταξύ των διαφορετικών υποκυτταρικών διαμερισμάτων. Συντμήσεις: DHA, δεϋδροασκορβικό. DHAR, DHA αναγωγή. FD, φερεδοξίνη. FNR, φερεδοξίνη NADPH αναγωγή. GLR, γλουταρεδοξίνη. GR, αναγωγή της γλουταθειόνης. GSH, ανηγμένη γλουταθειόνη. GSSG, οξειδωμένη γλουταθειόνη. IM, εσωτερική μεμβράνη. IMS, IM χώρος. MDA, μονοδεϋδροασκορβικό. MDAR, MDA αναγωγή. PSI, φωτοσύστημα I. PSII, φωτοσύστημα II. Trx, θειορεδοξίνη. tyl, θυλακοειδή.

I.1.1.3. Αποφεύγοντας την παραγωγή ROs στα φυτικά κύτταρα.

Η αποφυγή της παραγωγής ROs ίσως είναι εξίσου σημαντική με την ενεργητική εξουδετέρωσή τους. Επειδή πολλές καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης συνοδεύονται από έναν έντονο ρυθμό παραγωγής ROs, η αποφυγή ή ο μετριασμός των αποτελεσμάτων αυτών των καταστάσεων καταπόνησης, όπως η ξηρασία ή ο έντονος φωτισμός, στο μεταβολισμό των φυτών μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο της παραγωγής ROs. Οι μηχανισμοί που θα μπορούσαν να μειώσουν την παραγωγή ROs κατά τη διάρκεια καταστάσεων καταπόνησης περιλαμβάνουν: (1) ανατομικές προσαρμογές όπως η μετακίνηση και το κατσάρωμα των φύλλων, ανάπτυξη καταφρακτικών κυττάρων στην επιδερμίδα και κρύψιμο των στομάτων σε εξειδικευμένες δομές, (2) προσαρμογές στη φυσιολογία όπως ο μεταβολισμός των C₄ και CAM, και (3) μοριακοί μηχανισμοί που επαναπρογραμματίζουν τη φωτοσυνθετική συσκευή σύμφωνα με την ποιότητα και την ένταση του φωτός ή καταστέλλουν ολοκληρωτικά τη φωτοσύνθεση. Εξισορροπώντας την ποσότητα της φωτεινής ενέργειας που απορροφάται από το φυτό με τη διαθεσιμότητα του CO₂, αυτοί οι μηχανισμοί ίσως αντιπροσωπεύουν μία προσπάθεια αποφυγής της υπερβολικής αναγωγής της φωτοσυνθετικής συσκευής και της μεταφοράς των ηλεκτρονίων στο O₂ αντί της αφομίωσης του CO₂.

Η παραγωγή των ROs μπορεί, επίσης, να μειωθεί μέσω της εναλλακτικής διοχέτευσης των ηλεκτρονίων στις αλυσίδες μεταφοράς των ηλεκτρονίων των χλωροπλαστών και των μιτοχονδρίων από ένα σύμπλεγμα ενζύμων που ονομάζονται εναλλακτικές οξειδάσες (AOXs). Οι AOXs μπορούν να προωθήσουν τα διερχόμενα ηλεκτρόνια μέσω των αλυσίδων μεταφοράς των ηλεκτρονίων και να τα χρησιμοποιήσουν στην αναγωγή του O₂ σε νερό (Εικόνα 1.2). Ως εκ τούτου, μειώνουν την παραγωγή ROS με δύο μηχανισμούς: αποτρέπουν τα ηλεκτρόνια από το να ανάγουν το O₂ σε O₂⁻ και μειώνουν το συνολικό επίπεδο του O₂, του υποστρώματος για την παραγωγή ROs, στα κυτταρικά οργανίδια. Μειώνοντας την παρουσία των μιτοχονδριακών AOX αυξάνεται η ευαισθησία των φυτών στην οξειδωτική καταπόνηση [22]. Επιπρόσθετα, οι AOX των χλωροπλαστών επάγονται στα διαγονιδιακά φυτά με έλλειψη APX και/ή CAT, και σε συνηθισμένα φυτά σε απάντηση στον έντονο φωτισμό [23].



Εικόνα 1.2. Εμπλοκή εναλλακτικών οξειδασών (AOX) στην αποφυγή ROs στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (a) και στους χλωροπλάστες (b). Οι AOX εκτρέπουν τα ηλεκτρόνια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγωγή του O₂ σε O₂⁻ και χρησιμοποιούν αυτά τα ηλεκτρόνια για να ανάγουν το O₂ σε H₂O. Επιπρόσθετα, οι AOX μειώνουν το συνολικό επίπεδο του O₂, που αποτελεί το υπόστρωμα για την παραγωγή ROs, στα κυτταρικά οργανίδια. Οι AOX επισημαίνονται με κίτρινο και τα διαφορετικά συστατικά της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων με κόκκινο, πράσινο και γκριζό. Συντμήσεις: Cyt-b₆f, κυτόχρωμα b₆f. Cyt-c, κυτόχρωμα c. Fd, φερρεδοξίνη. PC, πλαστοκυανίνη. PSI, PSII, φωτοσυστήματα I και II.

1.2. NO και οξειδωτική καταπόνηση.

Το νιτρικό οξύ έχει αναφερθεί ότι επάγεται από πολλά διαφορετικά είδη χημικής, μηχανικής και περιβαλλοντικής καταπόνησης σε μία ποικιλία φυτικών ειδών και ότι ρυθμίζει τις απαντήσεις των φυτών στην αβιοτική καταπόνηση.

Σχεδόν όλες οι καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης δημιουργούν ελεύθερες ρίζες και άλλους οξειδωτικούς παράγοντες, αλλά ιδιαίτερα αυξανόμενο επίπεδο ROs

στα φυτικά κύτταρα προκαλείται από την οξειδωτική καταπόνηση στους χλωροπλάστες, τα μιτοχόνδρια και τα υπεροξειδιοσώματα [24]. Οι ROs δεν προκαλούν μόνο οξειδωτική καταστροφή, αλλά επίσης συμμετέχουν σε διάφορες σηματοδοτικές απαντήσεις. Έτσι ο έλεγχος της συγκέντρωσης των ROs από τα φυτά αποτελεί μία απάντηση για την επιβίωσή τους [25]. Στην πραγματικότητα, μειωμένες συγκεντρώσεις NO εξαλείφουν το υπεροξειδικό ανιόν και οι λιπιδικές ρίζες ενεργοποιούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα και ιδιαίτερα την υπεροξειδική δυσμουτάση. Η εξουδετέρωση του υπεροξειδικού ανιόντος από το NO οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξεινιτρίτη (ONOO⁻), που είναι ισχυρά τοξικός στα ζωικά κύτταρα αλλά όχι για τα φυτικά κύτταρα [26, 27]. Σε αντίθεση, υψηλές συγκεντρώσεις NO βελτιώνουν την παραγωγή υπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια αναστέλοντας τη ροή ηλεκτρονίων στην οξειδάση του κυτοχρώματος C [28]. Ο αντιοξειδωτικός ρόλος του NO βασίζεται κυρίως στην ικανότητά του να διατηρεί την κυτταρική οξειδωτική ομειόσταση και να ρυθμίζει την τοξικότητα των ROs. Επιπλέον, το NO έχει επίσης προταθεί ως ένας τρόπος εξάλειψης των νιτρικών που πλεονάζουν από τα φυτικά κύτταρα, αφού οι υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών είναι τοξικές για τα φυτικά κύτταρα [29, 30]. Ένας άλλος σημαντικός ρόλος του NO στην απάντηση στην αβιοτική καταπόνηση βασίζεται στις ιδιότητές του ως σηματοδοτικό μόριο. Το NO εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι καθοδικά της συνθάσης του γιασμονικού οξέος και ανοδικά της συνθάσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου, και ρυθμίζει την έκφραση κάποιων γονιδίων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στην αβιοτική καταπόνηση [31, 32]. Υπάρχει μία συνεργική δράση μεταξύ του NO και των ROS στην βιοσύνθεση του ABA [33]. Επιπλέον, το NO επιδρά στα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου σε απάντηση είτε στην αλατότητα ή στην οσμωτική καταπόνηση που προκαλείται από τη σορβιτόλη [34].

I.3. Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPXs).

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης είναι μία οικογένεια ενζύμων με δράση υπεροξειδάσης, των οποίων ο βασικός βιολογικός ρόλος είναι η προστασία των οργανισμών από την οξειδωτική καταστροφή. Η βιοχημική λειτουργία της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης είναι η αναγωγή των υδροϋπεροξειδικών λιπιδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες και η αναγωγή των ελεύθερων υπεροξειδίων του υδρογόνου σε νερό.

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPXs) καταλύουν την αναγωγή των υπεροξειδίων των λιπιδίων και άλλων οργανικών υπεροξειδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες χρησιμοποιώντας θειορεδοξίνες ως τον προτιμότερο δέκτη ηλεκτρονίων [35]. Στα θηλαστικά, υπάρχουν πέντε διακριτές ομάδες GPX που διαφέρουν στη δομή, την εξειδίκευση για συγκεκριμένα υποστρώματα και τον υποκυτταρικό εντοπισμό [36]. Πολύ λιγότερα πράγματα είναι γνωστά για τις GPX στα φυτά. Αυτές είναι πανομοιότυπες όσον αφορά την αλληλουχία των αμινοξέων με την GPX4 κατηγορία ενζύμων των θηλαστικών, η οποία περιλαμβάνει τις GPX υδρουπεροξειδάσες των φωσφολιπιδίων που εξαρτώνται από το σελήνιο. Πρόσφατα, μία GPX από το πράσινο φύκος *Chlamydomonas reinhardtii* έχει χαρακτηριστεί και δειχθεί ότι περιέχει ένα κατάλοιπο σεληνοκυστεΐνης στο ενεργό της κέντρο [37], αλλά όλες οι GPX από τα τραχεόφυτα όπως έχει αναγνωρισθεί μέχρι τώρα έχουν ένα κατάλοιπο κυστεΐνης στη θέση αυτή [38]. Η βασική λειτουργία των GPX στα φυτά φαίνεται να είναι η εξουδετέρωση των υδροϋπεροξειδασών των φωσφολιπιδίων και ως εκ τούτου η προστασία των κυτταρικών μεμβρανών από την οξειδωτική καταστροφή [39]. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι κάποιες GPX μπορεί επίσης να είναι αναμειγμένες με αναγωγικές μετατροπές κάτω από καταστάσεις έντονης καταπόνησης [40]. Σύμφωνα με αυτές τις δύο λειτουργίες, η έκφραση πολλών GPX εντείνεται σε απάντηση σε αβιοτική και βιοτική καταπόνηση, περιλαμβανομένου της αλατότητας, της τοξικότητας των βαρέων μετάλλων και της μόλυνσης από βακτήρια ή ιικά παθογόνα [41].

Πολλοί cDNA κλώνοι που κωδικοποιούν τις GPX έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτά γεωπονικού ενδιαφέροντος, όπως τα εσπεριδοειδή [42], ο αρακάς [43], το κριθάρι [44] και η τομάτα [35]. Εντούτοις, μέχρι σήμερα, γονίδια *GPX* έχουν μελετηθεί εκτενώς μόνο σε δύο είδη φυτών, το *A.thaliana* [45] και στη λεύκα [46]. Πολλές πληροφορίες στις βάσεις δεδομένων είναι επίσης διαθέσιμες για το ρύζι (*Oryza sativa*), του οποίου το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί πλήρως. Αντίστοιχες μελέτες για γονίδια *GPX* δεν έχουν πραγματοποιηθεί για κάποιο ψυχανθές φυτό, παρά τους πολλαπλούς ρόλους που παίζουν τα αντιοξειδωτικά στη συμβίωση ριζόβιων-ψυχανθών [47,48,49]. Δύο είδη ψυχανθών, το *Lotus japonicus* και το *Medicago truncatula* χρησιμοποιούνται τώρα σαν μοντέλα για πειράματα κλασικής και μοριακής γενετικής.

I.4. *Medicago truncatula*.

Το *Medicago truncatula* είναι ένα μικρό ψυχανθές που απαντάται στην περιοχή της Μεσογείου. Παρουσιάζει μικρή αύξηση, 10-60 cm στο ύψος. Τα φύλλα του είναι τρίφυλλα και στρογγυλεμένα, 1-2 cm στο μήκος και με μία σκούρα κηλίδα στο κέντρο. Τα άνθη του είναι κίτρινα και παράγονται μεμονωμένα ή σε μικρές ταξιανθίες των 2-5 μαζί. Ο καρπός του περιβάλλεται από ένα μικρό ακανθώδες περικάρπιο (Εικόνα 1.3).

Αναλυτικά η συστηματική του ταξινόμηση είναι η εξής:

Βασίλειο: Plantae

Φύλο: Magnoliophyta

Κλάση: Magnoliopsida

Τάξη: Fabales

Οικογένεια: Fabaceae

Υποοικογένεια: Faboideae

Φυλή: Trifolieae

Γένος: *Medicago*

Είδος: *M. Truncatula*

Το *Medicago truncatula* έχει επιλεγεί ως φυτό-μοντέλο για τα ψυχανθή λόγω του μικρού διπλοειδούς γονιδιώματος, της ικανότητάς του να αυτογονιμοποιείται, του μικρού κύκλου ζωής του, του μεγάλου αριθμού σπερμάτων που παράγει και του εύκολου μετασχηματισμού του.

Δημιουργεί συμβιωτικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια όπως τα *Sinorhizobium meliloti* και *Sinorhizobium medicae* και ενδομυκορριζικούς μύκητες (arbuscular mycorrhizal). Το φυτό-μοντέλο *Arabidopsis thaliana* δεν αναπτύσσει τέτοιου είδους συμβιωτικές σχέσεις καθιστώντας το *M. truncatula* ένα σημαντικό εργαλείο για την μελέτη αυτών των διαδικασιών [50].

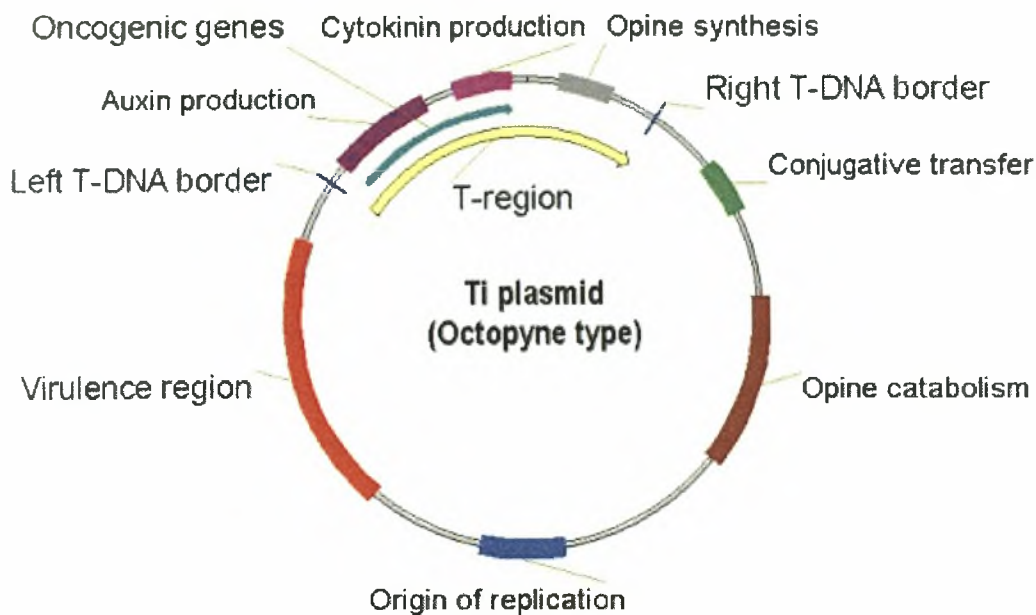


Εικόνα 1.3. *M. Truncatula*. Α) Σπέρματα, Β) Καρποί, Γ) Άνθος, Δ) Φύλλα.

1.5. *Agrobacterium tumefaciens* και μεταφορά DNA.

Ο παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού αλλά και ο σταθερός μετασχηματισμός φυτών *A.thaliana* απαιτούν τη μεταφορά του τελικού ανασυνδιασμένου πλασμιδίου μας σε βακτηριακά κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens*.

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα Gram-αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο του εδάφους που ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae και προκαλεί την ασθένεια της νεοπλασίας των φυτών που ονομάζεται κορονωτός κάλλος. Χρησιμοποιείται ευρέως στις εφαρμογές της βιοτεχνολογίας στα φυτά λόγω της ικανότητας που έχει να μολύνει φυτικά κύτταρα, να μεταφέρει τμήμα του γενετικού του υλικού σε αυτά και να το ενσωματώνει στο γενετικό υλικό του ξενιστή του.



Εικόνα 1.4. Γενετικός χάρτης του Ti πλασμιδίου.

