

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Ιωάννα Α. Μύρτζιου

Διδακτορική Διατριβή

«Ο ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου στον ενζυμικό αντιοξειδωτικό
μηχανισμό του φυτού *Medicago truncatula*»

2012

**Ο ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου στον ενζυμικό αντιοξειδωτικό
μηχανισμό του φυτού *Medicago truncatula***

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη (Επιβλέπουσα)

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μηλιώνη Δήμητρα

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γούναρης Ιωάννης

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χατζόπουλος Πολυδεύκης

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κοντού Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μηλιώνη Δήμητρα

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μολασιώτης Αθανάσιος

Λέκτορας, Τομέας Οπωροκηπευτικών και Αμπέλου, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Ιωάννα Α. Μύρτζιου

**Ο ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου στον ενζυμικό αντιοξειδωτικό
μηχανισμό του φυτού *Medicago truncatula***

*«Σα βγεις στον πηγαιμό για την Ιθάκη,
να εύχεται να ναι μακρύς ο δρόμος,
γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις.*

.....
Κι αν πτωχική την βρεις, η Ιθάκη δε σε γέλασε.

*Έτσι σοφός που έγινες, με τόση πείρα,
ήδη θα το κατάλαβες οι Ιθάκες τι σημαίνουν.»*

Κωνσταντίνος Καβάφης, 1911

Στους γονείς μου

Ιωάννα Α. Μύρτζιου, 2012

Ο ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου στον ενζυμικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό του
φυτού *Medicago truncatula*

Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: XXVI

Συνολικός αριθμός σελίδων: 187

Αριθμός πινάκων: 22

Αριθμός εικόνων: 31

Αριθμός γραφημάτων: 9

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 250

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κύριοι παράγοντες που θεωρούνται υπεύθυνοι για την οξειδωτική καταπόνηση στους φυτικούς οργανισμούς είναι η αλατότητα, η ξηρασία, οι ακραίες τιμές θερμοκρασιών, η υπεριώδης ακτινοβολία, η μεγάλη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων αλλά και η μόλυνση με παθογόνους οργανισμούς όπως μύκητες, βακτήρια και ιούς. Η οξειδωτική καταπόνηση που αναγνωρίζεται από την υπέρμετρη ενδοκυτταρική παραγωγή και συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου (EMO) προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα και τα οδηγεί σε θάνατο. Εξελικτικά αναπτύχθηκε ένα σύστημα ελέγχου των επιπέδων των EMO, καθώς αυτές εκτός από τοξικές μπορούν να παίζουν και σηματοδοτικό ρόλο σε πολλά αναπτυξιακά μονοπάτια του φυτού. Μέλος του αντιοξειδωτικού μηχανισμού είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης φωσφολιπιδικών υδροπεροξειδίων (Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, PHGPX).

Οι PHGPXs μεταβολίζουν οργανικά υδροπεροξειδία ή H_2O_2 σε νερό χρησιμοποιώντας ηλεκτρόνια από μόρια γλουταθειόνης ή θειορεδοξίνης. Περιέχουν αυστηρώς συντηρημένες περιοχές και ένα από τα χαρακτηριστικά τους είναι η διπτός τους υποκυτταρικός εντοπισμός στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στη ύπαρξη ή μη ενός πεπτιδίου του αμινοτελικού άκρου. Δεν σχηματίζουν ομοπολυμερή και οι γενωμικές τους αλληλουχίες απαρτίζονται από έξι, επτά ή οκτώ εξόνια. Τέλος, οι PHGPXs έχει δειχθεί πως έχουν τη δυνατότητα να αντιλαμβάνονται τα επίπεδα του H_2O_2 και να ενεργοποιούν στη ζύμη έναν μεταγραφικό παράγοντα που επάγει γονίδια σχετικά με την άμυνα σε καταστάσεις οξειδωτικής καταπόνησης.

Το μονοξείδιο του αζώτου (nitric oxide, NO), όπως και το H₂O₂, δρουν ως θετικοί ρυθμιστές στην άμυνα των φυτών έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Το NO απαντάται σε αέρια μορφή, η οποία του δίνει τη δυνατότητα να διαχέεται εύκολα και γρήγορα μέσα και ενδιάμεσα στα κύτταρα. Αλληλεπιδρά με μέταλλα και σύμπλοκα καθώς και με πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα. Εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες όπως η επιμήκυνση των ριζών, το κλείσιμο των στομάτων, την απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο. Έχει την ικανότητα να προσδένεται σε θειόλες κυστεϊνών προκαλώντας S-νιτροσυλίωση, μια διαδικασία που μεταβάλλει την ενζυμική δραστηριότητα των πρωτεϊνών στόχων. Το NO μπορεί επίσης να αλληλεπιδρά με EMO και να σχηματίζει ενεργές μορφές αζώτου και μία από αυτές, το υπεροξεινιτρώδες, προκαλεί την μετα-μεταφραστική τροποποίηση της νίτρωσης καταλοίπων τυροσίνης.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να διερευνηθεί η ύπαρξη ομολόγων PHGPX ισομορφών στο φυτό *Medicago truncatula* και να μελετηθεί η συμπεριφορά τους σε απάντηση του NO σε μεταγραφικό επίπεδο όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Στα πλαίσια αυτά απομονώθηκαν δύο ισομορφές (MtPHGPXα και MtPHGPXβ) και συγκρίθηκαν με γνωστές PHGPX από άλλους οργανισμούς. Βρέθηκε πως περιέχουν όλες τις συντηρημένες περιοχές, και εναλλακτικά περιέχουν από ένα διαφορετικό πεπτιδίο στο αμινοτελικό τους άκρο. Με στόχο να διερευνηθεί μια πιθανή εμπλοκή των πεπτιδίων αυτών στον υποκυτταρικό εντοπισμό των ισομορφών, οι κωδικές περιοχές τους αλλά και η πλήρης αλληλουχία του γονιδίου συντήχθηκαν με την GFP πρωτεΐνη και υπερεκφράστηκαν σε φύλλα καπνού. Και οι δύο ισομορφές βρέθηκαν να είναι κυτταροπλασματικές και η κατασκευή του γονιδίου, επίσης έδωσε μια πρωτεΐνη με κυτταροπλασματικό εντοπισμό. Η μελέτη της επίδρασης του NO και του H₂O₂ στην αντιπροσώπευση των μεταγραφημάτων σε φύλλα και ρίζες έδειξε διαφορετικά πρότυπα. Στην προσπάθεια διαλεύκανσης των μηχανισμών, στους οποίους το NO μπορεί να ρυθμίζει τα επίπεδα των MtPHGPX χρησιμοποιήθηκε μια προσέγγιση για τον έλεγχο της σταθεροποίησης των mRNA μορίων και βρέθηκε πως το NO ήταν σε θέση να επιμηκύνει την ημίσεια ζωή των μεταγράφων.

Ένα επιπλέον αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιοριστεί το βέλτιστο υπόστρωμα και ο βέλτιστος δότης ηλεκτρονίων για την MtPHGPX. Η πρωτεΐνη υπερεκφράστηκε σε βακτήρια και ακολούθησε καθαρισμός. Βρέθηκε ότι το βέλτιστο υπόστρωμα είναι το H₂O₂ και ο βέλτιστος δότης ηλεκτρονίων είναι η θειορεδοξίνη. Το NO δεν φαίνεται να επηρεάζει τη δραστηριότητα του ενζύμου και μόνο το υπεροξεινιτρώδες προκαλεί σημαντική αναστολή της δραστηριότητας. Οι κυστεΐνες της MtPHGPX βρέθηκε ότι υπόκεινται σε S-νιτροσυλίωση και οι τυροσίνες σε νίτρωση. Τέλος, η MtPHGPX πιθανότατα

αλληλεπιδρά με μια άγνωστη πρωτεΐνη του φυτού και η αλληλεπίδραση αυτή παρεμποδίζεται από το H_2O_2 .

Η μελέτη αυτή έδωσε σημαντικές πληροφορίες για τη συμπεριφορά των δύο MtPHGPX ισομορφών υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης, όπως αυτές προσομοιώθηκαν από την προσθήκη NO και H_2O_2 . Διαπιστώθηκε πως τα δύο μετάγραφα είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος και η αντιπροσώπευσή τους ρυθμίζεται από το NO και το H_2O_2 στα φύλλα και τις ρίζες. Οι ισομορφές παρουσιάζουν στενή συγγένεια με ομόλογες άλλων ψυχανθών και περιέχουν όλες τις συντηρημένες περιοχές εκτός των πεπτιδίων στο αμινοτελικό τους άκρο. Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι και οι δύο ισομορφές είναι κυτταροπλασματικές, ένα φαινόμενο που φαίνεται να είναι χαρακτηριστικό των ψυχανθών.

Η δραστικότητα του ενζύμου δεν επηρεάζεται από το NO, αλλά αναστέλλεται ισχυρά από το υπεροξεινιτρώδες. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει πως το NO δεν προσδένεται σε κάποια κυστεΐνη που συμμετέχει στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ή στη σωστή του διαμόρφωση και, το αντίθετο πιθανότατα ισχύει για κάποιο κατάλοιπο τυροσίνης. Ενδεχομένως, η MtPHGPX θα μπορούσε να δεσμεύει μόρια NO ταυτόχρονα με EMO. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι και οι δύο μορφές εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, ίσως η MtPHGPX θα μπορούσε να αναλάβει τον λειτουργικό ρόλο της απομάκρυνσης του NO και των EMO στο φυμάτιο, καθώς αυτά αναστέλλουν τη δράση της νιτρογενάσης.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να αποδειχθούν ιδιαίτερα χρήσιμα στα πλαίσια της ευρύτερης έρευνας πάνω στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό και της καλύτερης αντιμετώπισης της οξειδωτικής καταπόνησης. Οι πληροφορίες για την MtPHGPX θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων προς την κατεύθυνση μιας αποτελεσματικότερης αγρονομικής πολιτικής. Παρόλα αυτά, η περαιτέρω μελέτη του ακριβούς μηχανισμού με τον οποίο συσσωρεύονται τα MtPHGPX μετάγραφα στο κύτταρο και η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης με την οποία πιθανά αλληλεπιδρά η MtPHGPX πρωτεΐνη κρίνονται απαραίτητες μελλοντικές ενέργειες. Επίσης, η επίδραση του NO στη σταθερότητα της πρωτεΐνης και ο λειτουργικός ρόλος του ενζύμου παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά το μεγαλύτερο μέρος στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Καλλιόπης Παπαδοπούλου. Στην καθοδήγηση της διατριβής συνέβαλλαν τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής και Δήμητρα Μηλιώνη, Επίκουρος Καθηγήτρια. Ένα μέρος εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτικών Αλληλεπιδράσεων και Φυσιολογίας Φυτών του Εθνικού Ινστιτούτου Αγρονομικής Έρευνας της Γαλλίας (INRA-CNRS, Sophia – Antipolis Cedex, France) υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Alain Puyro και των Ερευνητών Dr. Renaud Brouquisse και Dr. Alexandre Boscari (Ιούλιος – Σεπτέμβριος 2007 και Μάρτιος – Σεπτέμβριος 2008).

Η διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για το διάστημα Νοεμβρίου 2006 – Νοεμβρίου 2009, κατόπιν γραπτής εξέτασης. Το μέρος της διατριβής που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτικών Αλληλεπιδράσεων και Φυσιολογίας Φυτών (INRA – CNRS) χρηματοδοτήθηκε με υποτροφία μικρής διάρκειας (Summer Short-term Fellowship) από την Πανευρωπαϊκή Συνομοσπονδία Βιοχημικών Εταιριών (FEBS).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Έμουν πάντα της άποψης πως τα ερεθίσματα που δεχόμαστε κατά τη διάρκεια των παιδικών μας χρόνων μας στιγματίζουν και συχνά αποβαίνουν καθοριστικά για την πορεία που τελικά ακολουθούμε ως ενήλικες. Το ενδιαφέρον μου για την επιστήμη της Βιοτεχνολογίας και της Μοριακής Βιολογίας γεννήθηκε μέσα μου από πολύ νωρίς, παρόλο που οι λέξεις αυτές δεν υπήρχαν ακόμα στο λεξιλόγιό μου. Η εμμονή ότι συμπληρώνοντας τμήματα DNA βατράχου σε σπασμένο γενετικό υλικό συγγενών ειδών που εξαφανίστηκαν πριν εκατομμύρια χρόνια προκαλεί έντονες αποδοκμασίες από τους γονείς (γιατί δεν τολμάς να το πεις παραέξω). Παράλληλα όμως μπορεί να αποτελέσει και ένα πολύ δυνατό κίνητρο σε ένα παιδί 10 ετών αν λάβει κανείς υπόψη και τα εντυπωσιακά για την εποχή εφέ της Μέκκας της έβδομης τέχνης.

Έτσι η Βιολογία έγινε ουσιαστικά η φυσική τάξη πραγμάτων στο Γυμνάσιο και το Λύκειο και η εισαγωγή στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας η μόνη λύση που θα μπορούσε να με κάνει να νιώσω ότι εκπληρώνω το στόχο μου. Η τελειότητα των μηχανισμών του κυττάρου έγινε αντικείμενο θαυμασμού. Η απύθμενη πολυπλοκότητα

μέσα από την απλότητά τους ήταν για μένα απλά εθιστική. Για το λόγο αυτό μια διδακτορική διατριβή σε θέματα Μοριακής Φυσιολογίας αποτέλεσε φυσική «Εξέλιξη»... .

Η διαδικασία τελικά ήταν μακρά και πολλές φορές επώδυνη, με εκνευρισμούς και πιασμάτα, τριβή στις ανθρώπινες σχέσεις και ψυχολογική φθορά. Κάποιος μου είπε πως: «Ένα διδακτορικό δεν αφήνει κανέναν αλώβητο. Προκαλεί τραύματα που δεν επουλώνονται και τα κουβαλάμε εφεξής μέσα μας». Το διάστημα που έγινε αυτή η συζήτηση ένιωθα ότι δεν θα μπορούσα να συμφωνήσω περισσότερο με αυτή την άποψη. Σήμερα, μόλις δύο μήνες μετά την διεκδίκηση του τίτλου, νιώθω πως δεν θα μπορούσα να διαφωνώ πιο κάθετα! Η απόσταση που μου προσέφερε ο χρόνος και η επιτυχής εξέταση ήταν αρκετή για να με κυριεύσει και πάλι η φρενήρης αγάπη για το αντικείμενο και να σβηστούν ως δια μαγείας όλα τα αρνητικά συναισθήματα. Εδώ πρέπει να προσθέσω πως βοήθησε πολύ και η σύντομη αλλά πολύ αναζωογονητική συναναστροφή μου με έναν επιστήμονα πρότυπο για μένα· έναν σκληρό εργάτη με όραμα και σχεδόν υπερφυσικές ικανότητες στο να παρουσιάζει την επιστήμη μας στο ευρύ κοινό σαν κάτι το απόλυτα προσιτό και κατανοητό, τον Καθηγητή Αθανάσιο Τσαυτάρη, Διευθυντή του Ινστιτούτου Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών και νυν Υπουργό Αγροτικής Ανάπτυξης. Η αναφορά μου αυτή δεν καλύπτει σε καμία περίπτωση τη σημαντική συμβολή όλων των ανθρώπων με τους οποίους βάδισα αυτόν το δύσκολο δρόμο και θα ευχαριστήσω μέσα από την ψυχή μου ευθύς αμέσως στις επόμενες γραμμές.

Πρώτα και πάνω από όλους θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου Επίκουρη Καθηγήτρια Καλλιόπη Παπαδοπούλου. Γνωρίζω πως είναι μια τυπική σειρά να ευχαριστεί κανείς πρώτα τον επιβλέποντα, ειλικρινά όμως στη συγκεκριμένη περίπτωση έχει ιδιαίτερη βαρύτητα για μένα. Ήταν ο άνθρωπος που με στήριξε από την αρχή μέχρι το τέλος και φρόντιζε πάντα για το καλύτερο δυνατό. Πέραν όλων των άλλων σημαντικών που έκανε για μένα, πήρε την πρωτοβουλία να κανονίσει την επίσκεψή μου στη Γαλλία, όπου είχα την ευκαιρία ζωής να γνωρίσω μια λαμπρή προσωπικότητα και διάσημο επιστήμονα, τον Καθηγητή Alain Purro και Διευθυντή του Τομέα Βιοτικών Αλληλεπιδράσεων και Φυσιολογίας Φυτών στο INRA Sophia-Antipolis, France. Το να συζητάς με μια ιδιοφυΐα καθημερινά, να ρίχνεις κλεφτές ματιές στο τρόπο σκέψης του και να παίρνεις ένα κομμάτι από την ηρεμία και τη σιγουριά του, να τον ακούς να σιγοτραγουδά το πρωί στους διαδρόμους και να βροντοφωνάζει καλημέρα είναι με απλά λόγια ευλογία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της Συμβουλευτικής μου Επιτροπής Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή και την Δήμητρα Μηλιώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια για τη συνεχή και ουσιαστική καθοδήγηση καθώς και τους Ερευνητές στη

Γαλλία, Dr. Renaud Brouquisse και Dr. Alexandre Boscarì. Δούλεψα στενά με τους τελευταίους και πρέπει να πω πως μου έδωσαν μια νέα προοπτική της Βιοχημείας και της Βιοτεχνολογίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Κοσμά Χαραλαμπίδη από το Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την ευγενή του καλοσύνη να μου αφιερώσει αρκετό από το χρόνο του για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της ετερόλογης έκφρασης. Θα ήθελα να ευχαριστήσω σε αυτό το σημείο τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τους Καθηγητές κυρίους Ι. Γούναρη και Π. Χατζόπουλο, και τους Λέκτορες κυρία Μ. Κοντού και κύριο Α. Μολασσιώτη, που μου έκαναν την τιμή να αφιερώσουν από το χρόνο τους για να μεταβούν στη Λάρισα αλλά και να διαβάσουν τον μεγάλο όγκο κειμένου που όλοι γνωρίζουμε ότι παίρνουν οι διδακτορικές διατριβές. Είναι όλοι τους σημαίνουσες προσωπικότητες του χώρου και με χαροποιεί ιδιαίτερα το γεγονός ότι μου δόθηκε η δυνατότητα να βρίσκεται το όνομά μου μαζί με το δικό τους στο ίδιο κείμενο.

Πολύ σημαντικό ρόλο στην πορεία του διδακτορικού μου έπαιξαν και οι Dr. Κωνσταντίνος Δελής και Dr. Ντανιέλα Τσίκου που απασχολούνταν το ίδιο διάστημα ως διδάσκοντες ΠΔ407/80 στο Τμήμα. Και οι δύο αφιέρωσαν από τον πολύτιμο χρόνο τους με σκοπό να με βοηθήσουν, παρόλο που το πρόγραμμά τους ήταν ήδη πολύ φορτωμένο. Είχα μια πολύ καλή σχέση και σε προσωπικό επίπεδο και με τους δύο, την Ντανιέλα όμως τη θεωρώ αδερφή μου, πέρα από άριστη επαγγελματία και καλή φίλη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω προσωπικά τους υποψήφιους διδάκτορες Αφροδίτη Κροκιδά, Παναγιώτη Καρά, Βαρβάρα Ποδιά και Chiara Perruchon, όπως και τους Ερευνητές Drs. Pauly Nicolas, Frenco Pierre, Boncompagni Éric, και Garcia Isabelle, τους μεταδιδάκτορες Daniel Marino, Isabelle Damiani, Gilles Inoscenti, Sebastien Gucciardo και Emilie Andrio καθώς και τους τεχνικούς Ferrari Céline, Piardi Stéphanie, Coste-Maehrel Céline, Hopkins Julie και Lambert Annie. Ολόψυχα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Γιάννη για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε από την πρώτη στιγμή και την υπομονή που έδειξε τόσο καιρό.

Άφησα για το τέλος τους ανθρώπους, χωρίς τη στήριξη των οποίων δεν θα έφτανα να ολοκληρώσω αυτό το εγχείρημα. Άντλησα από τους γονείς μου τρομερή ψυχολογική δύναμη όλα αυτά τα χρόνια και ότι είμαι το οφείλω σε αυτούς. Όλοι μας διαχρονικά και με πολύ κόπο διαμορφώνουμε την προσωπικότητά μας και ελπίζουμε να κάνουμε βήματα μπροστά. Η μητέρα και ο πατέρας μου έκαναν τη «βρωμοδουλειά» για μένα και άφησαν πολύ λίγα πράγματα που χρειάζονταν κόπο από πλευράς μου. Ήταν πάντα διορατικοί και μου προσέφεραν, με πολλές θυσίες, την πολυτέλεια των άπειρων επιλογών απομακρύνοντας τις δυσκολίες, τις ασχήμιες και τον πόνο. Η επιστήμη στην Ελλάδα είναι

ακριβό σπορ και σας ευχαριστώ πολύ που μου δώσατε τη δυνατότητα να κάνω τις σπουδές που εγώ επέλεξα. Σας αγαπώ πολύ!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. Οξειδωτική καταπόνηση και αντιοξειδωτικός μηχανισμός	1
I.I. Οξειδωτική καταπόνηση	1
I.II. Παραγωγή ΕΜΟ	1
I.III. Αντιοξειδωτικός μηχανισμός	4
II. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	7
II.I. Γενικά	7
II.II. Χαρακτηριστικά των GPX και PHGPX πρωτεϊνών	9
II.III. Γονιδιακή δομή των PHGPX	11
II.IV. Ενζυμική δραστηριότητα των PHGPX	13
II.V. Ο ρόλος των PHGPX έναντι της αβιοτικής οξειδωτικής καταπόνησης	16
II.VI. Ο ρόλος των PHGPX έναντι της βιοτικής οξειδωτικής καταπόνησης	18
II.VII. Ο ρόλος των PHGPX στη μεταγωγή σήματος	20
III. Το H₂O₂ ως σηματοδοτικό μόριο	25
III.I. Γενικά	25
III.II. H ₂ O ₂ και μεταγωγή σήματος	26
IV. Μονοξείδιο του αζώτου (Nitric oxide, NO)	27
IV.I. Γενικά	27
IV.II. Παραγωγή και ανακύκλωση NO	28
IV.III. Ο ρόλος του NO σε φυσιολογικές διεργασίες των φυτικών κυττάρων	30
IV.III. Το NO στην αβιοτική και βιοτική καταπόνηση	31
IV.IV. NO και μεταγωγή σήματος κατά τη διάρκεια της απόκρισης άμυνας	33
V. S-νιτροσυλίωση	36
V. I. Γενικά	36
V.II. Ο μηχανισμός της S-νιτροσυλίωσης	37
V.III. Εξειδίκευση του μηχανισμού της S-νιτροσυλίωσης	39
V.IV. Ο ρόλος της S-νιτροσυλίωσης στα φυτά	42
VI. Νίτρωση πρωτεϊνών	44
VI.I. Γενικά	44
VI.II. Νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης και καταπόνηση	46

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
I. Φυτικό υλικό	51
I. 1. <i>Medicago truncatula</i>	51
I.2. <i>Nicotiana benthamiana</i>	53
II. Πλασμιδιακοί Φορείς και Βακτηριακά Στελέχη	54
II.1. Πλασμιδιακοί φορείς και χαρακτηριστικά	54
II.2. Αντιβιοτικά	56
II.3. Βακτηριακά στελέχη	56
III. Θρεπτικά Διαλύματα	57
III.1. Θρεπτικά διαλύματα φυτικών οργανισμών	57
IV. Χειρισμοί Βακτηριακών Στελεχών	59
IV.1. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	59
IV.2. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>A. tumefaciens</i> GV3101:ρMP90	61
IV.3. Απομόνωση πλασμιδιακού φορέα από υγρή καλλιέργεια <i>E. coli</i> με χρήση Kit (Nucleospin plasmid, Macherey Nagel)	62
V. Ανάλυση Νουκλεϊνικών Οξέων	63
V.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικά κύτταρα	63
V.2. Καθαρισμός DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο	65
V.3. Απομόνωση RNA από φυτικά κύτταρα	66
V.4. Αναστολή της μεταγραφής	68
V.5. Πέψη DNA μορίων με ενδονουκλεάσες περιορισμού	69
V.6. Ανάλυση τμημάτων DNA σε πηκτική αгарόζη	71
V.7. Επανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτική αгарόζη	72
V.8. Αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA (Ligation)	73
V.9. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	75
V.10. Αντίστροφη μεταγραφή DNA από mRNA (cDNA σύνθεση)	78
V.11. Ποσοτική PCR (Real-time PCR)	79
VI. Ετερόλογη Έκφραση	82
VI.1. Παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού	82
VI.2. Χρώση μιτοχονδρίων	84
VI.3. Μικροσκοπία φθορισμού	84
VII. Ανάλυση Πρωτεϊνών	85
VII.1. Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών από <i>E. coli</i> Rosetta origami	85
VII.2. Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης από φυτικά κύτταρα	87

VII.3. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών	88
VII.4. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με κάθετη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμίδης (SDS PAGE)	89
VII.5. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)	92
VII.6. Ενζυμική δραστικότητα υπερεκφρασμένης MtPHGPX	94
VII.7. Ανίχνευση S-νιτροσουλιώσεων κυστεϊνών μέσω υποκατάστασης με βιοτίνη (Biotin switch method)	95
VII.8. Ανίχνευση νίτρωσης καταλοίπων τυροσίνης	97
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
A. Μοριακή ανάλυση της MtPHGPX	101
I. Το γονίδιο και τα μεταγραφήματα της MtPHGPX	101
I.1. <i>In silico</i> ανάλυση	101
I.2. Πειραματική προσέγγιση	103
I.3. Οι ισομορφές MtPHGPXα και MtPHGPXβ	105
I.4. Τα χαρακτηριστικά των MtPHGPX ισομορφών	106
II. Υποκυτταρικός εντοπισμός των MtPHGPX ισομορφών	111
II.1. <i>In silico</i> ανάλυση	111
II.2. Μοριακές κατασκευές	112
II.3. Ετερόλογη έκφραση και υποκυτταρικός εντοπισμός	116
III. Μελέτη έκφρασης των μεταγραφημάτων MtPHGPX	119
III.1. Ανάλυση αναλογίας των MtPHGPX μεταγραφημάτων στη ρίζα	120
III.2. Ανάλυση αναλογίας των MtPHGPX μεταγραφημάτων στα φύλλα	122
IV. Η δράση του NO στην προστασία των MtPHGPX μεταγράφων έναντι της αποικοδόμησής τους	124
B. Βιοχημική ανάλυση της MtPHGPX	125
I. Απομόνωση και καθαρισμός της MtPHGPX	125
II. Ενζυμική δραστικότητα και βιοχημικές παράμετροι της MtPHGPX	128
III. Επίδραση του NO στη δραστικότητα της MtPHGPX	131
IV. S-νιτροσουλίωση των κυστεϊνών της MtPHGPX	135
V. Νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης της MtPHGPX	137
VI. Αλληλεπίδραση της MtPHGPX με άλλες πρωτεΐνες	139

ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
I. Το γονίδιο και οι ισομορφές της MtPHGPX	145
II. Υποκυτταρικός εντοπισμός των MtPHGPX ισομορφών	146
III. Μελέτη έκφρασης των <i>MtPHGPX</i> μεταγραφημάτων	151
IV. Ενζυμική δραστικότητα και βιοχημικά χαρακτηριστικά της MtPHGPX	158
V. Η επίδραση του NO στην MtPHGPX	160
VI. Πιθανός εναλλακτικός ρόλος της MtPHGPX και μελλοντικές προοπτικές	163
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	169
ABSTRACT	185

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας	Τίτλος	Σελίδα
1	Παραγωγή, δέσμευση και περιορισμός των ΕΜΟ στα φυτά.	2
2	Χαρακτηριστικά των GPX των θηλαστικών.	8
3	S-νιτροσυλιωμένες πρωτεΐνες του <i>Arabidopsis thaliana</i> .	42
4	Δομές και χαρακτηριστικά των πλασμιδιακών φορέων	54
5	Αντιβιοτικά	56
6	Βακτηριακά στελέχη	57
7	Θρεπτικό διάλυμα Hogland	58
8	Σύσταση διαλύματος μικροστοιχείων (Microelements)	58
9	Περιοριστικά ένζυμα (New England BioLabs)	70
10	Πρότυπη αντίδραση μονής πέψης	70
11	Ενδεικτική αντίδραση σύνδεσης	74
12	Ενδεικτική αντίδραση PCR (και colony PCR)	76
13	Βήματα θερμοκυκλοποιητή (για απλή και colony PCR)	77
14	Εκκινητές	77
15	Ζεύγη εκκινητών	78
16	Ενδεικτική αντίδραση Real-time PCR	80
17	Βήματα θερμοκυκλοποιητή Real-time PCR	81
18	Εκκινητές Real-time PCR	81
19	Ζεύγη εκκινητών Real-time PCR	81
20	Stacking gel (5mL)	91
21	Separating gel 12.5% (10mL)	91
22	Ποσοστά ομοιότητας των συγκρινόμενων αμινοξικών αλληλουχιών	109

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα	Τίτλος	Σελίδα
1	Η παραγωγή ΕΜΟ στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες.	3
2	Μονοπάτια παραγωγής και εξουδετέρωσης των ΕΜΟ στο φυτικό κύτταρο.	6
3	Φυλογενετικό δέντρο των GPX θηλαστικών και άλλων οργανισμών.	10
4	Ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών GPX από διάφορους οργανισμούς	12
5	Ο μηχανισμός δράσης των NS-GPX	15
6	Ο αντιαποπτωτικός ρόλος της PHGPX των θηλαστικών στα μιτοχόνδρια	21
7	Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της Orp1 με τον μεταγραφικό παράγοντα YAP1	22
8	Ο ρόλος της AtGPX3 στο μονοπάτι ελέγχου κλεισίματος των στομάτων στα φύλλα που σηματοδοτείται από το ABA	23
9	Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών που πυροδοτεί το σήμα προσβολής του φυτικού κυττάρου από παθογόνους οργανισμούς και η διαμεσολάβηση του NO	35
10	S-νιτροσουλίωση μιας κυστεΐνης στόχου από το NO	38
11	Σχηματική απεικόνιση του ρόλου της S-νιτροσουλίωσης στη βιοτική καταπόνηση	43
12	Σχηματική απεικόνιση της νίτρωσης ενός καταλοίπου τυροσίνης μιας πρωτεΐνης σε έναν από τους ortho-άνθρακες του αρωματικού δακτυλίου.	44
13	Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού νίτρωσης τυροσίνης	45
14	Χαρακτηριστικές δομές των οργάνων του φυτού <i>Medicago truncatula</i>	52
15	Χαρακτηριστικές δομές οργάνων του φυτού <i>Nicotiana benthamiana</i>	53
16	Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου και των ισομορφών της MtPHGPX	102
17	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% των δύο ισομορφών MtPHGPX μετά από PCR.	103
18	Ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών διαφόρων οργανισμών και των δυο MtPHGPX ισομορφών	107
19	Φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει τις σχέσεις ομοιότητας, ως αποτέλεσμα της συγκριτικής μελέτης διαφόρων πρωτεϊνών	110
20	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% των αντιδράσεων πέψης του πλασμιδιακού φορέα pGEM-T easy με τα ενθέματα MtPHGPXα και MtPHGPXβ.	113
21	Σχηματική απεικόνιση των ενδιάμεσων βημάτων για την κατασκευή του τελικού φορέα pCambia2201:35S:EGFP	114
22	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% των αντιδράσεων πέψης του πλασμιδιακού φορέα p35SEGFP-N1 με τα ένζυμα EcoRI και Sall.	115
23	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% του προϊόντος ενίσχυσης με	115

	PCR του τμήματος του φορέα p35SEGFP-N1 το οποίο περιλαμβάνει τη θέση κοπής για το τον 35S υποκινητή, τον πολυσυνδέτη, και το γονίδιο αναφοράς GFP.	
24	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% των αντιδράσεων πέψης του φορέα pCambia2201:35S:EGFP, με τα ένζυμα EcoRI και BstEII.	115
25	Υποκυτταρικός εντοπισμός των MtPHGPX α , β και MtPHGPX:GFP συντηγμένων πρωτεϊνών σε φύλλα <i>Nicotiana benthamiana</i> .	117
26	Το NO προστατεύει τα MtPHGPX μετάγραφα έναντι της αποικοδόμησης.	124
27	Πηκτή πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE, πυκνότητας 12,5%, μετά από ηλεκτροφόρηση και βαφή με Coomassie.	126
28	Πηκτή ακρυλαμίδης SDS-PAGE πυκνότητας 12.5% μετά από χρώση με Coomassie και μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης μετά τη διαδικασία western blot και τη χρώση του αντισώματος που ανιχνεύει την αλληλουχία επισήμανσης πρωτεϊνών His-tag.	127
29	Εντοπισμός S-νιτροσυλιωμένων κυστεϊνών στην MtPHGPX μετά από μεταχείριση με τους δότες NO DEA-NONOate και GSNO με την τεχνική της BSM.	136
30	Εντοπισμός νιτροτυροσινών στην MtPHGPX μετά από μεταχείριση με τους δότες NO ONOO $^-$, DEA-NONOate και GSNO.	138
31	Αλληλεπίδραση των MtPHGPX με άλλες πρωτεΐνες.	140

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα	Τίτλος	Σελίδα
1	Αναλογικά επίπεδα έκφρασης της MtPHGPX α στις ρίζες.	121
2	Αναλογικά επίπεδα έκφρασης της MtPHGPX β στις ρίζες.	121
3	Αναλογικά επίπεδα έκφρασης της MtPHGPX α στα φύλλα	123
4	Αναλογικά επίπεδα έκφρασης της MtPHGPX β στα φύλλα.	123
5	Γραφική απεικόνιση της δραστηριότητας της MtPHGPX σε σχέση με τα υποστρώματα H ₂ O ₂ , Cumene-OOH και t-Butyl-OOH.	129
6	Γραφική παράσταση της καμπύλης υπολογισμού της K _m για το υπόστρωμα H ₂ O ₂ .	130
7	Γραφική παράσταση της καμπύλης υπολογισμού της K _m για τον δότη ηλεκτρονίων θειορεδοξίνη.	131
8	Γραφική παράσταση της επίδρασης των μορίων-σκελετών DEA και GSH στην δραστηριότητα της MtPHGPX.	133
9	Γραφική παράσταση που απεικονίζει την επίδραση των DEANONOate, GSNO και ONOO $^-$ στη δραστηριότητα της ανασυνδυασμένης MtPHGPX.	134

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ABA	αποκοπτικό οξύ
ActD	ακτινομυκίνη D
AdoMet	S-αδενοσυλμεθειονίνη
AOX	εναλλακτική οξειδάση
APX	ασκορβική περοξειδάση
AS	εναλλακτικό μάτισμα
BLAST	Βασικό εργαλείο αναζήτησης τοπικής ομοπαράθεσης
CaMV	ιός του μωσαϊκού του κουνουπιδιού
CAT	καταλάση
cGAPDH	δεϋδρογονάση της τριφωσφορικής γλυκεραλδεΐδης
cGMP	κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη
Cys	κυστεΐνη
Cyt C	κυτόχρωμα C
DAF-2	4,5-διαμινοφθορεσκίνη
DEANONOate	διαιθυλενοτριαμίνη NONO
EMO	ενεργές μορφές οξυγόνου
EST	εκφρασμένες ετικέτες γονιδίων
GFP	πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
GPX	περοξειδάση της γλουταθειόνης
GR	αναγωγή της γλουταθειόνης
GSH	γλουταθειόνη
GSNO	S-νιτροσοθειόλη
GSSG	οξειδωμένη γλουταθειόνη
H₂O₂	υπεροξειδίο του υδρογόνου
JA	ιασμονικό οξύ
MAPK	πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιημένες από μιτογόνο
MAT	αδενοσυλτρανσφεράση της μεθειονίνης
NADPH	φωσφορικό-νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NO	μονοξειδίο του αζώτου
NOS	συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου
NR	αναγωγή του νιτρικού
ONOO⁻	υπεροξεινιτρώδες
PCD	προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος
PHGPX	υπεροξειδάση φωσφολιπιδικών υδροπεροξειδίων
PSI	φωτοσύστημα I
PSII	φωτοσύστημα II
RNS	ενεργές μορφές αζώτου
SA	σαλικυλικό οξύ
SAR	επίκτητη διασυστημική ανθεκτικότητα
SeCys	σεληνοκυστεΐνη
SNO	S-νιτροσοθειόλες
SOD	δισμουτάση υπεροξειδικής ρίζας
TIGR	ινστιτούτο μελέτης του γονιδιώματος
TPx	περοξειδάση θειορεδοξίνης
Trx	θειορεδοξίνη
TSS	σημείο έναρξης της μεταγραφής

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. Οξειδωτική καταπόνηση και αντιοξειδωτικός μηχανισμός

I.I. Οξειδωτική καταπόνηση

Ως οξειδωτική καταπόνηση ορίζεται η περίσσεια ενεργών μορφών οξυγόνου, ΕΜΟ (reactive oxygen species, ROS), μέσα στα κύτταρα, που προκαλείται από εξωτερικά ερεθίσματα (1). Οι ΕΜΟ, μερικές από τις οποίες είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), η υπεροξειδική ρίζα (O_2^-), η υδροξυλική ρίζα (OH^-) και άλλες, παράγονται μέσα στα κύτταρα κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού που λαμβάνει χώρα υπό φυσιολογικές συνθήκες (2). Στα φυτά συγκεκριμένα, ΕΜΟ παράγονται κατά την διαδικασία της φωτοσύνθεσης και της αναπνοής. Επιπλέον, όταν τα φυτά βρεθούν υπό συνθήκες αυξημένης αλατότητας του εδάφους, ξηρασίας, έντονου φωτός, αυξημένης συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων ή όταν προσπαθούν να εισβάλλουν σε αυτά μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες) ή ιοί, η παραγωγή των ΕΜΟ αυξάνεται (3 - 9). Οι αβιοτικές και βιοτικές αυτές καταπονήσεις αποτελούν τον κύριο παράγοντα μείωσης της γεωργικής παραγωγής και ποιότητας, παγκοσμίως. Παράλληλα ευθύνονται για τον περιορισμό της διαθέσιμης κατάλληλης προς καλλιέργεια έκτασης με σοβαρές γεωργο-οικονομικές και κοινωνικές επιπτώσεις (10).