Μπορεί να προσβάλλει σχεδόν όλα τα δικοτυλήδονα φυτά και μερικά μονοκοτυλήδονα της οικογένειας *Liliaceae* και *Amaryllideae*. Η μολυσματική ικανότητα του *Agrobacterium tumefaciens* εξαρτάται άμεσα από την ύπαρξη στο εσωτερικό του κυττάρου του ενός μεγάλου πλασμιδίου μεγέθους 200-250 kb, του Ti (tumor inducing) ογκο-επαγωγικού πλασμιδίου (Εικόνα 1.4). Η ικανότητα αυτή χάνεται όταν το πλασμίδιο αποβάλλεται από τα βακτήρια, απλά με την επώαση τους σε θερμοκρασία υψηλότερη των 30°C. Γενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι, δύο περιοχές (Vir-περιοχή και T-DNA περιοχή) του Ti-πλασμιδίου είναι υπεύθυνες για την ικανότητα του να μολύνει φυτικά κύτταρα. Η Vir περιοχή περιέχει μια σειρά γονιδίων τα οποία όταν επάγονται παράγουν τις Vir πρωτεΐνες, οι οποίες με τη σειρά τους μεταφέρουν το τμήμα του DNA της T-DNA περιοχής στο γονιδίωμα του φυτού. Η T-DNA περιοχή του Ti-πλασμιδίου περιέχει γονίδια τα οποία εκφράζονται μέσα στο φυτό. Μερικά από αυτά τα γονίδια είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση ή τροποποίηση βασικών φυτικών αυξητικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα αυξίνες και κυτοκινίνες. Η ρυθμιστική έκφραση αυτών των T-DNA γονιδίων τροποποιεί την κανονική διαφοροποίηση των φυτικών κυττάρων και οδηγεί σε νεοπλασία. Άλλα γονίδια της T-DNA περιοχής κατευθύνουν την παραγωγή ειδικών αμινοξέων και

παραγώγων σακχάρων (οπίνες), τα οποία αναγνωρίζονται και καταβολίζονται αποκλειστικά και μόνο από το *A. tumefaciens*. Τα T-DNA γονίδια δεν συμβάλλουν στη μεταφορά και ενσωμάτωση της περιοχής αυτής στο γένωμα του φυτού. Η διαδικασία μεταφοράς και ενσωμάτωσης οφείλεται στα γονίδια που εδράζουν στην περιοχή Vir του Ti-πλασμιδίου. Τα γονίδια αυτά (*Vir* γονίδια) ρυθμίζονται από ένα πολύπλοκο σύστημα χημειούποδοχέων, το οποίο είναι ικανό να αναγνωρίζει φυτικούς μεταβολίτες που παράγονται κατά τη διάρκεια βιοσύνθεσης των λιγνινών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Έτσι, ο τραυματισμός του φυτού δεν επιτρέπει μόνο την είσοδο του *A. tumefaciens*, αλλά και την επαγωγή των Vir γονιδίων από τις νεοσυντιθέμενες λιγνίνες. Η μεταφορά του T-DNA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνοριακές ακολουθίες που βρίσκονται στα δύο άκρα του T-DNA. Πρόκειται για δύο πολύ όμοιες σε σειρά επαναλαμβανόμενες ακολουθίες μεγέθους 24 bp οι οποίες αναγνωρίζονται από τις Vir πρωτεΐνες. Η διαδικασία αντιγραφής της T-DNA περιοχής οδηγεί στην παραγωγή μιας σειράς μονόκλωνων και δίκλωνων T-DNA ενδιάμεσων προϊόντων, από τα οποία πιθανότατα το μονόκλωνο T-DNA μόριο μεταφέρεται στο φυτό μέσω μεμβρανικών πόρων που δημιουργούνται από τα προϊόντα των Vir γονιδίων. Οποιαδήποτε λοιπόν DNA ακολουθία βρίσκεται μεταξύ των δύο T-DNA συνοριακών ακολουθιών μπορεί να μεταφερθεί με παρόμοιο τρόπο στο φυτό παρουσία των Vir πρωτεϊνών. Στα φυτά, η μονόκλωνη T-DNA αλυσίδα μεταφέρεται στον πυρήνα του μολυσμένου κυττάρου.

Σήμερα υπάρχει μια πληθώρα τροποποιημένων στελεχών *Agrobacterium tumefaciens*, τα οποία φέρουν Ti –πλασμίδια απαλλαγμένα από την T-DNA περιοχή, διατηρώντας όμως τα γονίδια της Vir περιοχής και τις επαναλαμβανόμενες συνοριακές αλληλουχίες της T-DNA περιοχής (LB, RB). Η εισαγωγή, σε αυτά τα στελέχη, ειδικά κατασκευασμένων δυαδικών φορέων που φέρουν επιθυμητές DNA ακολουθίες μεταξύ των δύο συνοριακών, επιτρέπει την εύκολη κατευθυνόμενη γενετική τροποποίηση πολλών φυτών.

I.5.1. Δυαδικό σύστημα μεταφοράς στο *Agrobacterium*

Το δυαδικό σύστημα μεταφοράς χαρακτηρίζεται από δύο πλασμίδια τα οποία συνυπάρχουν ανεξάρτητα και αυτόνομα μέσα στο *Agrobacterium*, το πλασμίδιο Ti και ο φορέας μεταφοράς. Το πλασμίδιο Ti στο δυαδικό σύστημα περιέχει τα γονίδια της τοξικότητας vir, και μία αρχή αντιγραφής (*oriA*), αλλά δεν περιέχει τα T-DNA

επαναλαμβανόμενα συνοριακά. Το πλασμίδιο μεταφοράς περιέχει τουλάχιστον ένα (το δεξί) επαναλαμβανόμενο συνοριακό, μία αρχή αντιγραφής ευρέως φάσματος ξενιστών (*oriV*, *oriT*), ώστε να αντιγράφεται στο *Agrobacterium* και στο *E. coli*, λειτουργίες κινητοποίησης των πλασμιδίων (*trfA*), καθώς και ένα γονίδιο επιλογής (ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό).

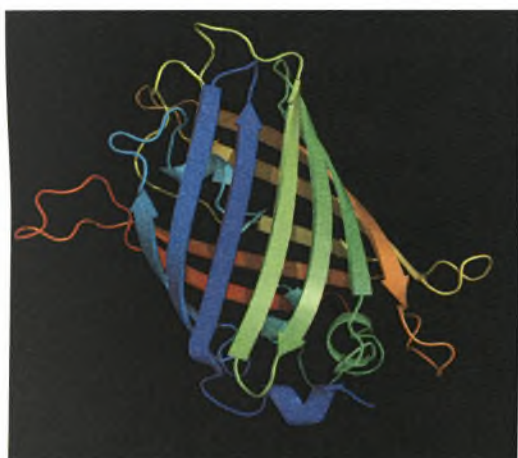
Ένα τέτοιο πλασμίδιο παρέχει τη δυνατότητα εφαρμογής μοριακών χειρισμών (εισαγωγή κάποιου τμήματος του DNA, τροποποίηση κάποιου γονιδίου, δημιουργία γονιδίου χίμαιρα, κ.λ.π.) χρησιμοποιώντας το σύστημα του *E. Coli* (όπου είναι πολύ πιο εύκολο). Ακολούθως το πλασμίδιο μεταφέρεται στο *Agrobacterium*. Επιπλέον, τα πλασμίδια αυτά συνήθως περιέχουν τεχνητές πολυδύναμες θέσεις κλωνοποίησης και κωδικοποιούν κάποιο μάρτυρα επιλογής των μετασχηματισμένων φυτικών κυττάρων. Μετά τη σύζευξη και τα δύο πλασμίδια συνυπάρχουν μέσα στο *Agrobacterium* κάτω από επιλεκτική πίεση.

Κατά τη μόλυνση του φυτού από το *Agrobacterium*, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από την περιοχή *nir* του πλασμιδίου T_i αλληλεπιδρούν με τα T-DNA συνοριακά του πλασμιδίου μεταφοράς σε κατάσταση trans, κινητοποιούν το “T-DNA”, μεταφέρουν το DNA που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα επαναλαμβανόμενα T-DNA συνοριακά και τελικά το εισάγουν στο γονιδίωμα του φυτού. Λόγω του μικρού μεγέθους του πλασμιδίου αυτού, μεγάλα τμήματα του DNA είναι δυνατό να κλωνοποιηθούν και ακολούθως να εισαχθούν μέσα στο γονιδίωμα φυτικών κυττάρων.

1.6. Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP

Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP είναι ένα πρωτεϊνικό συγκρότημα 238 αμινοξέων (26.9 kDa) (Εικόνα 1.5), που εκπέμπει ένα έντονο πράσινο φθορισμό όταν εκτεθεί σε μπλε φωτισμό. Αν και πολλοί άλλοι θαλάσσιοι οργανισμοί έχουν παρόμοιες πράσινες φθορίζουσες πρωτεΐνες, η GFP παραδοσιακά αναφέρεται στην πρωτεΐνη που πρώτη απομονώθηκε από τη μέδουσα *Aequorea victoria* (Εικόνα 1.6). Η GFP από την *A. victoria* έχει μία έντονη κορυφή διέγερσης σε ένα μήκος κύματος 395 nm και μία μικρότερη στα 475 nm. Η κορυφή εκπομπής της είναι στα 509 nm που βρίσκεται στο χαμηλότερο πράσινο τμήμα του ορατού φάσματος. Στην κυτταρική και μοριακή βιολογία το γονίδιο της GFP χρησιμοποιείται συχνά σαν γονίδιο αναφοράς της έκφρασης. Σε τροποποιημένη μορφή έχει χρησιμοποιηθεί για

να δημιουργηθούν βιοαισθητήρες και πολλά ζώα έχουν σχεδιαστεί που εκφράζουν την GFP ως μία απόδειξη της θεωρίας ότι ένα γονίδιο μπορεί να εκφράζεται σε οποιοδήποτε σημείο ενός δεδομένου οργανισμού. Το γονίδιο της GFP μπορεί να εισαχθεί σε οργανισμούς και να διατηρηθεί στο γονιδίωμά τους διαμέσου διασταύρωσης, έκχυσης με υικό φορέα, ή μετασχηματισμού κυττάρων. Μέχρι σήμερα το γονίδιο GFP έχει εισαχθεί και εκφραστεί σε πολλά βακτήρια, ζύμες και άλλους μύκητες, καθώς και σε κύτταρα από ψάρια (όπως το *Brachydanio rerio*), φυτά, μύγες και θηλαστικά συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Οι Martin Chalfie, Osamu Shimomura και Roger Y. Tsien βραβεύτηκαν το 2008 με το βραβείο Νόμπελ στη χημεία για την ανακάλυψη και την αξιοποίηση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης [51].



Εικόνα 1.5. Σχηματική απεικόνιση της τεταρτοταγής δομής της GFP.

Εικόνα 1.6. Φωτογραφία της μέδουσας *Aequorea victoria* από την οποία προέρχεται η GFP που χρησιμοποιείται σήμερα για πειραματικούς σκοπούς.



Η αγρίου τύπου GFP έχει διάφορα μειονεκτήματα και περιορισμούς στη χρήση ως δυνατό αναλυτικό εργαλείο. Για παράδειγμα, έχει διπλό μέγιστο στο φάσμα διέγερσης, ευαισθησία στο pH και στο χλώριο, ανεπαρκές πεδίο φθορισμού των κβάντων, ανεπαρκής φωτοσταθερότητα και αναδίπλωση στους 37°C. Το 1995, ο Roger Tsien επεξεργάστηκε την αγρίου τύπου GFP αλλάζοντας την αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης διαμέσου θέση κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, δημιουργώντας, έτσι, μεταλλάγματα με διαφορετικό μήκος κύματος εκπομπής και βελτιωμένη θερμοσταθερότητα [41]. Αργότερα δημιουργήθηκε η βελτιωμένη GFP (EGFP, enhanced GFP) και άλλα μεταλλάγματα όπως οι μπλε (EBFP και EBFP2), κυανές φθορίζουσες πρωτεΐνες (ECFP, Cerulian, CyPet) και κίτρινα φθορίζοντα πρωτεϊνικά παράγωγα (YFP, Citrine, Venus, YPet).

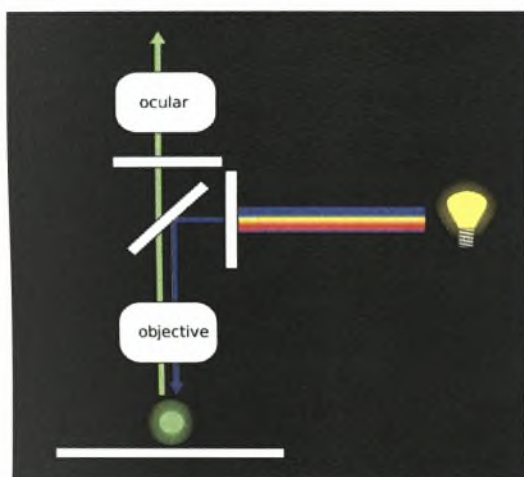
I.7. Ο *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S υποκινητής.

Ο 35S υποκινητής, από τον ιό του μωσαϊκού του κουνουπιδιού (CaMV), είναι ένας πολύ ισχυρός συστατικός υποκινητής υπεύθυνος για τη μεταγραφή ολόκληρου του γονιδιώματος του CaMV. Είναι γνωστός για τη χρήση του στο μετασχηματισμό φυτών. Προκαλεί υψηλά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης στα δικότυλα φυτά. Εντούτοις, είναι λιγότερο αποτελεσματικός στα μονοκοτυλήδονα φυτά και ιδιαίτερα στα σιτηρά. Οι διαφορές στη συμπεριφορά οφείλονται πιθανόν στην ποιότητα και/ή στην ποσότητα των ρυθμιστικών παραγόντων. Ο υποκινητής αυτός ονομάζεται CaMV 35S λόγω του ότι ο συντελεστής καθίζησης του ιικού μεταγράφου, του οποίου η έκφραση κατευθύνεται φυσιολογικά από αυτόν τον υποκινητή, είναι 35S. Είναι ένας από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους, γενικούς συστατικούς υποκινητές. Ανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '80 από τον Chua και τους συνεργάτες του στο Πανεπιστήμιο Rockefeller [42].

I.8. Μικροσκοπία Φθορισμού

Η μικροσκοπία φθορισμού είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως στις βιοεπιστήμες. Το φως διέγερσης περνάει από πάνω (ή, για ανάστροφα μικροσκόπια, από κάτω), από τον αντικειμενικό φακό και στη συνέχεια πάνω στο δείγμα αντί να διέρχεται πρώτα μέσα από το δείγμα (Εικόνα 1.7). (Στην τελευταία περίπτωση το εκπεμπόμενο φως διέγερσης φτάνει τον αντικειμενικό φακό μαζί με το εκπεμπόμενο

φως από το δείγμα). Ο φθορισμός στο δείγμα αυξάνει το εκπεμπόμενο φως το οποίο εστιάζεται στον ανιχνευτή από τον ίδιο αντικειμενικό φακό που χρησιμοποιείται για τη διέγερση. Ένα φίλτρο μεταξύ του αντικειμενικού φακού και του ανιχνευτή φιλτράρει το φως διέγερσης από το φως φθορισμού. Αφού το περισσότερο από το φως διέγερσης μεταδίδεται μέσω του δείγματος, μόνο το αντανακλώμενο φως διέγερσης φτάνει στον αντικειμενικό φακό μαζί με το εκπεμπόμενο φως και αυτή η μέθοδος συνεπώς δίνει ένα βελτιωμένο σήμα στην αναλογία του θορύβου. Μία κοινή χρήση στη βιολογία είναι να εφαρμόζουμε το φθορισμό ή χρώσεις με φθορίζουσα ουσία στο δείγμα για να οπτικοποιήσουμε μία πρωτεΐνη ή άλλα μόρια που μας ενδιαφέρουν [43].



Εικόνα 1.7. Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του μικροσκοπίου

Εικόνα 1.8. Φωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού.

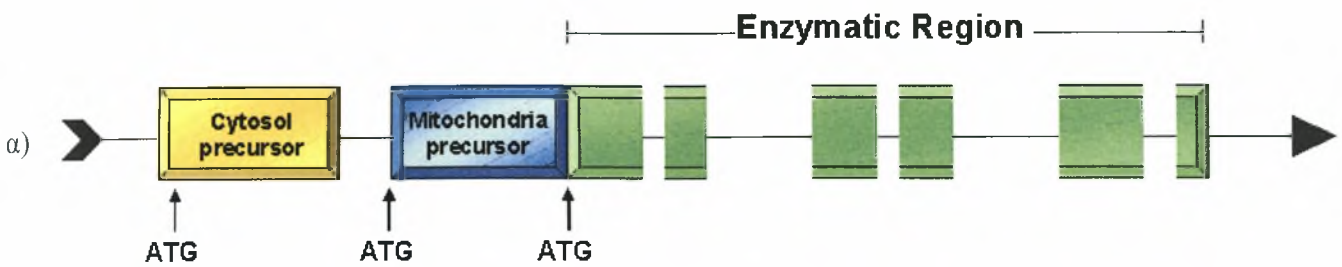


ΣΚΟΠΟΣ

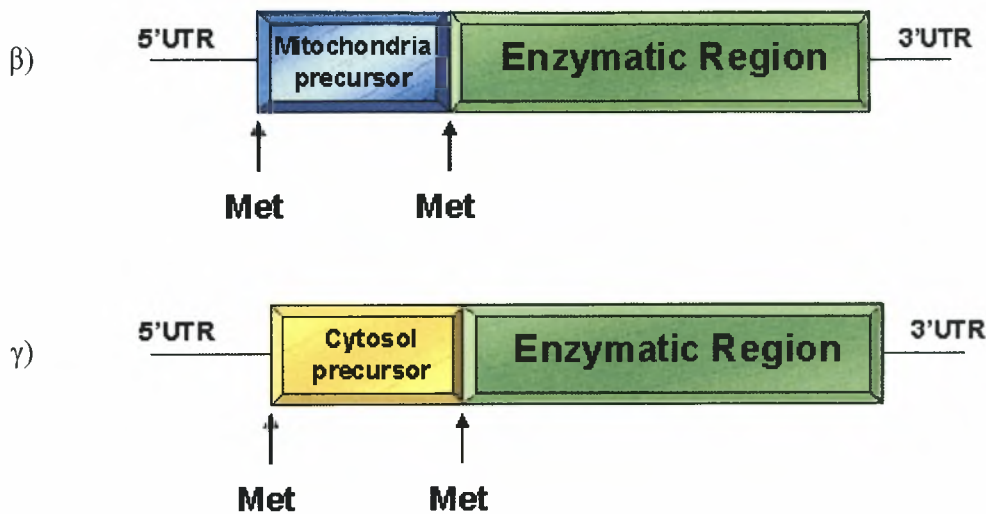
Η χορήγηση s-nitrosoglutathion (GSNO) σε φυτά *M. truncatula* προκαλεί υπερέκφραση μιας GPX που παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την GPX6 του *Arabidopsis* (Μύρτζιου και Παπαδοπούλου, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Από την *in silico* ανάλυση προέκυψε ότι το γονίδιο της *GPX6* από το φυτό *M. truncatula* μπορεί να υποστεί εναλλακτικό μάτισμα από το οποίο προκύπτουν δύο διαφορετικά mRNAs (Εικόνα 1.9). Οι αλληλουχίες των mRNAs αυτών διαφέρουν ως προς το πεπτίδιο οδηγό που είναι πιθανόν να κατευθύνει την ενζυμική περιοχή σε δύο διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα.

Έτσι, η παρούσα μελέτη είχε σαν σκοπό τον υποκυτταρικό εντοπισμό των δύο αυτών ισομορφών του γονιδίου της *GPX6* του φυτού *M. truncatula*. Η πειραματική προσέγγιση που επιχειρήθηκε ήταν ο μετασχηματισμός φυτών με κατασκευές που επιτρέπουν την έκφραση των δύο ισομορφών σε μεταφραστική σύντηξη με την πρωτεΐνη GFP.