I.II. Παραγωγή ΕΜΟ

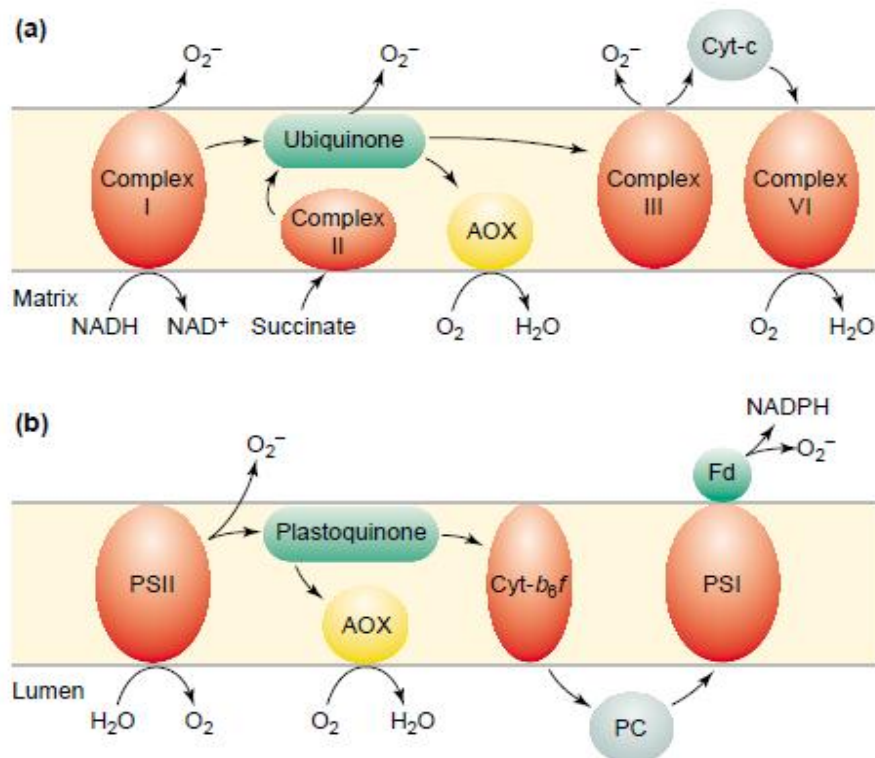
ΕΜΟ παράγονται από τον πρωτογενή μεταβολισμό υπό φυσιολογικές συνθήκες στα φυτά κατά την φωτοσύνθεση και τη μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, όπως και σε όλους άλλωστε τους αερόβιους οργανισμούς (Πίνακας 1). Είναι εν μέρει ανηγμένες μορφές ατμοσφαιρικού οξυγόνου (O_2) και τυπικά προκαλούνται από 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^-), υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) ή μία ρίζας υδροξυλίου (HO^-) (1).

Πίνακας 1: Παραγωγή, δέσμευση και περιορισμός των ΕΜΟ στα φυτά (1)

Μηχανισμός	Τοποθεσία	ΕΜΟ
Παραγωγή		
Photosynthesis ET and PSI or II	Chl	O_2^-
Respiration ET	Mit	O_2^-
Glycolate oxidase	Per	H_2O_2
Excited chlorophyll	Chl	O_2^1
NADPH oxidase	PM	O_2^-
Fatty acid β -oxidation	Per	H_2O_2
Oxalate oxidase	Apo	H_2O_2
Xanthine oxidase	Per	O_2^-
Peroxidases, Mn^{2+} and NADH	CW	H_2O_2, O_2^-
Amine oxidase	Apo	H_2O_2
Δέσμευση		
Superoxide dismutase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	O_2^-
Ascorbate peroxidase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2
Catalase	Per	H_2O_2
Glutathione peroxidase	Cyt,	$H_2O_2, ROOH$
Peroxidases	CW, Cyt, Vac	H_2O_2
Thioredoxin peroxidase	Chl, Cyt, Mit	H_2O_2
Ascorbic acid	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2, O_2^-
Glutathione	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2
α -Tocopherol	Membranes	$ROOH, O_2^1$
Carotenoids	Chl	O_2^1
Αποφυγή		
Anatomical adaptations	Leaf structure, epidermi	O_2^-, H_2O_2, O_2^1
C_4 or CAM metabolism	Chl, Cyt, Vac	O_2^-, H_2O_2
Chl movement	Cyt	O_2^-, H_2O_2, O_2^1
Suppression of photosynthesis	Chl	O_2^-, H_2O_2
PS and antenna modulations	Chl	O_2^-, O_2^1
Alternative oxidases	Chl, Mit	O_2
Συντηρήσεις: Apo: αποπλάστης, Chl: χλωροπλάστης, CW: κυτταρικό τοίχωμα, Cyt: κυτταρόπλασμα, ET: μεταφορά ηλεκτρονίων, Mit: μιτοχόνδριο, Per: περοξεισώματα, PM: πλασματική μεμβράνη, PS: φωτοσύστημα, Vac: κενοτόπιο		

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 (Εικόνα 1a) (1, 11). Μια από τις κύριες διαδικασίες που παράγουν ΕΜΟ είναι η φωτοσύνθεση, όπου μέσω του φωτοσυστήματος II (PSII) παράγονται O_2^1 και μέσω του φωτοσυστήματος I (PSI) παράγονται O_2^- στους χλωροπλάστες (Εικόνα 1b) (2). Στους χλωροπλάστες παράγεται και η ένωση φωσφογλυκολικό με τη συμβολή του NADPH και τη βοήθεια του ενζύμου Rubisco. Η ένωση αυτή μεταφέρεται στα υπεροξυσωμάτια και μέσω της οξειδάσης του γλυκολικού μετατρέπεται σε γλυοξυλικό με την παραγωγή H_2O_2 , μια διαδικασία που ονομάζεται φωτοαναπνοή (photorespiration) (12). Η οξείδωση των λιπαρών οξέων

είναι ακόμη μια φυσιολογική διαδικασία καταβολισμού που παράγει H_2O_2 στα μικροσωμάτια (12, 13). Τέλος σημαντική



Εικόνα 1: Η παραγωγή EMO στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες. Στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων παράγονται από το σύμπλεγμα I και το σύμπλεγμα III μόρια O_2^- ενώ από το σύμπλεγμα VI παράγεται H_2O_2 (a). Στον χλωροπλάστη τα μόρια O_2^- παράγονται διαδοχικά από τα φωτοσυστήματα PSI και PSII (b) (1).

συμβολή στην παραγωγή EMO έχουν και μια σειρά από οξειδάσες που εντοπίζονται στον αποπλάστη όπως η οξειδάση αμινών και η οξειδάση του οξαλικού, παράγοντας ως επί τω πλείστο H_2O_2 (14, 15).

Οι EMO λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια και οι μηχανισμοί του κυττάρου εκμεταλλεύονται την παραγωγή τους για να επιτύχουν πολλαπλές απαραίτητες για το φυτό διεργασίες (16, 17). Τα επίπεδα, όμως, των EMO που παράγονται φυσιολογικά μέσα στο κύτταρο ως προϊόντα του μεταβολισμού αυξάνονται υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης. Η οξειδαναγωγική ισορροπία του κυττάρου διαταράσσεται, με την τάση να αποκατασταθεί η ομοιόσταση με τις απαραίτητες ενέργειες. Σε περίπτωση που δεν γίνει εφικτή η αντιμετώπιση της υπερπαραγωγής EMO, το κύτταρο είναι καταδικασμένο σε κυτταρικό θάνατο, μια

επιλογή που, ορισμένες φορές, αποβαίνει εξαιρετικά χρήσιμη για την επιβίωση του οργανισμού στο σύνολό του (18, 19).

I.III. Αντιοξειδωτικός μηχανισμός

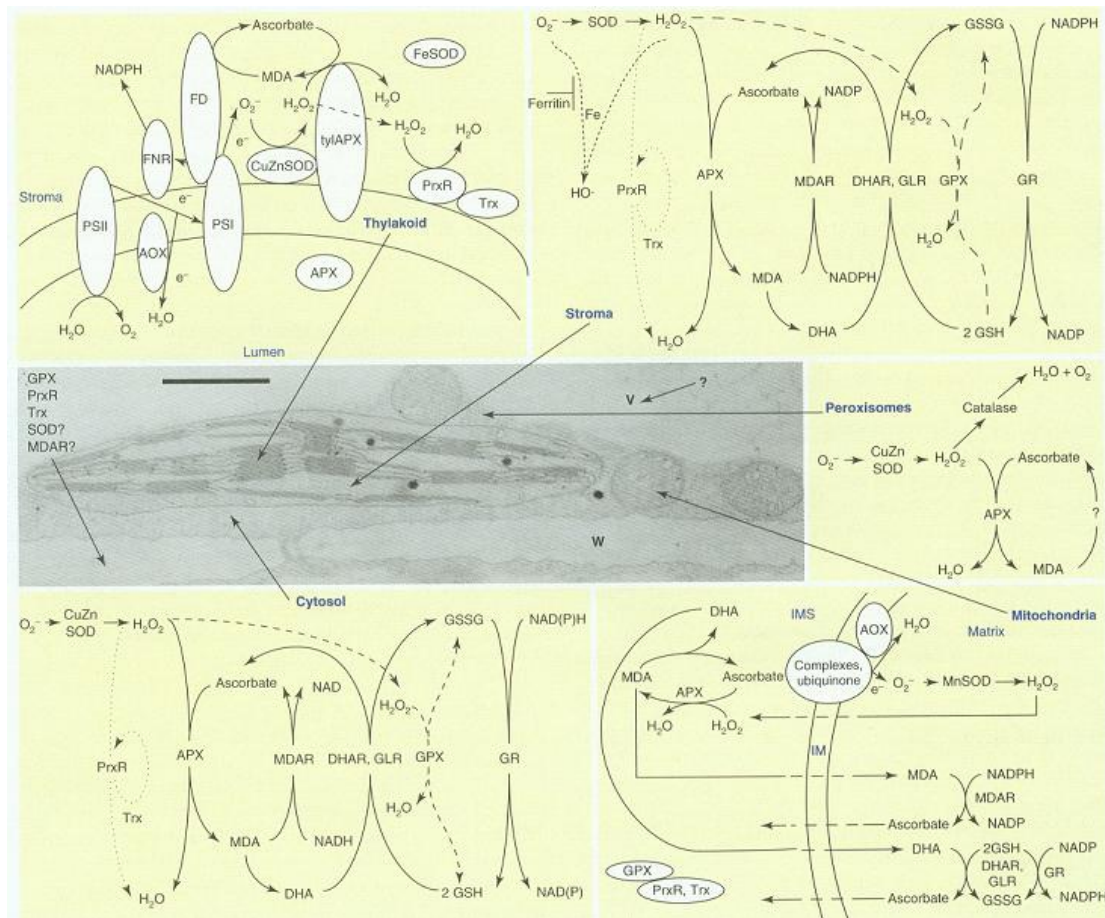
Οι ΕΜΟ είναι τοξικές για τα κύτταρα. Λόγω της αυξημένης ενεργότητάς τους, αλληλεπιδρούν με μακρομόρια του κυττάρου όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊνικά οξέα, με αποτέλεσμα να τους προκαλούν ανεπανόρθωτες βλάβες και να τα καθιστούν μη λειτουργικά (20). Για το λόγο αυτό εξελικτικά οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς μεταβολισμού των ΕΜΟ σε αδρανείς ή μη τοξικές ενώσεις.

Οι μηχανισμοί αυτοί είναι είτε ενζυμικοί είτε μη. Στους μη ενζυμικούς μηχανισμούς κατατάσσεται ο κύκλος γλουταθειόνης – ασκορβικού (21). Στους ενζυμικούς μηχανισμούς υπάρχουν δύο κατηγορίες: η αποφυγή αυξημένης παραγωγής ΕΜΟ, για παράδειγμα μέσω της εναλλακτικής οξειδάσης (alternative oxidase, AOX; EC 1.10.3.11) στα μιτοχόνδρια (11) και ο καταβολισμός των ΕΜΟ μέσω της υπεροξειδικής δισμουτάσης (superoxide dismutase, SOD; EC 1.15.1.1) της καταλάσης (catalase, CAT; EC 1.11.1.6), της υπεροξειδάσης του ασκορβικού οξέος (ascorbate peroxidase, APX; EC 1.11.1.1) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, GPX; EC 1.11.1.9) (22). Υπάρχουν και άλλα ένζυμα όπως η αναγωγή της γλουταθειόνης (glutathione reductase, GR) τα οποία συμμετέχουν έμμεσα στην αντιμετώπιση των αυξημένων επιπέδων ΕΜΟ, ανάγοντας την οξειδωμένη γλουταθειόνη (21).

Ανάλογα με το ερέθισμα οι ΕΜΟ παράγονται σε διαφορετικά σημεία του κυττάρου και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (23). Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα εντοπίζονται υποκυτταρικά σε διάφορα οργανίδια του κυττάρου και στο κυτταρόπλασμα ως ισοένζυμα με ελαφρώς διαφορετική μορφή και ενδεχομένως και ιδιότητες ή ικανότητες κατάλυσης (24). Ενεργοποιούνται επιλεκτικά με βάση τη φύση του ερεθίσματος που δέχεται το κύτταρο (Εικόνα 2). Για παράδειγμα, το έντονο φως προκαλεί αυξημένη παραγωγή ΕΜΟ στους χλωροπλάστες και για αυτόν τον λόγο ενεργοποιούνται εντονότερα οι SODs και οι APX και GPX του χλωροπλάστη (25, 26, 27).

Η SOD εντοπίζεται ως διαφορετικό ισοένζυμο ή και στην ίδια μορφή στο κυτταρόπλασμα, τον χλωροπλάστη και το μιτοχόνδριο (28). Όλες οι SOD μεταγράφονται στον πυρήνα. Τα διάφορα ισοένζυμα της SOD, εκτός από τις διαφορετικές αλληλουχίες που φέρουν και είναι υπεύθυνες για τον εντοπισμό και την κατεύθυνσή τους στα διαφορετικά οργανίδια του κυττάρου, παρουσιάζουν διαφορές και ως προς το μέταλλο που είναι συνδεδεμένο στο ενεργό τους κέντρο (29, 30). Η Cu/Zn SOD για παράδειγμα εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στους χλωροπλάστες. Η Mn SOD εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Η Fe SOD εντοπίζεται στους χλωροπλάστες. Η δομή ωστόσο των ισοενζύμων, δηλαδή το ποιο μέταλλο είναι συνδεδεμένο στο ενεργό τους κέντρο, μοιάζει να είναι ειδική για τις ανάγκες του κάθε οργανιδίου (30). Πειράματα έχουν δείξει ότι η μεταφορά, με μεθόδους βιοτεχνολογίας, ισοενζύμων της SOD από το οργανίδιο όπου εκφράζονται κανονικά σε κάποιο άλλο ως πρόσθετα αντίγραφα δεν προσφέρει καλύτερη αποσυμφόρηση από τις EMO για κάθε είδος αβιοτικής καταπόνησης αλλά μόνο για συγκεκριμένα (31).

Οι AOX προλαμβάνουν την παραγωγή EMO στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια καθώς προωθούν τα διερχόμενα ηλεκτρόνια μέσω των αλυσίδων μεταφοράς των ηλεκτρονίων και να τα χρησιμοποιήσουν στην αναγωγή του O₂ σε νερό (Εικόνα 1). Η APX εντοπίζεται, από ό,τι είναι γνωστό μέχρι σήμερα, στο κυτταρόπλασμα, στο χλωροπλάστη ενώ έχει δειχθεί πως υπάρχει και στο μιτοχόνδριο σε ορισμένα φυτά. Πολλά από τα ισοένζυμα προκύπτουν από ένα και μοναδικό γονίδιο. Η GPX μέχρι σήμερα γνωρίζουμε ότι εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και για ορισμένα φυτά έχει δειχθεί η ύπαρξη ισοενζύμου στο χλωροπλάστη και στο μιτοχόνδριο. Η αλληλουχία των APX και GPX είναι αυτή που καθορίζει την κατεύθυνση των ισοενζύμων μέσα στο κύτταρο. Η GR έχει δειχθεί σε ορισμένα φυτά πως εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, τον χλωροπλάστη και το μιτοχόνδριο. Ο συνεντοπισμός της GR με την GPX είναι απαραίτητος καθώς η πρώτη ανακυκλώνει τον δότη ηλεκτρονίων γλουταθειόνη που χρησιμοποιεί η δεύτερη (32).



Εικόνα 2: Μονοπάτια παραγωγής και εξουδετέρωσης των ΕΜΟ στο φυτικό κύτταρο. Τα ισόενζυμα των αντιοξειδωτικών ενζύμων δεσμεύουν και καταβολίζουν τις ΕΜΟ στα διαφορετικά υποκυτταρικά οργανίδια με τη βοήθεια του κύκλου ασκορβικού-γλουταθειόνης (32).

Ανακεφαλαιώνοντας, η πορεία περιγράφεται ως εξής: η AOX αποτρέπει τα ηλεκτρόνια από το να ανάγουν το O_2 σε O_2^- και μειώνει το συνολικό επίπεδο του O_2 και κατ' επέκταση ανακόπτει με αυτόν τον τρόπο την πορεία παραγωγής ΕΜΟ. Οι ΕΜΟ που τελικά παράγονται μετατρέπονται σε H_2O_2 από την SOD και αυτό στη συνέχεια μετατρέπεται σε νερό από τις APX, CAT και GPX.

II. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

II.1. Γενικά

Η GPX καταλύει την αναγωγή του H₂O₂ ή οργανικών υδροπεροξειδίων σε νερό ή στις αντίστοιχες αλκοόλες, χρησιμοποιώντας ανηγμένη γλουταθειόνη (38). Η ύπαρξη των GPX διαπιστώθηκε για πρώτη φορά το 1957 σε κύτταρα θηλαστικών (39). Κατά κανόνα τα θηλαστικά εκφράζουν έξι μέλη της οικογένειας GPX με διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό, τα οποία διαφοροποιούνται με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία, την εξειδίκευσή τους για το υπόστρωμα και τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 (40, 41). Τα μέλη αυτά είναι η κλασική ή κυτοπλασματική GPX1 και η πρώτη GPX θηλαστικών που χαρακτηρίστηκε, η γαστρεντερική GPX2, η πλασματική GPX3, η υπεροξειδάση φωσφολιπιδικών υδροπεροξειδίων PHGPX (Phospholipid Hydroperoxide GPX) ή GPX4, η επιδιδυμική GPX5 και η επιθηλιακή GPX6.

Στο ενεργό τους κέντρο, εκτός της GPX5, έχουν ένα κατάλοιπο σεληνοκυστεΐνης (SeCys), το οποίο εκλείπει στα φυτά και είναι υπεύθυνο για την ενεργότητα του ενζύμου. Έχει δειχθεί, για παράδειγμα, ότι η μετάλλαξη και αντικατάσταση της SeCys με Cys στην GPX1 και GPX4 των θηλαστικών οδήγησε και στις δύο περιπτώσεις σε κατακόρυφη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας (42, 43). Στην συντριπτική πλειοψηφία των φυτών η SeCys αντικαθίσταται από μια Cys γεγονός που, κατά τα φαινόμενα, προκαλεί τη χαμηλή ενζυμική ενεργότητα σε σύγκριση με τα θηλαστικά. Παρόλα αυτά, *in vitro* αντικατάσταση της κυστεΐνης μιας φυτικής GPX με σεληνοκυστεΐνη σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης δεν οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου (44). Η SeCys εμφανίζεται σποραδικά σε ελάχιστους οργανισμούς ως εξαίρεση στην αλληλουχία των GPX αυτών των οργανισμών. Πρόσφατα, έχει χαρακτηριστεί μία GPX από το πράσινο φύκι *Chlamydomonas reinhardtii* (45) και περιέχει ένα κατάλοιπο SeCys στο ενεργό της κέντρο. Εκτός των θηλαστικών, άλλα μέλη του ζωικού βασιλείου που βρέθηκε ότι εκφράζουν GPX που περιέχει SeCys είναι ο *Gallus gallus* (46) και ο *Danio rerio* (47).

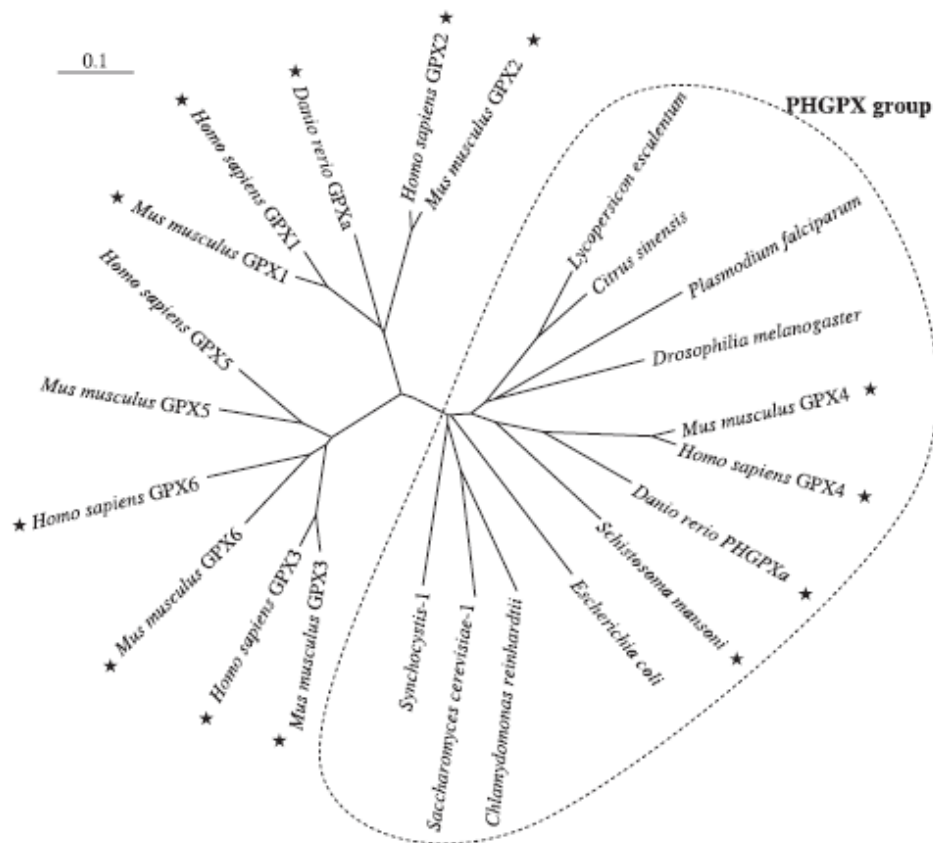
Numeric nomenclature	GPX1	GPX2	GPX3	GPX4	GPX5	GPX6
Literature denomination	cGPX (cytosolic or classical)	GI-GPX (gastro-intestinal)	pGPX (plasmatic)	PHGPX (phospholipid hydroperoxidase)	eGPX (epididymal)	OMP (olfactory-metabolizing protein)
Tissue distribution	Red cells, liver, lung, kidney, ...	Stomach, intestine, liver	Kidney, lung, epididymis, vas deferens, placenta, seminal vesicle, heart, muscle, ...	Testis, spermatozoa, liver, kidney, heart, brain, ...	Epididymis, spermatozoa	Olfactory epithelium
Cellular localization	Cytosol, nucleus, mitochondria	Cytosol, nucleus	Secreted, cytosol	Nucleus, cytosol, mitochondria, membrane-bound	Secreted	
Molecular mass (kDa)	21	22	22.5	19	24	22.5
Multimerization	4	4	4	1	2	4
SeCys	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes/No
First reference	Mills, 1957 [1]	Chu et al. 1993 [144]	Takahashi et al. 1987 [145]	Ursini et al. 1985 [35]	Ghyselink et al. 1989 [146]	Dear et al. 1991 [15]

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά των GPX των θηλαστικών. Δίνονται πληροφορίες σχετικές με τον εντοπισμό των ενζύμων στο κύτταρο, την έκφρασή τους στους ιστούς, το μέγεθός τους, την τεταρτοταγή τους δομή και την ύπαρξη SeCys στην αλληλουχία τους. Οι GPX1, GPX3 και GPX4 εντοπίστηκαν σε όλους τους ιστούς που ελέγχθηκαν αλλά παρουσιάζονται οι πιο χαρακτηριστικοί ιστοί. Η GPX6 περιέχει SeCys στον άνθρωπο και τον χοίρο αλλά όχι στον ποντικό και τον επίμω (38)

Παρόλο που οι φυσιολογικές λειτουργίες των σεληνιο-εξαρτώμενων GPX έχουν μελετηθεί διεξοδικά, ιδιαίτερως μάλιστα στα θηλαστικά, οι GPX που δεν περιέχουν SeCys, μέχρι σήμερα, δεν έχουν γίνει αντικείμενο πολλών μελετών. Το γεγονός αυτό οφείλεται πρωτίστως στο ότι δεν έχουν βρεθεί να παρουσιάζουν αυξημένη δραστικότητα έναντι των EMO και των υπεροξειδίων σε σύγκριση με τις σεληνιο-εξαρτώμενες GPX. Παρόλα αυτά, ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες διαφαίνονται οι εξελικτικές σχέσεις των δύο ειδών GPX και κυρίως το σύστημα ενσωμάτωσης της SeCys που προφανώς αναπτύχθηκε επιλεκτικά. Η διαφορετική ενζυμική δραστικότητα των δύο κατηγοριών πιστεύεται επίσης πως ίσως να προδίδει έναν ξεχωριστό φυσιολογικό ρόλο για τις GPX που δεν περιέχουν SeCys (38).

II.II. Χαρακτηριστικά των GPX και PHGPX πρωτεϊνών

Η ανάλυση της σύγκρισης αμινοξικών αλληλουχιών GPX από διάφορους οργανισμούς, είτε αυτές περιέχουν SeCys είτε Cys, δείχνει ότι η οικογένεια των GPX υποδιαιρείται σε τρεις ευρείς ομάδες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3 (38). Μία ομάδα περιλαμβάνει τις GPX1 και GPX2 των θηλαστικών, καθώς και ομόλογές τους προερχόμενες από άλλα σπονδυλωτά (38). Μια άλλη ομάδα αποτελείται από τις GPX3, GPX5 και GPX6 των θηλαστικών. Η τρίτη ομάδα, αποτελείται από την GPX4 ή PHGPX των θηλαστικών και τις περισσότερες GPX από διάφορους οργανισμούς. Είναι πραγματικά αξιοσημείωτο ότι πολύ συχνά, μία PHGPX ισομορφή παρουσιάζει περισσότερη ομολογία με ισομορφές άλλων οργανισμών, παρά με τις GPX ισομορφές εντός του ίδιου οργανισμού, με δεδομένο ότι οι οργανισμοί είναι συγγενείς. Αυτό έγινε φανερό και μετά από μια φυλογενετική ανάλυση αμινοξικών αλληλουχιών PHGPX που έγινε για διάφορα φυτά (48, 49).



Εικόνα 3: Φυλογενετικό δέντρο των GPX θηλαστικών και άλλων οργανισμών. Οι αμινοξικές αλληλουχίες ομοπαράτεθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού CLUSTALW (143) και το φυλογενετικό δένδρο πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό PHYLIP. Οι αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών στις βάσεις δεδομένων (GenBank/SWISS-PROT) είναι οι εξής: *B. rahangi* (X69128), *C. Reinhardtii* (AB009083), *C. sinensis* (Q06652), *D. rerio* GPXa (AY215589) και PHGPXa (AY216590), *D. melanogaster* (AAO41409), *E. coli* (P06610), *Homo sapiens* GPX1 (P07203), GPX2 (P18283), GPX3 (P22352), GPX4 (P36969), GPX5 (NM_001509) και GPX6 (NM_182701), *L. esculentum* (Y14729), *Mus musculus* GPX1 (P11352), GPX2 (BC054848), GPX3 (U13705), GPX4 (O70325), GPX5 (P21765) και GPX6 (NP_663426), *P. falciparum* (Z68200), *S. cerevisiae-1* (P30614), *Sch. mansoni* (Q00277), *Synechocystis* PCC 6803 (NP401201). Οι πρωτεΐνες, οι οποίες εμπεριέχουν SeCys στις αλληλουχίες τους, σημαίνονται με αστερίσκο. Η ευθεία (0.1) δίνει το μήκος των κλάδων και την απόσταση μεταξύ τους (38).

Οι PHGPX, όπως και όλες οι GPX πρωτεΐνες, έχουν μια κοινή εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή στο καρβοξυ-τελικό άκρο, όπως φαίνεται στην εικόνα 4, η οποία περιέχει το ενεργό κέντρο του ενζύμου (38). Στην περιοχή αυτή εντοπίζονται τρεις αυστηρώς συντηρημένες αμινοξικές αλληλουχίες οι οποίες, με βάση μελέτες

σε αντίστοιχα ένζυμα άλλων οργανισμών, συμμετέχουν ενεργά στη σωστή διαμόρφωση του ενεργού κέντρου και την πιθανή αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Κεντρικό ρόλο παίζουν και τρία κατάλοιπα Cys, ή και SeCys ανάλογα με το είδος, που εμπλέκονται άμεσα στον μηχανισμό δράσης του ενζύμου (50).

Έχει διαπιστωθεί πειραματικά ότι οι PHGPX απαντώνται σε δύο ισομορφές. Η μια εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και η δεύτερη στα μιτοχόνδρια. Οι αλληλουχίες που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο παρουσιάζουν μικρότερο ποσοστό ομολογίας και ευθύνονται συνήθως για τον διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό της ισομορφής που τις φέρει. Έχει παρατηρηθεί πως όταν το πεπτίδιο του αμινοτελικού άκρου είναι υδρόφοβο, η πρωτεΐνη έχει την τάση να εντοπίζεται σε οργανίδια. Όταν το πεπτίδιο αυτό είναι υδρόφιλο, η πρωτεΐνη συνήθως εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (50, 51, 52).

Τέλος ένα ακόμη χαρακτηριστικό των PHGPX είναι ότι δεν σχηματίζουν ομοπολυμερή, αντίθετα με τις υπόλοιπες GPX (Πίνακας 2). Όπως φαίνεται από την αμινοξική αλληλουχία των PHGPX (Εικόνα 4), εκλείπουν τμήματα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες GPX αλληλουχίες, τα οποία ενδεχομένως να ευθύνονται για την απουσία αλληλεπίδρασης δύο διαμορφωμένων PHGPX πρωτεϊνών (38). Σύμφωνα με μελέτες οι περιοχές αυτές ίσως να σχετίζονται και με την πρόσδεση του δότη ηλεκτρονίων γλουταθειόνη, εξηγώντας με αυτόν τον τρόπο τη χαμηλή συγγενεία της με το ένζυμο (53, 55).

II.III. Γονιδιακή δομή των PHGPX

Για τις GPX των θηλαστικών αναπτύχθηκε η θεωρία ότι η οικογένεια των ενζύμων εξελίχθηκε από έναν κοινό γονιδιακό πρόγονο, μετά από αλληπάλληλους διπλασιασμούς, τους οποίους διαδέχτηκαν τυχαίες μεταναστεύσεις των αλληλουχιών μέσα στο γονιδίωμα (48, 54). Αυτός ο γονιδιακός πρόγονος μάλλον αντιπροσωπεύεται καλύτερα από την αλληλουχία της PHGPX, υπόθεση που ενισχύεται από την χαμηλή ομολογία που παρουσιάζει με τις υπόλοιπες που συναντώνται στα θηλαστικά. Πιθανότατα, μετά από ένα γεγονός διπλασιασμού έδωσε δύο ομάδες ενζύμων, τις ενδοκυτταρικές GPX1 και GPX2 και παράλληλα τις εκκρινόμενες GPX3, GPX5 και GPX6.

```

M. musculus GPX1: -----MCAARLSAAAQS-----EYVAFSARPTGSEPVSLGSIKGVLLLENVVASLX : 47
M. musculus GPX2: -----MAYIAK-----SEYDLSAIGLDG-EKIDFNTERGRVLLLENVVASLX : 40
M. musculus GPX3: -----MARILRASCLLSLLLAGFVPPGRGQEKSKTDCHGCMSCFIYEYCALTDGEEYTPFKQYAGKYLLENVVASYX : 73
M. musculus GPX5: -----MVTFLRVFYLVPLLLASVYQVTPRPERKMKMDCYKDVKGTIYDYEALSUNGKEDTFPFKQYRKGVLLENVVAIYC : 73
M. musculus GPX6: -----MAQKLGWGSCLFSLFMAALAQETLNPQKSKVDCKNGVTCIVYEVGANTDGGGVNFOCYAGKYLLENVVASFC : 73
M. musculus GPX4: MSWGRLSRLKPALLCGALAAPGLAGTMCAS-----RDDWRCARSMHEFSARDHGG-HMVCLDKYRGTFCVILLENVVAQX : 73
S. mansoni: -----MSSS-----HKSWN-----SIYEETVKDING-VDVSLERKRGCHVLLLENVVAEKC : 43
C. sinensis: -----MASQS-----KTSVHDFTVKDAKG-QDVDLSLYKGLLLENVVASQC : 41
L. esculentum: -----MATQTSNPQSVHDFTVKDAKG-KDVDLSLYKGLLLENVVASQC : 43
P. falciparum: ---MFFSMFIKIFILPISFICYNFGKFNMFYFQKIRVSEQLLSIYDYEVKDLISG-SNVSMSEKPKKVLLENVVAEKC : 76
C. reinhardii: -----MASPFVALAATDLAG-KEFFPFAQLQKGVLLLENVVASQC : 37
S. cerevisiae: -----MSEFVKLAPVDDKGG-QPPFPDQLKGVLLLENVVAEKC : 36
E. coli: -----MQDSLTLTVVKDIDG-EVTLERKAGNVLLENVVAEKC : 37
Synechocystis: -----MTAQANNIYIGFSANAIDG-SFVALRDEKGVLLLENVVASQC : 41

```

```

M. musculus GPX1: GPTIRDYEMNLIQKRLGPRGIVVILGFPCNOFGSQEENKNEEITNLSIKYVRPGGGEPNFILKPCVNGEKAHPLFFL : 127
M. musculus GPX2: GPTTRDYNOENELQCRF-PRRLVVLGFPCNOFGSQEENCONELILNSLYVRPGGGYQPTFSLPCQCDVNGENHEHYFFL : 119
M. musculus GPX3: GPTD-CMELNADQELGPFGLVILGFPCNOFGSQEENSGHSLPGLKYVRPGGGVFNPFLEKGGVNGEKEQKFFL : 152
M. musculus GPX5: GPTI-CYFELNADQEDLKPFGLVILGFPCNOFGSQEENGLNLLPGLKYVRPGGCFPLNPFILKAGGVNGENEQKFFL : 152
M. musculus GPX6: GPTA-TYFELNADQELKPFVIVILGFPCNOFGSQEENSGHSLPGLKYVRPGGGYVFNPFLEKGGVNGENEQKFFL : 152
M. musculus GPX4: GPTDVMITQVLDLHARYAECGLRILAFPCNOFGSQEENQELKE-----FAAG-YNVVFDMKSAIQVNGDDAHLWMM : 147
S. mansoni: GPTDKNYRQIQEMHTRLVGKGLRILAFPCNOFGSQEENWAEALIKK-----FVTERKYGQCFMSEKIKVNGSDADDYKFL : 118
C. sinensis: GPTNSNTEPSQLYDKYKQGLELILAFPCNOFGSQEENQELKE-----FACTRFKAEFFIIDVAVNGENAAPIYKHL : 116
L. esculentum: GPTNSNTEPSQLYDKYKQGLELILAFPCNOFGSQEENQELKE-----MVCTRFKAEFFIIDVAVNGENAAPIYKFL : 118
P. falciparum: GPTKNHVEQFNKLEKYNARGLELILAFPTSOFINQEPDNTKLICT-----FNEK-NKIKYMSPIVNGENHPLKFL : 150
C. reinhardii: GPTP-CYKGLORLYDKYKDEGLVILGFPCNOFGSQEENQESHAS-----ECQKNRGVTFEMAKIIVNGENHPLKFL : 111
S. cerevisiae: GPTP-CYKGLORLYDKYKDEGLVILGFPCNOFGSQEENQESHAS-----FCQLMVGVTFFIIMKIVNGENADDVYKFL : 110
E. coli: GPTP-CYKGLORLYDKYKDEGLVILGFPCNOFGSQEENQESHAS-----YCTTAVGVTFFIIMKIVNGENGRHPLKFL : 111
Synechocystis: GPTP-CYKGLORLYDKYKDEGLVILGFPCNOFGSQEENQESHAS-----FCETRFKAEFFIIDVAVNGENAAPIYKFL : 115

```

```

M. musculus GPX1: RNALPTSPDDPT-ALMTDPKYIIVSPVCRNDIWNNEFKFLVGPFGVFWRRYRRFRITIDIEPDIETLISQQSGNS---- : 201
M. musculus GPX2: KDKLPYYPDDPF-SLMTDPKLIIVSPVRRSDVWNNEFKFLVGPFGVFWRRYRRFRITIDIEPDIETLISQQSGNS---- : 190
M. musculus GPX3: KNSCPPTA-----ELLSGPRGLFWEPKMIHEIWNNEFKFLVGPFGVFWRRYRRFRITIDIEPDIETLISQQSGNS---- : 226
M. musculus GPX5: KRSCPHTS-----ETVVMKHTSWEPTKVNHEIWNNEFKFLVGPFGVFWRRYRRFRITIDIEPDIETLISQQSGNS---- : 221
M. musculus GPX6: KNSCPPTS-----ELFGSPEHLFWDPMKIHHEIWNNEFKFLVGPFGVFWRRYRRFRITIDIEPDIETLISQQSGNS---- : 221
M. musculus GPX4: KV-----QPKGRGMLGNALWNNFKFLVDPKNCVWRRYRPFMEEPQVHEKDLPCYI----- : 197
S. mansoni: KS-----RQHG--TLTNNIWNNEFKFLVDRQGPVWRRYRPTTAPYDEGDIMELEKK----- : 169
C. sinensis: KS-----SKGGLFG--DSIWNNEFKFLVDRKGNVVERYPPTSPLSHEKDIKKILETA----- : 167
L. esculentum: KS-----SKGGFFG--DGIWNNEFKFLVDRKGNVVERYPPTSPASVEKDIKKILGVA----- : 169
P. falciparum: KKNCD-----SMHDENGTLKSLWNNFKFLVDRKGNVVERYPPTSPASVEKDIKKILGVA----- : 205
C. reinhardii: KSEK-----KQLFMER--IWNNEFKFLVDRKGNVVERYPPTSPASVEKDIKKILGVA----- : 163
S. cerevisiae: KSKQ-----SGMLGLRGIWNNEFKFLVDRKGNVVERYPPTSPASVEKDIKKILGVA----- : 163
E. coli: ISAAPTAVAPEESGFYARMVSKGRAPLYPDEIWNNEFKFLVDRKGNVVERYPPTSPASVEKDIKKILGVA----- : 183
Synechocystis: TAASPG-----MAIPFLGAEELWNNFKFLVDRKGNVWRRYRGIAPDEIADIEKIL----- : 169

```

Εικόνα 4: Ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών GPX από διάφορους οργανισμούς.

Οι αλληλουχίες συγκρίνονται και ομοπαρατιθενται με τη βοήθεια του λογισμικού CLUSTALW (143). Οι αριθμοί πρόσβασης των βάσεων δεδομένων για τις αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: *C. reinhardii* (AB009083), *C. sinensis* (Q06652), *E. coli* (P06610), *L. esculentum* (Y14729), *Mus musculus* GPX1 (P11352), GPX2 (BC054848), GPX3 (U13705), GPX4 (O70325), GPX5 (P21765) και GPX6 (NP663426), *P. falciparum* (Z68200), *S. cerevisiae-1* (P30614), *Sch. mansoni* (Q00277), *Synechocystis* PCC 6803 (NP401201). Τα αμινοξικά κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας είναι σημασμένα με αστερίσκο. Τα κατάλοιπα που είναι κοινά για όλους τους οργανισμούς σημαίνονται με λευκά γράμματα και μαύρο φόντο, ενώ αυτά που είναι κοινά σε περισσότερους από επτά οργανισμούς παρουσιάζονται σε γκρι φόντο (38).

Παρόλο που στα θηλαστικά και σε άλλους οργανισμούς, όπως στο *E. coli*, η PHGPX υπάρχει σε ένα αντίγραφο μέσα στο γονιδίωμά τους, υπάρχουν πολλοί οργανισμοί που έχουν περισσότερα αντίγραφα στο απλοειδές τους γονιδίωμα. Για παράδειγμα, από τα φυτά *Arabidopsis thaliana* και *Populus trichocarpa* έχουν απομονωθεί επτά και έξι αντίγραφα PHGPX αντίστοιχα, όντας ο μοναδικός τύπος GPX που βρέθηκε σε αυτούς τους οργανισμούς (50). Η σύγκριση των αντιγράφων του *A. thaliana* δείχνει πως ο αριθμός των εξονίων είναι παρόμοιος (πέντε μέχρι επτά), η δομή εξονίων-ιντρονίων είναι συντηρημένη σε ορισμένα γονίδια και γειτονικά γονίδια παρουσιάζουν επίσης μεγάλο βαθμό συντήρησης (51). Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι τα GPX γονίδια στο *A. thaliana* προέκυψαν από φαινόμενα διπλασιασμού ενός μόνο γονιδίου PHGPX. Όλα τα παραπάνω συγκλίνουν στο συμπέρασμα πως οι PHGPX και οι NS-GPX (no SeCys GPX) αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα της οικογένειας των GPX, που πιθανότατα έχει κοινό πρόγονο την αυστηρώς συντηρημένη PHGPX των θηλαστικών, με διακριτά και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.

II.IV. Ενζυμική δραστηριότητα των PHGPX

Η δραστηριότητα των PHGPX διακρίνεται από αυτή των απλών GPX, καθώς οι τελευταίες παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια υποστρώματος με το H_2O_2 και διάφορα οργανικά υδροπεροξειδία και οι πρώτες με φωσφολιπιδικά και λιπιδικά υδροπεροξειδία (56). Οι PHGPX χρησιμοποιούν ηλεκτρόνια από δότες ηλεκτρονίων όπως η γλουταθειόνη και η θειορεδοξίνη για να μεταβολίσουν τα φωσφολιπιδικά υδροπεροξειδία με μεγάλη συγγένεια και το H_2O_2 με μικρότερη συγγένεια σε μόρια νερού (57, 58). Στο *Citrus sinensis*, μία μερικώς καθαρή, απομονωμένη GPX επέδειξε χαμηλή δραστηριότητα, σαν εκείνη που μετρήθηκε όταν σε μια GPX θηλαστικών η SeCys αντικαταστάθηκε από Cys (59). Δύο ανασυνδυασμένες φυτικές PHGPX από τομάτα και από ηλίανθο, που εκφράστηκαν σε *E. coli*, καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και έδειξαν το ίδιο χαμηλή δραστηριότητα με αυτή της GPX του *Citrus sinensis* (60).

Αυτές οι αλληλοσυμπληρούμενες προσεγγίσεις επιδεικνύουν την εν γένει χαμηλή δραστηριότητα των PHGPX των φυτών, ζυμών και άλγεων σε σχέση με αυτή

των θηλαστικών. Η έλλειψη όμως του καταλοίπου SeCys από το ενεργό κέντρο δεν φαίνεται να είναι ο μοναδικός λόγος για την αδυναμία των PHGPX να συμπεριφερθούν ως γνήσιες GPX. Οι Brigelius- Flohe et al. (49) υποστηρίζουν πως οι PHGPX μάλλον κατηγοριοποιήθηκαν λανθασμένα, αφού όλα τα κατάλοιπα αμινοξέων που είναι υπεύθυνα για τη δέσμευση γλουταθειόνης έχουν υποστεί μετάλλαξη ή λείπουν από αυτές.

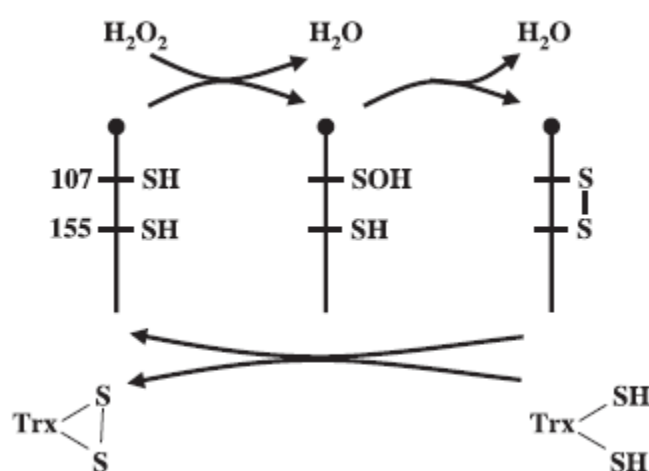
Η ενδεχόμενη εκμετάλλευση ενός άλλου δότη ηλεκτρονίων εκτός της γλουταθειόνης διερευνήθηκε σε μια σεληνιο-εξαρτώμενη GPX των θηλαστικών. Η ανθρώπινη GPX3, παρόλο που η συγκέντρωση της γλουταθειόνης στο πλάσμα όπου εκκρίνεται ($< 0.5 \mu\text{M}$), είναι εκτός των ορίων της φυσιολογικής λειτουργίας του ενζύμου, επιδεικνύει δραστικότητα, προφανώς χρησιμοποιώντας εξολοκλήρου κάποιον άλλο δότη ηλεκτρονίων (61). Αποτελεσματικοί τέτοιοι δότες αποδείχθηκαν για το συγκεκριμένο ένζυμο η θειορεδοξίνη και η γλουταρεδοξίνη (62).

Οι θειορεδοξίνες είναι μικρές και άφθονες μέσα στο κύτταρο πρωτεΐνες με χαρακτηριστικές, οξειδαναγωγικώς ενεργές ομάδες διθειολών/δισουλφιδίων στο ενεργό τους κέντρο. Η ανηγμένη θειορεδοξίνη δρα σε συνεργασία με την αναγωγή της θειορεδοξίνης και το NADPH ως ένα σύστημα μη ειδικής αναγωγής των πρωτεϊνικών δισουλφιδίων (63). Οι γλουταρεδοξίνες έχουν παρόμοια μορφή και λειτουργία με τις θειορεδοξίνες αλλά αποτελούν μια ξεχωριστή οικογένεια πρωτεϊνών καθώς δεν μοιράζονται καμία ομολογία αλληλουχιών και ανάγονται από την γλουταθειόνη (64). Μια PHGPX από τον *P. falciparum* ήταν η πρώτη GPX που αποδείχθηκε πως χρησιμοποιεί θειορεδοξίνη για να ανάγει H_2O_2 ή οργανικά υδροπεροξειδία (57). Το γεγονός αυτό οδήγησε στην αναθεώρηση της κατηγοριοποίησής της και ένταξής της στην ομάδα των υπεροξειδασών θειορεδοξίνης (Thioredoxin Peroxidase; TPx) μαζί με άλλες PHGPX φυτών, ζύμης και *Drosophila* που επίσης εκδηλώνουν ανάλογη δραστικότητα (57, 60, 65-69). Για αυτές τις πρωτεΐνες, η αυξημένη συγγένεια για την θειορεδοξίνη που μετρήθηκε, συνάδει με τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις θειορεδοξίνης στο *in vivo* περιβάλλον των ενζύμων.

Τα κατάλοιπα Cys που συμμετέχουν στο ενεργό κέντρο και διαμορφώνουν την ενζυμική δραστικότητα φαίνονται στην Εικόνα 5 (38). Οι Cys που σχηματίζουν

την καταλυτική τριάδα των GPX οξειδώνονται από μόρια H_2O_2 ή οργανικών υδροπεροξειδίων και αλληλεπιδρούν με το αυστηρά συντηρημένο μοτίβο PCNQF (70). Ο δισουλφιδικός δεσμός που προκύπτει ανάγεται από την θειορεδοξίνη. Προς ενίσχυση του μηχανισμού αυτού, αποδείχθηκε *in vivo* η αλληλεπίδραση μεταξύ ενδογενούς θειορεδοξίνης και NS-GPX μέσω των Cys στα φυτά. Επιπλέον, η οξειδαναγωγική κατάσταση της ζύμης φαίνεται να συνδέεται με την ενδογενή θειορεδοξίνη (67, 71, 72)

Οι PHGPX παρόλα αυτά δεν έχουν πάντα δράση υπεροξειδάσης θειορεδοξίνης και δεν χρησιμοποιούν πάντα ως δότη ηλεκτρονίων την θειορεδοξίνη. Χαρακτηριστι-



Εικόνα 5: Ο μηχανισμός δράσης των NS-GPX. Το H_2O_2 ανάγεται και η GPX αναγεννάται με την οξείδωση ενός μορίου θειορεδοξίνης στο μοντέλο του *Brassica napus* (AF411209; GenBank). Η θέση των καταλυτικών Cys δίνεται σύμφωνα με τους Jung et al. (70).

κό είναι το παράδειγμα της NS-GPX του *B. pahangi* (58) αλλά και μιας PHGPX του *S. cerevisiae* (73). Η τελευταία ανάγει μόρια H_2O_2 με τη βοήθεια ενός μεταγραφικού παράγοντα, του YAP1, ο οποίος λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων και οξειδώνεται, γεγονός που προκαλεί και την ενεργοποίησή του (74). Η καταλυτική αυτή δράση της PHGPX του *S. cerevisiae* παρουσιάζει όμως μεγαλύτερο ενδιαφέρον από άποψης διαφορετικών φυσιολογικών και λειτουργικών ρόλων που μπορεί να διαδραματίζουν αυτά τα ένζυμα (75).

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, εύκολα μπορεί να οδηγηθεί κανείς στο συμπέρασμα ότι η χρήση εναλλακτικών δοτών ηλεκτρονίων από τις PHGPX είναι ένα συχνό φαινόμενο και διαφοροποιείται από οργανισμό σε οργανισμό, ακόμα και ανάμεσα σε διαφορετικές ισομορφές του ίδιου οργανισμού. Η φυσιολογική συγκέντρωση των αναγωγικών παραγόντων που είναι διαθέσιμοι στα υποκυτταρικά οργανίδια και γενικά στο περιβάλλον όπου δραστηριοποιούνται οι ισομορφές των PHGPX, είναι αυτή που επιβάλλει την επιλογή. Για παράδειγμα, μια PHGPX στην τομάτα, η οποία εκφράζεται στον αποπλάστη και το κυόπλασμα, δεν δύναται να χρησιμοποιήσειθειορεδοξίνη και γλουταθειόνη στον αποπλάστη, καθώς αυτές δεν βρίσκονται σε αφθονία στον χώρο αυτό. Παρόλα αυτά, η ίδια ισομορφή του κυτταροπλάσματος έχει τη δυνατότητα να επιλέξει μεταξύ των δύο (76). Είναι εύλογο λοιπόν να υποστηρίζεται πως, τα ένζυμα των PHGPX, ενδέχεται να αναλαμβάνουν διαφορετικούς ρόλους μέσα στο κύτταρο, οι οποίοι μπορεί να έγκεινται στην διαμερισματοποίησή τους μέσα σε αυτό.

II.V. Ο ρόλος των PHGPX έναντι της αβιοτικής οξειδωτικής καταπόνησης

Οι PHGPX πιστεύεται πως εμπλέκονται στη διαδικασία προστασίας του κυττάρου έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης, μέσω δέσμευσης υπεροξειδίων, σε πληθώρα οργανισμών. Πολλές μελέτες αναφέρουν πως διάφορες καταστάσεις καταπόνησης τροποποιούν τα φυσιολογικά επίπεδα mRNA των κυττάρων που κωδικοποιούν για PHGPX σε φυτά όπως τον καπνό (53,77), το *Arabidopsis* (78), την τομάτα (76), τον ηλίανθο (60), το μπιζέλι (79), το κίτρο (59) και το κριθάρι (80). Μερικές από τις καταπονήσεις που αναφέρονται είναι η οσμωτική πίεση, ο μηχανικός ερεθισμός, ο τραυματισμός, η αλατότητα, έκθεση σε ζιζανιοκτόνα, έκθεση στο όζον, την ακτινοβολία UV, σε υψηλή θερμοκρασία και έντονο φως.

Ένα στέλεχος στρεπτόκοκκου που δεν εκφράζει μια PHGPX λόγω μετάλλαξης, παρουσιάζεται να είναι πιο ευαίσθητο σε σύγκριση με αγρίου τύπου στελέχη υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης (81). Διαγονιδιακά φυτά καπνού, στα οποία υπερεκφράζεται μια PHGPX από τον οργανισμό *Chlamydomonas*, έδειξαν να παρουσιάζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στο φυτοφάρμακο paraquat, έναν παράγοντα άμεσης πρόκλησης οξειδωτικής καταπόνησης στους χλωροπλάστες (82).

Στο *C. sinensis*, η έκφραση μιας PHGPX υπό συνθήκες αυξημένης αλατότητας, εξαρτάται από τη συσσώρευση EMO και η επαγωγή της ακολουθεί μια οξειδωτική καταπόνηση (59). Η έκφραση μιας PHGPX από τομάτα σε κύτταρα *S. cerevisiae* ανέστειλε τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από μεγάλες συγκεντρώσεις H₂O₂ (83).

Λαμβάνοντας υπόψη την διευρυμένη ομολογία και ομοιότητα των διαφόρων PHGPX με τις λιπόφιλες GPX4 των θηλαστικών, που είναι προσδεσμένες στις μεμβράνες, οι πρώτες έχει προταθεί ότι έχουν ενεργό ρόλο στην αναγωγή των οξειδωμένων λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώνεται από διάφορες μελέτες *in vitro* και συμπεριλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος υπεροξειδίων (84, 65, 85, 73, 66), αλλά η *in vivo* διαθεσιμότητα αυτών των υποστρωμάτων και η αναγωγή τους από τα συγκεκριμένα ένζυμα αμφισβητείται. Προσφάτως ελέγχθηκε η ικανότητα δυο PHGPX του *Synechocystis* να ανάγει λιπιδικά υδροπεροξειδία *in vivo* και δείχθηκε ότι απουσία τους παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση του υποστρώματος από αυτήν που καταγράφεται υπό φυσιολογικές συνθήκες (86). Αντιθέτως, σε κύτταρα θηλαστικών, μια PHGPX αποδείχθηκε απαραίτητη για την αποφυγή του κυτταρικού θανάτου μετά από μεταχείρισή τους με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (87).

Οι διαφορετικές ισομορφές των PHGPX πιθανότατα αναλαμβάνουν ξεχωριστούς ρόλους υπό συνθήκες καταπόνησης, καθώς η μεταγραφική τους ρύθμιση δεν ταυτίζεται. Στο *L. esculentum* παρατηρήθηκε πως το υψηλότερο επίπεδο μεταγράφων της GPX1e-1 ισομορφής σημειώνεται 1-2 ώρες μετά από μηχανικό ερεθισμό του μεσογονατίου και, αντιθέτως, το αντίστοιχο για την GPX1e-2 ισομορφή συμβαίνει 2-6 ώρες μετά το ερέθισμα (76). Μάλιστα, η GPX1e-2 αρχίζει να συσσωρεύεται όταν η συγκέντρωση των GPX1e-1 μεταγράφων επέστρεψε σε φυσιολογικά επίπεδα. Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο είναι ότι η GPX1e-1 συσσωρεύτηκε στις ρίζες των ερεθισμένων φυτών, ενώ η GPX1e-2 όχι, γεγονός που υπογραμμίζει τις διαφορές όσον αφορά στον βαθμό επαγωγής και την ενδεχόμενη ιστοειδικότητα μεταξύ των δύο ισομορφών. Στο φυτό *Helianthus annuus* παρατηρήθηκε πως οι δυο PHGPX επάγονται με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με το εξωτερικό ερέθισμα που προκαλεί καταπόνηση (88). Στο *Hordeum vulgare* η

έκφραση δυο ισομορφών επάγεται από την αλατότητα και την οσμωτική πίεση αλλά και από το ζιζανιοκτόνο Paraquat, ενώ αντίστοιχα η έκφραση μιας άλλης αναστέλλεται (80). Η διαφορετικότητα αυτή μπορεί ενδεχομένως να εξηγηθεί από τον υποκυτταρικό εντοπισμό των ισομορφών που δεν ταυτίζεται. Το ίδιο έδειξε και μια μελέτη στο φυτό *A. thaliana*, όπου τα γονίδια της οικογένειας των GPX ρυθμίζονται με διαφορετικό τρόπο, μέσω ξεχωριστών σηματοδοτικών μονοπατιών και οι πρωτεΐνες εντοπίζονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα (51). Στον *C. reinhardtii* παρατηρήθηκε μια εξειδικευμένη επαγωγή μιας PHGPX όταν αυξήθηκε η παραγωγή μονήρους O₂ από το φωτοσύστημα II, συνδέοντας το ένζυμο με τον ρόλο της απομάκρυνσης της συγκεκριμένης EMO τοπικά (89, 90).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, είναι προφανές ότι οι ισομορφές των PHGPX, εκτελούν διαφορετικές λειτουργίες, πράγμα που γίνεται ιδιαίτερα αισθητό υπό συνθήκες καταπόνησης και η εξειδίκευσή τους σχετίζεται άμεσα με τα ρυθμιστικά μονοπάτια που ελέγχουν την έκφρασή τους και από την χωροταξική τους κατανομή στους ιστούς του οργανισμού και εντός του κυττάρου. Όπως προκύπτει από τα στοιχεία, εμπλέκονται στην απόκριση σε καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης αλλά και υπό φυσιολογικές συνθήκες, ενδεχομένως λαμβάνοντας μέρος στο μηχανισμό που λειτουργεί ως διακόπτης ελέγχου της συγκέντρωσης των EMO.

II.VI. Ο ρόλος των PHGPX έναντι της βιοτικής οξειδωτικής καταπόνησης

Στα φυτά όσο και στα ζώα, η παραγωγή και απελευθέρωση EMO από τα κύτταρα αποτελούν κύρια γραμμή άμυνας εναντίων παθογόνων μικροοργανισμών που επιχειρούν να εισβάλουν στον οργανισμό. Μια από τις πρώτες αντιδράσεις των ξενιστών ενάντια στην εισβολή μικροοργανισμών είναι η απελευθέρωση EMO και η εξάπλωση ενός οξειδωτικού κύματος που προκαλεί τοπικά κυτταρικό θάνατο. Τα παθογόνα έχουν αναπτύξει αποτελεσματικά συστήματα αντιμετώπισης του οξειδωτικού αυτού κύματος (91). Για παράδειγμα, μεταλλάγματα βακτηρίων που υστερούν στην αντιμετώπιση οξειδωτικής καταπόνησης έχει δείχτει ότι καθίστανται μη μολυσματικά (92). Πιο συγκεκριμένα, μεταλλάγματα *Neisseria meningitidis* και

Streptococcus pyogenes για την PHGPX βρέθηκαν να είναι πιο ευαίσθητα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου στελέχη, υπογραμμίζοντας τον σημαντικό ρόλο που παίζει το ένζυμο στο αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού (81).

Παράλληλα, μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί η αντίστοιχη συμπεριφορά των ξενιστών έναντι μικροοργανισμών, καθώς και ο ρόλος των PHGPX. Σκοπός είναι να αποφευχθεί και να αναχαιτιστεί η περαιτέρω εξάπλωση της μόλυνσης και ο θάνατος των μικροοργανισμών που στερούνται πηγές θρεπτικών, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό ως αντίδραση υπερευαισθησίας. Στο φυτό *H. annuus* έχει δειχθεί πως δύο PHGPX ρυθμίζονται διαφορετικά σε φύλλα που μολύνονται με μολυσματικά και διαφορετικά με μη μολυσματικά στελέχη του παρασίτου *Plasmopara halstedii*. Και οι δύο μορφές επάχθηκαν κατά την επαφή με τον μολυσματικό παράγοντα ενώ η έκφρασή τους μειώθηκε κατά την επαφή του με το μη μολυσματικό στέλεχος, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η έκφρασή τους παίζει σημαντικό ρόλο για την εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας που χρησιμοποιείται στην περίπτωση του μολυσματικού στελέχους (88). Η μείωση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών γονιδίων ευνοεί την συσσώρευση ΕΜΟ τοπικά, ένα φαινόμενο αναγκαίο για την εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Συγκεκριμένα, η μείωση των επιπέδων της PHGPX επιτρέπει την άθροιση λιπιδικών υπεροξειδίων, προερχόμενων από την δραστικότητα της λιποξυγενάσης, ενός ενζύμου που ενισχύεται υπό τέτοιες συνθήκες (93).

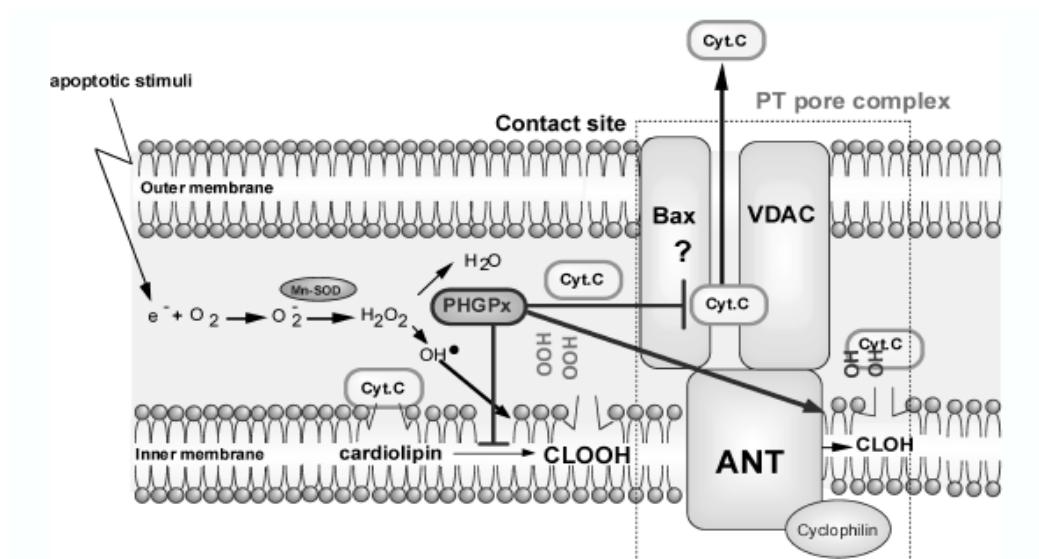
Αντιθέτως, η αύξηση των επιπέδων της PHGPX βοηθά στην αντιμετώπιση της οξειδωτικής βλάβης που προκαλείται από την πρόοδο της ασθένειας. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι φυτά καπνού που υπερεκφράζουν μια PHGPX δεν νοσούν μετά από μόλυνση με τον μύκητα *Botrytis cinerea*, παρόλο που εκδηλώνεται τοπική οξειδωτική καταπόνηση, καθώς ο μύκητας αυτός τρέφεται μόνο με νεκρό φυτικό ιστό (94). Υπό φυσιολογικές συνθήκες το οξειδωτικό κύμα θα νέκρωνε τα κύτταρα μέσω της οξείδωσης λιπιδίων και άλλων μακρομορίων, αλλά τα υψηλά επίπεδα PHGPX δεν επιτρέπουν την εκδήλωση παρατεταμένων βλαβών τέτοιου είδους. Άρα οι PHGPX φαίνεται να παίζουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις φυτών-μικροβίων, αν και περαιτέρω μελέτες είναι αναγκαίες για

την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών που βρίσκονται πίσω από τη ρύθμιση των επιπέδων τους κατά περίπτωση και τα σήματα που ελέγχουν την διαφορετική τους συμπεριφορά.

II.VII. Ο ρόλος των PHGPX στη μεταγωγή σήματος

Οι ΕΜΟ και τα υπεροξειδία, εκτός από τοξικά, θεωρούνται και μόρια κλειδιά για τη μεταγωγή σήματος σε διάφορα μονοπάτια που ελέγχουν πολλαπλές φυσιολογικές διαδικασίες. Η εμπλοκή των PHGPX, καθώς και όλων των άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων σε αυτά τα μονοπάτια έγκειται στην ρύθμιση της συσσώρευσης των μορίων αυτών στα κύτταρα. Για παράδειγμα, οι GPX4 των θηλαστικών έχει δειχθεί ότι ελέγχουν την παραγωγή των λευκοτριενίων (95) και των προσταγλαδινών (96), ουσίες που αποτελούν διαμεσολαβητές της εκδήλωσης φλεγμονών, αλλά και αναστέλλουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ από την ιντερλευκίνη-1 (97). Ακόμα ένα παράδειγμα είναι αυτό της αντιαποπτωτικής δράσης των GPX4 στο μιτοχονδριακό μονοπάτι κυτταρικού θανάτου (98), μέσω της αναστολής της δραστηριότητας της λιποξυγενάσης (99, 100) και την παρεμπόδιση της εξόδου του κυτοχρώματος Cyt C από τα μιτοχόνδρια (98), όπως φαίνεται στην Εικόνα 6. Ανάλογες λειτουργίες αναμένονται και για τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας των PHGPX σε άλλους οργανισμούς.

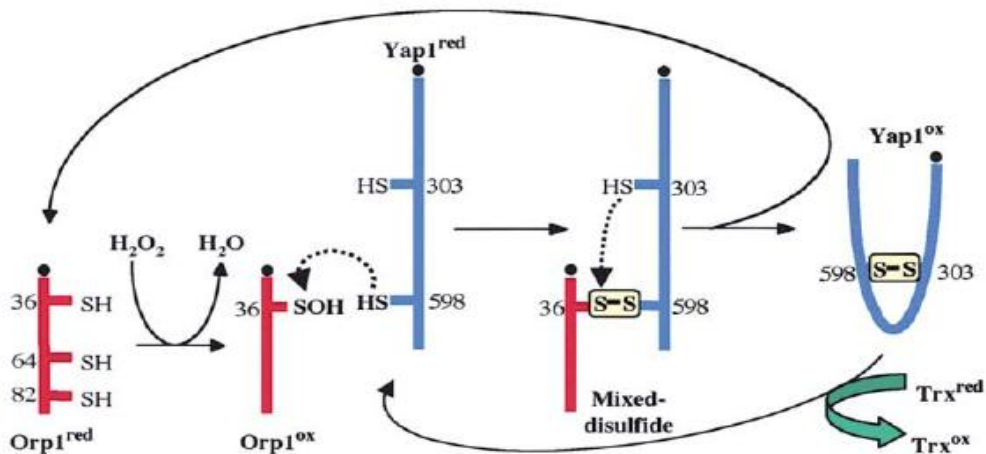
Μια από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες δράσεις σηματοδότησης των PHGPX είναι αυτή της GPX3 ή αλλιώς Orp1 του *S. cerevisiae* (74), ενός ενζύμου που αντιλαμβάνεται τη συγκέντρωση του H₂O₂ στο κύτταρο και ταυτόχρονα μετρέπει το σήμα έχοντας ως αποδέκτη τον μεταγραφικό παράγοντα YAP1 (Εικόνα 7). Μια από τις κυστεΐνες που περιέχονται στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου, εκτός από την συμμετοχή της στο ενεργό κέντρο, είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση της Orp1 με την YAP1. Υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης, δηλαδή αυξημένης συγκέντρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου, οξειδώνεται το άτομο θείου της εν λόγω



Εικόνα 6: Ο αντιαποπτωτικός ρόλος της PHGPx των θηλαστικών στα μιτοχόνδρια. Το σήμα της απόπτωσης προκαλεί παραγωγή EMO στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου με αποτέλεσμα την οξείδωση των καρδιολιπινών (cardiolipins) της εσωτερικής μεμβράνης του οργανιδίου. Οι ανηγμένες cardiolipins δεσμεύουν μόρια Cyt C τα οποία όταν αποδεσμεύονται, εξέρχονται του μιτοχονδρίου μέσω του Permeability Transition (PT) pore complex και οδηγούν σε απόπτωση. Η PHGPx δρα σε τουλάχιστο δύο επίπεδα, πρώτα εξουδετερώνοντας τις EMO πριν οξειδώσουν τις cardiolipins και δευτερευόντως ανάγοντας τα ήδη οξειδωμένα λιπίδια. Η πιθανή αλληλεπίδραση της PHGPx με την πρωτεΐνη Bax του πόρου με στόχο την απόφραξή του και την παρεμπόδιση με αυτόν τον τρόπο της εξόδου από το μιτοχόνδριο των Cyt C μορίων είναι υπό διερεύνηση (98).