The MtGPX6 GENE



The MtGPX6 mRNAs



Εικόνα 1.9. Σχηματική απεικόνιση της δεοξυριβονουκλεοτιδικής (α) και των ριβονουκλεοτιδικών (β και γ) περιοχών του γονιδίου της MtGPX6 όπως προκύπτουν έπειτα από εναλλακτικό μάτισμα. Με πράσινο παραλληλόγραμμα αναπαριστάται η ενζυμική περιοχή του γονιδίου, ενώ με λεπτή γραμμή τα εσώνια και οι μη μεταφραζόμενες περιοχές. Το μπλε παραλληλόγραμμα αναπαριστά τη νουκλεοτιδική περιοχή που κατευθύνει (σύμφωνα με τις υπολογιστικές προβλέψεις) τη short ισομορφή στα μιτοχόνδρια, ενώ το κίτρινο τη νουκλεοτιδική περιοχή που κατευθύνει τη long ισομορφή στο κυτταρόπλασμα.

II. ΥΛΙΚΑ

ΚΑΙ

ΜΕΘΟΔΟΙ

II. Υλικά και μέθοδοι

II.1. Φυτικό υλικό

Το γονίδιο που μελετήθηκε προέρχεται από το φυτό *Medicago truncatula*.

Σαν φυτικό υλικό για την πραγματοποίηση των πειραμάτων: (α) παροδικού και (β) σταθερού μετασχηματισμού, χρησιμοποιήθηκαν τα φυτά *Nicotiana benthamiana* και *Arabidopsis thaliana* (οικότυπος Columbia), αντίστοιχα.

Το *Nicotiana benthamiana* (Εικόνα 2.1) ανήκει στην οικογένεια Solanaceae και, λόγω της υφής των φύλλων του, χρησιμοποιείται συχνά ως φυτό-μοντέλο σε πειράματα παροδικού μετασχηματισμού.



Εικόνα 2.1. *Nicotiana benthamiana*.

Το *A.thaliana* (Εικόνα 2.2) ανήκει στην οικογένεια Brassicaceae και είναι το πλέον ενδεδειγμένο φυτό για πειράματα βασικής έρευνας καθώς έχει αλληλουχηθεί ολόκληρο το γονιδίωμα του, είναι μικρό σε μέγεθος (κι επομένως μπορεί να καλλιεργηθεί εύκολα), έχει μικρό κύκλο ζωής και μικρό γένωμα ενώ παράγει μεγάλο αριθμό σπερμάτων και οι συνθήκες ανάπτυξής του είναι σχετικά εύκολες. Ακόμα, το γεγονός ότι αυτογονιμοποιείται (αποφυγή ανεπιθύμητων σταυρογονιμοποιήσεων) σε συνδιασμό με τον εύκολο μετασχηματισμό του μας βοηθάει στη γρήγορη και εύκολη δημιουργία μεταλλαγμένων σειρών που περιέχουν το προς μελέτη γονίδιο.



Εικόνα 2.2. *A. thaliana*. A) ροζέτα, B) φυτό 4 εβδομάδων, C) άνθος, D) τμήμα ταξιανθίας E) σπέρματα.

II.2. Συνθήκες καλλιέργειας

Medicago truncatula

Φυτά *Medicago truncatula* αναπτύχθηκαν σε περλίτη και υπέστησαν επεξεργασία με s-nitrosoglutathione (GSNO). ριζοπότισμα, μία χημική ένωση που παίζει ρόλο δότη NO εξωγενώς. Συλλέχτηκαν ολόκληρα φυτά και έγινε εξαγωγή ολικού RNA. Παρασκευάστηκε cDNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ενίσχυση των δύο διαφορετικών mRNAs που προκύπτουν από το γονίδιο της GPX.

N.benthamiana

Σπόροι του φυτού ενυδατώθηκαν για 12 ώρες στους 4°C και αποστειρώθηκαν σε 30% υδατικό διάλυμα χλωρίνης. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε χώμα και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, υγρασία 40-60% και φωτοπερίοδο: 16 ώρες φως/ 8 ώρες σκοτάδι).

Arabidopsis thaliana

Τα φυτά αυτά καλλιεργήθηκαν όπως και τα *N.benthamiana* με τη διαφορά ότι δεν πραγματοποιήθηκε αποστείρωση των σπόρων σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης.

II.3. Διαδικασία κλωνοποίησης των υπό μελέτη ακολουθιών.

Η κλωνοποίηση γονιδίων ή/και συμπληρωματικών cDNAs αποσκοπεί στην απόκτηση των επιθυμητών ακολουθιών σε πλασμιδιακούς φορείς. Επιπρόσθετα, η διαδικασία επιτρέπει την δημιουργία εξειδικευμένων κατασκευών, βάσει των οποίων μπορεί να μελετηθεί περεταίρω η λειτουργία ενός γονιδίου/πρωτεΐνης.

II.3.1. Κλωνοποίηση των δύο ισομορφών της GPX6, short και long.

Για την κλωνοποίηση των *GPX6s* χρησιμοποιήθηκε cDNA το οποίο προέρχονταν από αντίστροφη μεταγραφή του ολικού mRNA φυτών *M.truncatula* που είχαν υποστεί μεταχείριση με s-nitrosoglutathione (GSNO).

II.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction).

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (ή PCR – polymerase chain reaction) είναι μία *in vitro* μέθοδος για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό αλληλουχίας DNA ή cDNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του, χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών όπως η *E. coli* ή οι ζύμες. Έτσι, από αρχική ποσότητα δείγματος DNA μη ανιχνεύσιμου με κλασσικές τεχνικές υβριδοποίησης (Southern blotting), το DNA ενισχύεται με την PCR ώστε να γίνεται εύκολα ανιχνεύσιμο.

Για την πραγματοποίηση της τεχνικής αυτής απαιτείται η χρήση:

- Μικρής ποσότητας DNA εκμαγείου
- Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων 15-30 βάσεων (εκκινητές ή primers)
- Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)
- Ειδική Taq πολυμεράση που έχει απομονωθεί από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι θερμοσταθερή διατηρώντας τη δραστηρότητά της σε θερμοκρασίες έως και 95°C.

- Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για την Taq πολυμεράση.
- Κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος MgCl₂.

Η PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Ξεκινάει με έναν αρχικό κύκλο αποδιάταξης και ακολουθούν 25-40 κύκλοι (ανάλογα με την ενίσχυση που απαιτείται) καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει: αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, υβριδοποίηση των εκκινητικών μορίων και επέκταση του DNA. Σε κάθε κύκλο από ένα αρχικό μόριο DNA παράγονται δύο νέα μόρια. Οπότε ο πολλαπλασιασμός των μορίων DNA σε μία αντίδραση PCR ακολουθεί εκθετική μορφή με αποτέλεσμα την τελική παραγωγή 2ⁿ μορίων DNA, όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων αντίδρασης.

II.4.1. PCR ενίσχυση των δύο ισομορφών της GPX6

Για την απομόνωση των δύο ισομορφών του γονιδίου της GPX6 πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα (template) cDNA από ρίζες και φύλλα του φυτού *M.truncatula*. Οι PCR που πραγματοποιήθηκαν περιελάμβαναν τα εξής:

cDNA (από ρίζες και φύλλα) (10-40ng)	1,0 μl
Buffer (10x) (Promega)	5,0 μl
dNTPs (2.5mM το καθένα)	1,0 μl
longSalf ¹ / shortSalf ² (forward primers)(10pmol/μl)	2,0 μl
BamHnonstopR ³ (reverse primer)(10pmol/μl)	2,0 μl
Taq πολυμεράση (5u/μl)	1,0 μl
ddH ₂ O	38,0 μl
Τελικός όγκος	50,0 μl

¹GCAGGTCGACATGGAGTTACTCGG

²CGTGGTCGACATGCTTTGTAGTACT

³ATAGGGATCCAGTGCATCAAGCAACTCAGC

Οι αντιδράσεις ολοκληρώθηκαν σε 35 κύκλους, ενώ οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι PCR ήταν οι παρακάτω:

Αρχικός κύκλος αποδιάταξης	95°C για 5 λεπτά	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	95°C για 45 δευτερόλεπτα	
Υβριδοποίηση	55°C για 30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση	72°C για 30 δευτερόλεπτα	
Τελικός πολυμερισμός	72°C για 10 λεπτά	

II.4.2. PCR ενίσχυση του CaMV35S υποκινητή

Για την απομόνωση του CaMV35S υποκινητή από τον πλασμιδιακό φορέα pCambia 2201 πραγματοποιήθηκε η παρακάτω PCR από δύο φορές:

pCambia 2201	0,5 μl
Buffer (5x)	10,0 μl
dNTPs (10mM)	1,0 μl
forward primer (35s RI) ⁴ (10pmol/μl)	2,5 μl
reverse primer (35s SalI) ⁵ (10pmol/μl)	2,5 μl
Taq Phusion Polymerase	0,5 μl
ddH ₂ O	33,0 μl
Τελικός όγκος	50,0 μl

⁴ ATCAGAATTCAAAGATTCAAATAGAGGACC

⁵ ATCAGTCGACAGTCCCCGTGTTCTCTC

Η αντιδράση ολοκληρώθηκε σε 35 κύκλους, ενώ οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η PCR ήταν οι παρακάτω:

Αρχικός κύκλος αποδιάταξης	98°C για 30 δευτερόλεπτα	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	98°C για 10 δευτερόλεπτα	
Υβριδοποίηση	63°C για 20 δευτερόλεπτα	
Επέκταση	72°C για 15 δευτερόλεπτα	
Τελικός πολυμερισμός	72°C για 5 λεπτά	

II.4.3. PCR ενίσχυση τμήματος του φορέα p35SEGFP-N1

Για την απομόνωση του 35s υποκινητή με το γονίδιο αναφοράς GFP από τον πλασμιδιακό φορέα p35seGFP-N1 πραγματοποιήθηκε η παρακάτω PCR:

p35seGFP-N1	0,4 μl
Buffer (5x)	20,0 μl
dNTPs (10mM)	2,0 μl
forward primer (35SRI) (10μM)	5,0 μl
reverse primer (GFPBstEII) ⁶ (10 μM)	5,0 μl
Taq Phusion Polymerase	0,6 μl
ddH ₂ O	67,0 μl
Τελικός όγκος	100,0 μl

⁶ ATCAGGTAACCTTTACTTGTACAGCTCGTC

Η αντιδράση ολοκληρώθηκε σε 35 κύκλους, ενώ οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε ήταν οι παρακάτω:

Αρχικός κύκλος αποδιάταξης	98°C για 30 δευτερόλεπτα	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	98°C για 10 δευτερόλεπτα	
Υβριδοποίηση	63°C για 20 δευτερόλεπτα	
Επέκταση	72°C για 15 δευτερόλεπτα	
Τελικός πολυμερισμός	72°C για 5 λεπτά	

II.5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό μορίων (DNA, RNA και πρωτεϊνών). Για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης απαιτείται η παρουσία ενός πηκτώματος αγαρόζης, μίας χρωστικής που θα μας επιτρέψει να δούμε τα δείγματά μας στο πήκτωμα (βρωμιούχο αιθίδιο), μιας συσκευής ηλεκτροφόρησης και ενός ηλεκτρολυτικού διαλύματος (TAE ή TBE).

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ρεύματος.

Στην παρούσα εργασία οι ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιούνταν σε 0,8 και 1% πήκτωμα αγαρόζης ενώ η χρώση γίνονταν με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου.

II.5.1. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR και πέψεων

Τα δείγματα των PCR και των πέψεων ηλεκτροφορούνταν για τον έλεγχο της παρουσίας προϊόντων αλλά και για να απομονωθούν τα τμήματα DNA (φορέων και ένθετων ακολουθιών) προκειμένου να δημιουργηθούν οι επιθυμητές κατασκευές. Τα πηκτώματα που χρησιμοποιούνταν ήταν περιεκτικότητας 0,8 και 1 % αγαρόζης σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE. Τα πηκτώματα βάφονταν μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης για 10 λεπτά σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου. Στα δείγματα προσθέτονταν επίσης, πριν την ηλεκτροφόρηση, 1μL loading buffer ανά 10 μL δείγματος προς ηλεκτροφόρηση η οποία πραγματοποιούνταν σε ένταση ηλεκτρικού ρεύματος 80 V.

II.6. Καθαρισμός των επιθυμητών κομματιών DNA (gel extraction και PCR clean up)

Η έκλουση από πήκτωμα (gel extraction) και ο καθαρισμός της αντίδρασης PCR (PCR clean up) πραγματοποιούνται μετά από τις αντιδράσεις των πέψεων και PCR και είναι διαδικασίες απαραίτητες για την επανάκτηση των καθαρών από προσμίξεις τμημάτων DNA από το μείγμα των αντιδράσεων αυτών. Είναι δε, ιδιαίτερα χρήσιμες όταν για τα τμήματα αυτά πρόκειται να ακολουθήσει αντίδραση σύνδεσης (ligation).

Στη συγκεκριμένη εργασία το gel extraction και το PCR clean up πραγματοποιήθηκαν με το NucleoSpin Extract II kit της Macherey-Nagel.

II.7. Πέψεις με ένζυμα περιορισμού

Ένα πολύ βασικό χαρακτηριστικό των βακτηριακών κυττάρων είναι η ανάπτυξη ενός ενζυμικού μηχανισμού που τα προστατεύει, επιτρέποντάς τους να

ελέγχουν με ακρίβεια την προέλευση του εισερχόμενου DNA και να το καταστρέφουν. Ο μηχανισμός αυτός απαρτίζεται από συγκεκριμένα ένζυμα που αποτελούν μέρος του συστήματος περιορισμού και τροποποίησης ξένου DNA. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται ένζυμα περιορισμού και ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει την αναγνώριση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA και τον τεμαχισμό του (δεν κόβουν το μεθυλωμένο DNA του βακτηρίου). Υπάρχουν διάφορα ένζυμα περιορισμού το καθένα από τα οποία αναγνωρίζει και μια διαφορετική αλληλουχία DNA. Το αποτέλεσμα των αντιδράσεων αυτών είναι η παραγωγή τμημάτων DNA με μονόκλωνα ή τυφλά άκρα ανάλογα με το ένζυμο περιορισμού που χρησιμοποιείται.

Η απομόνωση και η χρήση τους έχει βοηθήσει πολύ στην χαρτογράφηση γονιδιωμάτων διαφόρων οργανισμών, στην αναγνώριση πολυμορφισμών ή σημειακών μεταλλάξεων σε γνωστά γονίδια όπως επίσης και στον ανασυνδυασμό τμημάτων DNA.

II.7.1. Πέψεις φορέων και ενθεμάτων (ή ένθετων τμημάτων)

Προκειμένου να προχωρήσουμε σε αντιδράσεις σύνδεσης των φορέων και των ενθεμάτων για τη δημιουργία των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων μας, με σκοπό την κλωνοποίηση γονιδίων ή/και τη δημιουργία κατάλληλων κατασκευών για το μετασχηματισμό φυτών, πραγματοποιούμε πέψεις των φορέων και των ενθεμάτων με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού σε τελικό όγκο 100 μl.

Ενδεικτικά για τις πέψεις των φορέων οι αντιδράσεις ήταν οι εξής:

Φορέας	20,0 μl
Buffer	10,0 μl
Ένζυμο 1	1,5 μl
Ένζυμο 2	1,5 μl
BSA (100x)	1,0 μL
ddH ₂ O	66,0 μl
Τελικός όγκος	100,0 μl

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του pEGFP-N1 ήταν τα *EcoRI* και *Sall*, ενώ η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 1 ώρα και 30 λεπτά.

Για την πέψη του pCambia 2201 τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα *EcoRI* και *BstEII*, ενώ η επώαση έγινε, για το *BstEII* αρχικά, στους 60°C για 50 λεπτά και στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη του *EcoRI* και επώαση για άλλα 50 λεπτά στους 37°C.

Τέλος, η πέψη του pCambia35seGFP-N1 έγινε με τα ένζυμα *SalI* και *BamHI*, στους 37°C για 1 ώρα και 30 λεπτά.

Όσον αφορά τις πέψεις των ενθεμάτων ισχυε:

Ένθεμα	77,0 μl
Buffer	10,0 μl
Ένζυμο 1	1,5 μl
Ένζυμο 2	1,5 μl
BSA	1,0 μl
Τελικός όγκος	100,0 μl

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες της αντίδρασης για την πέψη του CaMV35S υποκινητή ήταν ίδια με την πέψη του pGFP-N1. Το τμήμα του φορέα p35seGFP-N1 που περιλαμβάνει τη θέση κοπής για το *EcoRI*, τον CaMV35S υποκινητή, τον πολυσυνδέτη, το γονίδιο αναφοράς eGFP και τη θέση κοπής για το *BstE II* (Εικόνα 2.3) έγινε πέψη όπως ο pCambia 2201 ενώ οι ισομορφές των γονιδίων GPX6 που μελετάμε, όπως ο pCambia35SEGFP-N1.

II.7.2. Διαγνωστικές πέψεις

Οι διαγνωστικές πέψεις γίνονται προκειμένου να επαληθευτεί η παρουσία του ενθέματος αφού έχει προηγηθεί μετασχηματισμός κυττάρων με τα ενθέματα αυτά, επιλογή μετασχηματισμένων αποικιών, υγρή καλλιέργεια ορισμένων από τις μετασχηματισμένες αποικίες και απομόνωση πλασμιδίων από βακτηριακά κύτταρα *E.coli*. Για το λόγο αυτό επιλέγουμε κατάλληλα ένζυμα περιορισμού για να ελέγξουμε το μέγεθος του ενθέματος ή το ειδικό προφίλ του ενζύμου.

Σε αυτή την περίπτωση ο τελικός όγκος των αντιδράσεων ήταν 30 μL και ως ακολούθως:

Πλασμίδιο	4,0 - 20,0 μl
Buffer (10x)	3,0 μl
Ένζυμο 1	0,5 μl
Ένζυμο 2	0,5 μl
BSA	0,3 μl
ddH ₂ O	21,7-5,7μL
Τελικός όγκος	30,0 μl

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι πέψεις αυτές ήταν ανάλογα με τον έλεγχο που πραγματοποιούνταν κάθε φορά.

Για τον έλεγχο της παρουσίας του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα pGEM T-easy πραγματοποιήθηκε η εξής αντίδραση:

Πλασμίδιο	5,0 μl
Ένζυμο	1,0 μl
Buffer (10x)	2,0 μl
RNase	0,5 μl
ddH ₂ O	11,5 μl
Τελικός όγκος	20,0 μl

Επώαση για 2 ώρες στους 37°C.

II.8. Αντίδραση σύνδεσης (ligation)

Κατά την αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιείται η ένωση μορίων DNA με τη δράση του ενζύμου T4 DNA λιγάση. Η DNA λιγάση είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται κατά την αντιγραφή του DNA στη σύνδεση των κομματιών Okazaki. Η δράση της εξαρτάται από το ATP και έχει τη δυνατότητα να αναγνωρίζει άκρα, όχι όμως προέλευση ούτε μέγεθος του DNA. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους τμήματα DNA in vitro, με κολλώδη ή προεξέχοντα συμπληρωματικά άκρα δημιουργώντας έτσι ένα χμαιοικό τμήμα DNA με τις ιδιότητες και των δύο αρχικών τμημάτων DNA.

II.8.1. Αντιδράσεις σύνδεσης τμημάτων ενθεμάτων και γραμμικών φορέων.

Για την εργασία αυτή οι αντιδράσεις σύνδεσης που πραγματοποιήθηκαν ήταν μεταξύ των pGEM T-easy με τις ισομορφές του γονιδίου *GPX6*, 35s υποκινητή με τον φορέα pEGFP-N1, 35SEGFp με τον φορέα pCambia 2201 και των ισομορφών του γονιδίου *GPX6* με τον φορέα pCambia35SEGFp ως εξής:

	Φορέας με ένθεμα	Self ligation
Φορέας (γραμμικός)	2,0 μl	2,0 μl
T4 λιγάση (takara)	0,6 μl	0,6 μl
Buffer (10x)	1,0 μl	1,0 μl
ένθεμα	1,0 μl	—
ddH ₂ O	5,4 μl	6,4μl
Τελικός όγκος	10,0 μl	10,0 μl

Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 16°C για 12 ώρες.

Τα self ligation των φορέων χρησιμοποιήθηκαν σαν αρνητικό κοντρόλ στο μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων DH10B που ακολούθησε.

II.9. Μετασχηματισμός (transformation) βακτηριακών κυττάρων.

Η γενετική μεταβολή ενός κυττάρου, που είναι αποτέλεσμα της εισαγωγής, ενσωμάτωσης και έκφρασης ξένου γενετικού υλικού (DNA) ονομάζεται μετασχηματισμός.

Ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιέχουν το προς μελέτη γονίδιο είναι ένα από τα βασικά βήματα που περιλαμβάνονται στη διαδικασία κλωνοποίησης γονιδίων.

II.9.1. Μετασχηματισμός (transformation) βακτηριακών κυττάρων *E.coli*.

II.9.1.1. Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli*.

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Cohen και συνεργάτες (1972). Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους *E.coli* (DH10B) αναπτύσσεται σε 10 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB (Lysogeny broth) για 12 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση. Εμβολιασμός 1 ml της παραπάνω καλλιέργειας σε κωνική φιάλη που περιέχει 200 ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37 °C υπό ανάδευση, έως ότου η οπτική πυκνότητα της φτάσει $OD_{600}=0,5$. Η καλλιέργεια τοποθετείται για 5 λεπτά στον πάγο και εν συνεχεία τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 6000 στροφές/ λεπτό στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 80 ml παγωμένου διαλύματος Buffer 1. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 6000 στροφές/ λεπτό στους 4 °C. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 8 ml παγωμένου διαλύματος Buffer 2. Τοποθέτηση σε πάγο για 15 λεπτά. Το δείγμα, αφού αναμειχθεί πολύ καλά, μοιράζεται σε φιαλίδια Eppendorf (aliquots των 200 μl) και καταψύχεται αμέσως σε υγρό άζωτο. Η διατήρηση των “δεκτικών” πλέον βακτηριακών κυττάρων, για μακρά χρονικά διαστήματα είναι δυνατή με την αποθήκευση τους στους -80 °C.

II.9.1.2. Μετασχηματισμός DH5a με pGEM T-easy.

Για τις ανάγκες της κλωνοποίησης των ισομορφών του γονιδίου της *GPX6* πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός DH5a κυττάρων με pGEM T-easy που περιείχε τις ισομορφές των γονιδίων της *GPX6*. Για το λόγο αυτόν αναμίχθηκαν 100 μL DH5a δεκτικών βακτηριακών κυττάρων με 2μL από την αντίδραση σύνδεσης και παρέμειναν στους 4°C (πάγος) για 30 λεπτά. Ακολούθησε επώαση για 45 δευτερόλεπτα, σε υδατόλουτρο 42°C (heat shock) και ξανά στους 4°C για 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 900μL LB και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C για 1 ώρα.

Μετά το τέλος της επώασης στρώθηκαν 200μL μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλία LB/Amp με επιλογή μπλε –λευκών αποικιών, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο του pGEM T-easy kit. Τα υπόλοιπα 800μL του μετασχηματισμού

συμπηκνώθηκαν σε 200μL τελικό όγκο και στρώθηκαν σε ένα δεύτερο τρυβλίο. Και για τα δύο τρυβλία η επώαση έγινε στους 37°C για 16 ώρες.

II.9.1.3. Μετασηματισμός DH10B με p35SEGFP-N1, pCambia35SEGFP, pCambia35SGPX6(short)EGFP και pCambia35SGPX6(long)EGFP.

Η διαδικασία μετασηματισμού των DH10b κυττάρων με τα παραπάνω πλασμίδια περιλάμβανε τα εξής στάδια: Σε 120 μl δεκτικών κυττάρων DH10B προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA. Το μείγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ, με τοποθέτηση σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 42°C για 50 δευτερόλεπτα. Προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμιξη του δείγματος και επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Τα κύτταρα κατακρημνίζονται σε φυγόκεντρο (μέγιστη ταχύτητα/ λεπτό). Κατάλληλη ποσότητα κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει ως μέσο επιλογής αντιβιοτικό (χλωραμφενικόλη). Εν συνεχεία τα τρυβλία επωάζονται για 12-16 ώρες στους 37 °C.

II.9.2. Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens*.

II.9.2.1. Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *A. tumefaciens* GV3101:pMP90.

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Holsters και συνεργάτες (1978). Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους *Agrobacterium* (C58C1Rif^R pGV 3101) αναπτύσσεται στους 28 °C σε 5 ml θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες. 2 ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 50 ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 28 °C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα της να φτάσει OD₆₀₀ = 0,6. Η καλλιέργεια τοποθετείται για 10 λεπτά στον πάγο και τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 3000 στροφές/ λεπτό στους 4 °C. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 ml 20 mM παγωμένου CaCl₂ και τα δείγματα των 0,1 ml μοιράζονται σε φιαλίδια Eppendorf και καταψύχονται αμέσως με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Η διατήρηση των δεκτικών

πλέον κυττάρων, για μακρά χρονικά διαστήματα είναι δυνατή με την αποθήκευση τους στους -80 °C.

II.9.2.2. Μετασηματισμός GV3101:pMP90 με pCambia35seGFP, pCambia35sGPX6(short)eGFP και pCambia35sGPX6(long)eGFP.

Σε 100 ml δεκτικών κυττάρων προστίθεται 1 µg πλασμιδιακού DNA. Το μίγμα επώαζεται για 5 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί πάγωμα του δείγματος για 1 λεπτά σε υγρό άζωτο. Εν συνεχεία επώαση για 5 λεπτά στους 37°C. Προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου LB και επώαση για 2-4 ώρες στους 28 °C. Φυγοκέντρηση του δείγματος για 30 δευτερόλεπτα στις 13000 στροφές/ λεπτό και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 µl θρεπτικού μέσου LB. Όλη η ποσότητα του δείγματος επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει ως μέσο επιλογής κατάλληλα αντιβιοτικά (ριφαμπικίνη, γενταμικίνη και καναμικίνη) για την επιλογή τόσο του πλασμιδίου T1 του *Agrobacterium* όσο και του πλασμιδιακού φορέα. Επώαση των τρυβλίων για 36-48 ώρες σε επωαστικό θάλαμο των 28 °C.

II.10. Υγρές καλλιέργειες βακτηρίων

Μετά το μετασηματισμό των βακτηριακών κυττάρων και την επιλογή σε τρυβλία των αποικιών που έχουν λάβει το πλασμίδιο με το επιθυμητό ένθεμα, κάποιες από τις αποικίες αυτές καλλιεργούνται σε υγρό LB με κατάλληλο αντιβιοτικό και στην ανάλογη θερμοκρασία (28°C για τις καλλιέργειες του *Agrobacterium* και 37°C για το *E. coli*) υπό ανάδευση 200rpm για 12 ώρες.

II.11. Απομόνωση πλασμιδίων

Προκειμένου να ελέγξουμε την παρουσία του επιθυμητού ενθέματος με το σωστό τρόπο (ένα αντίγραφο και με την κατάλληλη φορά) πριν από τις διαγνωστικές πέψεις απαιτείται η απομόνωση των πλασμιδίων από τα βακτηριακά κύτταρα που βρίσκονται σε υγρή καλλιέργεια.

Για το λόγο αυτό στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα των boiling preps και mini preps.

II.11.1. Boiling preps

Σε 1,5mL από το ίζημα της υγρής καλλιέργειας προστίθενται 150μL διαλύματος STET και 2μL λυσοζύμη (50μg/mL). Ανακατεύονται καλά και επωάζονται για 45 δευτερόλεπτα σε νερό που βράζει. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνται για 20 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα και απομακρύνεται το slime. Ακολουθεί προσθήκη 180μL ισοπροπανόλης, καλή ανάμιξη και φυγοκέντρηση για 7 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα. Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται 300μL 70% αιθανόλης. Μετά από καλή ανάμιξη τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα και αφαιρείται το υπερκείμενο. Τέλος, παραμένει για μερικά λεπτά στον πάγκο για να στεγνώσει και η επαναδιάλυση γίνεται σε 30μL νερό.

II.11.2. Mini preps

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Macherey-Nagel για τα πλασμίδια. Η έκλουση έγινε με το προτεινόμενο buffer, ενώ, για την κλωνοποίηση των ισομορφών της GPX6, στάλθηκαν για αλληλούχιση 20μL από το πλασμίδιο συγκέντρωσης 100ng/μL.

II.12. Στοκ γλυκερόλης

Το στοκ γλυκερόλης αποτελεί έναν τρόπο αποθήκευσης μικροβιακής καλλιέργειας έτσι ώστε να είναι διαθέσιμη για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

Για τη δημιουργία στοκ γλυκερόλης τόσο των βακτηρίων *E.coli*, όσο και των *Agrobacterium* που φέρουν τις ανασυνδρασμένες κατασκευές αναμείχθηκαν 800μL υγρής καλλιέργειας με 500μL υδατικού διαλύματος γλυκερόλης 60% (v/v) και αποθηκεύτηκαν σε υπερκαταψήκτη στους -80°C.

II.13. Αλληλούχιση τμημάτων DNA

Η μέθοδος που έχει γίνει πλέον η πάγια τεχνική για την αλληλούχιση του DNA είναι η δεύτερη που επινόησε ο Sanger σε συνδυασμό με μία μέθοδο σήμανσης των ddNTPs που ανέπτυξαν οι Michael Hunkapiller και Leroy Hood. Περιλαμβάνει τη χρήση τριφωσφορικών 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTP), που θα έχουν σημειωθεί

με χρωστική διαφορετικού χρώματος ανάλογα με την αζωτούχο βάση που περιέχουν, και προκαλούν τερματισμό της επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA (Εικόνα 2.5). Πλήρως αυτοματοποιημένες συσκευές αλληλούχισης που βασίζονται στη χρήση τριχοειδών σωληναρίων αντί του κλασικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης αναλύουν τα αποτελέσματα των αντιδράσεων και δίνουν στην οθόνη του υπολογιστή την αλληλουχία του τμήματος DNA που αναλύθηκε.

Η αλληλούχιση των ισομορφών του γονιδίου της *GPX6* έγινε στη εταιρεία Macrogen στην Κορέα.

II.14. Παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού.

Για να προσδιορίσουμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών που μελετάμε, μία συνήθης τεχνική είναι ο παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιείται με καλλιέργεια κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens*, τα οποία φέρουν τις κατάλληλες κατασκευές μεταφραστικής σύντηξης με το γονίδιο αναφοράς GFP. Η έκφραση της συντηγμένης πρωτεΐνης (και του γονιδίου αναφοράς) διατηρείται σε υψηλά επίπεδα χάρη στη χρήση ενός βοηθητικού στελέχους *Agrobacterium*, που εκφράζει ένα καταστολέα της αποσιώπησης (P19), με τον οποίο γίνεται ο συν-μετασχηματισμός των φύλλων καπνού.

II.14.1. Παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού *N.benthamiana* με *A. tumefaciens* GV3101:pMP90 με pCambia35SEGFP, pCambia35SGPX6(short)EGFP και pCambia35SGPX6(long)EGFP.

Διαχωρίστηκαν σε 4 eppendorfs από 1,5mL υγρής καλλιέργειας GV3101:pMP90 με τις κατασκευές μας κάθε φορά, που είχε μείνει στους 28°C για 12 ώρες. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 4000rpm και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Προσθήκη από 250 μL διαλύματος εμποτισμού ή διήθηση (infiltration) σε κάθε eppendorf και επαναδιάλυση. Αναμειγνύονται όλα σε ένα eppendorf που φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 4000rpm. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και γίνεται επαναδιάλυση σε 1ml infiltration medium. Πραγματοποιείται αραιώση 1:10 (με διάλυμα έκχυσης) και φωτομέτρηση σε OD₆₀₀ με χρήση του διαλύματος έκχυσης σαν τυφλό.

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται και για την καλλιέργεια με το στέλεχος P19.

Η OD₆₀₀ για την αραιώση της καλλιέργεια του στελέχους P19 ρυθμίζεται στο 0,8 ενώ για τις αραιώσεις των καλλιεργειών με τις κατασκευές μας στο 0,6. Στη συνέχεια αναμειγνύουμε ίση ποσότητα διαλύματος από την αραιώση της καλλιέργεια του στελέχους P19 με ίση ποσότητα από την αραιώσεις των καλλιεργειών με τις κατασκευές μας. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 25°C για 90 λεπτά προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ενεργοποίηση των *vir* γονιδίων του T_i-πλασμιδίου από την ακετοσυριγκόνη που περιέχεται στο διάλυμα έκχυσης. Μετά την επώαση, η καλλιέργεια ενίεται στο μεσόφυλλο φύλλων καπνού από τα στόματα της παραξονικής επιφάνειας. Η παρατήρηση των δειγμάτων, μετά τη λήψη επιδερμικών ιστών από τα φύλλα, πραγματοποιήθηκε μετά την πάροδο 48 ωρών σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss.

II.15. Σταθερός μετασχηματισμός *Arabidopsis thaliana*.

Ο παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού διαρκεί μερικές μέρες, η έκφραση γίνεται μόνο στα κύτταρα των φύλλων του φυτού και μας δίνει τη δυνατότητα να εντοπίσουμε κυρίως πρωτεΐνες που κατευθύνονται σε μεγάλα οργανίδια:

Ο σταθερός μετασχηματισμός φυτών *Arabidopsis* με τις κατασκευές μεταφραστικής σύντηξης προσφέρει τη δυνατότητα α) διατήρησης των διαγονιδιακών σειρών β) χρησιμοποίησης όλων των ιστών, οργάνων και κυττάρων του φυτού, και γ) την περαιτέρω επεξεργασία των ιστών με εξειδικευμένες χρωστικές ειδικές για επιμέρους οργανίδια.

II.15.1. Σταθερός μετασχηματισμός *A.thaliana* με *A. tumefaciens* GV3101:pMP90 με pCambia35SGPX6(short)EGFP και pCambia35SGPX6(long)EGFP.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους Bechtold και συνεργάτες (1993). Είναι προσαρμοσμένη για τη χρησιμοποίηση του οικότυπου *Columbia*. Το ποσοστό επιτυχίας σταθερού μετασχηματισμού ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος και το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν τον αριθμό των μετασχηματισμένων φυτών που θα προκύψουν, είναι η πυκνότητα της καλλιέργειας, το στέλεχος του *Agrobacterium* και οι συνθήκες ανάπτυξης των φυτών μετά το

μετασχηματισμό. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αυτή, 95% περίπου των φυτών δίνουν μετασχηματισμένα σπέρματα. Το ποσοστό των μετασχηματισμένων σπερμάτων για κάθε φυτό μπορεί να φτάσει το 5% (συνήθως όμως κυμαίνεται γύρω στο 2%).

Για την ανάπτυξη, σπέρματα *A.thaliana* (οικότυπος Columbia) τοποθετούνται σε ξεχωριστά δοχεία 7 cm x 7 cm σε πυκνότητα 4 σπέρματα/ δοχείο. Όταν τα φυτά φτάσουν σε ένα ύψος 10-15 cm και τα πρώτα άνθη έχουν σχηματιστεί (μετά από περίπου 4 εβδομάδες) είναι έτοιμα για μετασχηματισμό. Αναπτύσσουμε μία καλλιέργεια με το κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium* (που φέρει την επιθυμητή κατασκευή του δυαδικού φορέα) σε 5 ml θρεπτικού μέσου LB για 16 ώρες στους 28 °C. 1 ml αυτής της καλλιέργειας μεταφέρεται σε 300 ml θρεπτικό μέσο LB και αναπτύσσεται στους 28 °C υπό ανάδευση, μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα να φτάσει $OD_{600}=2,0$. Τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 15 λεπτά στις 4000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1000 ml διαλύματος εμβάπτισης (IM). Η οπτική πυκνότητα του αραιωμένου διαλύματος ρυθμίζεται στα 0,5-0,9. Τα φυτά εμβαπτίζονται μέσα στο διάλυμα αυτό προσέχοντας να είναι βυθισμένα ολόκληρα συμπεριλαμβανομένης της ροζέτας και των δευτερογενών βλαστών που αρχίζουν να εμφανίζονται στη βάση της ροζέτας. Συνίσταται το χώμα να ενυδατώνεται καλά πριν την εμβάπτιση, ώστε να απορροφά όσο το δυνατό λιγότερη καλλιέργεια *Agrobacterium*. Σε αντίθετη περίπτωση το μολυσμένο χώμα παρεμποδίζει την ανάπτυξη των φυτών. Αφού στεγνώσουν με διηθητικό χαρτί καλύπτονται με πλαστικό δοχείο για 24 ώρες έτσι ώστε να διατηρήσουν υψηλή υγρασία και μεταφέρονται σε κλίβανο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22 °C, υγρασία 40 % και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/ 8 ώρες σκοτάδι). Παραμένουν στις παραπάνω συνθήκες μέχρι να κλείσουν το κύκλο ζωής τους. Μόλις αφυδατωθούν, γίνεται η συγκομιδή των σπερμάτων τους. Η επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών της πρώτης διαγονιδιακής (T1) γενιάς, γίνεται έως εξής: Σπέρματα T1 γενιάς αποστειρώνονται και επιστρώνονται σε τριβλία με θρεπτικό μέσο επιλογής (καναμυκίνη). Τα τριβλία μεταφέρονται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22 °C, υγρασία 40 % και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/ 8 ώρες σκοτάδι). Μετά από 7-10 ημέρες τα μετασχηματισμένα σπέρματα αναπτύσσονται σε σκούρα πράσινα φυτά και έχουν φυσιολογικό φαινότυπο. Η ρίζα τους είναι κοντή αλλά φυσιολογική. Τα μη μετασχηματισμένα σπέρματα αναπτύσσουν πολύ κοντό ριζικό σύστημα και έχουν ανοιχτές πράσινες ή υποκίτρινες κοτυληδόνες. Μετά τη δέκατη ημέρα ο διαχωρισμός των μετασχηματισμένων φυτών

από τα μη μετασχηματισμένα είναι πλέον εμφανής. Τα μετασχηματισμένα φυτά αναπτύσσουν δεύτερο ζευγάρι φύλλων, ενώ η ανάπτυξη των μη μετασχηματισμένων επιβραδύνεται και τελικά νεκρώνονται. Μετά την επιλογή, τα μετασχηματισμένα φυτά μεταφέρονται στο χώμα, όπου και παραμένουν μέχρις ότου κλείσουν τον κύκλο ζωής τους.