κυστεΐνης της ενζυματικής περιοχής και σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς με μια ανηγμένη κυστεΐνη της YAP1. Η αλληλεπίδραση *in vivo* έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευσή του μεταγραφικού παράγοντα στον πυρήνα (74) και την προώθηση της μεταγραφής αμυντικών και αντιοξειδωτικών γονιδίων (101). Η αναγωγή του YAP1 από τη θειορεδοξίνη οδηγεί, αντιθέτως, στην απενεργοποίησή του μέσω κυτταρικής απομόνωσης.

Αυτή η ρυθμιστική λειτουργία του ενζύμου έχει δείχθει ότι εξαρτάται από την χαρακτηριστική του δομή PHGPx και ιδιαίτερα λόγω της απουσίας περιοχών που το καθιστούν μονομερές και όχι πολυμερές σαν τις άλλες GPx δίνοντας έτσι τη δυνατότητα στην πρωτεΐνη να αλληλεπιδράσει με άλλες (75). Συμπληρωματικά στην



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της Orp1 (GPX3 του *S. cerevisiae*) με τον μεταγραφικό παράγοντα YAP1. Η Orp1 διαθέτει, όπως όλες οι RHGPX πρωτεΐνες, τρία κατάλοιπα Cys στις θέσεις 36, 64 και 82. Αντίστοιχα ο μεταγραφικός παράγοντας YAP1 περιέχει στην αλληλουχία του δύο κατάλοιπα Cys στις θέσεις 303 και 598. Μετά από αλληλεπίδραση με ένα μόριο H₂O₂ το άτομο θείου (S) της Cys36 της Orp1 οξειδώνεται σε SOH και σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με την ανηγμένη Cys598 του YAP1. Η ανηγμένη Cys303 του YAP1 επιτίθεται στον δεσμό σχηματίζοντας δισουλφιδικό δεσμό με την Cys598 καθιστώντας τον YAP1 ενεργό και συσσωρεύοντάς τον στον πυρήνα του κυττάρου. Η αναγωγή του YAP1 ώστε να επανέρθει στην ανενεργή κατάσταση γίνεται μέσω του δότη ηλεκτρονίων θειορεδοξίνη (Trx) (74).

ίδια μελέτη διερευνήθηκε και ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου. Η κυστεΐνη που βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την κυστεΐνη του μεταγραφικού παράγοντα αντικαταστάθηκε με μη πολικό αμινοξύ. Εκτός από την από την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον μεταγραφικό παράγοντα, ανεστάλη πλήρως και η δραστηριότητα του ενζύμου. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του YAP1 δεν συνδέεται με την απλή υδροπεροξειδάση φωσφολιπιδίων, αλλά η Orp1 σχηματίζει *in vivo* δισουλφιδικούς δεσμούς με μια αναγωγάση σουλφοξειδίου μεθειονίνης. Αυτή η αλληλεπίδραση προκαλεί τον περιορισμό της δραστηριότητας της αναγωγάσης, η οποία όμως ανακτάται μετά από μεταχείριση με H₂O₂ αφού η Orp1 λειτουργεί ως οξειδαναγωγικός αισθητήρας (74). Το ένζυμο, λοιπόν, υπηρετεί δύο ρόλους μέσα στο κύτταρο, το προστατεύει από την οξείδωση των μεμβρανών και συμμετέχει στην σηματοδότηση έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης.

Εικόνα 8: Ο ρόλος της AtGPX3 στο μονοπάτι ελέγχου κλεισίματος των στομάτων στα φύλλα που σηματοδοτείται από το ABA. Η AtGPX3 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες ABI1 και ABI2, δύο φωσφατάσες 2C-τύπου (PP2C), και μεταβάλλει την ενεργότητά τους. Οι πρωτεΐνες αυτές εμποδίζουν την πορεία σηματοδότησης του κλεισίματος των στομάτων από την ορμόνη ABA σε δύο σημεία. Αναστολή της ενεργότητάς τους σημαίνει πρακτικά διευρυμένο και επείγον κλείσιμο των στομάτων ανάλογα με την ένταση του αρχικού σήματος (102).

Μια ανάλογη των PHGPX πρωτεΐνη από το έντομο *Venturia canescens* βρέθηκε πως στερείται του κατάλοιπου Cys ή SeCys στο ενεργό κέντρο (106), ενώ διατηρεί όλες τις άλλες συντηρημένες χαρακτηριστικές περιοχές των GPX πρωτεϊνών καθώς σημειώνει αυξημένη ομολογία με την αντίστοιχη PHGPX της *Drosophila melanogaster*. Αυτή η εξωκυτταρική PHGPX δεν είναι ενεργή ως φωσφολιπιδική υδροπεροξειδάση όπως οι ομόλογές της στους άλλους οργανισμούς. Παρόλα αυτά, διατηρεί την ικανότητα να αλληλεπιδρά με λιπίδια της μεμβράνης. Δεδομένων των υψηλών επιπέδων έκφρασής της, το ένζυμο μάλλον προσδέεται σε οξειδωμένα φωσφολιπίδια της μεμβράνης καλύπτοντάς τα και αναστέλλοντας τη δυνατότητά τους να πυροδοτήσουν αμυντικούς μηχανισμούς. Οι PHGPX και οι περισσότερες GPX που δεν περιέχουν SeCys είναι λοιπόν σε θέση να εκδηλώνουν και άλλες δράσεις εκτός της ενζυμικής άμυνας έναντι των ΕΜΟ. Σε φυτά τομάτας που υπερεκφράζουν μια PHGPX έγινε ανάλυση του συνόλου των γονιδίων που εκφράζονται σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου (107). Βρέθηκε να επηρεάζονται σε μεταγραφικό επίπεδο η συσσώρευση δυο πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κύκλο του Calvin και η σηματοδοτική πρωτεΐνη RanBP1, γεγονός που σημαίνει πως ίσως η τελευταία να εμπλέκεται στη φωτοσύνθεση και σηματοδοτικά μονοπάτια που διαμεσολαβούνται από GTPάσες. Επιπροσθέτως, όταν τα ίδια φυτά εκτίθενται σε χαμηλές θερμοκρασίες, οι ρυθμοί της φωτοσυνθετικής τους ικανότητας αυξάνονται λόγω της ενεργοποίησης των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτή. Το ίδιο παρατηρήθηκε σε φυτά καπνού που υπερεκφράζουν μια PHGPX από μια *Chlamydomonas* (82).

III. Το H₂O₂ ως σηματοδοτικό μόριο

III.I. Γενικά

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος όσον αφορά στην οριοθέτηση των ΕΜΟ ως σηματοδοτικά μόρια σε μια πληθώρα βιολογικών διαδικασιών στα φυτά. Το μικρό τους μέγεθος και η δυνατότητά τους να διαχέονται σε μικρές αποστάσεις τα καθιστά ιδανικά για να αναλάβουν αυτό το ρόλο (108). Οι ΕΜΟ επηρεάζουν την έκφραση πολλών γονιδίων, τροποποιώντας τη δραστηριότητα ορισμένων μεταγραφικών παραγόντων. Επιπλέον, οι ΕΜΟ, καθώς και προϊόντα οξείδωσης από ΕΜΟ, συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια, συνεπώς τα κύτταρα εκμεταλλεύονται την ελεγχόμενη παραγωγή τους για να ελέγξουν φυσιολογικές διεργασίες (109). Για παράδειγμα, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ένας συνήθης στόχος των ΕΜΟ και τα προϊόντα αυτής της οξείδωσης, ως βιολογικώς ενεργά μόρια, διαφοροποιούν την έκφραση κάποιων γονιδίων (110). Ένας άλλος πολύ σημαντικός τρόπος δράσης των ΕΜΟ είναι οι αλλαγές που προκαλούν στην οξειδαναγωγική κατάσταση του κυττάρου. Αυτές οι, έστω και ανεπαίσθητες, αλλαγές, για παράδειγμα στον χλωροπλάστη, μπορούν να επηρεάσουν ισχυρά τη δραστηριότητα των οργανιδιακών ενζύμων και την έκφραση γονιδίων (111).

Από τις κυριότερες μορφές ΕΜΟ, το H₂O₂ είναι το πιο σταθερό μόριο, έχει το μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής και μπορεί να διασχίζει φυτικές κυτταρικές μεμβράνες. Για αυτό το λόγο είναι και αυτό που μπορεί να λειτουργήσει άμεσα και ως διακυτταρικό σήμα (112). Έτσι, το H₂O₂ που παράγεται σε ένα κύτταρο μπορεί να επηρεάσει την έκφραση ορισμένων γονιδίων του ίδιου αλλά και των παρακείμενων σε αυτό κυττάρων καθώς και να ενεργοποιήσει αμυντικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (programmed cell death, PCD) (113). Αυτό προϋποθέτει πως υπάρχουν συστήματα ανίχνευσης μέσα στα κύτταρα, που μπορούν να μεταφράσουν αυτή την πληροφορία σε αντίστοιχες βιολογικές αποκρίσεις.

III.II. H₂O₂ και μεταγωγή σήματος

Κατά τη διάρκεια επίθεσης από παθογόνους οργανισμούς, το φυτό στιγμιαία παράγει περισσότερες EMO, ενόσω οι δεσμευτικές ικανότητές του έναντι τους είναι μειωμένες. Για το λόγο αυτό παρατηρείται ένα οξειδωτικό κύμα, συνιστώμενο από μια συσσώρευση H₂O₂, η οποία τελικά οδηγεί σε PCD. Ο περιορισμός του μηχανισμού δέσμευσης και αποτοξίνωσης από το H₂O₂ είναι κρίσιμος για την ενεργοποίηση του PCD και για παράδειγμα μόνη της η παραγωγή H₂O₂ στον αποπλάστη, χωρίς την απενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού δεν έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση του PCD (114, 115). Στην παραγωγή EMO μετά από αλληλεπίδραση με παθογόνους οργανισμούς συμβάλλουν υπεροξειδάσες του κυτταρικού τοιχώματος και οξειδάσες αμινών του αποπλαστικού χώρου, κυρίως όμως NADPH οξειδάσες (17, 116). Ταυτόχρονα, η δραστηριότητα των ενζύμων APX και CAT μειώνεται από το σαλυκυλικό οξύ (Salicylic acid, SA) και το μονοξείδιο του αζώτου (Nitric oxide, NO) (117).

Για την *de novo* μεταγραφή και μετάφραση γονιδίων που προκαλούν τον PCD, είναι απαραίτητο ένα ελάχιστο χρονικό διάστημα έκθεσης των κυττάρων στο H₂O₂ (118, 119). Το φαινόμενο είναι δόσοεξαρτώμενο αλλά εξαρτάται παράλληλα και από τον χρόνο έκθεσης στον παράγοντα καταπόνησης και τη διάρκεια της έκθεσης. Φαρμακολογικές προσεγγίσεις έδειξαν πως η απομάκρυνση των EMO κατά την επίθεση από παθογόνους οργανισμούς μειώνει τα ποσοστά PCD (120). Το πρώτο οξειδωτικό κύμα σε φύλλα *Arabidopsis* μετά από επαφή με παθογόνο οργανισμό βρέθηκε ότι προωθεί την εκδήλωση ενός δεύτερου οξειδωτικού κύματος ακόμα και σε απομακρυσμένα μέρη του φυτού, γεγονός που οδηγεί σε διασυστηματική ανοσοποίηση μέσω της έκφρασης γονιδίων (121). Σε καταστάσεις υψηλής ακτινοβολίας που προσομοιώνουν την οξειδωτική καταπόνηση από παθογόνους οργανισμούς, επιτυγχάνεται αυξημένη παραγωγή H₂O₂ που επάγει το PCD. Παρόλα αυτά, βραχεία έκθεση σε υψηλή ακτινοβολία (1-2 ώρες) πριν την τελική έκθεση φαίνεται να δημιουργεί ένα καθεστώς προσαρμογής του φυτού στην καταπόνηση και τελικά το προστατεύει (122). Αυτά τα στοιχεία ενισχύουν την άποψη ότι το H₂O₂ μπορεί να παίρνει ωφέλιμους ή καταστροφικούς ρόλους στο κύτταρο.

Το κλείσιμο των στομάτων στα φύλλα, μια διαδικασία που είναι άμεσα επαγόμενη από την ορμόνη ABA, φαίνεται, μετά από πρόσφατες μελέτες, να εξαρτάται και από την συμβολή των EMO (Εικόνα 8) (108). Η αντίδραση αυτή είναι πολύ σημαντική στην αντιμετώπιση της ξηρασίας, καθώς δεν επιτρέπει την απώλεια νερού και αυξάνει τα ποσοστά επιβίωσης του φυτού. Το H₂O₂ είναι ένας ενδογενής παράγοντας που συμμετέχει ενεργά στο σηματοδοτικό μονοπάτι αυτό και προάγει το κλείσιμο των στομάτων μεσολαβώντας στην ενεργοποίηση των καναλιών ασβεστίου. Η απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου οδηγεί στο κλείσιμο των στομάτων στα φύλλα. Διάφορα μεταλλάγματα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι, όπως της ABI1, της ABI2 και της OST1 (Open Stomata 1) αδυνατούν να παράγουν EMO και ειδικότερα H₂O₂ με συνέπεια να αποτυγχάνουν να κλείσουν τα στόματα, η χορήγηση όμως εξωγενούς H₂O₂ αποκαθιστά την ανωμαλία (123). Συμπερασματικά, το H₂O₂ είναι ένα μόριο κλειδί του οποίου η εμπλοκή στα σηματοδοτικά μονοπάτια φυσιολογικών διεργασιών αποκτά σταδιακά κρίσιμη σημασία.

IV. Μονοξείδιο του αζώτου (Nitric oxide, NO)

IV.I. Γενικά

Το μονοξείδιο του αζώτου είναι ένα μικρό, απλό και τοξικό αέριο μόριο, που εμπλέκεται σε ένα ευρύ δίκτυο οξειδαναγωγικών μορφών χημικής διαδραστικότητας. Η διελεύκανση των βιολογικών του ρόλων πραγματοποιήθηκε την δεκαετία του '80 και ανακηρύχθηκε «Μόριο της χρονιάς» το 1992 από το περιοδικό Science, ενώ παράλληλα ιδρύθηκαν η «Εταιρία Μονοξειδίου του Αζώτου» και ένα περιοδικό, αφιερωμένο εξολοκλήρου στη μελέτη αυτού του μορίου (124). Η μεγαλύτερη πηγή έκλυσης NO στην ατμόσφαιρα είναι οι μηχανές εσωτερικής καύσης και οι σταθμοί παραγωγής ενέργειας. Μια ισχνότερη πηγή, όμως, είναι και τα φυτά υπό συνθήκες καταπόνησης που προκαλούνται από ζιζανιοκτόνα, προσβολή από παθογόνα, αλλά και υπό φυσιολογικές συνθήκες (125). Το NO, ως διαμεσολαβητής φυσιολογικών διαδικασιών, παίζει συχνά ευεργετικό ρόλο, όπως για παράδειγμα, το να μεταγάγει το σήμα σε ανοσολογικές αντιδράσεις.

Μπορεί, παρόλα ταύτα, να αποδειχθεί εξαιρετικά τοξικό υπό συγκεκριμένες και πολύπλοκες συνθήκες που περιλαμβάνουν το ρυθμό παραγωγής του και διάχυσής του, καθώς και την οξειδαναγωγική κατάσταση μέσα στα κύτταρα (126).

Το NO εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες στα φυτά. Προωθεί την εκβλάστηση, την επιμήκυνση του φύλλου και της ρίζας και συνάμα καθυστερεί τη γήρανση των φύλλων και την ωρίμανση των καρπών (127). Επίσης παίζει ρόλο στην άμυνα του φυτού, καθώς έχει την ικανότητα να πυροδοτεί τον κυτταρικό θάνατο κατά την αντίδραση υπερευαισθησίας και να ενεργοποιεί την έκφραση αρκετών αμυντικών γονιδίων (128). Παράλληλα, σε πρωτεϊνικό επίπεδο, το NO και παράγωγά του αλληλεπιδρούν με θειϊκά κατάλοιπα πρωτεϊνών και τα νιτροσυλιώνουν (S-nitrosylation) ή νιτρώνουν κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr-nitration), προκαλώντας διαφοροποιήσεις στη λειτουργία τους (129). Αυτή η πληθώρα δράσεων αντανακλά τους βασικούς μηχανισμούς σηματοδότησης, οι οποίοι χρησιμοποιούνται σχεδόν από όλους τους οργανισμούς. Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στον τομέα της κατανόησης του λειτουργικού ρόλου του NO στις φυτικές αποκρίσεις έναντι βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης και την αναπτυξιακή βιολογία των φυτικών οργανισμών. Έχουν διερευνηθεί σε βάθος οι μηχανισμοί με τους οποίους τα φυτά ρυθμίζουν την ενεργότητα του NO και γίνονται προσπάθειες να διαλευκανθεί ο τρόπος με τον οποίο μεταγάγει σήματα προκαλώντας κυτταρικές αποκρίσεις.

IV.II. Παραγωγή και ανακύκλωση NO

Στα θηλαστικά είναι γνωστό πως το NO παράγεται μέσω της μετατροπής της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη με τη βοήθεια της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO synthase, NOS). Η αντίστοιχη οδός έχει δειχθεί πως πιθανότατα ακολουθείται και στα φυτά (130). Στα φυτά μέχρι τώρα είναι γνωστό ότι το NO παράγεται μέσω της μη ενζυμικής αναγωγής του αποπλαστικού νιτρώδους άλατος (nitrite) υπό όξινες συνθήκες και ενζυμικά από την αναγωγή του νιτρικού άλατος (nitrate reductase, NR) (131). Υπό διερεύνηση είναι η παραγωγή του NO μέσω της οξειδάσης των πολυαμινών (14).

Τα θηλαστικά ρυθμίζουν την ενεργότητα και τη διαθεσιμότητα του NO μέσω αιμογλοβινών είτε με αποτοξίνωση ή με αποδέσμευση μέσω αντιδράσεων *trans*-νιτροσουλίνωσης (132). Ελέγχουν τα εσωτερικά επίπεδα NO σε στενά όρια μέσω ρύθμισης της ενεργότητας των διαφόρων ισομορφών NOS. Τα φυτά έχουν να αντιμετωπίσουν το ατμοσφαιρικό NO το οποίο αυξάνεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης λόγω της παραγωγής του από νιτρώδη (133). Για το λόγο αυτό, τα φυτά πρέπει να εμποδίσουν την παρέμβαση του ενδογενούς ή του ατμοσφαιρικού NO ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς αποτοξίνωσής του. Διάφορες μελέτες έχουν ασχοληθεί με την σχέση μεταξύ φυτικών αιμογλοβινών και μεταφοράς του οξυγόνου. Οι αιμογλοβίνες παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια για το οξυγόνο και αργές ταχύτητες αποδέσμευσης του οξυγόνου, οπότε δεν είναι κατάλληλες για να δράσουν ως μεταφορείς οξυγόνου (134). Ωστόσο, πολλές φυτικές αιμογλοβίνες διεγείρονται κατά την διάρκεια της υποξίας, μια κατάσταση καταπόνησης όπου παράγονται σημαντικές ποσότητες NO (135) και η έκφρασή τους είναι άμεσα συνδεδεμένη με την προστασία έναντι της υποξίας (136, 137). Οι αιμογλοβίνες του *A. thaliana* (136), του κριθαριού (138) και του τριφυλλίου (139) είναι γνωστές ότι μετατρέπουν το NO σε νιτρώδη με τρόπο που εξαρτάται από το NAD(P)H. Το ενδιάμεσο της μεθαιμογλοβίνης μπορεί κατόπιν να αναχθεί από το NADPH, όπως στην *A. thaliana*, ή από της αναγωγή της μεθαιμογλοβίνης, όπως έχει διαπιστωθεί στο τριφύλλι.

Αν και η οξειδωση του NO σε νιτρώδη από την αιμογλοβίνη είναι, πιθανώς, ο κύριος μεταβολικός δρόμος για το NO, άλλα ένζυμα όπως η οξειδάση της ξανθίνης, η GPX και η αναγωγή του GSNO διασπούν τα διάφορα είδη NO (140-142). Ωστόσο ο φυσιολογικός ρόλος των ενζύμων αυτών στο μεταβολισμό του NO δεν έχει πλήρως διασαφηνιστεί, όπως επίσης, δεν έχουν ταυτοποιηθεί ένζυμα τα οποία οξειδώνουν το NO *in vivo* ή άλλα που να επάγονται από καταπόνηση παραγώγων αζώτου (nitrosative stress). Τέλος, έχει δειχθεί πως το NO αλληλεπιδρά με ορισμένες EMO προς τον σχηματισμό νέων δραστικών ενώσεων με διαφορετικό ρόλο από αυτόν του NO, τις RNS (Reactive Nitrogen Species), που έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της συγκέντρωσης του NO. Η οξειδωση του NO από την O_2^- προς την δημιουργία περοξυνιτρώδους ($ONOO^-$) είναι ένα χαρακτηριστικό

παράδειγμα. Είναι φανερό πως, λόγω της φύσης του NO και του κρίσιμου ρόλου που παίζει σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες, η ρύθμιση της συγκέντρωσής του εντός του κυττάρου είναι κρίσιμη για την εύρυθμη λειτουργία του υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και υπό συνθήκες καταπόνησης.

IV.III. Ο ρόλος του NO σε φυσιολογικές διεργασίες των φυτικών κυττάρων

Η ύπαρξη πολλαπλών μηχανισμών δράσης του NO κάνει τη διαλεύκανση συγκεκριμένων σηματοδοτικών καταρρακτών αρκετά δύσκολη, αλλά μπορεί να εξηγήσει την ατελή αναστολή που παρατηρείται όταν διακόπτονται συγκεκριμένα βήματα των NO-μονοπατιών (143). Είναι πάντως κοινά παραδεκτό πως το NO, όπως και οι EMO αντίστοιχα, δεν σχετίζονται μόνο με καταστάσεις καταπόνησης και δεν αποτελούν εξολοκλήρου βλαβερά μόρια. Αντιθέτως, πληθαίνουν οι αναφορές στις ευεργετικές δράσεις του μορίου σε φυσιολογικές διεργασίες των φυτικών που δεν συνδέονται με την άμυνα του φυτού.

Πρόσφατες μελέτες πιστοποιούν ότι το NO διακόπτει το λήθαργο και διεγείρει την εκβλάστηση των σπόρων σε πολλά είδη (144, 145). Επιπρόσθετα, η ανάλυση με παραμαγνητικό συντονισμό ηλεκτρονίων (electron paramagnetic resonance; EPR) αποκάλυψε ότι το ενδογενές NO συσσωρεύεται σε εκβλαστημένους σπόρους σόργου (146). Οι ενεργότητες τόσο της NR όσο και της NOS φαίνεται ότι απαιτούνται για την αύξηση της συγκέντρωσης του NO κατά τη διάρκεια της εβλάστησης, αν και η παραγωγή NO με μη ενζυμική αναγωγή των νιτρωδών του αποπλάστη κάτω από όξινες συνθήκες είναι επίσης πιθανή (147). Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης του NO κατά τη διάρκεια της εκβλάστησης στηρίζεται στην ενεργοποίηση της β-αμυλάσης, η οποία εμπλέκεται στα πρώτα στάδια της διαδικασίας, τα οποία διεγείρονται από το NO σε διάφορα είδη (138). Ωστόσο, μπορεί να ανακαλυφθούν άλλοι μηχανισμοί που στηρίζονται στη διαμόρφωση της ενεργότητας ρυθμιστικών πρωτεϊνών και βιοσυνθετικών ενζύμων από το NO, ενδεχομένως μέσω νίτρωσης/νιτροσυλίσωσης και S- νιτροσυλίσωσης.

Άλλες μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι το NO είναι ένα «πολυσχιδές» μόριο το οποίο επηρεάζει τα φυτά καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους, ρυθμίζοντας πολλές αυξητικές και αναπτυξιακές διεργασίες. Για παράδειγμα, στις ρίζες δρα στο

σηματοδοτικό μονοπάτι της αυξίνης μέσω cGMP-εξαρτώμενων και μη μηχανισμών, οι τελευταίοι των οποίων περιλαμβάνουν ενεργοποίηση του καταρράκτη των MAP κινασών (148, 149). Στον αγγειακό ιστό, το NO ρυθμίζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και τη λιγνιτοποίηση κατά την ξυλογένεση: συσσωρεύεται στην αρχή των διαδικασιών του σχηματισμού του ξυλώματος και είναι απαραίτητο για το σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος και τη λύση του (150). Η μείωση του ενδογενούς NO προάγει την αλλαγή από την ωρίμανση στην αναπαραγωγική φάση ενώ η αύξησή του καταστέλλει την άνθιση (151). Το NO συνδέεται και με τη γονιμοποίηση καθώς και με τη σωστή διαμόρφωση των αναπαραγωγικών οργάνων (152). Η έλλειψη συσσώρευσης NO στο άκρο του γυρεοσωλήνα επιτρέπει την ανάπτυξή του, ενώ η δημιουργία NO πίσω από το άκρο προκαλεί την διακοπή της ανάπτυξης μέσω ενός cGMP-εξαρτώμενου μηχανισμού. Τα υπεροξυσωμάτια είναι μια σημαντική πηγή NO (153), και η διασπορά τους πίσω από την κορυφή του γυρεοσωλήνα καθορίζει τον προσανατολισμό της ανάπτυξής του (152). Ένα παρόμοιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί στις ρίζες, όπου κατά τον γεωτροπισμό αυξάνεται η ασύμμετρη συγκέντρωση του NO στα κατώτερα σημεία των οριζόντιων ριζών οπότε και προκαλείται η γεωτροπική κάμψη (154). Για μια ακόμη φορά, η παραγωγή NO προκαλεί τη σύνθεση του cGMP, η οποία είναι απαραίτητη για μια πλήρη γεωτροπική απόκριση. Η εμπλοκή του cGMP έχει πλήρως διευκρινιστεί σε πολλά μονοπάτια σηματοδότησης. Παρόλα αυτά, το NO φαίνεται να αποτελεί απαραίτητη αλλά όχι ικανή συνθήκη της συσσώρευσης του cGMP, καθώς η δραστηριότητα της μοναδικής γουανυλικής κυκλάσης που έχει ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα δεν εξαρτάται από το NO (155).

IV.III. Το NO στην αβιοτική και βιοτική καταπόνηση

Έχει αναφερθεί ότι υπό συνθήκες αβιοτικού στρες, όπως αυξημένη αλατότητα και οσμωτικό στρες, αυξάνεται η συσσώρευση πολυαμινών στα φυτά. Ταυτόχρονα, υπό αυτές τις συνθήκες, έχει αναφερθεί συσσώρευση NO. Πιστεύεται ότι μέσω της συσσώρευσης του NO και της πιθανής του επίδρασης πάνω στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό, τα φυτά επιδεικνύουν μια επιμέρους ανθεκτικότητα στην αλατότητα και

το οσμωτικό στρες. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το NO επάγει την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων ή/και αυξάνει τη δραστικότητά τους. Τα περισσότερα από τα ερευνητικά δεδομένα για την ανίχνευση NO κατά τη διάρκεια των αλληλεπιδράσεων φυτού-παθογόνου προέρχονται από μελέτες επιμόλυνσης με βιοτροφικά παθογόνα (156). Στις περιπτώσεις αυτές, αμέσως πριν την έναρξη του κυτταρικού θανάτου, παρατηρείται τοπική συσσώρευση του NO ταυτόχρονα με την εκδήλωση του οξειδωτικού κύματος.

Σήμερα είναι διαθέσιμες πολλές μέθοδοι προσδιορισμού του NO. Αυτές περιλαμβάνουν απεικονιστικές μεθόδους όπως τη χρήση φθορίζοντων ανιχνευτών, για παράδειγμα τον DAF-2 (4,5-diaminofluorescein) και τον DAFFM (4-amino-5-methylamino-20,70-difluorofluorescein) (157, 158). Πιο ακριβείς υπολογισμοί της συγκέντρωσης του NO μπορούν να πραγματοποιηθούν με άμεσες μεθόδους, όπως η EPR (158) αλλά και με τεχνικές που μετρούν την εκπομπή NO σε αέρια φάση με χημειοφωταύγεια (159), φωτοακουστική ανίχνευση laser (160) και φασματοσκοπία μάζας (161). Παρόλα αυτά, η διακύμανση στη συγκέντρωση του NO ως οξειδοαναγωγικού μορίου στο κύτταρο αλλάζει (162) και η ασυμφωνία που παρατηρείται όταν το NO προσδιορίζεται με διαφορετικές μεθόδους στο ίδιο σύστημα, επιτάσσει τη βελτιστοποίηση των διαθέσιμων μεθοδολογιών.

Τα φυτά έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν τους βασικούς και γενικούς μολυσματικούς παράγοντες (διεγέρτες) που προκαλούν την άμυνα του φυτού, όπως οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) στην κυτταρική επιφάνεια των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Στο *Arabidopsis thaliana*, οι LPS από φυτικά και ζωικά παθογόνα βρέθηκε ότι επάγουν ένα έντονο και ταχύτατα διευρυνόμενο κύμα NO, το οποίο εξαρτάται κυρίως από τη δραστικότητα του *AtNOS1*, του μοναδικού, μέχρι σήμερα, ταυτοποιημένου γονιδίου στα φυτά, που κωδικοποιεί τη συνθάση του NO (130). Οι αποκρίσεις των φυτών σε νεκροτρόφες μολύνσεις έχουν κοινούς μόνο ορισμένους κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς με τις φυτικές αποκρίσεις σε βιοτρόφα παθογόνα. Ωστόσο, η μόλυνση από νεκρότροφα παθογόνα συνδέεται ευρέως με το οξειδωτικό στρες και το θάνατο των κυττάρων-ξενιστών (163). Τα νεκρότροφα παθογόνα επάγουν την παραγωγή τοξικών επιπέδων των EMO και με τον τρόπο αυτό ενισχύουν τη μόλυνση (164). Ο μύκητας *Botrytis elliptica*, ένα νεκρότροφο

παθογόνο, ταυτόχρονα με την επαγωγή της παραγωγής EMO στον ξενιστή προκαλεί και αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων του NO. Τα κύτταρα του ξενιστή οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο και ο μύκητας τρέφεται μέσω αυτής της μη συμβατικής αλληλεπίδρασης με τα φυτά ξενιστές που προσβάλλει (165). Φαρμακολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι το NO είναι απαραίτητο για την έναρξη της απόπτωσης σε παρακείμενα κύτταρα κατά τη διάρκεια της αμυντικής απόκρισης της βρώμης στο *Puccinia coronata* (166). Επιπλέον, σε φυτά *A. thaliana* τα οποία ήρθαν σε επαφή με *P. syringae*, βρέθηκε ότι αρχικά συσσωρεύουν NO αποκλειστικά στον ενδοκυττάριο χώρο προτού το NO εμφανιστεί στο κυτταρόπλασμα παρακείμενων κυττάρων. Πολλά από τα κύτταρα αυτά πέθαναν αμέσως μετά (158).

Είναι γνωστό ότι το NO επάγει την συσσώρευση SA, του κρίσιμου διαμεσολαβητή για την εγκαθίδρυση της επίκτητης διασυστημικής ανθεκτικότητας (Systemic acquired resistance; SAR), βασικού αμυντικού εργαλείου των φυτών έναντι των μολύνσεων με παθογόνους οργανισμούς. Παράλληλα, η μεταγραφική ρύθμιση της αναγωγής της S-νιτροσογλουταθειόνης (S-nitrosoglutathione, GSNO) της *A. thaliana* σε απόκριση των ορμονών ιασμονικού οξέως (Jasmonic acid, JA) και SA υποστηρίζει τη δράση της στη διαμόρφωση των μονοπατιών του NO και μεταγραφής γονιδίων, τα οποία συνδέονται με την άμυνα του φυτού [60]. Η μεταχείριση με NO βρέθηκε ότι διεγείρει τόσο την συσσώρευση JA όσο και των JA-αποκρινόμενων γονιδίων, όπως η ντεφενσίνη (PDF1.2) και η επαγόμενη- από- JA πρωτεΐνη (JIP) αλλά μόνο σε NAhG φυτά-μεταλλάγματα, τα οποία δεν είναι ικανά να παράγουν SA (167). Αντίστροφα, η μεταχείριση με JA είχε ως αποτέλεσμα την ισχυρή παραγωγή NO, προτείνοντας ένα αυτοενισχυόμενο κύκλο JA-NO, γεγονός που προκαλεί έκπληξη. Ο ρόλος λοιπόν του NO στις αποκρίσεις σε βιοτικές καταπονήσεις φαίνεται να ρυθμίζεται από το SA, το οποίο μπορεί να αναστείλει τη βιοσύνθεση του JA. Το JA με τη σειρά του όμως, σε απόκριση στο NO, ανταγωνίζεται την ενεργοποίηση της φυσιολογικής αμυντικής απόκρισης (166).

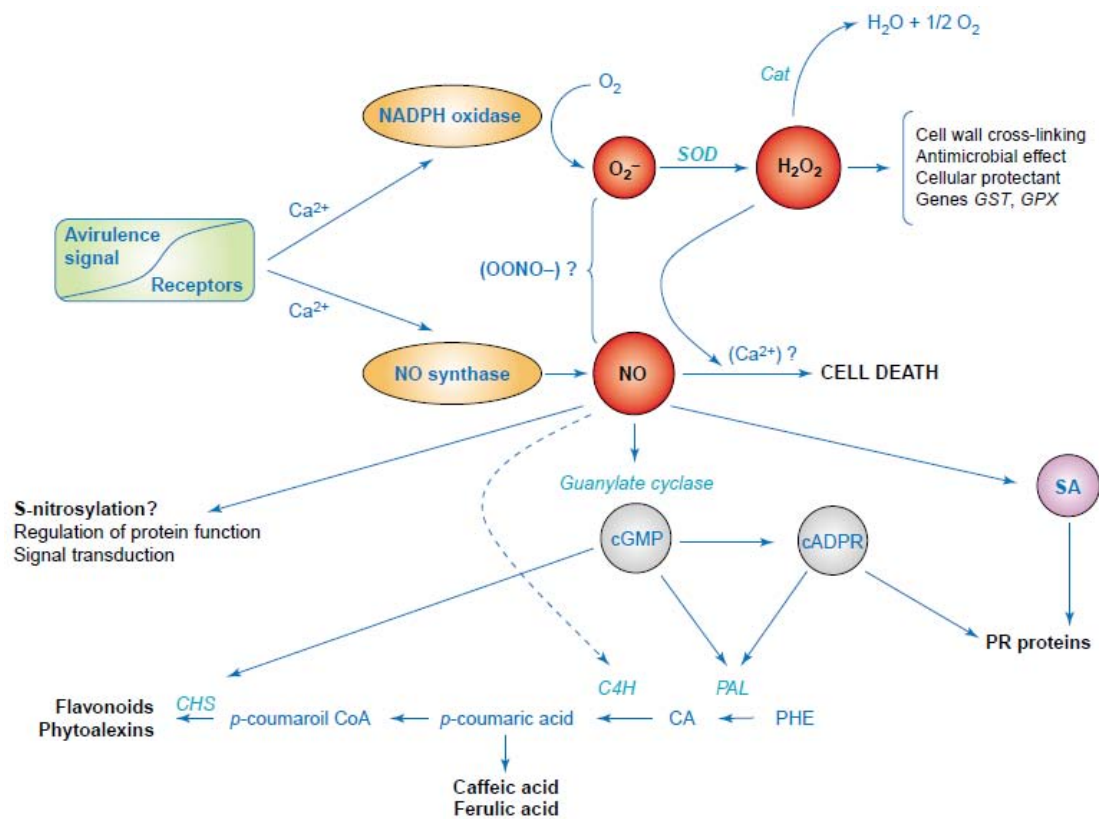
IV.IV. NO και μεταγωγή σήματος κατά τη διάρκεια της απόκρισης άμυνας

Οι σηματοδοτικές λειτουργίες του NO εξαρτώνται από πολύπλοκες συνθήκες οι οποίες επηρεάζουν την δραστηριότητά του. Αυτές περιλαμβάνουν την ταχύτητα

παραγωγής και διάχυσης του NO και την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, με τις EMO να παίζουν ρόλο-κλειδί στην διοχέτευση του NO στο μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου (168) μέσω ενός άγνωστου μέχρι στιγμής μηχανισμού (114). Παρόλα αυτά έχουν σκιαγραφηθεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια που λαμβάνουν χώρα στα φυτικά κύτταρα μετά από μόλυνση με παθογόνους παράγοντες μέχρι την ενεργοποίηση των γονιδίων της SAR, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9 (124).