II.16. Διαδικασία χρώσης μιτοχονδρίων στις ρίζες μετασχηματισμένων φυτών *A.thaliana* με Mitotracker.

Για τη χρώση των ριζών μετασχηματισμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* είναι πολύ βασικό το στάδιο ανάπτυξης των φυτών. Τα φυτά πρέπει να είναι 3-4 ημερών. Η τελική συγκέντρωση του MitoTracker κατά τη διαδικασία χρώσης είναι 20nM. Η χρώση πραγματοποιείται σε υγρό διάλυμα MitoTracker MS (1/2) με σουκρόζη και pH 5.7 για 30 λεπτά. Ακολουθούν ξεπλύματα με σκέτο MS (1/2) με σουκρόζη και pH 5.7 και στερέωμα των φυτών σε αντικειμενοφόρο πλάκα για παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

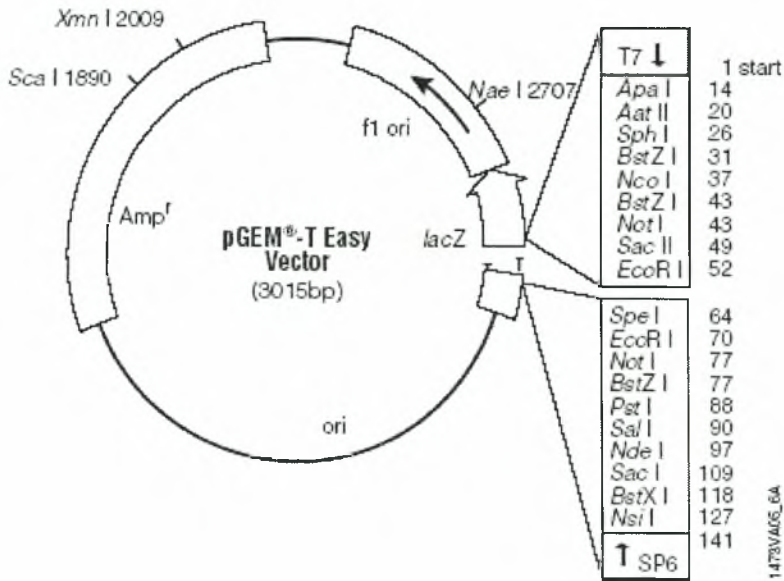
II.17. Μικροσκοπία φθορισμού

Για τον εντοπισμό της συντηγμένης με GFP πρωτεΐνης χίμαιρας χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού ZEISS (Γερμανία). Η λήψη των εικόνων έγινε με ψηφιακή CCD κάμερα μικροσκοπίου χρησιμοποιώντας μπλε φίλτρο διέγερσης (450-490nm), διχρωϊκό κάτοπτρο (510nm) και πράσινο φίλτρο (BP 515-565 nm).

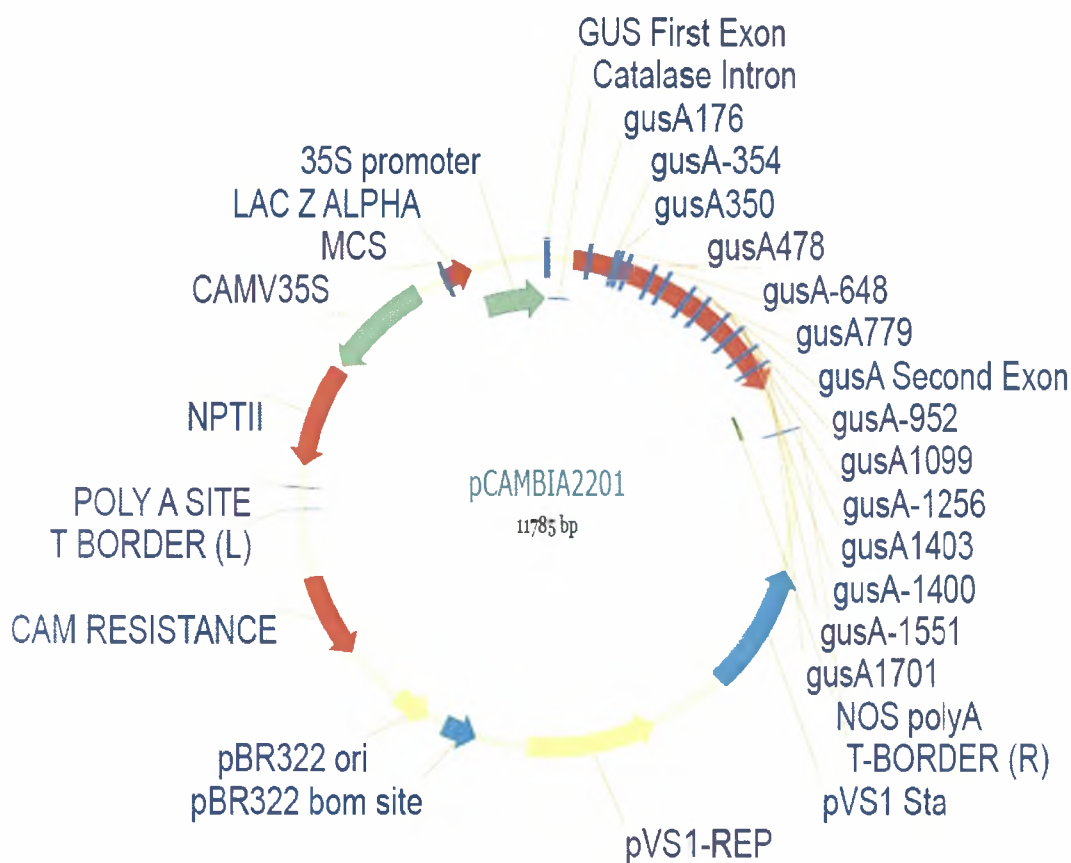
Για την παρατήρηση των μιτοχονδρίων έγινε χρήση της χρωστικής MitoTracker Orange CMTMRos (M7510, Molecular Probes, USA). Για την λήψη των εικόνων χρησιμοποιήθηκε το ίδιο μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρο διέγερσης (510-560nm), διχρωϊκό κάτοπτρο (580nm) και κόκκινο φίλτρο (LP 590nm).

II.18. Πλασμιδιακοί φορείς

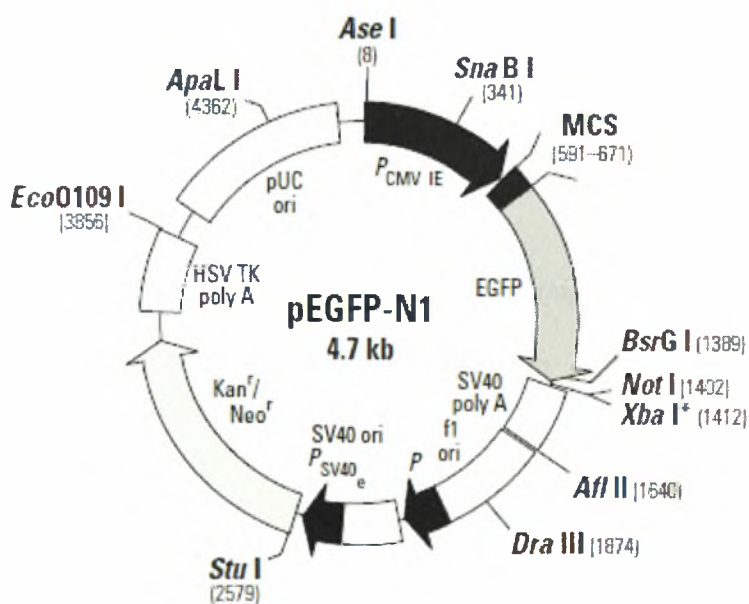
Οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι pGEM T-easy (Εικόνα 2.3), pCambia 2201(Εικόνα 2.4) και pGFP-N1 (Εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.3. Γενετικός χάρτης του φορέα pGEM T-easy.



Εικόνα 2.4. Γενετικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pCambia 2201.



Εικόνα 2.5. Γενετικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-N1.

II.19. Διαλύματα

II.19.1. Θρεπτικά μέσα και αντιδραστήρια για τη δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και το μετασχηματισμό τους.

LB υγρό θρεπτικό μέσο:

- 0,5 % (w/v) Yeast extract,
- 1 % (w/v) NaCl,
- 1 % (w/v) Tryptone.

Στην περίπτωση στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται 1,5 % (w/v) άγαρ (microbiological grade).

Buffer 1:

- 30 mM KOAc,
- 100 mM RbCl₂,
- 10 mM CaCl₂,
- 50 mM MnCl₂,
- 15 % glycerol,

ρύθμιση του pH στο 5,8 με 0,2 N Acetic acid. Αποστείρωση.

Buffer 2:

- 10 mM MOPS,
- 75 mM CaCl₂,
- 10 mM RbCl₂,
- 15% glycerol,

ρύθμιση του pH στο 6,5 με 0,2 N Acetic acid. Αποστείρωση.

IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside):

200 mg/ ml σε dH₂O. Αποθήκευση στους -20 °C.

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (BRL):

200 mg/ ml σε διμεθυλ-φορμαμίδιο. Αποθήκευση στους -20°C.

LB υγρό θρεπτικό μέσο με επιλογή σε αντιβιοτικό (αμπικιλίνη/ καναμυκίνη):

Όπως το LB αλλά με προσθήκη 100 mg/ ml αμπικιλίνη και 50 mg/ ml καναμυκίνη.

Π.19.2. Διαλύματα και θρεπτικά μέσα μετασχηματισμού φυτών *A.thaliana*.

Διάλυμα Εμβάπτισης (IM)

- 1L dH₂O
- 2,2 g MS θρεπτικό διάλυμα αλάτων,
- 1X B5 βιταμίνες (από 1000X),
- 50 g σουκρόζη,
- 0,5 g MES
το pH ρυθμίζεται στο 5,7 με KOH
- 0,01 mg/ lt BA (Benzylaminopurine) και
- 200 μl Silwet L-77 (OSI Specialties).

Stock βιταμινών 1000X B5

- 1000 mg ινοσιτόλη,
- 100 mg θειαμίνη,
- 10 mg νικοτινικό οξύ,
- 10 mg πυροδοξίνη
- σε 10 ml ddH₂O.

Θρεπτικό Διάλυμα MS Για Την Ανάπτυξη *Arabidopsis thaliana*

- 1L dH₂O
- 4,3 g/ L MS salts,
- 0,5g MES,
- 10 g σουκρόζη και
- 1 ml διάλυμα βιταμινών B5 (1000X),
ρύθμιση του pH στο 5,7 με KOH,
- 0,8 % (w/v) άγαρ.

II.19.3. Διάλυμα STET

- Σουκρόζη 8,0 %
- Triton X-100 0,5 %
- EDTA 50,0 mM

II.19.4. Διαλύματα για τον Παροδικό μετασχηματισμό φύλλων καπνού

Διάλυμα Mes 500 mM

- 10 mL dH₂O
- 0,9764 g Mes

Διάλυμα 20 mM Na₃PO₄.12H₂O (trisodium orthophosphate)

- 10 mL dH₂O
- 0,076 g Na₃PO₄.12H₂O

Διάλυμα 200 mM ακετοσυριγκόνη (3',5'-dimethoxy-4'hydroxy acetophenone)

- 1 mL DMSO
- 0,0392 g 3',5'-dimethoxy-4'hydroxy acetophenone

Το διαιρούμε σε μικρές ποσότητες (μίας χρήσης) και το αποθηκεύουμε στους - 20 °C.

Διάλυμα έκχυσης

- 250 mg D-γλυκόζης
- 5 mL Mes
- 5 mL Na₃PO₄.12H₂O
- 25 μL ακετοσυριγκόνη

Συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τα 50 mL.

II.19.5. Διαλύματα χρώσης MitoTracker Orange CMTMRos (MW 427,37 g)

1000mM=1M	427,37 g	1000mL	DMSO
1mM	427,37 mg	1000mL	DMSO
1mM	427,37 μ g	1mL	DMSO
1mM	50,00 μ g	117 μ L	DMSO

Φτιάχνουμε ακόμα ένα διάλυμα στοκ σε DMSO με τελική συγκέντρωση 0,2mM=200 μ M. Για 250 μ l 0,2mM διαλύματος στοκ MitoTracker χρησιμοποιούμε 50 μ l από το στοκ του 1mM και 200 μ l DMSO.

Για όγκο 50mL διαλύματος χρώσης 1/2MS συγκέντρωσης 10nM χρησιμοποιούμε 2,5 μ L από το στοκ διάλυμα MitoTracker των 0,2mM σε 50mL διαλύματος χρώσης 1/2MS.

Για όγκο 50mL διαλύματος χρώσης 1/2MS συγκέντρωσης 5nM χρησιμοποιούμε 25mL από το προηγούμενο στοκ διάλυμα MitoTracker των 10nM σε 25mL διαλύματος χρώσης 1/2MS.

III.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.1. Κλωνοποίηση των δύο ισομορφών του γονιδίου της *GPX6*.

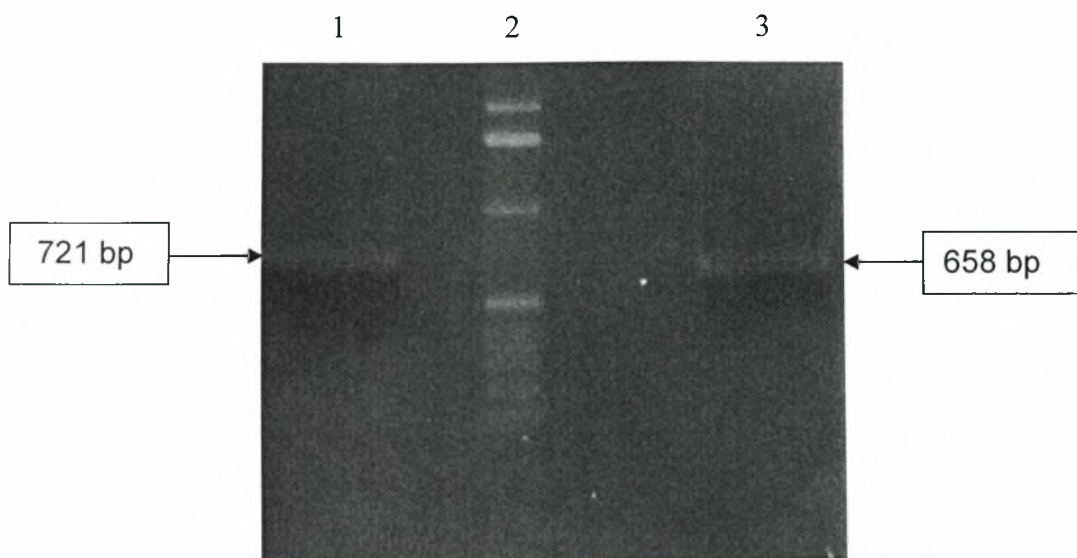
Η παρούσα μελέτη είχε σαν σκοπό τον υποκυτταρικό εντοπισμό των δύο ισομορφών του γονιδίου της *GPX6* του φυτού *Medicago truncatula*. Για το λόγο αυτό, φυτά *Medicago* αναπτύχθηκαν σε περλίτη και υπέστησαν επεξεργασία με s-nitrosoglutathione (GSNO), που παίζει ρόλο δότη NO. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν ολόκληρα φυτά και έγινε εξαγωγή ολικού RNA. Ακολούθως, παρασκευάστηκε cDNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ενίσχυση των δύο διαφορετικών mRNAs που προκύπτουν από το γονίδιο της GPX.

Η συγκεκριμένη εργασία ξεκίνησε με την κλωνοποίηση των δύο αυτών ισομορφών με PCR ενίσχυση τους με τους εκκινητές longSalF, shortSalF και BamHnonStopR. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και έδωσαν μία ζώνη στις 658 bp (long ισομορφή) και μία ζώνη στις 721 bp (short ισομορφή) (Εικόνα 3.1).

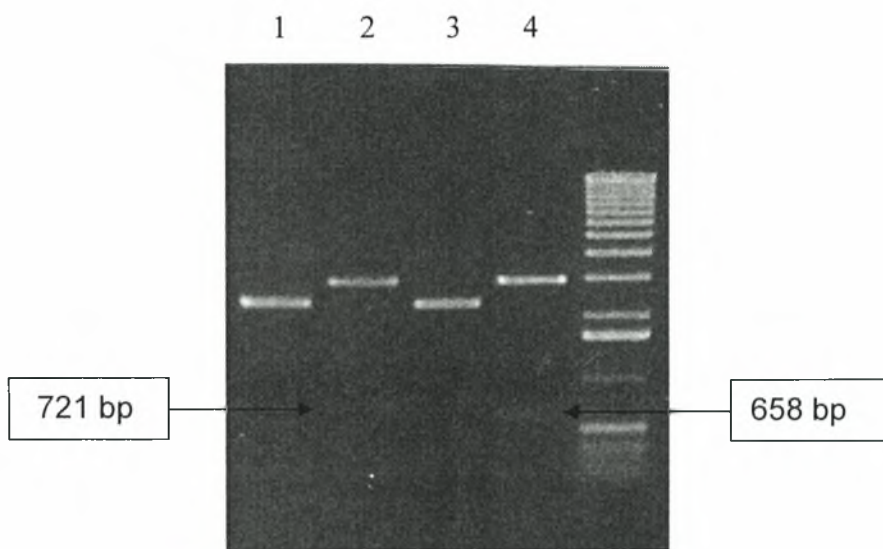
Ακολούθησε έκλουση από το πήκτωμα (gel extraction) και κλωνοποίηση τους στον φορέα pGEM-T easy (όπως αναφέρεται στα «Υλικά και μέθοδοι»).