Η ανάγκη για σύνθεση του cGMP, ένα γνωστό μόριο που μεταγεί το σήμα καθοδικά (downstream) του NO στους ζωικούς οργανισμούς (143) για τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, είναι επιπλέον στοιχείο που αναδεικνύει την εμπλοκή του NO στην διαδικασία αυτή. Ενεργοποιώντας κανάλια ασβεστίου διαφορετικού τύπου, το cGMP μπορεί να ρυθμίσει άμεσα και έμμεσα διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες (169). Το NO συνδέεται με την κινητοποίηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} , καθιστώντας τα κανάλια Ca^{2+} ως πιθανούς στόχους του NO στους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος (170). Το NO επηρεάζει την έκφραση πολυάριθμων γονιδίων στα φυτά (171), συμπεριλαμβανομένων και αυτών που κωδικοποιούν τη λυάση της φαινυλαλανίνης που παράγει αμμωνία (PAL) και την σχετιζόμενη με παθογένεση πρωτεΐνη-1 (PR1) (172). Επειδή, η συσσώρευση των PAL και PR1 έχει ανιχνευθεί σε φυτά καπνού επεξεργασμένα με ένα ανάλογο του cGMP, διαπερατό της κυτταρικής μεμβράνης, και λαμβάνοντας υπόψη ότι η επαγωγή της PAL από το NO μπορεί να ανασταλεί από διάφορους αναστολείς της κυκλάσης του γουανυλικού, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση ορισμένων, τουλάχιστον, γονιδίων άμυνας που εξαρτώνται από το NO υποκινείται από το cGMP (172).

Εκτός από την ενεργοποίηση μονοπατιών που εμπλέκουν το cGMP και τις MAP κινάσες, το NO έχει τη δυνατότητα να προκαλεί μετα-μεταφραστικές



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών που πυροδοτεί το σήμα προσβολής του φυτικού κυττάρου από παθογόνους οργανισμούς και η διαμεσολάβηση του NO. Μετά την μόλυνση με παθογόνους οργανισμούς δίνεται το σήμα στην NOS και την NADPH οξειδάση να παράγουν περίσσεια NO και EMO αντίστοιχα. NO ενεργοποιεί την γουανυλική κυκλάση και μέσω του cGMP μορίου επάγει τη μεταγραφή κρίσιμων γονιδίων του δικτύου της SAR, όπως του PAL και των PR πρωτεϊνών. Οι τελευταίες επάγονται και μέσω του SA, το οποίο επίσης συσσωρεύεται σε απάντηση του NO. Τα γονίδια αυτά παίζουν καταλυτικό ρόλο στην παραγωγή μιας σειράς σημαντικών για την άμυνα του φυτού μορίων όπως τα φλαβονοειδή και τις φυτοαλεξίνες. Δευτερευόντως το NO ενδέχεται να προκαλεί μεταμεταφραστικές μεταβολές σε στοχευμένες πρωτεΐνες επηρεάζοντας έτσι την δραστηρότητά τους. Οι EMO παράλληλα ενεργοποιούν διάφορα μονοπάτια άμυνας, καθώς και την μεταγραφή αντιοξειδωτικών γονιδίων, μεταξύ των οποίων και των GPX. Οι EMO μαζί με το NO τελικά, με τρόπο που δεν έχει διαλευκανθεί ακόμα, προωθούν τον κυτταρικό θάνατο (124).

τροποποιήσεις σε πρωτεϊνικούς στόχους, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της δραστικότητάς τους. Οι τροποποιήσεις αυτές εξαρτώνται από την υψηλή δραστικότητα του NO με αμινοξέα και αφορούν στην S-νιτροσουλίωση και τη νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης από παράγωγες ενώσεις του NO. Οι στοχευμένες αυτές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την καταπόνηση και την οξειδοαναγωγή, σηματοδοτικές ή ρυθμιστικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και μεταβολικά ένζυμα.

V. S-νιτροσουλίωση

V. I. Γενικά

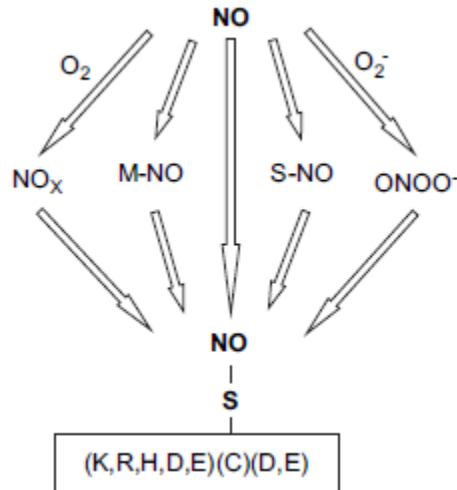
Η ανακάλυψη των βιολογικών λειτουργιών του NO συνδέθηκε αρχικά με την άποψη ότι είναι ένα αέριο, δευτερογενές σηματοδοτικό μόριο που διαχέεται ελεύθερα στα κύτταρα και δρα ρυθμίζοντας την ενεργότητα της γουανυλικής κυκλάσης (133). Προσφάτως όμως, στοιχεία έρχονται να αναπροσδιορίσουν τον τρόπο δράσης του μορίου, καθώς, σε όλο και περισσότερες μελέτες, η δράση του δεν συνοδεύεται από αλλαγές στην ενεργότητα της γουανυλικής κυκλάσης αλλά φαίνεται να δρα ανεξάρτητα από αυτή. Η χημεία του NO τού επιτρέπει να αλληλεπιδρά με κέντρα αρκετών πρωτεϊνών και ενζύμων που περιέχουν συμπλέγματα σιδήρου, σουλφιδίων και αίμες επηρεάζοντας την ενεργότητά τους (173). Το 1992 αποκαλύφθηκε ένας νέος μηχανισμός μεταγωγής σήματος μέσω NO, όπου αυτό προσδένεται πάνω σε ενεργές θειόλες κυστεϊνών σχηματίζοντας S-νιτροσοθειόλες (SNO) (174). Η παρουσία αυτής της ομάδας σε μια πρωτεΐνη μπορεί ακολούθως να τροποποιήσει την λειτουργία της, όπως αντίστοιχα γίνεται και με την προσθήκη φωσφορικής ομάδας κατά τη διαδικασία της φωσφορυλίωσης.

Την τελευταία δεκαετία, έχει δειχθεί ότι η S-νιτροσουλίωση ρυθμίζει έναν αυξανόμενο αριθμό σηματοδοτικών συστημάτων, δομικών πρωτεϊνών και μεταβολικών διεργασιών στους ζωικούς οργανισμούς (175). Επίσης επανεκτιμάται η χωροταξική και χρονική ρύθμιση του σχηματισμού της SNO, που διευκολύνει μια εξαιρετικά ακριβή δράση στη σηματοδότηση μέσω NO (176). Η S-νιτροσουλίωση

αποτελεί πλέον μια πρωτότυπη μετα-μεταφραστική τροποποίηση στα ζωικά και φυτικά συστήματα και εξαρτάται από την εκάστοτε οξειδαναγωγική κατάσταση του κυττάρου. Πρόσφατα, οι προσεγγίσεις με μεθόδους πρωτεομικής αποκάλυψαν τους πρωτεϊνικούς στόχους για S-νιτροσυλίωση σε φυτικούς οργανισμούς (177). Στα φυτά όμως, η σύνθεση των SNO και η ανακύκλωσή τους δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως.

V.II. Ο μηχανισμός της S-νιτροσυλίωσης

Η ποσότητα NO που είναι απαραίτητη για την S-νιτροσυλίωση μπορεί να προσφερθεί από διάφορες πηγές, εκτός της διαθεσιμότητας του ίδιου του ελεύθερου μορίου, όπως ρίζες NOx, συμπλέγματα NO με μέταλλα, υπεροξυνιτρώδες, νιτρώδες οξύ ή ήδη υπάρχουσες SNO (Εικόνα 10) (178). Μέχρι σήμερα δεν έχουν εντοπιστεί συγκεκριμένοι ενζυμικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την S-νιτροσυλίωση, παρόλο που αρκετά ένζυμα είναι γνωστά για την ικανότητά τους να καταλύουν την τροποποίηση αυτή αλλά και για την αντίστροφη, την απονιτροσυλίωση. Για παράδειγμα, η σερουλοπλασμίνη καταλύει την S-νιτροσυλίωση πρωτεογλυκανών, γλυπικανών και είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό της GSNO χρησιμοποιώντας NO (179). Ένα άλλο φαινόμενο που αφορά στην τροποποίηση SNO είναι η ανταλλαγή τους μεταξύ δύο θειολών που ονομάζεται *trans*-νιτροσυλίωση. Το NO από την S-νιτροσοαιμοσφαιρίνη μεταφέρεται άμεσα σε μια γειτνιάζουσα θειόλη της Band3, μιας πρωτεΐνης που προσδέεται πάνω στην αιμοσφαιρίνη (180). Η ανακύκλωση των SNO και η απονιτροσυλίωση μπορούν να υποβοηθηθούν από τη θειορεδοξίνη, όπως για παράδειγμα συμβαίνει με την περίπτωση της πρωτεϊνικής κινάσης C, που άρει την αναστολή της από το NO (181).



Εικόνα 10: S-νιτροσυλίωση μιας κυστεΐνης στόχου από το NO. Ο σχηματισμός μιας πρωτεϊνικής SNO μπορεί να επιτυγχάνεται άμεσα από το NO ή από ρίζες NO_x, από συμπλέγματα μετάλλων με NO (M-NO), άλλες νιτροσοθειόλες ή υπεροξυνιτρώδη (ONOO⁻). Στο πλαίσιο παρουσιάζεται ένα πρωτοταγές πρότυπο πεπτίδιο που προτείνεται ως μοτίβο για τα σημεία τροποποίησης SNO (178).

Η GSNO σχηματίζεται ραγδαία στο εσωτερικό των κυττάρων αλλά και εκτός των ορίων του μετά την αλληλεπίδραση του NO με μόρια γλουταθειόνης και αποτελεί βασικό αντιοξειδωτικό (182). Είναι ένα πολύ σταθερό μόριο με αυξημένη κινητικότητα και για αυτόν τον λόγο υπηρετεί άριστα τον σκοπό της διατήρησης μιας δεξαμενής διαθέσιμου ενεργού NO. Προσφάτως, βρέθηκε ένα ένζυμο που ευθύνεται για την ανακύκλωση της GSNO στην *Escherichia coli*, η αναγωγή της GSNO (GSNO reductase; GSNOR), η οποία μάλλον είναι σημαντική και για την ομοίωση της GSNO στη ζύμη και τα ποντίκια (183). Απουσία της GSNOR παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση GSNO και S-νιτροσυλιωμένων πρωτεϊνών παρόλο που αυτή δεν εμπλέκεται άμεσα στην διαδικασία απονιτροσυλίωσής τους. Παρόμοια μελέτη στο φυτό *Arabidopsis* έδειξε πως σε μεταλλάγματα που είχαν μειωμένη δραστικότητα του ενζύμου AtGSNOR1 (*Atgsnor1-3*) ανιχνεύτηκαν περισσότερες SNO και αντίστοιχα σε μεταλλάγματα που είχαν αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου (*Atgsnor1-1*) ανιχνεύτηκαν λιγότερες SNO. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μια δυναμική ισορροπία θειολών μικρού μοριακού βάρους και SNO τροποποιημένων πρωτεϊνών, η οποία βασίζεται

στην μεταφορά NO μεταξύ των δύο. Έτσι, η GSNO δύναται να μεταφέρει NO στις πρωτεϊνικές θειόλες είτε μέσω τρανσνιτροσυλίωσης, είτε παρέχοντας άμεσα NO, παρουσία μετάλλων και αναγωγικών παραγόντων (184).

V.III. Εξειδίκευση του μηχανισμού της S-νιτροσυλίωσης

Οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν μια εντυπωσιακή διαφορική ευαισθησία στην S-νιτροσυλίωση, παρόλο που σε αυτή τη διαδικασία δεν παίζει ρόλο η συνολική περιεκτικότητά τους σε κυστεΐνες. Έχει γίνει σαφές ότι η τροποποίηση αυτή εκτελείται με εκπληκτική εξειδίκευση και άκρως στοχευμένα. Χαρακτηριστικά, οι πρωτεΐνες που τροποποιούνται με αυτή τη διαδικασία υπό φυσιολογικές συνθήκες νιτροσυλιώνονται μόνο σε συγκεκριμένα κατάλοιπα κυστεΐνης που είναι απαραίτητα και επαρκούν για να φέρουν το επιθυμητό αποτέλεσμα (178). Το φαινόμενο της S-νιτροσυλίωσης είναι ως επί τω πλείστο μελετημένο στα θηλαστικά και ελάχιστα στα φυτά. Ορισμένες όμως συνθήκες που αποτελούν απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχή ολοκλήρωση της τροποποίησης, λόγω της καθαρά φυσικοχημικής φύσης τους, πιθανότατα έχουν ισχύ και στους φυτικούς οργανισμούς.

Το τοπικό pH, η οξειδαναγωγική κατάσταση και η παρουσία μεταλλικών ιόντων όπως τα Mg^{2+} και Ca^{2+} , τα οποία μπορούν να δράσουν ως αλλοστερικά κέντρα για να ρυθμίσουν την προσβασιμότητα ή την αντιδραστικότητα των θειολών, είναι καθοριστικοί παράγοντες της αντίδρασης (185, 186, 187). Επιπλέον, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες ελέγχουν την pKa των θειολών ή τον υδροφοβικό χαρακτήρα της διαμερισματοποίησής τους παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο (176, 186). Η οξυγόνωση και αποξυγόνωση της Cys93 της αιμοσφαιρίνης των θηλαστικών προωθούν αντίστοιχα την S-νιτροσυλίωση και την απονιτροσυλίωση της ίδιας, σύμφωνα με μελέτες. Το φαινόμενο αυτό διευκολύνει τη μεταφορά και απελευθέρωση βιοενεργού αγγειοδιασταλτικού NO από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, εκτός από το O_2 , σε μια προσπάθεια να ικανοποιηθούν οι ανάγκες των κυττάρων στον άμεσο τοπικό περιβάλλοντα χώρο (188, 189, 190). Είναι πολύ σημαντικό να σημειωθεί πως η Cys93 είναι περικυκλωμένη από διαδοχικές όξινες και αλκαλικές πλευρικές αλυσίδες και αυτή η παρατήρηση οδήγησε σταδιακά στην κατανόηση

ενός μοντέλου του «όξινου-αλκαλικού» μοτίβου, απαραίτητου για την στοχευμένη αντίδραση της S-νιτροσουλίωσης (176).

Τέτοιου είδους χαρακτηριστικά μοτίβα είναι πολύ συνήθη και απαραίτητα για τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Στην περίπτωση του SNO μοτίβου, είναι αξιοσημείωτο πως, η κυστεΐνη-στόχος ενδέχεται στην πρωτοταγή μορφή της πεπτιδικής αλυσίδας να μην βρίσκεται ανάμεσα σε όξινες και αλκαλικές αλυσίδες και να έρχεται σε τέτοιο περιβάλλον μόνο μετά την διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής και της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης στο χώρο (176, 186, 191). Οι κατάλληλες συνθήκες για SNO μοτίβα μπορούν να προκύψουν ακόμα και μετά την τεταρτοταγή διαμόρφωση των πρωτεϊνών αλλά και μετά από μια σχέση αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με μια άλλη, όπως γίνεται στην περίπτωση της *trans*-νιτροσουλίωσης της Band3 από την αιμοσφαιρίνη. Πράγματι, βρέθηκε πως 50% των τροποποιημένων καταλοίπων κυστεϊνών είναι τοποθετημένα σε μικρές αποστάσεις από άτομα υδρογόνου αρωματικών δακτυλίων και προφανώς επηρεάζονται από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Το περιβάλλον αυτό αποτελεί ένα αντίστοιχο τρισδιάστατο δομικό μοτίβο που καθιστά τις κυστεΐνες ευαίσθητες στην SNO τροποποίηση.

Η μελέτη της S-νιτροσουλίωσης της πρωτεΐνης OxyR από την GSNO, έχει οδηγήσει στην καθιέρωση ενός πιθανού μοτίβου για την συγκεκριμένη αντίδραση που πραγματοποιείται μέσω της GSNO (175). Το μόριο της GSNO εισάγεται και προσδένεται στη θέση υποδοχής της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) μέσω ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της c-γλουταμυλ-αμινικής ομάδας της GSNO και της c-καρβοξυλικής ομάδας της Asp202. Αυτό τοποθετεί το NO περίπου 4 Å μακριά από την θειϊκή ομάδα της Cys199. Ένα πιθανό μοτίβο για την τρανσνιτροσουλίωση που προκύπτει από την μελέτη της αλληλουχίας γύρω από την Cys199 είναι το εξής: (H,K,R)(C)(υδροφοβικό)(X)(D,E), όπου το X μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ. Αυτή η συγκεκριμένη αλληλουχία, μετά από μια ανάλυση στη βάση δεδομένων, φάνηκε να είναι παρούσα σε πληθώρα πρωτεϊνών που αποτελούν στόχους S-νιτροσουλίωσης.

Στα φυτά, υπάρχουν λίγα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με τον μηχανισμό που ακολουθείται και πως αυτός στοχεύει συγκεκριμένα κατάλοιπα Cys στις πρωτεΐνες

στόχους. Οι περισσότερες μελέτες βασίζονται σε *in vivo* προσεγγίσεις πάνω σε κυτταρικά εκχυλίσματα ή ανασυνδυασμένες απομονωμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας την εκλεπτυσμένη τεχνική της υποκατάστασης με μόρια βιοτίνης (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Οι Lindermayr et al. (2005) (177) αναγνώρισαν 63 πρωτεΐνες στο *Arabidopsis* από κυτταρικές καλλιέργειες που επώαστηκαν με δότες NO και 52 πρωτεΐνες από τα φύλλα. Η τροποποίηση διαπιστώθηκε πως αφορά σε πληθώρα συνόλων πρωτεϊνών, όπως δομικές πρωτεΐνες, ρυθμιστικές και σηματοδοτικές, μεταβολικά ένζυμα, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση και πρωτεΐνες που ελέγχουν την οξειδαναγωγική ισορροπία, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.

Μια μελέτη βασισμένη σε εργαλεία βιοπληροφορικής κατάφερε να εντοπίσει μέσα από την βάση δεδομένων SwissProt, έχοντας ως κριτήριο αναζήτησης το πρότυπο SNO μοτίβο [GSTCYNQ]-[KRHDE]-C-[DE], 103 υποψήφιες περιοχές S-νιτροσυλίσωσης σε 99 αλληλουχίες του φυτού *Arabidopsis* (192). Οι περιοχές αυτές βρέθηκαν σε αλληλουχίες πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια, πρωτεΐνες μεταφοράς, που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και πρωτεΐνες του βασικού μεταβολισμού. Στην ανασκόπηση των Wang et al. (2006) (178) αναφέρεται πως οι ομάδες των Delledonne και Loake κατάφεραν να αναγνωρίσουν S-νιτροσυλιωμένες πρωτεΐνες κατά την έναρξη της αντιμετώπισης ασθενειών. Οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν να επιδέχονται της μετα-μεταγραφικής αυτής τροποποίησης κατατάσσονται σε μεταβολικές, μεταγωγής σήματος, σχετιζόμενες με καταπονήσεις και αυτές που ρυθμίζουν την οξειδαναγωγική ισορροπία στο κύτταρο. Τα ευρήματα αυτών των ευρέως φάσματος μελετών δείχνουν πως η S-νιτροσυλίωση φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο ως μετα-μεταγραφική τροποποίηση σε πολλές λειτουργίες του κυττάρου υπό φυσιολογικές συνθήκες και δίνουν το έναυσμα για περαιτέρω μελέτες.

Πίνακας 3: Μέρος του πίνακα των S-νιτροσυλιωμένων πρωτεϊνών που βρέθηκαν στο φυτό *Arabidopsis thaliana* από τους (177). Στις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την οξειδαναγωγική ισορροπία στο κύτταρο διακρίνεται μια GPX (κόκκινο πλαίσιο) η οποία, από τον αριθμό καταχώρησής της (NP_192897), αποδεικνύεται πως είναι η PHGPX του φυτού υπό διερεύνηση.

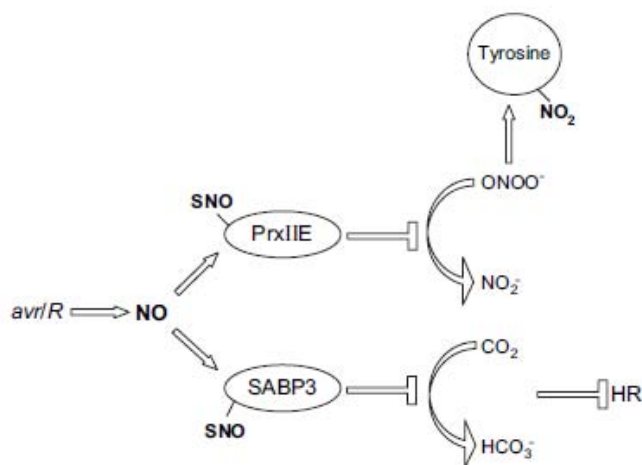
Protein	Acc. No.	Molecular Mass	Identified Peptides (Score) GSNO/NO	Identified Peptides (Score) GSH/Untreated	Hints to S-Nitrosylation
<i>D</i>					
Stress-Related Proteins					
GST, putative	NP_565178	25,634	VTEFVSELR (79)	NPILPSPDYLR (38)	Sies et al. (1998); Ji et al. (2002)
Hsp 90, putative	AAL49788	80,036	ADLVNNLGTIAR (5) + 1		Jaffrey et al. (2001); Fratelli et al. (2002, 2003); Lind et al. (2002); Shenton and Grant (2003)
Cu/Zn-superoxide dismutase	NP_172360	15,088	AVVVHADPDDLK (55) + 1		Lawler and Song (2002)
Redox-Related Proteins					
Glutathione peroxidase, putative	NP_192897	25,568	FAPTTSPLSIEK (65) + 1	FAPTTSPLSIEK (51)	Koh et al. (2001)
Peroxiredoxin-related	AAF66133	21,230	AVNVEEAPSDFK (37)		Motohashi et al. (2001); Fratelli et al. (2002, 2003); Lind et al. (2002)
Type 2 peroxiredoxin-related	NP_176773	17,417	APIAVGDVVPDGTISFF-DENDQLQTASVHSL-AAGK (51)		
Glutaredoxin, putative	NP_198853	11,749	LVPLITEAGAIAGK (59)		Klatt et al. (2000); Song and Lee (2003)

V.IV. Ο ρόλος της S-νιτροσυλίωσης στα φυτά

Το ένζυμο αδενοσυλτρανσφεράση της μεθειονίνης (Methionine adenosyltransferase, MAT) καταλύει τη βιοσύνθεση της S-αδενοσυλμεθειονίνης (S-adenosylmethionine, AdoMet), τον πιο σημαντικό δότη μεθυλομάδων σε αντιδράσεις τρανσμεθυλίωσης. Παράλληλα, η AdoMet είναι το βασικό υπόστρωμα για την βιοσύνθεση των πολυαμινών και της ορμόνης του αιθυλενίου. Το ισοένζυμο MAT1 βρέθηκε να είναι μεταξύ των SNO που ανιχνεύτηκαν στη μελέτη των Lindermayr et al. (2005) (177) μετά από μεταχείριση με GSNO. Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί το εύρημα ότι ενώ η δραστηριότητα της ανασυνδυσασμένης MAT1 βρέθηκε να μειώνεται κατά περίπου 30% μετά από μεταχείριση με GSNO, οι άλλες δύο ισομορφές MAT στο *Arabidopsis* δεν φάνηκε να επηρεάζονται υπό τις ίδιες συνθήκες (193). Σειρά σημειακών μεταλλάξεων και ανάλυση με φασματομετρία μάζας έδειξαν πως η S-νιτροσυλίωση της Cys114 του MAT1 ισοενζύμου είναι υπεύθυνη για την αναστολή της δραστηριότητάς του μετά από μεταχείριση με GSNO. Συνδυάζοντας τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι, το NO, μέσω της S-νιτροσυλίωσης της MAT1 πρωτεΐνης, μπορεί να ελέγχει και να αναστέλλει τη

βιοσύνθεση του αιθυλενίου, λαμβάνοντας υπόψη πως, το προϊόν της αντίδρασης που καταλύει, η AdoMet, αποτελεί βασικό υπόστρωμα για την ορμόνη.

Σύμφωνα με μελέτες η S-νιτροσουλίωση παίζει σημαντικό ρόλο και στην άμυνα των φυτών. Η πρωτεΐνη SABP3 (Salicylic acid binding protein 3) παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίδραση υπερευαισθησίας καθώς δεσμεύει το SA και παράλληλα έχει δράση καρβονικής ανυδράσης (carbonic anhydrase, CA) (194). Το NO επηρεάζει άμεσα και δραστικά την ενεργότητα της CA αλλά δεν δείχνει να παίζει κάποιο ρόλο στην πρόσδεση του SA. Σειρά σημειακών μεταλλάξεων απέδειξε πως η Cys280 της πρωτεΐνης, η οποία είναι ενταγμένη μέσα σε ένα κλασικό SNO μοτίβο, υφίσταται S-νιτροσουλίωση, με αποτέλεσμα να ανακόπτεται ο κυτταρικός θάνατος και κατ' επέκταση η εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Εικόνα 11; 178).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση του ρόλου της S-νιτροσουλίωσης στη βιοτική καταπόνηση. Το NO που παράγεται σε απάντηση της επαφής των κυττάρων του φυτού ξενιστή με τον παθογόνο οργανισμό προκαλεί την S-νιτροσουλίωση των πρωτεϊνών PrxII E (Peroxiredoxin E) και SABP3 (Salicylic acid binding protein 3). Η τροποποίηση της PrxII E αναστέλλει την διάσπαση του ONOO⁻ με αποτέλεσμα να αυξάνεται η νίτρωση τυροσίνης στις πρωτεΐνες στόχους. Η S-νιτροσουλίωση της Cys280 της SABP3 αναστέλλει την δραστηριότητα καρβονικής ανυδράσης (Carbonic anhydrase, CA) που έχει η πρωτεΐνη. Το γεγονός αυτό ανακόπτει την εκδήλωση αντίδρασης (178).

Η υπεροξειρεδοξίνη E (Peroxiredoxin E, PrxII E) είναι απαραίτητη για τον μεταβολισμό και τον έλεγχο των επιπέδων του H₂O₂ και του ONOO⁻. Έχει δειχθεί ότι προσφέρει προστασία έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης σε μεταλλάγματα ζύμης που στερούνται την ομόλογη πρωτεΐνη (195). Πρόσφατα δείχθηκε πως η PrxII E είναι

στόχος S-νιτροσυλίσωσης υπό συνθήκες άμυνας του φυτού έναντι βιοτικών καταπονήσεων, παρόλο όμως που το γεγονός αυτό μειώνει *in vitro* τη δραστηριότητα του ενζύμου, *in vivo* δεν εμφανίζεται να μεταβάλλει τη συγκέντρωση του H₂O₂ ούτε να προκαλεί ευαισθησία. Αντίθετα, παρατηρήθηκε πως η έλλειψη του ενζύμου προκάλεσε μεγάλη συσσώρευση τροποποιήσεων νίτρωσης τυροσίνης, όπως και υπερέκφρασή του ανέστειλε σημαντικά την εμφάνισή τους. Η S-νιτροσυλίσωση λοιπόν έχει τη δυνατότητα να επηρεάζει μέσω της PrxIIΕ και την διαδικασία της νίτρωσης τυροσίνης (Εικόνα 11) (178).

VI. Νίτρωση πρωτεϊνών

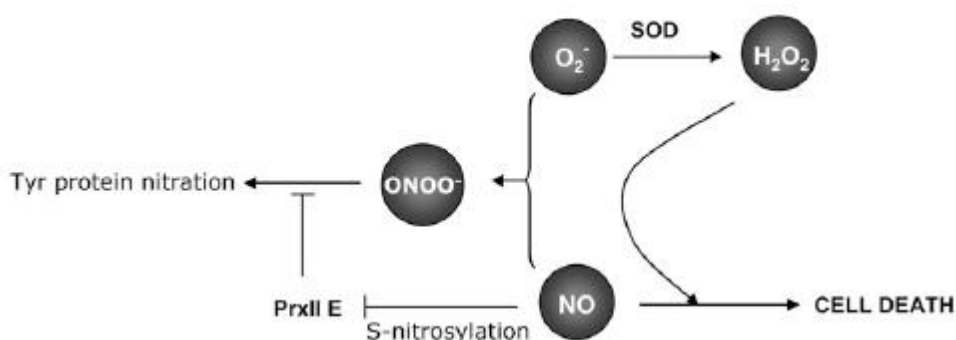
VI.1. Γενικά

Η νίτρωση είναι μια χημική αντίδραση που εισάγει μια νιτροομάδα (-NO₂) σε άλλα μόρια. Στην περίπτωση που αυτά τα μόρια είναι οι πρωτεΐνες, αρκετά είναι τα αμινοξέα που υφίστανται αυτή την τροποποίηση, όπως για παράδειγμα η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη, η κυστεΐνη και η μεθειονίνη. Πιο συνηθισμένη είναι η νίτρωση της τυροσίνης που συνίσταται στην προσθήκη μιας ομάδας NO₂ σε έναν από τους δύο *ortho*-άνθρακες του αρωματικού δακτυλίου του αμινοξέος (Εικόνα 12) (196). Συνήθως προκαλείται μετά την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με το ONOO⁻, το οποίο σχηματίζεται από την ένωση ενός μορίου NO και μιας υπεροξειδικής ρίζας και είναι ιδιαίτερα ενεργό. Καθώς η διαθεσιμότητα της υπεροξειδικής ρίζας εξαρτάται από τη



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της νίτρωσης ενός καταλοίπου τυροσίνης μιας πρωτεΐνης σε έναν από τους *ortho*-άνθρακες του αρωματικού δακτυλίου (196).

δραστικότητα της SOD, η συγκέντρωση του ONOO^- , και κατ' επέκταση το ποσοστό νίτρωσης της τυροσίνης, μπορούν να απεικονίσουν την οξειδαναγωγική κατάσταση του κυττάρου (Εικόνα 13) (178). Η προσθήκη αυτή δίνει αρνητικό φορτίο στο αμινοξύ, το καθιστά υδρόφιλο και μετατοπίζει τοπικά την pKa του τμήματος της νιτροτυροσίνης από 10.07 σε 7.50 (197). Η μετα-μεταφραστική αυτή τροποποίηση πιστεύεται πως είναι ένα κατευθυνόμενο γεγονός και παρόλο που συνήθως οι πρωτεΐνες περιέχουν περίπου 3 με 4 mol% κατάλοιπα τυροσίνης, μόνο δύο ή τρία σε απόλυτο αριθμό από αυτά υπόκεινται σε αυτή τη διαδικασία. Παράγοντες που επηρεάζουν αυτή τη διαδικασία μπορεί να αποτελούν η δομή της πρωτεΐνης, ο μηχανισμός της αντίδρασης και το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη (197).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού νίτρωσης τυροσίνης. Η αλληλεπίδραση των NO και του μονήρους οξυγόνου οδηγεί στον σχηματισμό υπεροξυνιτρώδους. Κρίσιμο ρόλο παίζει η S-νιτροσυλίωση της υπεροξειδωξειδίνης II (PrxII E) που αναστέλλει τη δράση της και επιτρέπει τη νίτρωση της τυροσίνης. Η δισμουτάση της υπεροξειδικής ρίζας (SOD) απομακρύνει την υπεροξειδική ρίζα και ελέγχει με αυτό τον τρόπο τον σχηματισμό υπεροξυνιτρώδους.

Μέχρι σήμερα, έχει δειχθεί ότι η νίτρωση της τυροσίνης δύναται να επηρεάσει τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης στόχου με διάφορους τρόπους. Επιφέρει την ενίσχυση της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης ή, αντιθέτως, την αναστολή της (198). Σε πολλές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να αποτρέψει ή να προσελκύσει άλλου είδους τροποποιήσεις, όπως αυτή της φωσφορυλίωσης (199, 200).

VI.II. Νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης και καταπόνηση

Στα θηλαστικά, η νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης ανιχνεύεται σε αρκετές πρωτεΐνες διαφόρων ιστών υπό φυσιολογικές συνθήκες (201) και ορισμένες από αυτές έχουν ταυτοποιηθεί (202). Τα ποσοστά νίτρωσης, λοιπόν, αποτελούν πιθανώς έναν παράγοντα ελέγχου φυσιολογικών διεργασιών, καθώς πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Παράλληλα, το ποσοστό νίτρωσης της τυροσίνης των πρωτεϊνών μπορεί να χρησιμεύσει και ως μάρτυρας για ορισμένες παθολογικές καταστάσεις και την καταπόνηση από παράγωγα αζώτου (203).

Μέχρι σήμερα, έχουν διενεργηθεί αρκετές πρωτεομικές μελέτες στα θηλαστικά και έχουν αναδείξει έναν σχετικά μικρό αριθμό νιτρωμένων πρωτεϊνών. Πολλές από αυτές, στους ζωικούς οργανισμούς, εμπλέκονται στην εκδήλωση της φλεγμονής, στην οξειδωτική καταπόνηση, την απόπτωση, την παραγωγή ATP και τον μεταβολισμό λιπαρών οξέων (204, 205). Η CAT και η δεϋδρογονάση της τριφωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cGAPDH) είναι σταθεροί στόχοι σχεδόν σε όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις. Πλέον, το ενδιαφέρον στρέφεται στον πιθανό σηματοδοτικό ρόλο που μπορεί να παίζει αυτή η διαδικασία και τον τρόπο με τον οποίο εμπλέκεται στα μονοπάτια του NO (204, 206).

Στα φυτά οι πληροφορίες είναι περιορισμένες για την νίτρωση πρωτεϊνών υπό φυσιολογικές συνθήκες, αν και έχουν ανιχνευτεί πρωτεΐνες σε διάφορα όργανα. Το πρώτο φυτό στο οποίο ανιχνεύτηκαν νιτρωμένες πρωτεΐνες ήταν μεταλλάγματα καπνού με περιορισμένης δραστικότητα NR (207). Αργότερα εντοπίστηκαν περισσότερες πρωτεΐνες *in vivo* σε φυτά που τροφοδοτήθηκαν με νιτρικά (208), που μολύνθηκαν με παθογόνους παράγοντες (209) και υπό φυσιολογικές συνθήκες (210). Στο φυτό *A. thaliana* εντοπίστηκαν πλήθος πρωτεϊνών που υφίστανται νίτρωση, μεταξύ των οποίων είναι μια APX του κυτταροπλάσματος και μια CAT (196). Η διαδικασία της φαίνεται παράλληλα να επηρεάζεται από το είδος της καταπόνησης. Κύτταρα καπνού που στερούνται μιας λειτουργικής NR επιλέγουν, με κάποιον άγνωστο μέχρι στιγμής τρόπο, να τροποποιούν πολλαπλά πρωτεΐνες που έχουν μέγεθος μεταξύ 10 και 50 kDa (207),

κύτταρα που έρχονται σε επαφή με μύκητες νιτρώνουν τυροσίνες πεπτιδίων μεγέθους 20-50kDa αλλά με μικρότερη ένταση.

Σε φυτά ελιάς υπό συνθήκες αλατότητας νιτρώνονται σε μεγάλο βαθμό πρωτεΐνες μεγέθους 44-60kDa παράλληλα με μια αύξηση της δρατικότητας της NOS και της συγκέντρωσης των S-νιτροσοθειολών, όπως η GSNO (211). Το αντίστοιχο εύρος για το μπιζέλι είναι 29-59kDa υπό συνθήκες ψύχους, αυξημένης θερμοκρασίας, συνεχόμενου φωτός και έντονου φωτός, με την παρατήρηση πως η ένταση του φαινομένου σε αυτές τις συνθήκες είναι ιδιαίτερα μεγάλη (212). Στον ηλίανθο, μόλυνση με τον παθογόνο *Plasmopara halstedii* αυξάνει το ποσοστό των πρωτεϊνών που υφίστανται την τροποποίηση με την παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης των S-νιτροσοθειολών (210). Όλα αυτά τα δεδομένα συγκλίνουν στο ότι το ποσοστό των πρωτεϊνών που νιτρώνονται, καθώς και η ένταση με την οποία παρατηρείται το φαινόμενο κάθε φορά είναι ενδεικτικά της κατάστασης του κυττάρου υπό αυτές τις συνθήκες και της έκτασης του αντίκτυπου της καταπόνησης. Παρόλα αυτά, δεν έχει γίνει δυνατό μέχρι σήμερα να εντοπιστεί ένα συγκεκριμένο μοτίβο που να κατευθύνει εξειδικευμένα την νίτρωση τυροσίνης στις πρωτεΐνες, αλλά και ένας συγκεκριμένος μηχανισμός που διεκπεραιώνει αυτές τις τροποποιήσεις.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

I. Φυτικό υλικό

I. 1. *Medicago truncatula*

Ο οργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του NO στην ΡΗGPX είναι το φυτό *Medicago truncatula* (Εικόνα 14). Είναι ένα φυτό μοντέλο που αναπτύσσεται βέλτιστα στον χώρο της Μεσογείου και την Αυστραλία καθώς και σε άλλες περιοχές με παρόμοιο κλίμα. Ανήκει στην τάξη των Fabales, την οικογένεια των Fabaceae, την υποοικογένεια των Faboideae και την φυλή Trifolieae (Lesins KA and Lesins L, 1979). Είναι επίσης γνωστό με την ονομασία barel medic ή alfalfa και ο κυριότερος οικότυπος είναι ο A17 ή Jemalong. Τα είδη με τη μεγαλύτερη συγγένεια είναι η *Medicago sativa*, η *Medicago aculeata* και η *Medicago arabica*.

Είναι ένα ψυχανθές δικότυλο αγγειόσπερμο, που αποτελείται από έναν κεντρικό άξονα και κλάδους σε σχηματισμό ροζέτας ή επιμηκυμένου άξονα και τα χαρακτηριστικά της αρχιτεκτονικής της ανάπτυξής του εξαρτώνται από τον οικότυπο και τις συνθήκες ανάπτυξης (Aitken Y, 1955). Τα φύλλα οργανώνονται σε τρίφυλλη διάταξη αποτελούμενα από τρεις ενωμένους στη βάση τους φυλλικούς δίσκους, όπου σχηματίζεται συνήθως και μια σκούρα κηλίδα, με τριχίδια στο πάνω μέρος τους, έναν μίσχο και δύο πλευρικά πτίλα, τοποθετημένα στη βάση του μίσχου. Το μέγεθός του μπορεί να φτάσει τα 10-60cm σε ύψος ανάλογα με τις επικρατούσες κλιματολογικές συνθήκες. Τα άνθη του είναι κίτρινου χρώματος και αναπτύσσονται μεμονωμένα ή σε ταξιανθίες των 2-5 μαζί. Οι καρποί περικλείονται σε ομάδες των 6-9 συνήθως, σε διάταξη ελατηρίου, μέσα σε ένα ακανθώδες περικάρπιο.

Καθώς το φυτό ανήκει στην οικογένεια των ψυχανθών, είναι σε θέση να δημιουργεί ειδικές δομές αζωτοδέσμευσης στις ρίζες του μετά την μόλυνση τους από συμβιωτικά βακτήρια (*Rhizobium meliloti*). Οι δομές αυτές ονομάζονται φυμάτια και αποτελούνται από ένα εξωτερικό στρώμα φυτικών κυττάρων της ρίζας που περιβάλλει έναν όγκο αποδιαφοροποιημένων βακτηριακών κυττάρων (βακτηριοειδή) στο κέντρο. Τα βακτηριοειδή είναι υπεύθυνα για τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης που προσφέρει άζωτο στο φυτό και τρέφονται από τα θρεπτικά στοιχεία που τους προσφέρονται από τα φυτικά κύτταρα.

Το γονιδίωμα του *Medicago truncatula* είναι διπλοειδές (2n) και είναι οργανωμένο σε 8 χρωμοσώματα. Το μέγεθός του είναι περίπου 4 φορές μεγαλύτερο από αυτό του *Arabidopsis thaliana* και κυμαίνεται περί των 454-526 Mbp. Η αλληλούχιση του γονιδιώματός του ξεκίνησε το 2001 και ολοκληρώθηκε τον Δεκέμβριο του 2011 (Young ND). Τα γενετικά του χαρακτηριστικά καθώς και ο σύντομος κύκλος ζωής του φυτού, το κάνουν από τα καλύτερα φυτά μοντέλα για τη μελέτη ψυχανθών αλλά και φυτών γενικότερα.

Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του φυτού είναι φωτοπερίοδος 8 ώρες νύχτα και 16 ώρες ημέρα με σταθερή θερμοκρασία 23⁰C και σταθερή υγρασία 70-80%. Η ένταση του φωτός είναι 200 μέχρι 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.



Εικόνα 14: Χαρακτηριστικές δομές των οργάνων του φυτού *Medicago truncatula*

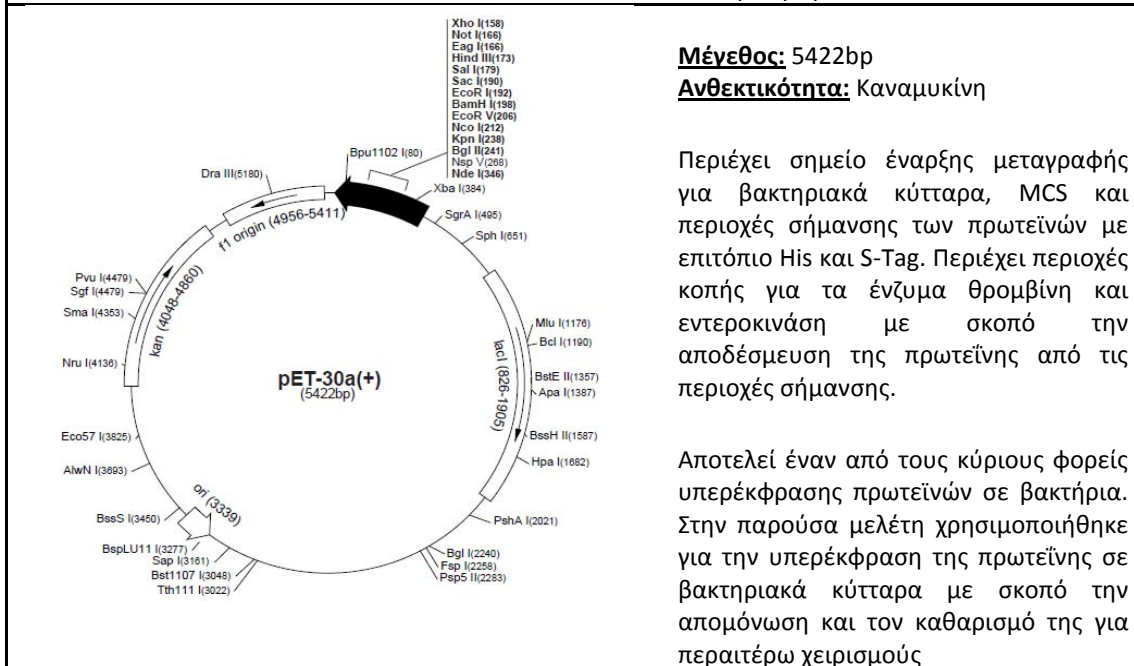
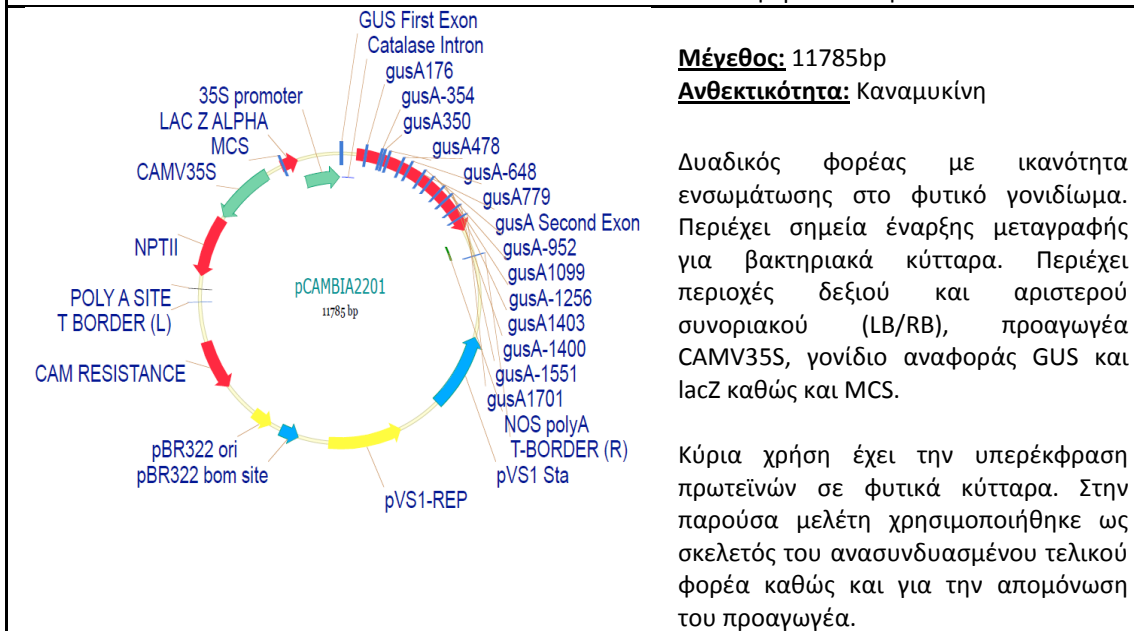
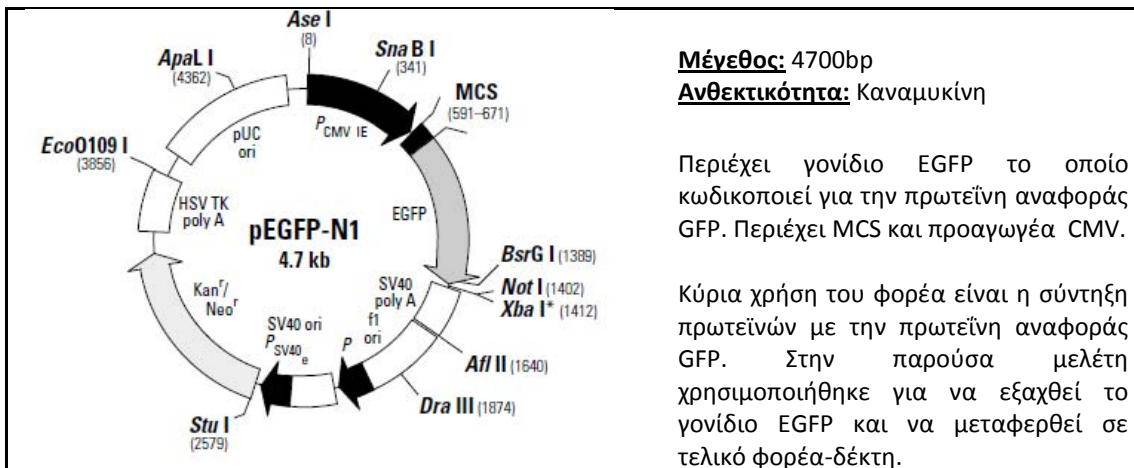
1.2. *Nicotiana benthamiana*

Για την τεχνική της ετερόλογης έκφρασης της πρωτεΐνης MtrHPGX χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Nicotiana benthamiana* (Εικόνα 15). Ανήκει στην οικογένεια Solanaceae και, λόγω της υφής των φύλλων του, χρησιμοποιείται συχνά ως φυτό μοντέλο σε πειράματα παροδικού μετασχηματισμού. Έχει σύντομο κύκλο ζωής και αυτό είναι ακόμα ένα χαρακτηριστικό που το καθιστά ένα καλό εργαλείο για τη μελέτη πρωτεϊνών μέσα από την ετερόλογη έκφραση.

Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του φυτού απαιτούν φωτοπερίοδο 8 ώρες νύχτα και 16 ώρες ημέρα, σταθερή θερμοκρασία 22°C και υγρασία 75%. Η ένταση του φωτός πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 200-600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.



Εικόνα 15: Χαρακτηριστικές δομές οργάνων του φυτού *Nicotiana benthamiana*



II.2. Αντιβιοτικά

Για τον έλεγχο των θετικών αποικιών ως προς την επιτυχία του μετασχηματισμού γίνεται χρήση του γονιδίου ανθεκτικότητας που περιέχουν οι φορείς. Κάθε φορέας περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό που χρησιμεύει ως γονίδιο αναφοράς. Τα βακτήρια που έχουν μετασχηματιστεί αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει το αντιβιοτικό έναντι στο οποίο παρέχει ανθεκτικότητα ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε. Μόνο τα βακτήρια που μετασχηματίζονται επιτυχώς επιβιώνουν στο θρεπτικό υλικό με το αντιβιοτικό. Τα αντιβιοτικά πρέπει να προστίθενται σε συγκεντρώσεις που έχει δειχθεί ότι μπορούν να ανταπεξέλθουν τα βακτήρια με τα επίκτητα χαρακτηριστικά του φορέα.

Πίνακας 5: Αντιβιοτικά

Αντιβιοτικό	Διαλύματα Stock			Τελική Συγκέντρωση
	Συγκέντρωση	Διαλύτης	Φύλαξη	
Αμπικιλλίνη (Amp)	100mg/mL	H ₂ O	-20 ⁰ C	100μg/mL
Καναμυκίνη (Kan)	50mg/mL	H ₂ O	-20 ⁰ C	50μg/mL
Χλωραμφενικόλη (Cam)	20mg/mL	Αιθανόλη	+4 ⁰ C	20μg/mL
Ριφαμπικίνη (Rif)	25mg/mL	Μεθανόλη	-20 ⁰ C	50μg/mL

II.3. Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά κύτταρα είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για έναν ερευνητή. Είναι απαραίτητα για ένα μεγάλο εύρος χειρισμών ακόμα κι αν η στοχευμένη έρευνα δεν αφορά σε παρατήρηση και μελέτη λειτουργιών των βακτηριακών κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά στελέχη με σκοπό:

- α) τον πολλαπλασιασμό των φορέων
- β) τη διευκόλυνση των χειρισμών ανασυνδυασμού των φορέων
- γ) την υπερέκφραση πρωτεϊνών

Πίνακας 6: Βακτηριακά στελέχη

Στέλεχος	Χαρακτηριστικά	Συνθήκες ανάπτυξης
DH5α	Στέλεχος <i>E. coli</i> που χρησιμοποιείται κυρίως για τη διευκόλυνση των χειρισμών φορέων και τον εύκολο και γρήγορο πολλαπλασιασμό τους.	LB, 37 ⁰ C υπό ανάδευση για 18 ώρες
Rosetta Origami	Στέλεχος <i>E. coli</i> που χρησιμοποιείται κυρίως για την υπερέκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα. Έχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην χλωραμφενικόλη στο γονιδίωμά του. Κατά τη μετάφραση χρησιμοποιεί τριπλέτες στα tRNA μόρια που είναι πιο κοντά σε αυτές των ευκαρυωτικών οργανισμών, με αποτέλεσμα να μεταφράζει πρωτεΐνες με μεγαλύτερη ακρίβεια.	LB, 30 ⁰ C υπό ανάδευση για 16 ώρες
GV3101:pMP90	Στέλεχος <i>Agrobacterium tumefaciens</i> που χρησιμοποιείται για την μόλυνση φυτικών κυττάρων με σκοπό την μεταφορά γενετικού υλικού. Έχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην ριφαμπικίνη στο γονιδίωμά του. Περιέχει όλα τα βασικά χαρακτηριστικά του γένους που προσδίδουν την ικανότητα μόλυνσης φυτικών κυττάρων (γονίδιο <i>vir</i>)	LB, 28 ⁰ C υπό ανάδευση για 18 ώρες

III. Θρεπτικά Διαλύματα

III.1. Θρεπτικά διαλύματα φυτικών οργανισμών

Για τον καλύτερο έλεγχο των συνθηκών ανάπτυξης των φυτικών οργανισμών επιλέγεται η τεχνητή παροχή θρεπτικών συστατικών σε αυτά. Το υποστηρικτικό μέσο αποτελείται από υλικά, όπως περλίτη και βερμικουλίτη, που δεν αποτελούν εκμεταλλεύσιμες πηγές ενέργειας για τα φυτά. Η χορήγηση θρεπτικών συστατικών

γίνεται με το πότισμα των φυτών με χημικά θρεπτικά διαλύματα συγκεκριμένης και ελεγχόμενης σύστασης. Όταν επιλέγεται η ανάπτυξη φυτών σε τρυβλία αυτή γίνεται σε θρεπτικό διάλυμα όπου έχει γίνει προσθήκη άγαρ με σκοπό την στερεοποίηση του μέσου.

Για το φυτό *M. truncatula* επιλέχθηκε το θρεπτικό διάλυμα Hogland που αποτελεί το πλέον χρησιμοποιούμενο για ψυχανθή φυτά (57). Είναι πλούσιο σε πηγές μικροστοιχείων και σιδήρου. Πριν την μόλυνση του φυτού με συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια είναι απαραίτητη η προσθήκη πηγών αζώτου. Μετά τη μόλυνση, η προσθήκη πηγών αζώτου είναι απαγορευτική της φυσιολογικής ανάπτυξης των αζωτοδεσμευτικών δομών. Το φυτό *N.benthamiana* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα τύρφης και ποτιζόταν με απεσταγμένο νερό καθώς δεν χρειαζόταν επιπλέον θρεπτικά συστατικά για το χρονικό διάστημα της ανάπτυξής του υπό τις συνθήκες του πειράματος.

Πίνακας 7: Θρεπτικό διάλυμα Hogland

Χημική ένωση	Διάλυμα Stock	mL/L
MgSO ₄	1M	2
KH ₂ PO ₄	1M	1
FeEDTA	0.5M	0.2
Microelements		1
CaCl ₂	0.1M	50
KCl	1M	5

Πίνακας 8: Σύσταση διαλύματος μικροστοιχείων (Microelements)

Χημική ένωση	gr/L
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.81
ZnCl ₂	0.11
CuCl ₂ H ₂ O	0.05
H ₂ MoO ₄	0.02

IV. Χειρισμοί Βακτηριακών Στελεχών

IV.1. Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

Αρχή της μεθόδου

Στόχος της μεθόδου αυτής είναι να εισαχθούν πλασμιδιακοί φορείς στα βακτηριακά κύτταρα και στη συνέχεια να πολλαπλασιαστούν καθώς αυξάνεται ο πληθυσμός των βακτηρίων σε βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Το πλήθος των φορέων δύναται να απομονωθεί από τα βακτήρια και να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω χειρισμούς όπως την αλληλούχηση, την κοπή συγκεκριμένου τμήματος γενετικού υλικού, την ενίσχυσή του και άλλα. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα και υπό φυσιολογικές συνθήκες στο βασίλειο των προκαρυωτικών οργανισμών. Αφορά στην οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού και είναι υπεύθυνη για την απόκτηση χαρακτηριστικών που προωθούν την επιβίωση των βακτηρίων.

Δεν είναι όλοι οι βακτηριακοί οργανισμοί κατάλληλα εξοπλισμένοι γενετικά για να προβούν στην πρόσληψη ξένου γενετικού υλικού. Για το λόγο αυτό έχει αναπτυχθεί μια τεχνική που επιτρέπει την διαδικασία αυτή σε συγκεκριμένα και εύκολα σε χειρισμό στελέχη βακτηρίων. Ταυτόχρονα προσφέρεται το πλεονέκτημα του πλήρους ελέγχου της διαδικασίας καθώς οι οργανισμοί αυτοί δεν είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν την πρόσληψη γενετικού υλικού αυτόνομα. Συνοπτικά, τα βακτηριακά κύτταρα υποβάλλονται σε διάνοιξη οπών στο τοίχωμα και την μεμβράνη τους με χημικό τρόπο. Το γενετικό υλικό στο εξωκυττάριο διάλυμα προσκολλάται στην επιφάνεια των βακτηρίων και με τη βοήθεια μιας σύντομης θερμικής καταπόνησης εισέρχεται στο δεκτικό κύτταρο. Στα καταπονημένα κύτταρα προστίθεται άμεσα θρεπτικό υλικό και τους επιτρέπεται να πολλαπλασιαστούν σε βέλτιστες συνθήκες για σύντομο χρονικό διάστημα πριν γίνει η επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων.

Διαδικασία παρασκευής δεκτικών κυττάρων:

1. Μόλυνση 200mL αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB με 2mL υγρής καλλιέργειας *E. coli* DH5α με οπτική πυκνότητα $O.D._{600}=0.8$
2. Επώση στους 37°C υπό ανάδευση μέχρι την επίτευξη οπτικής πυκνότητας $O.D._{600}=0.2-0.3$
3. Φυγοκέντριση στις 6.000rpm στους 4°C για 10min
4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 10mL αποστειρωμένου διαλύματος $CaCl_2$ συγκέντρωσης 25mM στον πάγο
5. Φυγοκέντριση στις 6.000rpm στους 4°C για 10min
6. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5mL αποστειρωμένου διαλύματος $CaCl_2$ συγκέντρωσης 75mM στον πάγο
7. Τοποθέτηση στον πάγο για 20min με τακτική αλλά ήπια ανάδευση
8. Φυγοκέντριση στις 6.000rpm στους 4°C για 10min
9. Επαναδιάλυση σε 9.6mL αποστειρωμένου διαλύματος $CaCl_2$ συγκέντρωσης 100mM με προσθήκη 2.4mL αποστειρωμένης γλυκερόλης 100% στον πάγο
10. Αποθήκευση των κυττάρων στους -80°C

Διαδικασία μετασχηματισμού δεκτικών *E.coli*

1. Ξεπάγωμα των δεκτικών κυττάρων στον πάγο από τους -80°C
2. Προσθήκη του γενετικού υλικού (10-100ng περίπου) σε 80μL κυττάρων και τοποθέτηση στον πάγο για 30min
3. Θέρμανση των κυττάρων στους 42°C για 45sec και τοποθέτηση στον πάγο για περίπου 2min
4. Άμεση προσθήκη 200μL αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB και επώση στους 37°C για μία ώρα
5. Επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλίο που επιλεκτικά περιέχει 10μL από διάλυμα 100mM IPTG και 50μL από διάλυμα 80μg/mL x-Gal για τον οπτικό

διαχωρισμό αποικιών που προκύπτουν από επιτυχώς μετασχηματισμένα κύτταρα

6. Επώαση του τρυβλίου στους 37°C για 16 ώρες

Διαλύματα:

LB 10g τρυπτόνη ή πεπτόνη

5g εκχύλισμα ζύμης

5g NaCl

Ρύθμιση του pH στο 7.0 με NaOH

IPTG 1.2g σε 50mL αποστειρωμένο νερό για τελική συγκέντρωση 100mM

x-Gal 100mg σε 2mL διμεθυλφορμαμίδη για παρασκευή διαλύματος 2%

IV.2. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *A. tumefaciens* GV3101:pMP90

Διαδικασία παρασκευής δεκτικών κυττάρων:

1. Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB 50mL μολύνεται με 2mL υγρής καλλιέργειας *A. tumefaciens* GV3101:pMP90 που έχει αναπτυχθεί για 12 ώρες στους 28°C υπό ανάδευση
2. Επώαση στους 28°C υπό ανάδευση μέχρι οπτικής πυκνότητας $OD_{600} = 0.6$
3. Ψύξη για 10 στον πάγο και φυγοκέντρωση για 5min στις 3.000rpm στους 4°C
4. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1mL παγωμένου διαλύματος 20mM CaCl₂
5. Άμεση ψύξη των κυττάρων σε υγρό άζωτο

Διαδικασία μετασχηματισμού δεκτικών *A. tumefaciens* GV3101:pMP90

1. Προσθήκη 1μg πλασμιδίου σε 100μL δεκτικών κυττάρων και επώαση για 5min στον πάγο
2. Ψύξη του μείγματος στο υγρό άζωτο για 1min

3. Επώαση στους 37⁰C για 5min
4. Προσθήκη 1mL LB και επώαση για 2-3 ώρες στους 28⁰C υπό ανάδευση
5. Φυγοκέντριση για 30sec στις 13.000rpm και επαναδιάλυση σε 100μL
6. Επίστρωση τρυβλίων LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επώαση για 24-36 ώρες στους 28⁰C

IV.3. Απομόνωση πλασμιδιακού φορέα από υγρή καλλιέργεια *E. coli* με χρήση Kit (Nucleospin plasmid, Macherey Nagel)

Αρχή της μεθόδου

Σκοπός της μεθόδου είναι η απομόνωση κυκλικού πλασμιδιακού DNA καθαρό από πρωτεΐνες και RNA. Βασίζεται στην αρχή της αλκαλικής λύσης, όπου παρουσία NaOH και SDS αποδιατάσσονται τα κύτταρα συμπαρασύροντας το χρωμοσωμικό DNA των βακτηρίων και των πρωτεϊνών που το συνοδεύουν και μετά από εξουδετέρωση με οξικό κάλιο κατακρημνίζονται σε ένα αδιάλυτο λευκό ίζημα. Το πλασμιδιακό DNA, όντας διαλυτό στο υπερκείμενο, δεσμεύεται ιοντικά στην στήλη απομόνωσης και καθαρίζεται από τα άλατα και άλλα κυτταρικά κατάλοιπα με τη βοήθεια διαλυμάτων υψηλής περιεκτικότητας σε αιθανόλη. Τέλος το αυξημένης καθαρότητας DNA ανακτάται μετά από αποδέσμευσή του από τη στήλη με χρήση υδατικού διαλύματος.

Διαλύματα του Kit

- **A1:** υδατικό διάλυμα επαναδιάλυσης βακτηρίων που περιέχει RNase A
- **A2:** υδατικό διάλυμα που περιέχει NaOH και SDS
- **A3:** υδατικό διάλυμα με βάση το οξικό κάλιο που περιέχει υδροχλωρική Γουανιδίνη
- **AW:** υδατικό διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης
- **A4:** διάλυμα υψηλής περιεκτικότητας σε αλκοόλη
- **AE:** υδατικό διάλυμα 5mM Tris/HCl, pH 8.5

Διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με τη χρήση Kit

1. Φυγοκέντρηση 3mL υγρής καλλιέργειας *E. coli* στις 13.000rpm για 30sec
2. Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 250μL διαλύματος A1
3. Προσθήκη 250μL διαλύματος A2 και αναμονή για 5min ώστε να επιτευχθεί η λύση των κυττάρων
4. Προσθήκη 300μL διαλύματος A3 και ήπια ανάδευση για την εξουδετέρωση
5. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 10min
6. Μεταφορά του υπερκείμενου στην στήλη και άμεση φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min
7. Προσθήκη 500μL διαλύματος AW προθερμασμένου στους 50°C και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min
8. Προσθήκη 600μL διαλύματος A4 και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min
9. Απόρριψη του εκλούσματος και φυγοκέντρηση για επιπλέον 2min στις 13.000rpm
10. Προσθήκη 50μL διαλύματος AE ή νερού (ανάλογα με το είδος των χειρισμών που θα ακολουθήσουν). Αναμονή για ένα λεπτό και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min

Όλοι οι χειρισμοί γίνονται σε θερμοκρασία δωματίου και σε άσηπτες συνθήκες.

V. Ανάλυση Νουκλεϊνικών Οξέων

V.1.Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από φυτικά κύτταρα

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος που ακολουθείται για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA από φυτικά κύτταρα βασίζεται στην διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης με μηχανικό τρόπο, λειοτρίβηση, χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες και τα κυτταρικά υπολείμματα μετουσιώνονται και απομακρύνονται από το σύνολο του εκχυλίσματος με τη βοήθεια εξειδικευμένων

αντιδραστηρίων όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη και το CTAB (185). Ο καθαρισμός και η απομόνωση του DNA γίνονται με χρήση οργανικών διαλυτών και της ιδιότητας του μορίου να παραμένει αδιάλυτο σε αυτούς. Τελικά το DNA παραλαμβάνεται ελεύθερο από πρωτεΐνες και λιπίδια αλλά και από άλατα που προστίθενται στην διαδικασία απομόνωσης και ενδέχεται να παρεμποδίσουν την χρήση του σε περαιτέρω χειρισμούς.

Διαδικασία απομόνωσης γονιδιωματικού DNA

1. Λειοτρίβηση 100mg φρέσκου φυτικού ιστού σε erpendorfs με τη βοήθεια αποστειρωμένου εμβόλου μέσα σε υγρό άζωτο.
2. Προσθήκη 100μL διαλύματος CTAB προθερμασμένο στους 65⁰C με 1%/v β-μερκαπτοαιθανόλη
3. Επώαση στους 65⁰C για 15min
4. Προσθήκη 150μL χλωροφορμίου και 1/25 του όγκου ισοαμυλική αλκοόλη και καλή ανάδευση
5. Φυγοκέντρηση για 5min στις 13.000rpm
6. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο erpendorf και προσθήκη ισοπροπανόλης ίση με 0.8 του όγκου της φάσης.
7. Ήπια ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10min
8. Φυγοκέντρηση για 15min στις 13.000rpm μετά από την οποία το ίζημα του DNA είναι ορατό.
9. Απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 500μL παγωμένης 70% αιθανόλης για να πλυθεί το ίζημα
10. Φυγοκέντρηση 5min στις 13.000rpm, απόρριψη του υπερκείμενου και επανάληψη των βημάτων 9 και 10
11. Εξάτμιση των υπολειμμάτων της αιθανόλης και επαναδιάλυση του ιζήματος του DNA σε 20-50μL αποστειρωμένου υπερκάθαρου νερού ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος

Διάλυμα CTAB

50mM Tris (pH 8.0)

50mM Tris (pH 6.0)

1.1M NaCl

6.4M LiCl

0.1% Tween 20

1% CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide)

V.2. Καθαρισμός DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο

Αρχή της μεθόδου

Μετά το τέλος των χειρισμών ανακτάται υδατικό διάλυμα πλούσιο σε μεγάλης καθαρότητας DNA. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται για να ανακτηθεί καθαρό DNA μετά από χειρισμούς που μολύνουν αναγκαστικά το δείγμα με ένζυμα και διαλύματα αλάτων που πρέπει να απομακρυνθούν πριν ακολουθήσει επόμενος χειρισμός του δείγματος. Τέτοιες περιπτώσεις είναι συχνά οι εμβόλιμες περιοριστικές πέψεις μορίων DNA που ακολουθούνται από αντιδράσεις σύνδεσης των τμημάτων που προκύπτουν με νέα μόρια.

Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA, λόγω του πολικού του κορμού, είναι διαλυτό στο νερό και αδιάλυτο σε οργανικούς διαλύτες. Το σύστημα φαινόλης-χλωροφορμίου είναι ικανό να απομακρύνει στην οργανική φάση τα πρωτεϊνικά υπολείμματα των κυττάρων. Διαλύματα υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα κατακρημνίζουν τα μόρια του DNA. Τα άλατα στη συνέχεια απομακρύνονται παρουσία αιθανόλης και το ίζημα του DNA επαναδιαλύεται σε νερό.

Διαδικασία καθαρισμού DNA

1. Στο προς καθαρισμό δείγμα προστίθεται τριπλάσιος όγκος υπερκίθουρου αποστειρωμένου νερού και στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος εξισορροπημένης φαινόλης (pH 8.0).
2. Φυγοκέντρηση για 5min στις 13.000rpm

3. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf και γίνεται προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης-χλωροφορμίου. Ακολουθεί σύντομη έντονη ανάδευση
4. Φυγοκέντρηση για 5min στις 13.000rpm
5. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf με προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και ακολουθεί σύντομη και έντονη ανάδευση
6. Φυγοκέντρηση για 5min στις 13.000rpm
7. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf και ακολουθεί προσθήκη 100% παγωμένης αιθανόλης και 1/20 του όγκου οξικού νατρίου 3M (pH 5.2). Έντονη ανάδευση και ψύξη στους -20°C για 16 ώρες ή εναλλακτικά στους -80°C για 45min
8. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 20min στους 4°C
9. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 500μL 70% παγωμένης αιθανόλης για την πλύση του ιζήματος και την απομάκρυνση των εναπομείναντων αλάτων
10. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 20min στους 4°C
11. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και εξάτμιση των υπολειμμάτων αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου
12. Επαναδιάλυση του ιζήματος DNA σε 20-50μL αποστειρωμένου υπερκάθαρου νερού ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος και τον χειρισμό που θα ακολουθήσει

V.3. Απομόνωση RNA από φυτικά κύτταρα

Αρχή της μεθόδου

Σκοπός της μεθόδου είναι να απομονωθεί RNA ελεύθερο από πρωτεΐνες, λιπίδια και κυτταρικά υπολείμματα αλλά και από DNA μόρια. Η μέθοδος βασίζεται στις ιδιότητες που έχει το RNA και είναι ίδιες με αυτές του DNA. Συνεπώς αναπόφευκτα μαζί με τα RNA μόρια απομονώνονται και DNA. Για το λόγο αυτό στο τέλος της διαδικασίας γίνεται μια πέψη των δειγμάτων RNA με ένζυμα που καταστρέφουν

επιλεκτικά μόνο τα μόρια DNA και λέγονται DNases. Καθώς τα RNA μόρια είναι πολύ ευαίσθητα και αποικοδομούνται πολύ εύκολα η διαδικασία απομόνωσης γίνεται με μεγάλη προσοχή και σε άσηπτες συνθήκες.