Η επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών DH5a κυττάρων με τον ανασυνδιασμένο φορέα έγινε σε τρυβλία LB/Amp με X-gal και IPTG ενώ η επιβεβαίωση για την εισαγωγή του ενθέματος έγινε με διαγνωστικές πέψεις, η ηλεκτροφόρηση των οποίων φαίνεται στην Εικόνα 3.2.

Την κλωνοποίηση των δύο ισομορφών του γονιδίου της *GPX6* ακολούθησε η αλληλούχισή τους, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ορθότητα της ακολουθίας μετά την αντίδραση PCR. Στην εικόνα 3.3 φαίνονται οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες των δύο ισομορφών που απομονώθηκαν.



Εικόνα 3.1. Προϊόντα PCR ενίσχυσης των δύο ισομορφών της GPX6 long (658 bp) και short (721 bp).



Εικόνα 3.2. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης των αντιδράσεων πέψης του πλασμιδιακού φορέα pGEM-T easy με τα ενθέματα GPX6short και GPX6long, με τα ένζυμα SalI/BamHI. Ως δείκτης μοριακών βαρών (MB) χρησιμοποιήθηκε ο 1Kb DNA Ladder. Οι ζώνες των 658 και 721 bp υποδεικνύουν την ύπαρξη του σωστού κλώνου, ενώ στα 1 και 3 φαίνονται οι ανασυνδιασμένοι πλασμιδιακοί φορείς pGEM-T easy με το short και το long αντίστοιχα.

> GPX6short

5'-

CGTGGTCGACATGCTTTGTAGTACTTCAACAACAACCTCGCATCCGATTTCAT
TTCAACTACAAAACGTCTTTTAACTGCTCCTCTTTCTTCCTTACTTCGCTTC
TTCTCAATCTCTACTACTCTTCCAAACAAACCTATAATACATAAAACCACTT
TTTACAACCTCTAACCCCTTCTTTGTATTTCACTTTAAGAAGAACAGATCAC
ACCATGGCATCTGCATCAAACCCTCAATCAATTCATGATTTCACTGTTAAG
GATGCTAAGGGTAACGATGTTAATCTCGGTGACTACAAAGGAAAGGTCCT
TATCATTGTCAATGTTGCCTCACAATGTGGATTGACTAACTCAAATTACAC
AGAGCTGAGTCAGTTGTATGAGAAATACAAATCAAAGGTTTGGAAATTC
TGGCATTCCCTTGTAATCAATTTGGGGCACAAGAGCCTGGATCTGTTGAA
GAGATACAAAACCTTTGTGTGTACACGCTTCAAGGCTGAGTTTCCTGTTTTT
GACAAGGTTGATGTGAATGGTGCCACTGCTGCTCCAATCTACAAGTATCT
GAAGTCGAGCAAAGGTGGACTCTTTGGGGATGGTATCAAATGGAACCTTCT
CCAAGTTCCTTGTTGATAAAAATGGGAATGTTGTTGATCGTTATGCACCAA
CGACTTCTCCACTGAGCATTGAGAAGGACTTGCTGAAGTTGCTTGATGCA
CTGGATCCCTAT-3'

>GPX6long

5'-

GCAGGTCGACATGGAGTTACTCGGTGTGAAATACAGACAGATCGGCACTT
GGACACGAGAAGAAGCATCCACGCGTAATCTTCGTTATTCTGTTCACACT
CACAATTGTCGGTGGCTCTCAGAACAAGAAGAACAGATCACACCATGGC
ATCTGCATCAAACCCTCAATCAATTCATGATTTCACTGTTAAGGATGCTAA
GGGTAACGATGTTAATCTCGGTGACTACAAAGGAAAGGTCCTTATCATTG
TCAATGTTGCCTCACAATGTGGATTGACTAACTCAAATTACACAGAGCTG
AGTCAGTTGTATGAGAAATACAAATCAAAGGTTTGGAAATTCTGGCATT
CCCTTGTAATCAATTTGGGGCACAAGAGCCTGGATCTGTTGAAGAGATAC
AAAACCTTTGTGTGTATACGCTTCAAGGCTGAGTTTCCTGTTTTTGGACAAGG
TTGATGTGAATGGTGCCACTGCTGCTCCAATCTACAAGTATCTGAAGTCGA
GCAAAGGTGGACTCTTTGGGGATGGTATCAAATGGAACCTTCTCCAAGTTC
CTTGTTGATAAAAATGGGAATGTTGTTGATCGTTATGCACCAACGACTTCT
CCACTGAGCATTGAGAAGGACTTGCTGAAGTTGCTTGATGCACTGGATCC
CTAT-3'

Εικόνα 3.3. Νουκλεοτιδικές ακολουθίες των ισομορφών της GPX6.

III.2. Δημιουργία κατασκευών μεταφραστικής σύντηξης ισομορφών της GPX6 με το γονίδιο αναφοράς GFP

Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα οι δύο ισομορφές να κατευθύνονται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα από ότι προέκυψε βάσει της πρόβλεψης των υπολογιστικών προγραμμάτων, προχωρήσαμε στη δημιουργία εξειδικευμένων κατασκευών μεταφραστικής σύντηξης του 5' άκρου των δύο cDNAs με το γονίδιο αναφοράς GFP. Οι κατασκευές αυτές χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια τόσο σε πειράματα προσωρινού μετασχηματισμού φύλλων καπνού όσο και στη δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων φυτών *Arabidopsis thaliana*.

Η δημιουργία της κατασκευής πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιελάμβανε την κλωνοποίηση του 35S υποκινητή στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N1. Αρχικά έγινε η σύνδεση του φορέα pEGFP-N1 της Clontech με τον 35S υποκινητή του ιού CaMV από το φορέα pCambia 2201, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του ενδιάμεσου φορέα p35SEGFP-N1. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε τμήμα του p35SEGFP-N1 στον φορέα pCambia 2201 για τη δημιουργία του πλασμιδιακού φορέα pCambia2201:35S:EGFP. Τέλος προστέθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pCambia2201:35S:EGFP και οι ισομορφές του γονιδίου της GPX6 με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο κατασκευών, των pCambia35SGPX6(short)EGFP και pCambia35SGPX6(long)EGFP.

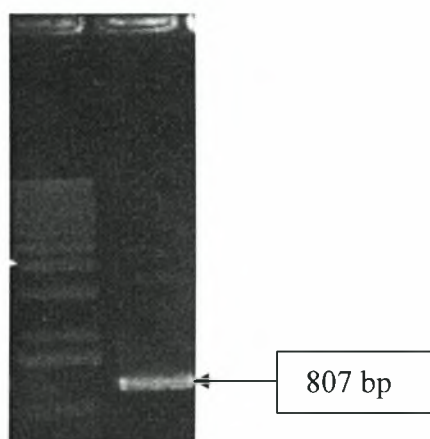
III.2.1. Δημιουργία ενδιάμεσου φορέα p35SEGFP-N1.

Η δημιουργία του ενδιάμεσου αυτού φορέα πραγματοποιήθηκε ενισχύοντας, αρχικά, με PCR τον 35S υποκινητή από τον πλασμιδιακό φορέα pCambia 2201, με τους 35SR1 και 35SSalI εκκινητές. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής αφού ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% (w/v) (Εικόνα 3.4), καθαρίστηκε με έκλουση από το πήκτωμα σύμφωνα με το πρωτόκολλο του «Gel extraction» του NucleoSpin Extract II kit της Macherey-Nagel.

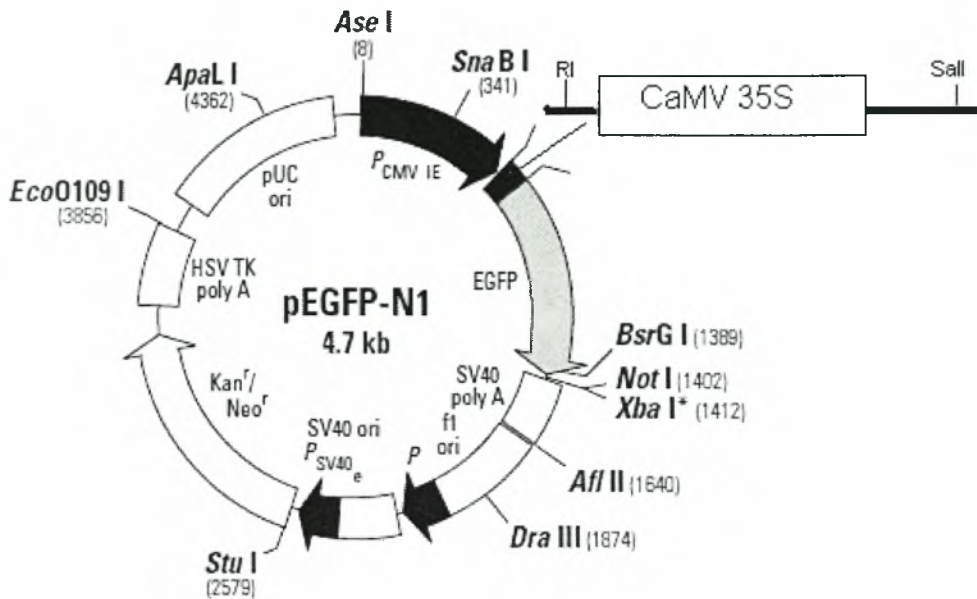
Ακλούθησε πέψη με EcoRI και SalI και καθαρισμός με το πρωτόκολλο «PCR clean up» του NucleoSpin Extract II kit της Macherey-Nagel. Αντίστοιχη πέψη και καθαρισμός με έκλουση από πήκτωμα αγαρόζης 0.8% (w/v) με το NucleoSpin Extract II kit της Macherey-Nagel έγινε και στον pEGFP-N1. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης μεταξύ του CaMV 35S υποκινητή και του

pEGFP-N1 (Εικόνα 2.5), για να προκύψει τελικά ο ανασυνδιασμένος ενδιάμεσος φορέας p35SEGFP-N1 (Εικόνα 3.5) με τον οποίο μετασχηματίστηκαν DH10B βακτηριακά δεκτικά κύτταρα.

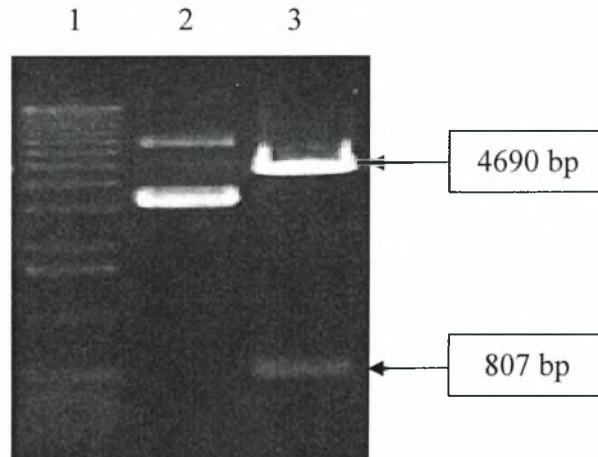
Η επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών DH10B κυττάρων με τον ανασυνδιασμένο ενδιάμεσο φορέα p35SEGFP-N1 έγινε σε τρυβλία LB/Kn ενώ η επιβεβαίωση για την εισαγωγή του ενθέματος έγινε με διαγνωστικές πέψεις, η ηλεκτροφόρηση των οποίων φαίνεται στην Εικόνα 3.6.



Εικόνα 3.4. Ενίσχυση με PCR του CaMV 35S υποκινητή από τον φορέα pCambia 2201.



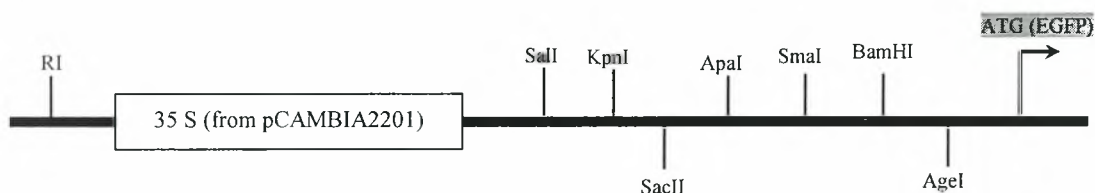
Εικόνα 3.5. Γενετικός χάρτης πλασμιδιακού φορέα pEGFP-N1 με επισήμανση στο σημείο του πολυσυνδέτη όπου συνδέθηκε ο CaMV 35S υποκινητής.



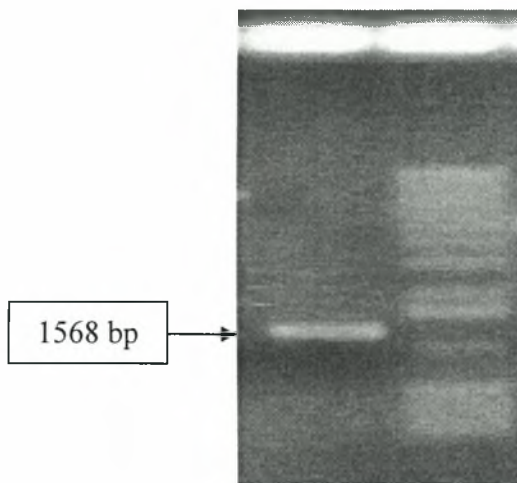
Εικόνα 3.6. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης των αντιδράσεων πέψης του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-N1 με το ένθεμα CaMV 35S, με τα ένζυμα EcoRI/SalI. Ως δείκτης μοριακών βαρών (MB) χρησιμοποιήθηκε ο 1Kb DNA Ladder (1). Στο 2 οι ζώνες που παρατηρούμε αντιστοιχούν στο άκοπο ανασυνδιασμένο πλασμίδιο p35SEGF-N1 και στο 3 η ζώνη των 807 bp υποδεικνύει την ύπαρξη του σωστού κλώνου ενώ η ζώνη των 4690 bp αντιστοιχεί στον pEGFP-N1.

III.2.2. Δημιουργία του ανασυνδιασμένου πλασμιδιακού φορέα pCambia2201:35S:EGFP.

Για τη δημιουργία του ανασυνδιασμένου πλασμιδιακού φορέα pCambia2201:35S:EGFP ενισχύθηκε με PCR, με τους 35SRI και GFPBstEII εκκινητές, το τμήμα του ενδιάμεσου φορέα p35SEGFP-N1 που περιλαμβάνει τη θέση κοπής για το EcoRI, τον 35S υποκινητή, τον πολυσυνδέτη, το γονίδιο αναφοράς EGFP και τη θέση κοπής για το BstEII (Εικόνα 3.7). Το προϊόν της αντίδρασης αυτής αφού ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% (w/v) (Εικόνα 3.8), καθαρίστηκε με έκλυση από το πήκτωμα σύμφωνα με το πρωτόκολλο του «Gel extraction» του NucleoSpin Extract II kit της Macherey-Nagel.



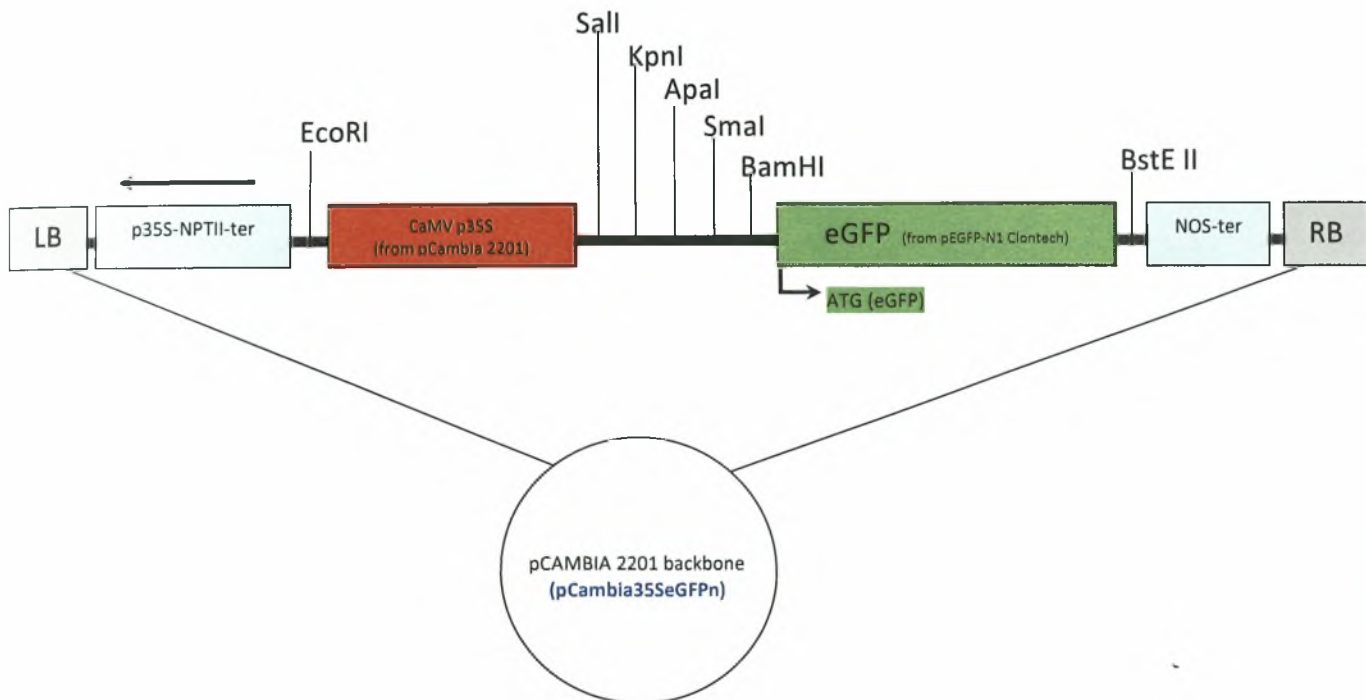
Εικόνα 3.7. Σχηματική απεικόνιση τμήματος της κατασκευής του ενδιάμεσου φορέα pCambia2201:35S:EGFP. Ο υποκινητής CaMV35S από τον φορέα pCambia 2201 κλωνοποιήθηκε ως τμήμα EcoRI/SalI στον φορέα pEGFP-N1 της Clontech.



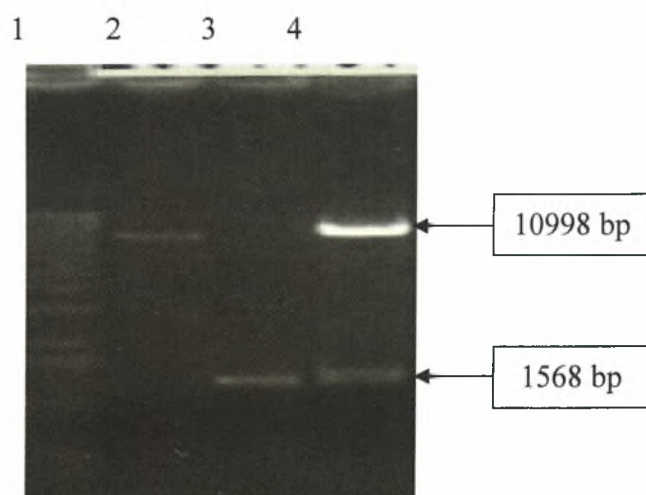
Εικόνα 3.8. PCR του τμήματος του φορέα p35SEGF-N1 που περιλαμβάνει τη θέση κοπής για το EcoRI, τον 35S υποκινητή, τον πολυσυνδέτη, το γονίδιο αναφοράς EGFP και τη θέση κοπής για το BstEII.

Ακλούθησε πέψη με EcoRI και BstEII και καθαρισμός με το πρωτόκολλο «PCR clean up» του NucleoSpin Extract II kit της Macherey-Nagel. Αντίστοιχη πέψη και καθαρισμός με έκλουση από πήκτωμα αγαρόζης 0.8% (w/v) με το NucleoSpin Extract II kit της Macherey-Nagel έγινε και στον pCambia 2201. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης μεταξύ του προϊόντος της PCR και του pCambia 2201 (Εικόνα 2.5), όπως είχε προκύψει μετά την πέψη, αντικαθιστώντας έτσι τα γονίδια MCS και GUS του pCambia 2201 και δημιουργώντας τον ανασυνδιασμένο φορέα pCambia2201:35S:EGFP (Εικόνα 3.9), με τον οποίο μετασηματίστηκαν DH10B βακτηριακά δεκτικά κύτταρα.

Η επιλογή των μετασηματισμένων αποικιών DH10B κυττάρων με τον ανασυνδιασμένο φορέα pCambia2201:35S:EGFP έγινε σε τρυβλία LB/Kn ενώ η επιβεβαίωση για την εισαγωγή του ενθέματος έγινε με διαγνωστικές πέψεις, με EcoRI και BstEII, η ηλεκτροφόρηση των οποίων φαίνεται στην Εικόνα 3.10.



Εικόνα 3.9. Σχηματική απεικόνιση της κατασκευής του πλασμιδιακού φορέα pCambia35SEGFP.

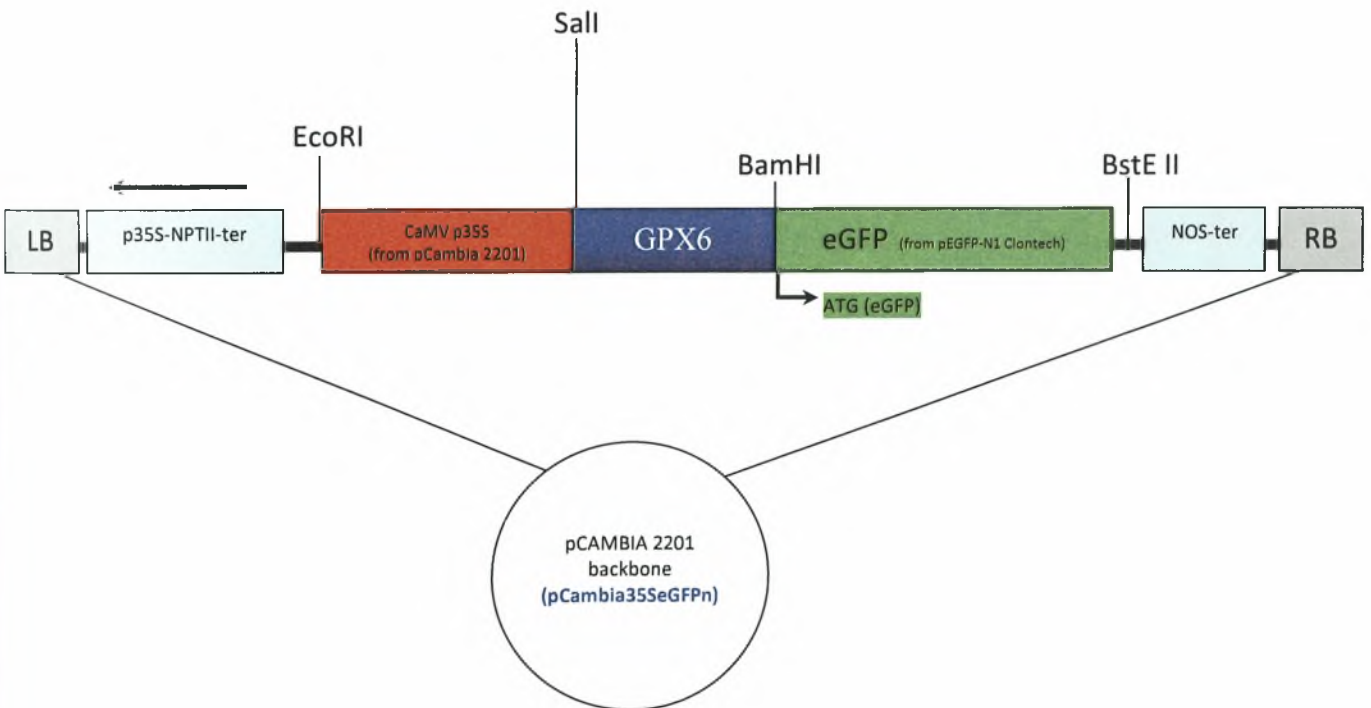


Εικόνα 3.10. Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης της αντίδρασης πέψης του ανασυνδιασμένου πλασμιδιακού φορέα pCambia2201:35S:EGFP, με τα ένζυμα EcoRI/BstEII. Ως δείκτης μοριακών βαρών (MB) χρησιμοποιήθηκε ο 1Kb DNA Ladder (1). Οι ζώνες των 10998 bp που φαίνονται στο 2 και 4 αντιστοιχούν στον γραμμικό pCambia 2201 χωρίς τον CaMV 35S υποκινητή ενώ οι ζώνες των 1568 bp που φαίνονται στο 3 και 4 αντιστοιχούν στο ένθεμα. Η ζώνη των 1568 bp στο 4 υποδεικνύει την ύπαρξη του σωστού κλώνου.

III.2.3. Κλωνοποίηση των δύο cDNAs της GPX6 στον ανασυνδιασμένο φορέα pCambia2201:35S:EGFP.

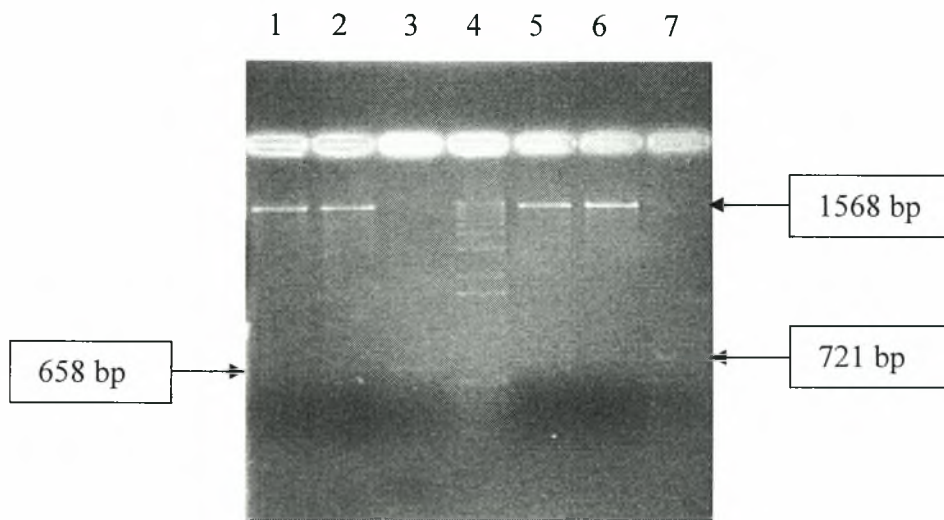
Για την κλωνοποίηση των δύο cDNAs της GPX6 στον ανασυνδιασμένο φορέα pCambia2201:35S:EGFP πραγματοποιήθηκε απομόνωση των ανασυνδιασμένων πλασμιδίων pGEM T-easy με τις ισομορφές του γονιδίου της GPX6 από τα DH5a βακτηριακά κύτταρα και πέψη αυτών με τα ένζυμα SalI και BamHI.

Ακολούθησε πέψη με EcoRI και BstEII και καθαρισμός με το πρωτόκολλο «PCR clean up» του NucleoSpin Extract II kit της Macherey-Nagel. Αντίστοιχη πέψη και καθαρισμός με έκλυση από πήκτωμα αγαρόζης 0.8% (w/v) με το NucleoSpin Extract II kit της Macherey-Nagel έγινε και στον ανασυνδιασμένο πλασμιδιακό φορέα pCambia2201:35S:EGFP. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης μεταξύ των ισομορφών του γονιδίου της GPX6 και του pCambia2201:35S:EGFP που έδωσε τις κατασκευές των ανασυνδιασμένων πλασμιδίων pCambia2201:35S:GPX6(short):EGFP και pCambia2201:35S:GPX6(long):EGFP (Εικόνα 3.11), με τις οποίες μετασχηματίστηκαν DH10B βακτηριακά δεκτικά κύτταρα.



Εικόνα 3.11. Σχηματική απεικόνιση της κατασκευής του πλασμιδιακού φορέα pCambia2201:35S:GPX6:EGFP. Στη θέση της GPX6 έχουμε κάθε φορά την αντίστοιχη ισομορφή.

Η επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών DH10B κυττάρων με τους ανασυνδιασμένους φορείς pCambia2201:35S:GPX6(short):EGFP και pCambia2201:35S:GPX6(long):EGFP έγινε σε τρυβλία LB/Kn ενώ η επιβεβαίωση για την εισαγωγή του ενθέματος έγινε με διαγνωστικές πέψεις, με SalI και BamHI, η ηλεκτροφόρηση των οποίων φαίνεται στην Εικόνα 3.12.



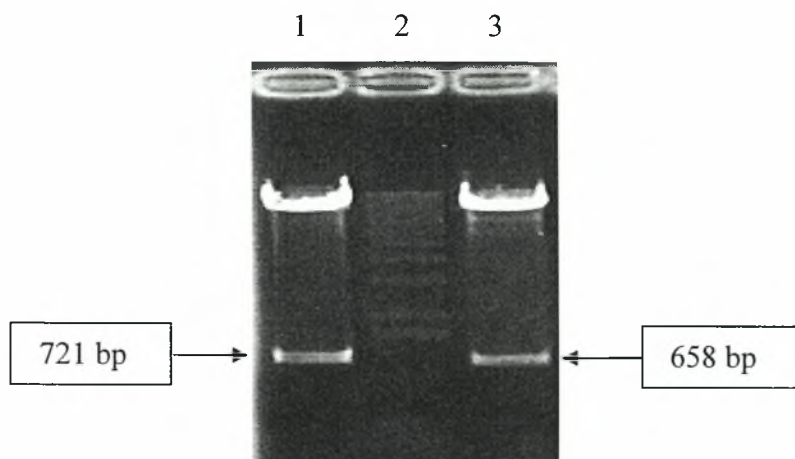
Εικόνα 3.12. Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης των αντιδράσεων πέψης δυο διαφορετικών κλώνων των pCambia2201:35S:GPX6(short):EGFP (5 και 6) και pCambia2201:35S:GPX6(long):EGFP (1 και 2), με τα ένζυμα SalI/BamHI. Ως δείκτης μοριακών βαρών (MB) χρησιμοποιήθηκε ο 1Kb DNA Ladder (4). Οι ζώνες των 658 και 721 bp υποδεικνύουν την ύπαρξη των σωστών κλώνων ενώ στα 3 και 7 φαίνονται τα ενθέματα GPX6long και GPX6short αντίστοιχα, για σύγκριση με τα προϊόντα των διαγνωστικών πέψεων.

III.3. Υποκυτταρικός εντοπισμός των ισομορφών της GPX6 σε *N.benthamiana*.

Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των ισομορφών της GPX6 σε *N.benthamiana* αλλά και για την GFP-GPX6 έκφραση στο ριζικό σύστημα του φυτού *A.thaliana* απαιτούνταν ο μετασχηματισμός των φυτών αυτών με βακτηριακά κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* που να περιέχουν τις κατασκευές μας σε ένα δυαδικό σύστημα μεταφοράς.

Έτσι, οι κατασκευές μας απομονώθηκαν από τα DH10B βακτηριακά κύτταρα και μεταφέρθηκαν σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* GV3101:pMP90.

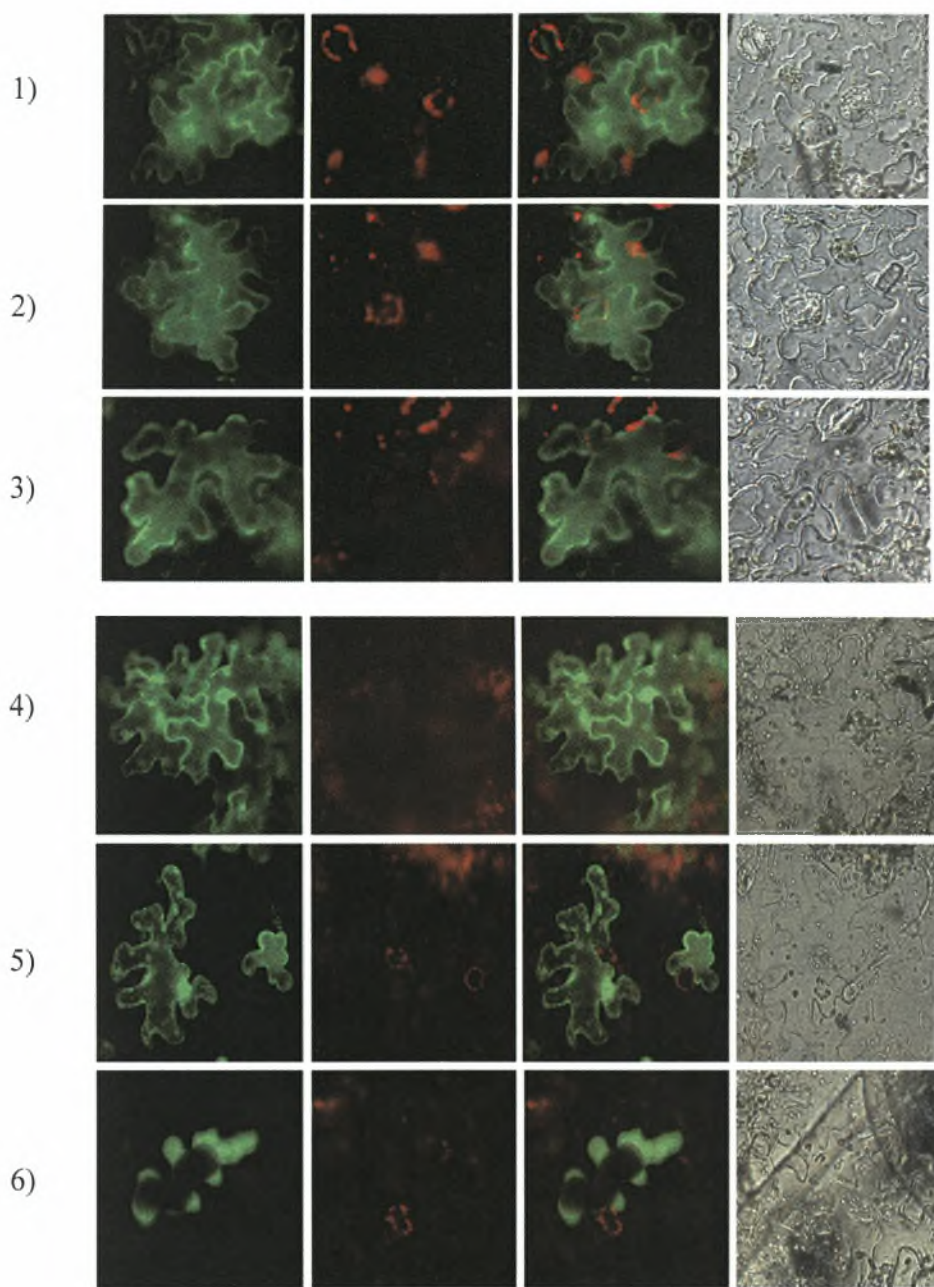
Η επιλογή των μετασηματισμένων αποικιών GV3101:pMP90 κυττάρων με τους ανασυνδιασμένους φορείς pCambia2201:35S:GPX6(short):EGFP και pCambia2201:35S:GPX6(long):EGFP έγινε σε τρυβλία LB/Rif/Gent/Kn ενώ η επιβεβαίωση για την εισαγωγή του ενθέματος έγινε με διαγνωστικές πέψεις, με EcoRI και BamHI, η ηλεκτροφόρηση των οποίων φαίνεται στην Εικόνα 3.12.



Εικόνα 3.12. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης των αντιδράσεων πέψης των pCambia2201:35S:GPX6(short):EGFP (1) και pCambia2201:35S:GPX6(long):EGFP (3), με τα ένζυμα EcoRI/BamHI. Ως δείκτης μοριακών βαρών (MB) χρησιμοποιήθηκε ο 1Kb DNA Ladder (2). Οι ζώνες των 658 και 721 bp υποδεικνύουν την ύπαρξη των σωστών κλώνων.

Με τα μετασηματισμένα αυτά βακτηριακά κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* πραγματοποιήθηκε παροδικός μετασηματισμός φύλλων καπνού (όπως αναφέρεται στα «Υλικά και μέθοδοι») και ακολούθησε η παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο.