Διαδικασία απομόνωσης RNA

1. Λειοτρίβηση 100mg φρέσκου ιστού σε υγρό άζωτο και προσθήκη 400μL διαλύματος εκχύλισης και 400μL εξισορροπημένης φαινόλης (pH 8.0).
Σύντομη και έντονη ανάδευση
2. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 15min στους 4⁰C
3. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf και προσθήκη 10μL 12M LiCl. Ακολουθεί ψύξη στους -20⁰C για 16 ώρες
4. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 12min στους 4⁰C
5. Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 100μL αποστειρωμένου υπερκάθαρου νερού. Έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση για 2min στις 13.000min στους 4⁰C
6. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθενται εκ νέου 20μL LiCl. Ακολουθεί ψύξη στους -20⁰C για 16 ώρες
7. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 8min στους 4⁰C
8. Αφαίρεση του υπερκείμενου και πλύσιμο του ιζήματος με 400μL 70% παγωμένης αιθανόλης
9. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 5min στους 4⁰C
10. Επανάληψη των βημάτων 8 και 9 και προσθήκη 200μL αποστειρωμένου υπερκάθαρου νερού και 20μL 3M NaOAc και 600μL παγωμένης 95% αιθανόλης
11. Ψύξη των δειγμάτων στους -80⁰C για μία τουλάχιστον ώρα
12. Φυγοκέντρηση για 10min στις 13.000rpm στους 4⁰C
13. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 20-50μL υπερκάθαρου αποστειρωμένου νερού ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος

Διάλυμα εκχύλισης (5mL)

500μL	10% SDS (sodium dodecyl sulfate)
0.05 gr	TPNS (Triisopropyl-naphthalene sulfonic acid)
0.2 gr	PAS (<i>p</i> -4-aminosalicylic acid)
50μL	1M Tris pH 7.5
10μL	0.5M EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)
100μL	BME (β -mercaptoethanol)
4.34mL	dH ₂ O ₂

Η ποσότητα RNA στο κάθε δείγμα υπολογίζεται μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας με τη βοήθεια ενός φασματοφωτόμετρου. Μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 260nm για τον προσδιορισμό της ποσότητας νουκλεϊκών οξέων και στα 280nm για τον προσδιορισμό της ποσότητας πρωτεϊνών. Ο λόγος των δύο τιμών πρέπει να κυμαίνεται ανάμεσα στις τιμές 1.7 με 2.0 και σημαίνει υψηλή καθαρότητα δείγματος από πρωτεΐνες. Συνήθως σε 99μL dH₂O₂ προστίθενται 1μL του δείγματος και η συνάρτηση η οποία χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA στο δείγμα είναι: $C = A_{260} \times \text{dilution factor} \times 40 / 1.000$.

Τα δείγματα στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε απλή πηκτή αγαρόζης συνήθως 0.8% ή 1.0% έτσι ώστε να διαπιστωθεί ότι είναι ανέπαφα και δεν έχουν αποικοδομηθεί κατά τη διαδικασία. Αν παρατηρηθεί αποικοδόμηση του RNA τότε τα δείγματα δύσκολα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μελέτη έκφρασης ανάλογα βέβαια και με την έκταση της αποικοδόμησης.

V.4. Αναστολή της μεταγραφής

Αρχή της μεθόδου

Σκοπός της μεθόδου είναι να ανασταλεί φαρμακολογικά η μεταγραφή όλων των γονιδίων για να διευκολυνθεί η μελέτη της προστασίας των mRNA μορίων μέσω του NO. Κάθε mRNA μόριο έχει έναν συγκεκριμένο χρόνο ημιζωής μέσα στο κύτταρο και

στη συνέχεια αποικοδομείται. Ο χρόνος ημιζωής μπορεί να αποτελεί σημείο ελέγχου του επιπέδου διαθεσιμότητας των μεταγράφων στο κύτταρο. Η μεταβολή του είναι σε θέση να επηρεάζει τα επίπεδα ενός μεταγράφου στον ίδιο βαθμό που τα επηρεάζει η ενίσχυση ή αντίστοιχα επιβράδυνση του ρυθμού μεταγραφής.

Η ακτινομυκίνη D (Actinomycin D, ActD) χρησιμοποιείται ευρέως ως αντιβιοτικό και αντικαρκινικό φάρμακο και αναστέλλει την DNA-εξαρτώμενη DNA και RNA σύνθεση (217, 29). Έχει την ικανότητα να δεσμεύεται σε μονόκλινα και δίκλινα DNA μόρια, σε υβριδικά DNA-RNA σύμπλοκα αλλά όχι σε μονόκλινα RNA μόρια (38). Εμποδίζει τον υβριδισμό μορίων DNA με τα συμπληρωματικά τους DNA ή RNA μόρια (114). Επίσης, δεσμεύεται στα DNA-τμήματα των συμπλόκων έναρξης της μεταγραφής ανακόπτοντας με αυτόν τον τρόπο τη διαδικασία μεταγραφής (156).

Διαδικασία

Φυτά 21 ημερών τοποθετήθηκαν σε υγρό θρεπτικό διάλυμα Hogland, προστατευμένο από το φώς, το οποίο περιείχε ActD 1μg/mL για 4 ώρες στους 23°C. Στη συνέχεια χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, την ομάδα μεταχείρισης με NO (ομάδα 1) και την ομάδα ελέγχου (ομάδα 2). Στο θρεπτικό διάλυμα της ομάδας 1 προστέθηκε GSNO σε τελική συγκέντρωση 0.5mM, παρουσία ActD 1μg/mL. Στο θρεπτικό διάλυμα της ομάδας 2 προστέθηκε όγκος απεσταγμένου νερού ίσος με αυτόν του GSNO διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε στην ομάδα 1, παρουσία ActD 1μg/mL. Τα φυτά των δύο ομάδων επώαστηκαν για 3 ώρες. Οι ρίζες των φυτών αποθηκεύτηκαν άμεσα στους -80°C και ακολούθησε απομόνωση RNA, cDNA σύνθεση και ημιποσοτική ανάλυση των επιπέδων των *MtPHGPX* μεταγράφων των δύο ομάδων.

V.5. Πέψη DNA μορίων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Αρχή της μεθόδου

Για τον ανασυνδυασμό και την εύκολη μεταχείριση μορίων DNA καθώς και για τη δημιουργία χιμαιρικών μορίων είναι απαραίτητη η χρήση εργαλείων που επιτρέπουν την τμηματοποίηση των μεγάλων μορίων σε μικρότερα. Είναι μια

διαδικασία που λαμβάνει χώρα στη φύση ως μηχανισμός άμυνας έναντι ελεύθερων DNA μορίων εισβολέων με στόχο την καταστροφή τους. Στο εργαστήριο χρησιμοποιείται για την αποκοπή τμημάτων DNA σε συγκεκριμένα σημεία γνωστά στον ερευνητή καθώς τα ένζυμα που επιτελούν την τμηματοποίηση αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες σε δίκλινα μόρια και τέμνουν τοπικά και κατευθυνόμενα.

Τα ένζυμα αυτά λειτουργούν υπό συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και ιοντικού περιβάλλοντος που παρέχονται από τον κατασκευαστή. Πολλές φορές είναι ανάγκη να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα δύο ένζυμα και τότε επιλέγονται οι βέλτιστες συνθήκες που είναι κοινές για τα δύο ένζυμα και παρέχονται από τον κατασκευαστή. Στην αντίδραση περιλαμβάνεται το μόριο προς πέψη, το ένζυμο ή τα ένζυμα και τα διαλύματα που είναι απαραίτητα για την βέλτιστη δραστικότητα του ενζύμου. Η αντίδραση επιτελείται σε συγκεκριμένη σταθερή θερμοκρασία και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα που είναι ανάλογο της ποσότητας του υποστρώματος και της ποσότητας του ενζύμου.

Πίνακας 9: Περιοριστικά ένζυμα (New England BioLabs)

Ένζυμο περιορισμού	Αλληλουχία αναγνώρισης	Διάλυμα πέψης	Βέλτιστη θερμοκρασία	Προσθήκη BSA
EcoRI	G/AATTC	1-4	37 ⁰ C	-
Sall	G/TCGAC	4	37 ⁰ C	-
BamHI	G/GATCC	3	37 ⁰ C	+
NcoI	C/CATGG	3	37 ⁰ C	-
NotI	GC/GGCCGC	3	37 ⁰ C	+

Πίνακας 10: Πρότυπη αντίδραση μονής πέψης

Δείγμα DNA	Μέχρι 1μg
Ένζυμο περιορισμού	1μL (10U)
BSA	Τελική συγκέντρωση 100μg/mL (1X)
Διάλυμα 10X	5μL (1X)
H₂O	Μέχρι τα 50μL

Η επώαση διαρκεί 1-3 ώρες ανάλογα με τον σκοπό της πέψης (για διαγνωστικές πέψεις 1 ώρα και για πλήρεις πέψεις 2-3 ώρες). Η προσθήκη του BSA (Bovine Serum Albumin) είναι επιλεκτική και προτείνεται από τον κατασκευαστή.

V.6. Ανάλυση τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης

Αρχή της μεθόδου

Σκοπός της μεθόδου είναι ο διαχωρισμός των τμημάτων DNA που περιέχονται σε ένα δείγμα με βάση το μέγεθός τους. Η τεχνική εκμεταλλεύεται την πολικότητα των μορίων DNA και τα αναγκάζει να κινηθούν με την φορά του ηλεκτρικού ρεύματος μέσα από το πλέγμα μιας πηκτής αγαρόζης. Στην περίπτωση όπου τα τμήματα είναι γραμμικά δίκλινα μόρια, αυτά κινούνται αναλογικά με το μήκος τους και τα μικρότερα έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν ταχύτερα και να διανύουν μεγαλύτερες αποστάσεις σε σχέση με τα μακρύτερα μόρια. Οι προπαρασκευασμένοι μάρτυρες είναι ενδεικτικοί των αποστάσεων που διανύουν συγκεκριμένα μεγέθη γραμμικών τμημάτων DNA.

Η απεικόνιση γίνεται με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), μίας ουσίας που εγκλωβίζεται ανάμεσα σε δίκλινα τμήματα DNA, υπό έντονη UV ακτινοβολία. Ένα διάλυμα γλυκερόλης με χρωστική αναμιγνύεται με το δείγμα πριν την τοποθέτησή του στην πηκτή για να είναι εύκολη η παρακολούθηση του δείγματος στην πορεία του εντός της πηκτής αλλά και για να αυξήσει το βάρος του δείγματος και να κάνει την τοποθέτησή του στις ειδικές θέσεις υποδοχής πιο εύκολη. Η συγκέντρωση της αγαρόζης υπολογίζεται με βάση το αναμενόμενο μέγεθος των τμημάτων DNA προς διαχωρισμό. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση τόσο λιγότερο μεταναστεύουν τα τμήματα και αντίστροφα σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και σε συγκεκριμένη ένταση ρεύματος.

Διαλύματα

50X TAE	24.2% Tris	Loading Buffer 10X	35% glycerol
	57.1mL/L Acetic acid		0.25% bromophenol blue
	100mL/L 0.5M EDTA		
EtBr	0.5mg/mL H ₂ O		

Διαδικασία ηλεκτροφόρησης τμημάτων DNA

- Σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 1X TAE (ορίζεται από τον κατασκευαστή της συσκευής ηλεκτροφόρησης) προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης για την επίτευξη προεπιλεγμένης συγκέντρωσης πηκτής. Το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να ομογενοποιηθεί
- Μόλις η πηκτή ψυχθεί στους 50⁰C περίπου, προστίθεται 0.007% v/v EtBr και το μείγμα πολυμερίζεται σταδιακά σε θερμοκρασία δωματίου μέσα στην ειδική κατασκευή της συσκευής αφού βυθιστεί σε αυτή ειδική δομή που δημιουργεί τις υποδοχές όπου θα τοποθετηθεί το δείγμα
- Μετά τον πολυμερισμό της πηκτής αφαιρείται η ειδική δομή και η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η πηκτή καλύπτεται με ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE.
- Τα δείγματα DNA αναμιγνύονται με Loading buffer σε τελική συγκέντρωση 1X και μεταφέρονται στις ειδικές υποδοχές
- Στην πηκτή εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο τάσης έως 100V ανάλογα με τον σκοπό της ηλεκτροφόρησης
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετείται σε τράπεζα UV ακτινοβολίας με σκοπό την απεικόνιση των τμημάτων και παρατηρείται με τη χρήση προστατευτικών επιφανειών ή γυαλιών από τον ερευνητή

V.7. Επανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Αρχή της μεθόδου

Μετά την τεχνική της ηλεκτροφόρησης και αφού τα τμήματα DNA έχουν διαχωριστεί με βάση το μέγεθός τους υπάρχει συχνά η ανάγκη να επανακτηθούν συγκεκριμένα τμήματα από αυτά. Για παράδειγμα, μετά από μια πέψη ενός φορέα για να εξαχθεί ένα ένθεμα και να χρησιμοποιηθεί σε μία αντίδραση σύνδεσης με νέο φορέα. Επίσης χρησιμοποιείται για να απομονωθούν τμήματα DNA από μείγμα τμημάτων όπου το μόνο διαφορετικό χαρακτηριστικό με βάση το οποίο μπορούν να διαχωριστούν είναι το μέγεθος.

Για λόγους συντομίας και ευκολίας η διαδικασία αυτή γίνεται με τη βοήθεια ειδικού kit (Qiagen; QIAquick Gel Extraction Kit). Συνοπτικά, απομακρύνεται η αγαρόζη και το DNA δεσμεύεται σε ειδικές στήλες. Στη συνέχεια ακολουθεί η ίδια διαδικασία πλύσης και έκλουσης του DNA όπως και στα υπόλοιπα κοινά kit απομόνωσης DNA.

Διαδικασία:

1. Αφαιρείται με νυστέρι η περιοχή της πηκτής αγαρόζης που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA με στόχο να επιτευχθεί το μικρότερο δυνατό μέγεθος
2. Το κομμάτι πηκτής που αφαιρέθηκε ζυγίζεται και σε αυτό προστίθεται τριπλάσιος όγκος διαλύματος QG που σαν στόχο έχει την αποδιάταξη της αγαρόζης
3. Θέρμανση στους 50⁰C για περίπου 10min έως ότου να επιτευχθεί πλήρης τήξη της πηκτής
4. Προσθήκη ενός όγκου ισοπροπανόλης και έντονη ανάδευση
5. Τοποθέτηση του μείγματος σε ειδική στήλη και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min
6. Πλύση της στήλης για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αγαρόζης με 500μL επιπλέον διάλυμα QG
7. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min
8. Πλύση με 750μL διαλύματος PE για την απομάκρυνση των αλάτων και την παραμονή του DNA στην στήλη καθώς περιέχει αιθανόλη. Αναμονή για 2-3min
9. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min και επανάληψη για άλλο 1min με στόχο να απομοκρυνθούν υπολείμματα αιθανόλης που θα δυσκολέψουν περαιτέρω χειρισμούς του δείγματος
10. Έκλουση του DNA με προσθήκη στη στήλη 30μL αποστειρωμένου υπερκάθαρου νερού και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min

V.8. Αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA (Ligation)

Αρχή της μεθόδου

Στόχος της τεχνικής αυτής είναι να συνδεθούν τμήματα DNA με τρόπο κατευθυνόμενο και ελεγχόμενο ως προς το σημείο σύνδεσής τους. Η διαδικασία πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός ενζύμου που λέγεται λιγάση. Έχει την ικανότητα να συνδέει και να δημιουργεί φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ συμβατών και συμπληρωματικών άκρων καταναλώνοντας κάθε φορά ένα μόριο

ΑΤΡ. Το ένζυμο αυτό υπό φυσιολογικές συνθήκες βοηθά την σύνδεση μεταξύ άκρων DNA που έχουν αποκοπεί για να αποφευχθεί ή να εκτονωθεί η υπερ-ελίκωση των πλασμιδίων που βρίσκονται στα βακτήρια.

Διαδικασία:

Συνήθως η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται για να εισαχθεί ένα ένθεμα σε κάποιον φορέα. Βασική προϋπόθεση είναι τα δύο μέρη (ένθεμα και φορέας) να έχουν συμβατά άκρα, τα οποία έχουν δημιουργηθεί μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Μετά από την πέψη τα δύο μέρη πρέπει να έχουν καθαριστεί από ένζυμα και διαλύματα αλάτων. Όταν η αντίδραση σύνδεσης αφορά σύνδεση ενθέματος και φορέα σημαντικό είναι να ληφθεί υπόψη το μέγεθος των δύο τμημάτων για πρακτικούς και μηχανικούς λόγους, όπως και η ποσότητα των δύο έτσι ώστε να αυξηθεί το ποσοστό επιτυχίας της μεθόδου. Η σχέση αυτή περιγράφεται από την παρακάτω συνάρτηση:

$$\text{ng ενθέματος} = \frac{\text{ng φορέα} \times \text{kb ενθέματος} \times 1/3}{\text{kb φορέα}}$$

Το ένζυμο έχει μέγιστη δραστηριότητα υπό βέλτιστες συνθήκες συγκέντρωσης αλάτων, θερμοκρασίας, συγκέντρωσης DNA και συγκέντρωσης ΑΤΡ. Οι συνθήκες αυτές περιγράφονται από τον κατασκευαστή και το ρυθμιστικό διάλυμα παρέχεται μαζί με το ανασυνδυασμένο και απομονωμένο ένζυμο.

Πίνακας 11: Ενδεικτική αντίδραση σύνδεσης

2X Ρυθμιστικό διάλυμα	5μL
Λιγάζη	1μL
Ένθεμα	Υπολογισμός με συνάρτηση
Φορέας	Υπολογισμός με συνάρτηση
H₂O	Μέχρι τελικό όγκο 10μL

V.9. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αρχή της μεθόδου

Σκοπός της τεχνικής είναι ο πολλαπλασιασμός γραμμικών τμημάτων DNA σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η διαδικασία γίνεται ενζυμικά με τη βοήθεια της πολυμεράσης και υπό φυσιολογικές συνθήκες επιτυγχάνει τον διπλασιασμό του γενετικού υλικού πριν από μιτωτικές διαιρέσεις σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς (46). Το ένζυμο που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο έχει απομονωθεί από ένα θερμόφιλο βακτήριο και έχει ως βέλτιστη θερμοκρασία τους 72⁰C. Ο λόγος που επιλέχθηκε είναι καθαρά πρακτικός καθώς τα υπόλοιπα βήματα της αντίδρασης όπως η αποδιάταξη των αλυσίδων και ο υβριδισμός των εκκινητών γίνονται σε θερμοκρασίες εξαιρετικά υψηλές. Μόνο μια πολυμεράση ενός θερμόφιλου οργανισμού θα μπορούσε να διατηρήσει για πολλούς κύκλους επανάληψης σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες τη δραστηριότητά του.

Η αντίδραση χρησιμοποιεί ένα δίκλωνο γραμμικό μόριο DNA ως εκμαγείο το οποίο αρχικά αποδιατάσσεται σε δύο ξεχωριστούς κλώνους. Ειδικά σχεδιασμένοι τεχνητοί εκκινητές υβριδίζονται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες και σημαίνουν το εναρκτήριο σημείο της επιμήκυνσης. Το ένζυμο προσκολλάται στους εκκινητές και ενσωματώνει τα κατάλληλα συμπληρωματικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια συνεχίζοντας την πορεία του με κατεύθυνση 5'-3' με βάση την αρίθμηση των ατόμων άνθρακα που σχηματίζουν τους δεσμούς μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων. Αποτέλεσμα είναι η σύνθεση δύο πανομοιότυπων κλώνων με τους αρχικούς, άρα και δύο πανομοιότυπων δίκλωνων DNA τμημάτων.

Σε ορισμένες περιπτώσεις και για καθαρά διαγνωστικούς λόγους αντί για μόρια DNA χρησιμοποιούνται απευθείας βακτηριακά κύτταρα (Colony PCR). Στόχος είναι συνήθως να διαπιστωθεί αν μια αποικία που προήρθε από ένα μοναδικό κύτταρο περιέχει μια συγκεκριμένη αλληλουχία. Τα κύτταρα λόγω του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται σε αυτή την περίπτωση και λόγω της πολύ υψηλής θερμοκρασίας διαρρηγνύονται και το DNA που περιέχεται σε αυτά γίνεται προσβάσιμο στους παράγοντες της αντίδρασης

Διαδικασία:

Απαραίτητη προετοιμασία είναι η σωστή επιλογή των εκκινητών ως προς την αλληλουχία τους και την θερμοκρασία στην οποία προσδένονται πάνω στο μόριο DNA. Σημαντικό είναι το ζεύγος εκκινητών που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε αντίδραση να έχουν παρόμοια θερμοκρασία πρόσδεσης. Όσο πιο υψηλή είναι η θερμοκρασία του ζεύγους εκκινητών τόσο πιο ειδική θα είναι η αντίδραση και τόσο πιο πιθανό είναι να ενισχυθεί το επιθυμητό τμήμα DNA.

Η συγκέντρωση του υποστρώματος, δηλαδή του DNA, μπορεί να παίζει καθοριστικό ρόλο στην έκβαση της αντίδρασης. Πολύ μικρές συγκεντρώσεις μπορεί να μην είναι ικανές να επιτρέψουν να ενισχυθεί σε ανιχνεύσιμα επίπεδα το τμήμα που μας ενδιαφέρει. Πολύ μεγάλες ποσότητες ενδέχεται να εμποδίσουν την επιτυχή έκβαση της αντίδρασης και αυτή να μην πραγματοποιηθεί. Το ίδιο ισχύει και για την συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται. Η προσθήκη χλωριούχου μαγνησίου ($MgCl_2$) είναι απαραίτητη για την λειτουργικότητα του ενζύμου. Η συγκέντρωσή του μπορεί να επηρεάσει την εξειδίκευση των εκκινητών και επομένως τον περιορισμό της ενίσχυσης μη επιθυμητών τμημάτων. Σε υπερβολικά μεγάλες και μικρές συγκεντρώσεις αναστέλλει την αντίδραση.

Πίνακας 12: Ενδεικτική αντίδραση PCR (και colony PCR)

DNA εκμαγείο	10-100ng
Εκκινητής A (10μM)	2.5μL
Εκκινητής B (10μM)	2.5μL
Πολυμεράση (1U/μL)	0.5-1μL
5X Ρυθμιστικό διάλυμα	10μL
Νουκλεοτίδια (10mM)	1μL
H₂O	Μέχρι τα 50μL

10X Ρυθμιστικό διάλυμα για Colony PCR

500mM KCl

100mM Tris-HCl (pH 9.0)

1% Triton X-100

Πίνακας 13: Βήματα θερμοκυκλοποιητή (για απλή και colony PCR)

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	94 ⁰ C	3min	Επανάληψη για 25-35 κύκλους
Αποδιάταξη κλώνων	94 ⁰ C	40sec	
Υβριδισμός εκκινητών	55-60 ⁰ C	40-50sec	
Επιμήκυνση	72 ⁰ C	20sec-2.5min*	
Τελική επιμήκυνση	72 ⁰ C	10min	

* Ο χρόνος της επιμήκυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος προς ενίσχυση. Συνήθως οι πολυμεράσες είναι σε θέση να επιμηκύνουν κατά 1kb/min

Πίνακας 14: Εκκινητές

Όνομα	Αλληλουχία	Γονίδιο	Πηγή DNA
ShortF	ATGCTTTGTAGTACTTCAACAAC	MtPHGPXβ	cDNA ή γονιδιωματικό
LongF	ATCGGCACTTGGACACGAGAAGAA	MtPHGPXα	cDNA ή γονιδιωματικό
ClonR	ATTTATTCATGTTCCCATC	MtPHGPXα+β	cDNA ή γονιδιωματικό
ShortSalF	CGTGGTCGACATGCTTTGTAGTACT	MtPHGPXβ	cDNA
LongSalF	GCAGGTCGACATGGAGTTACTCGG	MtPHGPXα	cDNA
BothBamHR	ATAGGGATCCAGTGCATCAAGCAACT-TCAGC	MtPHGPXα+β	cDNA
35s RI	ATCAGAATTCAAAGATTCAAATAGAG-GACC	CaMV 35S	pCambia2201
35s SalI	ATCAGTCGACAGTCCCCCGTGTTC-TC	CaMV 35S	pCambia2201
GFPBstEI	ATCAGGTAACCTTTACTTGTACAGCT-CGTC	35S-GFP	P35SEGFP-N1

Πίνακας 15: Ζεύγη εκκινητών

Ζεύγος εκκινητών	Θερμοκρασία	Μήκος προϊόντος (bp)
ShortF – ClonR	55 ⁰ C	699
LongF – ClonR	55 ⁰ C	636
LongSalF – BothBamHR	58 ⁰ C	658
ShortSalF – BothBamHR	58 ⁰ C	721
LongSalF – BothBamHR	57 ⁰ C	2758

V.10. Αντίστροφη μεταγραφή DNA από mRNA (cDNA σύνθεση)

Αρχή της μεθόδου

Η αντίστροφη μεταγραφή DNA από mRNA μόρια είναι μια διαδικασία η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες πραγματοποιείται ενζυμικά από ρετροϊούς (178). Ιοί που για γενετικό τους υλικό χρησιμοποιούν RNA αντί για DNA μεταφράζουν την αντίστροφη μεταγραφάση εκμεταλλευόμενοι τους μηχανισμούς των κυττάρων ξενιστών. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί ως εκμαγείο μονόκλιωνα μόρια RNA και χρησιμοποιώντας δεσοξυριβονουκλεοτίδια μεταγράφουν τον πρώτο κλώνο ενός μορίου DNA (cDNA). Στη συνέχεια είναι δυνατό να παραχθούν δίκλιωνα μόρια DNA με επακόλουθη αντίδραση PCR.

Διαδικασία:

Είναι μεγάλης σημασίας να χρησιμοποιηθεί καλής ποιότητας RNA μετά από έλεγχο μέσω ηλεκτροφόρησης σε αποστειρωμένη πηκτή αгарόζης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τον κατασκευαστή του ενζύμου (Invitrogen, Superscript II).

- Σε 1 - 5μg ολικού RNA προστίθενται 1 μl νουκλεοτιδίων 40mM, 1μL Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 μg/ml) και αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό μέχρι τον όγκο των 12μL

- Θέρμανση του μείγματος στους 65⁰C για 5min και στη συνέχεια άμεση τοποθέτηση στον πάγο
- Προσθήκη 2μL 0.1 M DTT, 1 μL αναστολέα RNασών RNaseOUT™ (40 units/μl) και 4μL 5X ρυθμιστικού διαλύματος
- Ήπια ανάδευση και θέρμανση του μείγματος για 2min στους 42⁰C
- Προσθήκη 1μL SuperScript™ II RT (200U)
- Επώαση στους 42⁰C για 50min
- Θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου και διακοπή της αντίδρασης στους 70⁰C για 15min.

V.11. Ποσοτική PCR (Real-time PCR)

Αρχή της μεθόδου

Σκοπός της μεθόδου είναι η ποσοτικοποίηση της έκφρασης ενός γονιδίου σε σχέση με ένα σύστημα αναφοράς. Η τεχνική βασίζεται στην κλασική αντίδραση PCR όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η διαφορά είναι ότι σε κάθε νέο δίκλωνο τμήμα DNA που παράγεται ενσωματώνονται μόρια φωσφορίζουσας χρωστικής τα οποία στη συνέχεια ανιχνεύονται και ποσοτικοποιούνται από το ειδικό μηχάνημα στο οποίο εκτελείται η αντίδραση (200). Τα τμήματα DNA που ενισχύονται με την τεχνική αυτή πρέπει να είναι μικρά σε μήκος (150-220bp) και τα συγκρίσιμα μεταξύ τους να έχουν παρόμοιο μέγεθος με απόκλιση 20-30 νουκλεοτιδίων. Η αρχή αυτή διευκολύνει την ακριβέστερη ποσοτικοποίηση καθώς δεν είναι ελέγξιμο μέγεθος το πλήθος των μορίων σήμανσης που ενσωματώνονται σε κάθε δίκλωνο τμήμα DNA. Θεωρητικά σε παρόμοιο μήκος προϊόντος δεσμεύεται παρόμοιο πλήθος μορίων σήμανσης.

Σημαντικό κομμάτι στην εκτέλεση της τεχνικής είναι οι εκκινητές που επιλέγονται για την ενίσχυση των προϊόντων στόχων. Η περιοχή στην οποία σχεδιάζονται επιβάλλεται να είναι μοναδική για το προϊόν υπό διερεύνηση και να μην ενισχύουν άλλες περιοχές παράγοντας διαφορετικά προϊόντα. Η τεχνική παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και μπορεί να διακρίνει ανάμεσα σε δύο

διαφορετικά προϊόντα βασιζόμενη στη θερμοκρασία αποδιάταξής τους ακόμα και σε πολύ χαμηλά επίπεδα ενίσχυσης. Το ίδιο συμβαίνει και για την ενίσχυση ενός μοναδικού γονιδίου όταν ως εκμαγείο προσφέρεται ταυτόχρονα με το cDNA και γονιδιωματικό DNA που περιέχει και τις ακολουθίες των ιντρονίων. Για το λόγο αυτό είναι πολύ σημαντική η απομάκρυνση γονιδιωματικού DNA από το RNA πριν δρομολογηθεί η παραγωγή cDNA που προορίζεται για ανάλυση με Real-time PCR. Τέλος πολύ σημαντική είναι η επιλογή της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκνητών, καθώς όλες οι αντιδράσεις των δειγμάτων προς διερεύνηση επιβάλλεται να γίνουν ταυτόχρονα υπό τις ίδιες συνθήκες.

Διαδικασία:

Το μείγμα της αντίδρασης περιγράφεται από τον κατασκευαστή (SYBR® FAST qPCR Master Mix, Kapa, UK).

Πίνακας 16: Ενδεικτική αντίδραση Real-time PCR

Αντιδραστήρια	Τελική Συγκέντρωση	Ανά 20 μl αντίδρασης
H ₂ O	-	7.8 μl
2x KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix	1x	10 μl
Forward primer (10 μM)	0.3 μM	0.6 μl
Reverse primer (10 μM)	0.3 μM	0.6 μl
cDNA (100 ng – 10 pg/rxn)		1 μl
Τελικός όγκος		20 μl

Το πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή προτείνεται επίσης από τον κατασκευαστή των αντιδραστηρίων και του μηχανήματος Real-time PCR (Mx3005Pro, Stratagene).

Πίνακας 17: Βήματα θερμοκυκλοποιητή Real-time PCR

Βήμα	Θερμοκρασία και Χρόνος	
Αρχική Αποδιάταξη	10 min at 95°C	
Αποδιάταξη	10 sec at 95°C	40 cycles
Υβριδισμός	20 sec at 58°C	
Επιμήκυνση	10 sec at 72°C Data acquisition point	
Καμπύλη αποδιάταξης	65 μέχρι 95°C ανά 30 sec	

Για τα γονίδια υπό διερεύνηση με την Real-time PCR χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές.

Πίνακας 18: Εκκινητές Real-time PCR

Όνομα	Αλληλουχία	Γονίδιο	Πηγή DNA
RT LongF	ATCGGCACTTGGACACGAGAA	MtPHGPXα	cDNA
RTShortF	TCTTCCTTACTTCGCTTCTT	MtPHGPXβ	cDNA
RTLlongR	ACATCGTTACCCTTAGCATCC	MtPHGPXα+β	cDNA
RTBothF	GAACAGATCACACCATGGCAT	MtPHGPXα+β	cDNA
RTBothR	CACATTGTGAGGCAACATTGAC	MtPHGPXα+β	cDNA

Τα ζεύγη που προκύπτουν από αυτούς τους εκκινητές καθώς και οι θερμοκρασίες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν και το μέγεθος των προϊόντων που ενισχύουν είναι τα εξής.

Πίνακας 19: Ζεύγη εκκινητών Real-time PCR

Ζεύγος εκκινητών	Θερμοκρασία	Μήκος προϊόντος (bp)
RTLlongF – RTLlongR	58°C	173
RTShortF – RTLlongR	58°C	191
RTBothF – RTBothR	58°C	141

VI. Ετερόλογη Έκφραση

VI.1. Παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού

Για να μελετήσουμε τη λειτουργία, να προσδιορίσουμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό ή ακόμα και να παρατηρήσουμε την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν μία συνήθης τεχνική είναι ο παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού (78). Η ετερόλογη έκφραση μιας φυτικής πρωτεΐνης σε φύλλα καπνού είναι ιδιαίτερα προνομιακή καθώς μιμείται πιο πιστά το αυτόλογο σύστημα έκφρασης. Όλες οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις μπορούν να επιτελεστούν, τα οργανίδια όπου μπορεί να κατευθύνονται κάποιες πρωτεΐνες υπάρχουν και αναγνωρίζουν σχεδόν τα ίδια μηνύματα. Τέλος, μεταφέροντας μια πρωτεΐνη προς έκφραση σε φύλλα καπνού, προσφέρεται η δυνατότητα να γίνουν τροποποιήσεις στα επίπεδα έκφρασής της, υπάρχει η επιλογή να συντηχτεί με άλλες πρωτεΐνες, να σημανθεί και άλλα.

Ο μετασχηματισμός πραγματοποιείται με καλλιέργεια κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101:pMP90), τα οποία φέρουν τις κατάλληλες κατασκευές μετάφρασης ανάλογα με το στόχο μελέτης και εισάγονται σε νεαρά φύλλα καπνού. Αυτά με τη σειρά τους εκμεταλλεύονται τους κυτταρικούς μηχανισμούς του καπνού και μεταφράζουν τις γενετικές πληροφορίες που βρίσκονται στους πλασμιδιακούς φορείς των βακτηρίων. Στην παρούσα μελέτη στόχος ήταν ο υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η σύντηξη με γονίδιο αναφοράς GFP. Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιείται περιλαμβάνει προαγωγέα που προωθεί την υπερέκφραση της πρωτεΐνης για τον πιο εύκολο εντοπισμό της. Η έκφραση της συντηγμένης πρωτεΐνης 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.