Το αποτέλεσμα της έκφρασης των χημικών πρωτεϊνών GFP-GPX6 σε φύλλα του φυτού *N.benthamiana* και για τις δύο ισομορφές φαίνεται στις παρακάτω εικόνες:

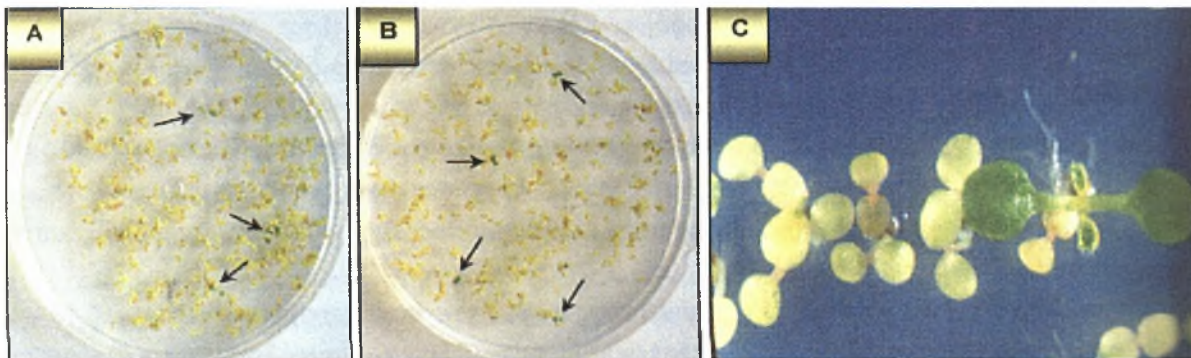


Εικόνα 3.13. Υποκυτταρικός εντοπισμός της GFP-GPX6. Η κατανομή των χιμαιρικών πρωτεϊνών GFP-GPX6long (σειρές 1, 2, 3) και GFP-GPX6short (σειρές 3, 4, 5) σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού. Τα κύτταρα οπτικοποιούνται με GFP inpluresence σε μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρα ειδικά για την GFP (Ex 450-490, Dichroic 510, Em 515-565) (σειρά α), με φίλτρα για τον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης (σειρά β), αλληλοεπικάλυψη φίλτρων α και β (σειρά γ) και με Nomarski differential interference contrast (DIC) (σειρά δ). Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες GFP-GPX6 εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα.

III.4 GFP-GPX6 έκφραση στο ριζικό σύστημα του φυτού *A.thaliana*.

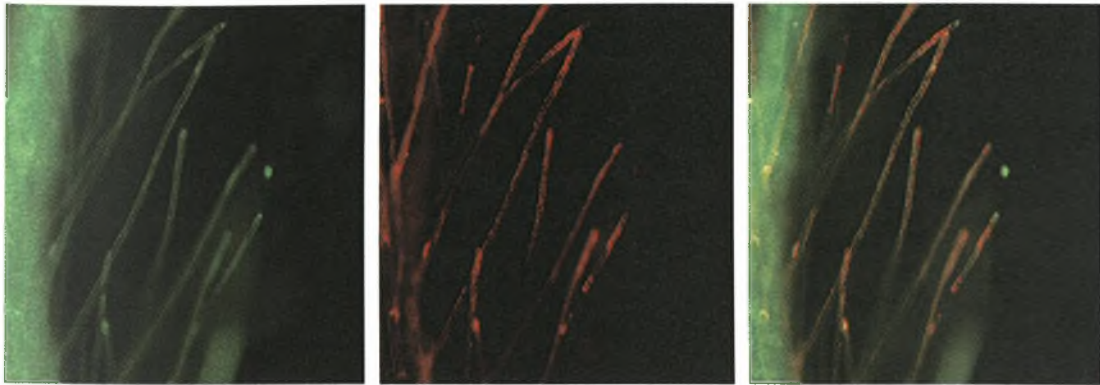
Με τα μετασηματισμένα βακτηριακά κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* GV3101:pMP90 που περιείχαν τις κατασκευές μας πραγματοποιήθηκε επίσης σταθερός μετασηματισμός φυτών *A.thaliana* (όπως αναφέρεται στα «Υλικά και μέθοδοι»).

Οι σπόροι των μετασηματισμένων φυτών που είχαν επιλεγεί σε τρυβλία MS/Cf/Kn (Εικόνα 3.14), φυτεύτηκαν σε τρυβλία MS και μετά την πάροδο τριών ημερών πραγματοποιήθηκε χρώση των ριζών με MitoTracker Orange CMTMRos (M7510, Molecular Probes, USA).



Εικόνα 3.14 Βλαστάνοντα σπέρματα μετασηματισμένων φυτών *Arabidopsis thaliana*, επιστρωμένα σε θρεπτικό μέσο επιλογής MS, παρουσία 50 µg/ml καναμυκίνης και 100 µg/ml σεφοταξίμης. Α) Σπέρματα φυτών μετασηματισμένα με την κατασκευή pCambia2201:35S:GPX6(short):EGFP. Β) Σπέρματα φυτών μετασηματισμένα με την κατασκευή pCambia2201:35S:GPX6(long):EGFP. Τα βέλη υποδεικνύουν τα μετασηματισμένα σπέρματα που δίνουν φυσιολογικά φυτά (σκούρο πράσινο χρώμα) και είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Τα μη μετασηματισμένα φυτά έχουν χρώμα υποκίτρινο και νεκρώνονται μετά από 10 ημέρες στο μέσο επιλογής. C) Λεπτομέρεια των μετασηματισμένων φυτών με την κατασκευή pCambia2201:35S:GPX6(short):EGFP.

Οι εικόνες που φάνηκαν στο μικροσκόπιο από την έκφραση της χμιαϊκής πρωτεΐνης GFP-GPX6 στο ριζικό σύστημα του φυτού *A.thaliana* ήταν οι ακόλουθες:



Εικόνα 3.15. Υποκυτταρικός εντοπισμός της GFP:: GPX6(short). Η κατανομή της χμαιρικής πρωτεΐνης GFP::GPX6(short) σε διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis thaliana*, σε ριζικά τριχειδία. Τα κύτταρα οπτικοποιούνται με GFP influresence σε epifluorescence μικροσκόπιο με φίλτρα ειδικά για την GFP (Ex 450-490, Dichroic 510, Em 515-565) (α) και με φίλτρο διέγερσης (510-560nm), διχρωϊκό κάτοπτρο (580nm) και κόκκινο φίλτρο (LP 590nm) για την παρατήρηση των μιτοχονδρίων, με χρήση της χρωστικής MitoTracker Orange CMTMRos (M7510, Molecular Probes, USA) (β). Στο γ παρατηρούμε την εικόνα της αλληλοεπικάλυψης των φίλτρων α και β. Η χμαιρική πρωτεΐνη εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα.

IV.

ΣΥΜΠΤΕΡΑΣΜΑΤΑ

-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τόσο η *in silico* ανάλυση όσο και τα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι το γονίδιο της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης 6 (GPX6) στο φυτό *M.truncatula*. GPX6 (2.601bp) κωδικοποιεί για δύο πρωτεΐνες των 212 (long) και 233 (short) αμινοξέων, με κωδικές περιοχές 658 και 721bp αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες του mRNA των δύο αυτών ισομορφών διαφέρουν μόνο ως προς το 5' άκρο, ενώ στην περιοχή δραστηριότητας του ενζύμου η αλληλουχία είναι η ίδια και για τις δύο ισομορφές.

Η παρούσα διπλωματική εργασία, είχε σαν σκοπό τον υποκυτταρικό εντοπισμό των δύο ισομορφών, short και long. Για το λόγο αυτό αναλύθηκαν αρχικά *in silico* οι νουκλεοτιδικές και οι αμινοξικές ακολουθίες των παραπάνω ισομορφών με προγράμματα επεξεργασίας βιολογικών δεδομένων. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν μία σειρά από μοριακές προσεγγίσεις, αλλά και πειράματα μετασχηματισμού φυτών, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών αυτών στα φυτά.

Οι δύο αυτές ισομορφές είναι πιθανόν να προκύπτουν είτε (1) από την παραγωγή δύο διαφορετικών πρωτογενών μεταγράφων, (επειδή η χρήση διαφορετικών σημείων έναρξης της μεταγραφής, ή η δημιουργία εναλλακτικών 5' άκρων αλλάζει το πρότυπο του ματίσματος), είτε (2) από την παραγωγή ενός πρωτογενούς μεταγράφου που υπόκειται σε μάτισμα με περισσότερους από έναν τρόπους, οπότε τα εσωτερικά εξόνια υποκαθίστανται, προστίθενται ή αποκόπτονται. Σε κάποιες περιπτώσεις, τα πολλαπλά προϊόντα μπορούν να παραχθούν όλα στο ίδιο κύτταρο, ενώ σε άλλες η διαδικασία ρυθμίζεται έτσι ώστε συγκεκριμένα πρότυπα ματίσματος να λαμβάνουν χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Το εναλλακτικό μάτισμα είναι μία διαδικασία που έχει παρατηρηθεί ότι συμβαίνει σε διάφορες περιπτώσεις. Για παράδειγμα τα αντιγόνα T/t του SV40 προκύπτουν από τη συρραφή δύο εναλλακτικών 5' θέσεων ματίσματος στην ίδια 3' θέση ματίσματος. Το ίδιο ισχύει και για τα μετάγραφα του *EIA* στον αδενοϊό, ενώ στη *D.melanogaster*, τα μετάγραφα του γονιδίου *tra* προκύπτουν από τη συρραφή εναλλακτικών 3' θέσεων ματίσματος στην ίδια 5' θέση ματίσματος.

Όσον αφορά την MtGPX6, με τα μέχρι τώρα δεδομένα μας, μπορούμε να πούμε ότι η long ισομορφή εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ενώ η short φαίνεται να εντοπίζεται σε κάποια μεμβρανικά κυστίδια του κυτταροπλάσματος τα οποία ενδέχεται να είναι χλωροπλάστες ή/και μιτοχόνδρια. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών είναι κυρίως αποτέλεσμα της μετα-μεταφραστικής μετακίνησης της

πρωτεΐνης σε αυτό το υποκυτταρικό διαμέρισμα που την εντοπίζουμε μέσω αμινοξικών αλληλουχιών που ονομάζονται οδηγοί (leaders) και καθορίζουν τη μετακίνησή της στο αντίστοιχο υποκυτταρικό διαμέρισμα. Σε πολλές περιπτώσεις το πεπτίδιο αυτό αποκόπτεται από την πρωτεΐνη αφότου επιτελέσει το σκοπό του.

Ομόλογα γονίδια της GPX6 του *M. truncatula* έχουν μελετηθεί στο *Arabidopsis* και τη λεύκα. Από τις μέχρι τώρα μελέτες που έχουν γίνει στο γονίδιο της GPX6 στο *Arabidopsis* γνωρίζουμε ότι η *AtGPX6*, όπως η ανθρώπινη υδροϋπεροξειδάση των φωσφολιπιδίων (phospholipid hydroperoxide, *PHGPX*), είναι πιθανόν να κωδικοποιεί μία μιτοχονδρική και μία κυτταροπλασματική ισομορφή με διαφορετική αμινοξική αλληλουχία στο 5' άκρο. Επιπρόσθετα, αυτό το γονίδιο αποτελεί την πιο δυνατή απάντηση στις περισσότερες καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης. Η *AtGPX6::GUS* ανάλυση σε διαγονιδιακά *Arabidopsis* δείχνει ότι η *AtGPX6* εκφράζεται έντονα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης στους περισσότερους ιστούς επιβεβαιώνοντας το σημαντικό ρόλο αυτού του γονιδίου στην προστασία ενάντια στην οξειδωτική καταπόνηση. Οι διαφορετικές επιπτώσεις του σαλικυλικού οξέος (SA), του γιασμονικού οξέος (jasmonic acid, JA), του αμπζισικού οξέος (ABA) και της αυξίνης στην έκφραση των γονιδίων υποδεικνύουν ότι η οικογένεια των *AtGPX* ρυθμίζεται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Ανάλυση των ανοδικών περιοχών των γονιδίων *AtGPX* αποκαλύπτουν την παρουσία πολλαπλών συντηρημένων μοτίβων, μερικά από τα οποία μοιάζουν με αντιοξειδοτικά στοιχεία απόκρισης που βρίσκονται στους φυτικούς και στους ανθρώπινους υποκινητές [].

Στη λεύκα, οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι η *PtGrcGpx3.2*, που είναι ομόλογη με την *AtGPX6* εμφανίζεται σε δύο ισομορφές εκ των οποίων η μία εντοπίζεται στους χλωροπλάστες και η άλλη και στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια []. Το γεγονός αυτό δεν μας παραξενεύει αφού έχει ήδη παρατηρηθεί και σε άλλες πρωτεΐνες (αναγωγή της γλουταθειώνης, αναγωγή του δεϋδροασκορβικού και υπεροξειδάση του ασκορβικού) [].

Τα παραπάνω αποτελέσματα μας δίνουν κάποιες ενδείξεις για το πώς δημιουργούνται, πώς μετακινούνται και που εντοπίζονται υποκυτταρικά οι δύο ισομορφές της GPX6. Ο πλήρης αποσαφηνισμός των παραπάνω συμπερασμάτων όμως προϋποθέτει τη διεκπεραίωση και άλλων πειραμάτων, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Περαιτέρω επίσης διερεύνηση απαιτείται για να απαντήσουμε στον αν και τα δύο mRNA μεταφράζονται στα ίδια κύτταρα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες και σε τι βαθμό.

v.

ΒΙΒΛΙΟΤΡΑΦΙΑ

- 1) http://en.wikipedia.org/wiki/Oxidative_stress.
- 2) Asada, K. and Takahashi, M. (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In *Photoinhibition* (Kyle, D.J. *et al.*, eds), pp. 227–287, Elsevier.
- 3) Dat, J. *et al.* (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 779–795.
- 4) Asada, K. (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639.
- 5) Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (1996) Resistance gene- dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773–1791.
- 6) Kovtun, Y. *et al.* (2000) Functional analysis of oxidative stressactivated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2940–2945.
- 7) Pei, Z-M. *et al.* (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406, 731–734.
- 8) Mullineaux, P. and Karpinski, S. (2002) Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 43–48.
- 9) Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- 10) Torres, M.A. *et al.* (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 517–522.
- 11) Foreman, J. *et al.* (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422, 442–446.
- 12) Overmyer, K. *et al.* (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci.* 8, 335–342.
- 13) Kwak, J.M. *et al.* (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO J.* 22, 2623–2633.
- 14) Jiang, K. *et al.* (2003) Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development* 130, 1429–1438.

- 15) Dat, J. et al. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 779–795
- 16) Neill, S. et al. (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 388–395.
- 17) Grant, J.J. and Loake, G.J. (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124, 21–29.
- 18) Foyer, C.H. (2002) The contribution of photosynthetic oxygen metabolism to oxidative stress in plants. In *Oxidative Stress in Plants* (Inze', D. and Van Montagu, M., eds), pp. 33–68, Taylor and Francis.
- 19) Møller, I.M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 561–591.
- 20) Urban, P. et al. (1997) Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *J. Biol. Chem.* 272, 19176–19186.
- 21) Noctor, G. and Foyer, C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279.
- 22) Maxwell, D.P. et al. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8271–8276.
- 23) Rizhsky, L. et al. Double antisense plants with suppressed expression of ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants with suppressed expression of ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J.*
- 24) Leshem YY, Haramaty E (1996). The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *J. Plant Physiol.* 148, 258–263.
- 25) Beligni MV, Lamattina L (2001). Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ.* 24, 267–278.
- 26) Beligni MV, Lamattina L (1999). Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta* 208, 337–344.

- 27) Yamasaki H (2000). Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 1477–1488.
- 28) Hill AC, Bennett JH (1970). Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides. *Atmos. Environ.* 4, 341–348.
- 29) Zottini M, Formentin E, Scattolin M, Carimi F, LoSchiavo F, Terzi M (2002). Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in vivo*. *FEBS Lett.* 515, 75–78.
- 30) Leshem YY, Haramaty E, Iluz D, Malik Z, Sofer Y, Roitman L et al. (1997). Effect of stress nitric oxide (NO): interaction between chlorophyll fluorescence, galactolipid fluidity and lipoxygenase activity. *Plant Physiol. Biochem.* 35, 573–579.
- 31) Pedroso MC, Magalhaes JR, Durzan D (2000a). Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Sci.* 157, 173–180.
- 32) Gould KS, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D (2003). Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ.* 26, 1851–1862.
- 33) Beligni MV, Lamattina L (2001). Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ.* 24, 267–278.
- 34) Neill S, Desikan R, Hancock JT (2003). Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* 159, 11–35.
- 35) Herbette S, Lenne C, Leblanc N, Julien J-L, Drevet JR, Roeckel-Drevet P. 2002. Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *European Journal of Biochemistry* 269: 2414–2420.
- 36) Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohé L. 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology* 252: 38–53.
- 37) Fu L, Wang X, Eyal Y, She Y, Donald LJ, Standing KG, Ben-Hayyim G. 2002. A selenoprotein in the plant kingdom. *Journal of Biological Chemistry* 277: 25983–25991.
- 38) Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff DB, Issakidis E, Jacquot JP, Rouhier N. 2006. Plant glutathione peroxidases are

- functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology* **142**: 1364–1379.
- 39) Gueta-Dahan Y, Yaniv Z, Zilinskas BA, Ben-Hayyim G. 1997. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. *Planta* **203**: 460–469.
- 40) Miao Y, Lv D, Wang P, Wang X-C, Chen J, Miao C, Song C-P. 2006. An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* **18**: 2749–2766.
- 41) Avsian-Kretchmer O, Gueta-Dahan Y, Lev-Yadun S, Ben-Hayyim G. 2004. The salt-stress signal transduction pathway that activates the *gpx1* promoter is mediated by intracellular H₂O₂, different from the pathway induced by extracellular H₂O₂. *Plant Physiology* **135**: 1685–1696.
- 42) Holland D, Ben-Hayyim G, Faltin Z, Camoin L, Strosberg AD, Eshdat Y. 1993. Molecular characterization of salt-stress associated protein in citrus: protein and cDNA sequence homology to mammalian glutathione peroxidases. *Plant Molecular Biology* **21**: 923–927.
- 43) Mullineaux P, Karpinski S, Jiménez A, Cleary SP, Robinson C, Creissen GP. 1998. Identification of cDNAs encoding plastid-targeted glutathione peroxidase. *Plant Journal* **13**: 375–379.
- 44) Churin Y, Schilling S, Börner T. 1999. A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley). *FEBS Letters* **459**: 33–38.
- 45) Rodríguez Milla MA, Maurer A, Rodríguez Huete A, Gustafson JP. 2003. Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *Plant Journal* **36**: 602–615.
- 46) Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff DB, Issakidis E, Jacquot JP, Rouhier N. 2006. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology* **142**: 1364–1379.
- 47) Dalton DA. 1995. Antioxidant defenses of plants and fungi. In: Ahmad S, ed. *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. New York, NY, USA: Chapman and Hall, 298–355.

- 48) Matamoros MA, Dalton DA, Ramos J, Clemente MR, Rubio MC, Becana M. 2003. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiology* **133**: 499–509.
- 49) Puppo A, Groten K, Bastian F, Carzaniga R, Soussi M, Lucas MM, de Felipe MR, Harrison M, Vanacker H, Foyer CH. 2003. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist* **165**: 683–701.
- 50) http://en.wikipedia.org/wiki/Medicago_truncatula
- 51) http://en.wikipedia.org/wiki/Green_fluorescent_protein
- 52) Heim R, Cubitt AB, Tsien RY (1995) *Nature* 373:663–664
- 53) http://en.wikipedia.org/wiki/Cauliflower_mosaic_virus
- 54) http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_microscope#Epifluorescence_microscopy