Διαδικασία:

- Καλλιέργεια των GV3101:pMP90 που περιέχουν τις κατασκευές στους 28⁰C για 12 ώρες

- Φυγοκέντρηση των βακτηρίων ανά 1.5mL (X4) στις 4000rpm για 5min και απομάκρυνση του υπερκείμενου
- Προσθήκη 250μL διαλύματος διήθησης (IM, Infiltration Medium) επαναδιάλυση και ένωση σε ένα erpendorf
- Φυγοκέντρηση των βακτηρίων στις 4000rpm για 5min
- Αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση σε 1mL IM
- Ρύθμιση της πυκνότητας της καλλιέργειας φασματομετρικά με τελικό $OD_{600}=0.8$ για τα βακτήρια που περιέχουν τον παράγοντα P19 και $OD_{600}=0.6$ για τα βακτήρια που περιέχουν τις κατασκευές των συντηγμένων πρωτεϊνών. Πολύ πυκνές καλλιέργειες αντιμετωπίζονται από τα φύλλα καπνού ως παθογόνοι εισβολείς και καταπολεμούνται. Πολύ αραιές καλλιέργειες αδυνατούν να δώσουν ισχυρό σήμα υπερέκφρασης
- Ισος όγκος καλλιέργειας βακτηρίων που περιέχουν μια μοναδική κατασκευή αναμιγνύεται με ίσο όγκο καλλιέργειας βακτηρίων που περιέχουν τον παράγοντα P19
- Επάωση του μείγματος καλλιεργείων στους 25°C για 90min προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ενεργοποίηση των *vir* γονιδίων του Ti-πλασμιδίου από την ακετοσυριγκόνη που περιέχεται στο διάλυμα έκχυσης
- Ένεση της ενεργοποιημένης καλλιέργειας στο μεσόφυλλο των φύλλων καπνού από τα στόματα της παραξονικής επιφάνειας
- Τοποθέτηση των φυτών στον θάλαμο ανάπτυξης για 48 ώρες
- Αφαίρεση της εφυμενίδας και τοποθέτησή της σε αντικειμενοφόρο πλάκα με λεπτό στρώμα νερού. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού με το κατάλληλο φίλτρο

Υλικά:

Διάλυμα 500mM Mes

- 10 mL dH₂O
- 0,9764 g Mes

Διάλυμα 20mM Na₃PO₄.12H₂O (trisodium orthophosphate)

- 10 mL dH₂O
- 0,076 g Na₃PO₄.12H₂O

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

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

Διάλυμα διήθησης IM

- 250 mg D-γλυκόζης
- 5 mL Mes 500mM
- 5 mL Na₃PO₄.12H₂O 20mM
- 25 μL ακετοσυριγκόνη 200mM
- Νερό μέχρι τα 50 mL

VI.2. Χρώση μιτοχονδρίων

Η χρώση των μιτοχονδρίων έγινε με τον φθορίζοντα ιχνηθέτη (probe) MitoTracker Orange CMTMRos (M7510, Molecular Probes, USA). Οι ιστοί εμβαπτίστηκαν σε θρεπτικό διάλυμα MS που περιείχε 25nM Mitotracker για 30min στους 22°C στο σκοτάδι. Ακολούθησαν τρία πλυσίματα με θρεπτικό διάλυμα MS για 5min υπό ανάδευση.

VI.3. Μικροσκοπία φθορισμού

Για τον εντοπισμό της συντηγμένης με GFP πρωτεΐνης χίμαιρας χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού ZeissAxioPlan (ZEISS, Γερμανία). Η λήψη των εικόνων έγινε με ψηφιακή CCD AxioCam MRc5 κάμερα μικροσκοπίου. Χρησιμοποιήθηκαν οι ρυθμίσεις: για το GFP, φίλτρο διέγερσης (exciter) HQ470/40, διχρωϊκό κάτοπτρο (dichroic) Q495LP και φίλτρο διέγερσης (emitter) HQ525/50, για το MitoTracker Orange CMTMRos, φίλτρο διέγερσης BP 546/12, διαχωριστής δέσμης (beam-

splitter) FT 580, φίλτρο διέγερσης LP 590 και για τον φθορισμό της χλωροφύλλης, διέγερση στα 633nm και εκπομπή στα 680nm.

VII. Ανάλυση Πρωτεϊνών

VII.1. Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών από *E.coli* Rosetta origami

Αρχή της μεθόδου

Σκοπός της μεθόδου είναι να απομονωθούν και να καθαριστούν οι πρωτεΐνες που υπερεκφράστηκαν στα μετασχηματισμένα κύτταρα rosetta origami με τον φορέα pET30a+. Οι υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες έχουν σημανθεί μέσω του φορέα υπερέκφρασης με μια αλληλουχία His-tag, ένα εξαπεπτίδιο ιστιδινών, στο αμινοτελικό άκρο. Το πεπτίδιο αυτό έχει την ικανότητα να προσδένεται ειδικά και ισχυρά σε μόρια κοβαλτίου.

Μετά τη ρήξη των μετασχηματισμένων κυττάρων συλλέγεται το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Αυτό περνά μέσα από μια στήλη συγγένειας κοβαλτίου και σε αυτήν συγκρατούνται μόνο οι σεσημασμένες με το His-tag πρωτεΐνες. Μετά από διαδοχικές πλύσεις, όλες οι πρωτεΐνες που δεν έχουν το μόριο σήμανσης απομακρύνονται από τη στήλη, όπου εξακολουθούν να είναι προσδεμένες οι υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες. Η έκλυση των πρωτεϊνών γίνεται με διάλυμα πλούσιο σε ιμιδαζόλιο χάρη στην ικανότητά του να ανταγωνίζεται τα His-tags για τα μόρια κοβαλτίου. Μετά την έκλυση της πρωτεΐνης αυτή υπόκειται σε διαπίδυση για την απομάκρυνση των αλάτων και του ιμιδαζολίου έτσι ώστε να είναι πιο εύκολοι οι περαιτέρω χειρισμοί (189).

Διαδικασία:

- Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν για 16 ώρες στους 30⁰C υπό ανάδευση φυγοκεντρούνται για 15min στις 9.000rpm στους 4⁰C

- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1-2mL ρυθμιστικού διαλύματος Α και υποβάλλεται σε περιοδική εφαρμογή υπερήχων (40sec, 5 επαναλήψεις με μεσοδιαστήματα 10sec) σε πάγο
- Φυγοκέντρηση στους 4⁰C στις 13.000rpm για 15min
- Συλλογή του υπερκείμενου (εκχύλισμα ολικής πρωτεΐνης) και διαποτισμός με αυτό της εξισορροπημένης στήλης (Novagen, Co-MAC) με τρεις όγκους στήλης ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης Β
- Πλύση της στήλης με έξι όγκους στήλης διαλύματος πλύσης Γ
- Διαποτισμός της στήλης με έξι όγκους στήλης διαλύματος έκλουσης Δ
- Συλλογή του εκλούσματος που περιέχει την καθαρή υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη
- Τοποθέτηση του εκλούσματος σε μεμβράνη διαπίδυσης και μετά το σφράγισμά της, εμφύσηση της μεμβράνης σε 1-2L ρυθμιστικού διαλύματος Α για 16 ώρες υπό ανάδευση. Σκοπός της μεταχείρισης αυτής είναι η απομάκρυνση των αλάτων και του ιμιδαζολίου και αντικατάσταση αυτών με το διάλυμα Α που έχει επιλεγεί ως πιο φιλικό για τους επόμενους χειρισμούς

Διαλύματα:

Ρυθμιστικό διάλυμα Α

500mM NaCl		pH 7.9
20mM Tris-HCl		
2mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)		

Διάλυμα εξισορρόπησης Β

500mM NaCl		pH 7.9
20mM Tris-HCl		
5mM Imidazole		

Διάλυμα πλήσης Γ

500mM NaCl		pH 7.9
20mM Tris-HCl		
20mM Imidazole		

Διάλυμα έκλουσης Δ

500mM NaCl		pH 7.9
20mM Tris-HCl		
1M Imidazole		

VII.2. Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης από φυτικά κύτταρα

Αρχή της μεθόδου

Σκοπός της μεθόδου είναι να απομονωθούν στο σύνολό τους οι εκφρασμένες πρωτεΐνες του κυττάρου διατηρώντας την τριτοταγή τους δομή και συνεπώς την δραστικότητά τους. Τα υπόλοιπα συστατικά του κυττάρου, όπως λιπίδια και πολυσακχαρίτες απομακρύνονται στο μεγαλύτερο δυνατό ποσοστό για να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις. Στη διαδικασία δεν χρησιμοποιούνται αποδιατακτικοί παράγοντες που αλλοιώνουν την τρισδιάστατη διαμόρφωση των πρωτεϊνών, αντιθέτως, η προσθήκη αναστολέων πρωτεϊνών και αναγωγικών παραγόντων κρίνεται απαραίτητη.

Διαδικασία

1. Λειοτριβήση ιστών ριζών ή φύλλων (~200mg) στον πάγο σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος 1.
2. Φυγοκέντριση του μίγματος για 15min στους 4°C
3. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf και φυγοκέντριση για 5min στους 4°C
4. Άμεση χρησιμοποίηση του υπερκείμενου σε περαιτέρω διαδικασίες μετά από ποσοτικοποίηση για να αποφευχθούν αλλοιώσεις των πρωτεϊνών

Ρυθμιστικό διάλυμα 1

500mM NaCl
20mM Tris-HCl
2mM PMSF

pH 7.9

Σε κάθε λειοτρίβηση προστίθεται μικρή ποσότητα σκόνης διαλυτής PVP-10 (polyvinylpyrrolidone; Sigma, Germany) ως αναγωγικού παράγοντα.

VII.3. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης σε ένα δείγμα. Είναι μια φασματοφωτομετρική μέθοδος με τη βοήθεια του χρωμογόνου αντιδραστηρίου Bradford (76), που έχει την ικανότητα να προσδέεται σε αμινοξέα που απαντώνται σε όλες τις πρωτεΐνες (π.χ. αργινίνη). Η αλληλεπίδραση αμινοξέων και Bradford έχουν σαν αποτέλεσμα τον κυανό χρωματισμό του διαλύματος, ανάλογο με την συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο δείγμα, οδηγώντας σε αύξηση της απορρόφησης A_{595} . Αρχικά κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη απορρόφησης για δείγματα γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης (BSA). Με βάση τις μετρήσεις της πρότυπης καμπύλης υπολογίζεται η συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης του δείγματος από την απορρόφησή του.

Διαδικασία:

- Ανάμιξη 10μL δείγματος με 990μL αντιδραστηρίου Bradford και επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 10min
- Μέτρηση απορρόφησης στα 595nm
- Υπολογισμός συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης [C] με βάση την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης που συνήθως έχει τη μορφή: $A_{595} = \alpha[C] + \beta$

Διάλυμα Bradford

0.5 mg/mL Coomassie Blue G

25% methanol

42.5% H₃PO₄

VII.4. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με κάθετη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμίδης (SDS - PAGE)

Αρχή της μεθόδου

Σκοπός της τεχνικής είναι ο διαχωρισμός πρωτεϊνών ενός δείγματος με βάση το μέγεθός τους. Σε μια πηκτή πολυ-ακρυλαμίδης διαχωρίζονται όλες οι πρωτεΐνες ενός δείγματος όχι με βάση την πολικότητά τους ή τον όγκο που καταλαμβάνουν στο χώρο καθώς έχουν αποδιαταχθεί. Η αποδιάταξη γίνεται πριν την ηλεκτροφόρηση με το διάλυμα Laemmli υπό βρασμό. Πάνω στα αποδιατεταγμένα μόρια πρωτεϊνών προσδένονται μόρια SDS που περιέχονται μέσα στο διάλυμα Laemmli και εντός της πηκτής προσδίδοντας ομοιόμορφο αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες (215). Όσο μεγαλύτερη είναι η πρωτεΐνη τόσο λιγότερο μεταναστεύει μέσα στην πηκτή και το αντίστροφο. Ειδικοί μάρτυρες πρωτεϊνών μεταναστεύουν στην πηκτή και βοηθούν στον υπολογισμό του μεγέθους των πρωτεϊνών υπό διερεύνηση.

Διαδικασία:

Προετοιμασία δειγμάτων

Υπολογίζεται η ποσότητα πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιηθεί στην ηλεκτροφόρηση με τη μέθοδο Bradford. Συνήθως σε κάθε διαδρομή το εύρος που χρησιμοποιείται είναι 2-50μg ανάλογα με το σκοπό της εφαρμογής και τον χειρισμό που θα ακολουθήσει.

- Ανάμιξη της επιλεγμένης ποσότητας δείγματος με διάλυμα Laemmli σε τελική συγκέντρωση 1X
- Βρασμός του μείγματος για 2-3min

- Άμεση ψύξη του μείγματος στον πάγο για 2min και τοποθέτησή του στις ειδικές υποδοχές που έχουν σχηματιστεί στην πηκτή

Διάλυμα Laemmli 4X

250mM Tris-HCl pH 6.8

40% Glycerol

5% SDS

0.005% Bromophenol blue

10% BME

Πηκτή πολυ-ακρυλαμίδης

Η πηκτή πολυ-ακρυλαμίδης αποτελείται από δύο στρώματα. Το ένα στρώμα (stacking gel) χρησιμεύει στο να στοιβάξει τις πρωτεΐνες και αυτές να εισέρθουν στο δεύτερο στρώμα σε ένα μέτωπο, έτσι ώστε να μην επηρεαστεί η μετανάστευσή τους από το σημείο αφετηρίας τους. Το δεύτερο στρώμα (separating gel) είναι ένα πιο πυκνό πλέγμα και είναι υπεύθυνο για τον τελικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους (54). Το δεύτερο μείγμα εγχέεται πρώτο στην κάθετη δομή που παρέχεται από τον κατασκευαστή της συσκευής ηλεκτροφόρησης και καλύπτεται με ένα στρώμα νερού μέχρι να πολυμεριστεί. Το νερό απομακρύνεται και εγχέεται το πρώτο μείγμα με την ταυτόχρονη τοποθέτηση πάνω από αυτό μιας ειδικής δομής που μετά τον πολυμερισμό έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία υποδοχών για τα δείγματα. Η πηκτή τοποθετείται μέσα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και καλύπτεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης εσωτερικά και εξωτερικά, δημιουργώντας έτσι κλειστό κύκλωμα. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετούνται στις ειδικές υποδοχές και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο 100-150mA μέχρι να εξέλθει η χρωστική από την πηκτή και ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών προς διερεύνηση.

Πίνακας 20: Stacking gel (5mL)

Συστατικά	Όγκος σε mL
0,6 M Tris-HCl pH 6,8	0.5
Sterile water	3.75
Stock acrylamide (30%)	0.675
10% SDS	0.05
10% APS (ammonium persulfate)	0.05
Temed (tetramethylethylene diamine)	0.01

Πίνακας 21: Separating gel 12.5% (10mL)

Συστατικά	Όγκος σε mL
1,875 M Tris-HCl pH 8,8	2
Sterile water	3.68
Stock acrylamide (30%)	4.16
10% SDS	0.1
10%APS	0.1
Temed	0.01

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

25mM Tris-HCl

192mM Glycine

0.1% SDS

Χρώση πρωτεϊνών μετά από διαχωρισμό SDS-PAGE

Αφού αφαιρεθεί προσεκτικά η πηκτή από την συσκευή ηλεκτροφόρησης, απομακρύνεται το stacking gel και το separating gel εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης. Τα χρωμογόνα δεσμεύονται μόνιμα στις πρωτεϊνικές δομές και παροδικά πάνω στην πηκτή (66). Η χρώση διαρκεί 15-20min και εκτελείται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα χρώσης αφαιρείται και η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα αποχρωματισμού. Μετά από 1-2 ώρες αποχρωματίζεται πλήρως η

πηκτή και παραμένει μόνο το χρώμα που έχει δεσμευτεί εντός των πρωτεϊνικών δομών. Οι πρωτεΐνες αποτυπώνονται ως μελανές ζώνες σε άχρωμο περιβάλλον.

Διάλυμα χρώσης

0.1% Coomassie blue

50% methanol

10% glacial acetic acid

Διάλυμα αποχρωματισμού

10% methanol

7% glacial acetic acid

VII.5. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)

Αρχή της μεθόδου

Στόχος της τεχνικής είναι η ανίχνευση συγκεκριμένης πρωτεΐνης με τη βοήθεια αντισώματος αναγνώρισης μοναδικού επιτόπου σε αποτύπωμα διαχωρισμένων πρωτεϊνών μέσω SDS-PAGE (32). Η τεχνική εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση και επιβεβαίωση των πρωτεϊνών υπό διερεύνηση. Αρχικά οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σαν αποτύπωμα από την πηκτή σε μια μεμβράνη ειδική να συγκρατεί πρωτεϊνικά μόρια. Οι κενές θέσεις της μεμβράνης καλύπτονται από κοινές πρωτεΐνες του γάλακτος, οι οποίες δεν αναγνωρίζονται από το ειδικό αντίσωμα. Η μεμβράνη επωάζεται με το αντίσωμα που προσδένεται στην πρωτεΐνη στόχο σε διάλυμα κορεσμένο με πρωτεΐνες γάλακτος. Αν είναι απαραίτητο η μεμβράνη επωάζεται και με δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει το πρώτο και φέρει το χρωμογόνο για τον εντοπισμό και την αποτύπωση της πρωτεΐνης. Η εμφάνιση του χρώματος γίνεται μετά από προσθήκη ειδικού διαλύματος ανάλογα με το σύστημα ανίχνευσης που φέρει το αντίσωμα όπως ορίζεται από τον κατασκευαστή.

Διαδικασία:

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη

Η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή ακρυλαμίδης σε μεμβράνη γίνεται με ειδικές συσκευές υγρής ή ημι-στεγνής μεταφοράς ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα τελευταία χρόνια επιλέγεται μεμβράνη μεταφοράς PVDF

(polyvinyl fluoride, Millipore, USA) και όχι νιτροκυτταρίνης για τη βελτίωση του σήματος και την μείωση των σημάτων θορύβου.

- Εμβάπτιση του τμήματος της μεμβράνης που θα χρησιμοποιηθεί στη μεταφορά σε μεθανόλη για την ενεργοποίησή της
- Εμβάπτιση της μεμβράνης και της πηκτής σε διάλυμα μεταφοράς A
- Τοποθέτηση της μεμβράνης και της πηκτής στη συσκευή μεταφοράς σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
- Εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης προς διερεύνηση

Διάλυμα μεταφοράς A

25mM Tris-HCl

192mM Glycine

10% Methanol

0.1% SDS

Ανοσοαποτύπωση (Western blot)

Η ανίχνευση της πρωτεΐνης MtPHGPX έγινε με αντίσωμα που αναγνωρίζει τον επίτοπο His-tag και φέρει σύστημα χρώσης αλκαλικής φωσφατάσης AP (Qiagen, Germany)

1. Επώαση της μεμβράνης σε ρυθμιστικό διάλυμα γάλακτος A για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Σκοπός του βήματος αυτού είναι η πλήρωση των κενών θέσεων της μεμβράνης με πρωτεΐνες γάλακτος
2. Αφαίρεση του διαλύματος και προσθήκη διαλύματος πρώτου αντισώματος σε συγκέντρωση που προτείνει ο κατασκευαστής (1/5.000) για 2 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα γάλακτος A
3. Αφαίρεση του διαλύματος αντισώματος και πλύση της μεμβράνης με ρυθμιστικό διάλυμα γάλακτος A χωρίς γάλα, 3 φορές για διάρκεια 10min η κάθε μια
4. Προσθήκη 25mL διαλύματος εμφάνισης αλκαλικής φωσφατάσης και ανάδευση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου

5. Προσθήκη των χρωμογόνων NBT (100μL) και BCIP (100μL) και ανάδευση μέχρι την εμφάνιση μελανών ζωνών
6. Πλύση της μεμβράνης με νερό για την διακοπή της διαδικασίας χρώσης

Ρυθμιστικό διάλυμα γάλακτος A (TBS-T Milk)

25mM Tris, pH 7.5

150mM NaCl

0.2% Tween 20

1% Dry Skimmed Milk

Διάλυμα εμφάνισης (αλκαλική φωσφατάση)

100mM Tris, pH 9.5

100mM NaCl

5mM MgCl₂

NBT (Nitro Blue Tetrazolium)

25mg/mL σε 70% διμεθυλφορμαμίδη

BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)

25mg/mL σε 100% διμεθυλφορμαμίδη

VII.6. Ενζυμική δραστικότητα υπερεκφρασμένης MtPHGPX

Αρχή της μεθόδου

Σκοπός της μεθόδου είναι να διερευνηθούν οι βιοχημικές παράμετροι της δραστικότητας του υπερεκφρασμένου ενζύμου της MtPHGPX. Το ένζυμο καταλύει την μετατροπή του H₂O₂ και λιπιδικών υπεροξειδίων σε νερό με την οξείδωση ενός

μορίου γλουταθειόνης ή θειορεδοξίνης. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζονται το υπόστρωμα και ο δότης ηλεκτρονίων του ενζύμου καθώς και η συγγένεια του υποστρώματος και η ταχύτητα της αντίδρασης (173). Επίσης μελετήθηκε η επίδραση δοτών μονοξειδίου του αζώτου σε αυτές τις παραμέτρους μετά από μεταχείριση των δειγμάτων με αυτούς.

Διαδικασία:

Η δραστηριότητα της MtPHGPX ελέγχθηκε φωτομετρικά στα 340nm. Ο μηδενισμός έγινε με το μείγμα της αντίδρασης και η αποικοδόμηση του H₂O₂ μετρήθηκε μετά την προσθήκη του ενζύμου (1μg) στην αντίδραση. Η δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίστηκε με συντελεστή $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Η επίδραση των δοτών NO έγινε ακολουθώντας την ίδια μέθοδο μετά από επώαση της ποσότητας του ενζύμου με 0.5mM δοτών NO όπως nitrosoglutathione (GSNO), peroxyxynitrite (ONOO⁻) και dithylenetriamine NONOate (DEA NONOate)

Μείγμα αντίδρασης

100mM Tris-HCl, pH 8.0

1mM GSH (glutathione) ή 4mM Thx (thioredoxin)

1U GR (glutathione reductase) ή 1U ThxR (thioredoxin reductase)

0.2mM NADPH

0.2mM H₂O₂ ή 0.2mM Cumene hydroperoxide

VII.7. Ανίχνευση S-νιτροσυλιώσεων κυστεϊνών μέσω υποκατάστασης με βιοτίνη (Biotin switch method)

Αρχή της μεθόδου

Σκοπός της τεχνικής είναι η ανοσοανίχνευση S-νιτροσυλιωμένων κυστεϊνών πρωτεϊνών υπό διερεύνηση που είναι ικανές να μειώσουν την δραστηριότητά τους (233). Οι πρωτεΐνες επώαζονται με δότες NO έτσι ώστε οι κυστεΐνες που περιέχουν να περάσουν από τη μορφή S-H στη μορφή S-NO. Οι κυστεΐνες που έχουν παραμείνει στη μορφή S-H προστατεύονται χημικά και «μπλοκάρονται» με την

αντικατάσταση του υδρογόνου από μια μεθυλομάδα. Στη συνέχεια η NO ομάδα αφαιρείται με χημικό τρόπο και η κυστεΐνη ανάγεται σε S-H, η ίδια διαδικασία είναι αδύνατο να γίνει για τις προστατευμένες κυστεΐνες. Το υδρογόνο των ανηγμένων S-H αντικαθίσταται με μια ομάδα βιοτίνης. Στη συνέχεια ακολουθούνται τα βήματα διαχωρισμού πρωτεϊνών με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωσης western blot όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Η ανίχνευση γίνεται με ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τις ομάδες βιοτίνης με το σύστημα αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφηκε παραπάνω σε αραιώση 1/10.000 (Sigma, Germany).

Διαδικασία αντικατάστασης με βιοτίνη:

1. Προσθήκη 0.2mL 25% SDS και 20μL MMTS σε 1.8mL δείγματος που περιέχει 2mg πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα A
2. Επώαση του μείγματος στους 50°C για 15-20min απουσία φωτός
3. Προσθήκη τριών όγκων παγωμένης ακετόνης και ψύξη του μείγματος στους -20°C για 20min
4. Φυγοκέντρηση στις 3.000rpm για 5min
5. Αφαίρεση του υπερκείμενου και πλύση του ιζήματος πρωτεϊνών με 70% ακετόνη 4 φορές
6. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 240μL ρυθμιστικού διαλύματος B
7. Προσθήκη 30μL διαλύματος βιοτίνης-HPDP παρουσία 20mM ασκορβικού οξέος για την έναρξη της αντίδρασης υποκατάστασης
8. Επανάληψη των βημάτων 3-5 και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100-150μL ρυθμιστικού διαλύματος A
9. Χρήση 20-25μL δείγματος για διαχωρισμό SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση western blot

Διαλύματα:

Ρυθμιστικό διάλυμα A

100 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

1 mM EDTA

pH 8.0

Ρυθμιστικό διάλυμα Β

100 mM HEPES

1 mM EDTA

1% SDS

pH 8.0

MMTS

10% MMTS σε διμεθυλφορμαμίδη

Βιοτίνη-HPDP (N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamide)

2.5 mg/ml Biotin-HPDP σε DMSO (dimethyl sulfoxide)

VII.8. Ανίχνευση νίτρωσης καταλοίπων τυροσίνης

Αρχή της μεθόδου

Σκοπός της μεθόδου είναι η ανίχνευση νίτρωσης καταλοίπων τυροσίνης στις πρωτεΐνες υπό διερεύνηση (244). Η νίτρωση τυροσίνης είναι μια μεταμεταφραστική τροποποίηση που είναι υπεύθυνη για την μείωση ή μεταβολή της δραστηριότητας πρωτεϊνών, όπως και η νιτροσυλίωση κυστεϊνών. Στον άνθρακα 3 του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης προστίθεται μια ομάδα -NO₂. Αυτή η ομάδα ανιχνεύεται από ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-NO₂Tyr.

Διαδικασία:

Επώαση 2mg πρωτεΐνης με 0.5mM peroxynitrite για 15min σε θερμοκρασία δωματίου μετά από ήπια ανάδευση.

Διαχωρισμός πρωτεϊνών με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση western blot όπως έχει περιγραφεί. Έγινε χρήση του ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος anti- NO₂Tyr (Sigma, Germany) σε αραιώση 1/20.000 και η εμφάνιση έγινε με το σύστημα αλκαλικής φωσφατάσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. Μοριακή ανάλυση της MtPHGPX

I. Το γονίδιο και τα μετάγραφα της MtPHGPX

I.1. *In silico* ανάλυση

Όλα τα ανώτερα φυτά περιλαμβάνουν στην οικογένεια των GPX ένα μέλος PHGPX. Τα ένζυμα αυτά έχουν αυστηρά συντηρημένα μοριακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα χαρακτηριστικά μπορούν σε θεωρητικό επίπεδο να κατηγοριοποιηθούν αλληλουχίες που είναι πιθανό να αποδειχθεί πειραματικά ότι αποτελούν πράγματι το συγκεκριμένο μέλος. Η προεργασία γίνεται στον υπολογιστή (*in silico*) και τα δεδομένα που συλλέγονται από αυτή την ανάλυση βοηθούν και καθοδηγούν την πειραματική διερεύνηση σε βιολογικό επίπεδο.

Η δημόσια προσβάσιμη βάση δεδομένων της αλληλούχισης του γονιδιώματος της *Medicago truncatula* (The Institute for Genomic Research, TIGR, <http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>) παρόλο που δεν είναι πλήρης, παρέχει σημαντικά δεδομένα για μια πληθώρα εκφρασμένων ετικετών γονιδίων (Expressed Sequence Tags, ESTs). Σε μια αρχική αναζήτηση με λέξη-κλειδί την ονομασία του προϊόντος μεταγραφής (χρησιμοποιώντας το όνομα “glutathione peroxidase”) προέκυψε ένας αριθμός αλληλουχιών EST. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν στο πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) για να συγκριθούν με άλλες χαρακτηρισμένες διαθέσιμες αλληλουχίες PHGPX από άλλους οργανισμούς. Οι αλληλουχίες με τον κωδικό TC179098 και TC173544 βρέθηκαν να παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας (94%) με την αντίστοιχη PHGPX του φυτού *Lotus japonicus* (LjGPX1), φυτό-μοντέλο το οποίο ανήκει επίσης στην οικογένεια των ψυχανθών. Μεγάλα ποσοστά ομοιότητας παρουσίασαν με αντίστοιχες GPX άλλων ψυχανθών, 89% με του φυτού *Phaseolus lunatus*, 85% με του φυτού *Phaseolus vulgaris* και 84% με του φυτού *Glycine max*. Επίσης μεγάλα ποσοστά παρατηρήθηκαν με τα φυτά *Prunus avium* (82%), *Nicotiana tabacum* (80%), *Plantago major* (80%) και *Populus trichocarpa* (79%).

Οι αλληλουχίες βρέθηκαν να παρουσιάζουν ποσοστό 100% ομοιότητας με την αλληλουχία του χρωμοσώματος 5 της *Medicago truncatula* με τον κωδικό mth2-78c9. Η πλήρης αλληλουχία του χρωμοσώματος 5 αναλύθηκε στο πρόγραμμα GeneScan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) για να εντοπισθούν οι περιοχές του γονιδιωματικού DNA που πιθανόν να δίνουν μεταγραφόμενα γονίδια καθώς και οι αμινοξικές αλληλουχίες που προκύπτουν από αυτά. Η πρόβλεψη που προέκυψε από το πρόγραμμα έδωσε, μεταξύ άλλων, μια περιοχή που ορίζεται από τις βάσεις 97.000 έως 94.300 σε σύνολο 134.556 bp, η οποία δίνει θεωρητικά μια πρωτεΐνη μήκους 215 αμινοξέων. Ορισμένα από τα τμήματα που αναγνωρίζονται ως εξόνια παρουσιάζουν 100% ομοιότητα με τις TC179098 και TC173544 αλληλουχίες. Παρόλα αυτά δεν συμπίπτουν όλα τα εξόνια του 5' άκρου της αλληλουχίας με τα κατατεθειμένα ESTs. Το γεγονός αυτό ώθησε προς την υπόθεση της ύπαρξης δύο διαφορετικών ισομορφών mRNA που προκύπτουν από το ίδιο γονίδιο. Καθότι οι αλληλουχίες δεν είναι πλήρεις η δυνητική έναρξη (ATG) υπολογίστηκε με βάση τη γονιδιωματική αλληλουχία.



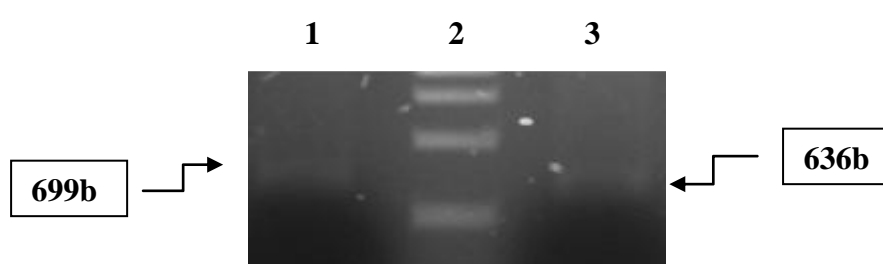
Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου και των ισομορφών της *MtPHGPX*

Θεωρητικά η αλληλουχία του γονιδίου περιέχει δύο αλληλουχίες ATG, που κωδικοποιούν για το πρώτο αμινοξύ μεθειονίνης, που ηγείται των πεπτιδικών αλυσίδων που προκύπτουν από το γονίδιο. Ο αριθμός των ιντρονίων ανέρχεται στα 6 και των εξονίων στα 7 (Εικόνα 16). Με βάση την αλληλουχία του γονιδιωματικού DNA σχεδιάστηκαν, στο δημόσια προσβάσιμο πρόγραμμα Primer3 v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), οι εκκινητές για την ενίσχυση των προβλεπόμενων δύο μεταφράφων του γονιδίου *MtPHGPX* (Εικόνα 16). Σχεδιάστηκε ένας εκκινητής στο 3' άκρο της αλληλουχίας και δύο εκκινητές στα δύο πιθανά 5'

άκρα (βλ. «Υλικά και Μέθοδοι»). Το μήκος των τμημάτων που προκύπτουν από τα δύο ζεύγη είναι θεωρητικά 636bp και 699bp αντίστοιχα.

1.2. Πειραματική προσέγγιση

Με τη μέθοδο της PCR ενισχύθηκαν τα τμήματα DNA χρησιμοποιώντας τα ζεύγη LongF – BothR (*MtPHGPXα*) και ShortF – BothR (*MtPHGPXβ*). Ως πηγή DNA επιλέχθηκε το cDNA από ιστό ρίζας υπό φυσιολογικές συνθήκες. Τα δύο ζεύγη εκκινητών ενίσχυσαν δύο τμήματα DNA στο αναμενόμενο μέγεθος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0.8% των δύο ισομορφών *MtPHGPX* μετά από PCR. Στην διαδρομή 1 φαίνεται η *MtPHGPXβ* (699bp), στη διαδρομή 2 φαίνεται ο μάρτυρας (500bp, 1000bp και 1500bp) και στην διαδρομή 3 φαίνεται η *MtPHGPXα* (636bp).

Οι ενισχυμένες αλληλουχίες στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν σε φορείς pGEMT-easy και εστάλησαν για αλληλούχιση. Η ακριβής αλληλουχία των δύο ισομορφών έγινε γνωστή και είναι η εξής:

***MtPHGPXα* (5' - 3')**

```

ATGGAGTTACTCGGTGTGAAATACAGACAGATCGGCACTTGGACACGAGAAGAAGCATCCACGCGTAAT
CTTCGTTATTCTGTTACACTCACAATTGTCGGTGGCTCTCAGAACAAAGAAGACAGATCACACCATG
GCATCTGCATCAAACCCCTCAATCAATTCATGATTTCACTGTTAAGATGCTAAGGGTAACGATGTTAAT
CTCGGTGACTACAAAGGAAAGGTCCTTATCATTTGTCAATGTTGCCTCACAATGTGGATTGACTAACTCA
AATTACACAGAGCTGAGTCAGTTGTATGAGAAATACAAATCAAAAGGTTTGGAAATTCTGGCATTCCCT
TGTAATCAATTTGGGGCACAAGAGCCTGGATCTGTTGAAGAGATACAAAACCTTTGTGTGTATACGCTTC
AAGGCTGAGTTTCCTGTTTTTGACAAGGTTGATGTGAATGGTGCCACTGCTGCTCCAATCTACAAGTAT
CTGAAGTCGAGCAAAGGTGGACTCTTTGGGGATGGTATCAAAATGGAACCTTCTCCAAGTTCCTTGTGAT
AAAAATGGGAATGTTGTTGATCGTTATGCACCAACGACTTCTCCACTGAGCATTGAGAAGGACTTGCTG
AAGTTGCTTGATGCA
    
```

***MtPHGPXβ* (5' - 3')**

ATGCTTTGTAGTACTTCAACAACAACCTCGCATCCGATTCATTTCAACTACAAAACGTCTTTTAACTGCT
CCTCTTTCTTCCCTTACTTTCGCTTCTTCTCAATCTCTACTACTCTTCCAAACAAACCTATAATACATAAA
CCACTTTTTTACAACCTCTAACCCTTCTTTGTATTTCACTTTAAGAAGAACAGATCACACCATGGCATCT
GCATCAAACCCTCAATCAATTCATGATTTCACTGTTAAGG**ATG**CTAAGGGTAACGATGTTAATCTCGGT
GACTACAAAGGAAAGGTCCCTTATCATTTGTCAATGTTGCCTCACAATGTGGATTGACTAACTCAAATTAC
ACAGAGCTGAGTCAGTTGTATGAGAAATACAAATCAAAGGTTTGGAAATCTGGCATTCCCTTGTAAT
CAATTTGGGGCACAAGAGCCTGGATCTGTTGAAGAGATACAAAACCTTTGTGTGTACACGCTTCAAGGCT
GAGTTTCCCTGTTTTTACAAGGTTGATGTGAATGGTGCCACTGCTGCTCCAATCTACAAGTATCTGAAG
TCGAGCAAAGGTGGACTCTTTGGGGATGGTATCAAATGGAACCTTCTCCAAGTTCCTTGTGATAAAAAAT
GGGAATGTTGTTGATCGTTATGCACCAACGACTTCTCCACTGAGCATTGAGAAGGACTTGTGTAAGTTG
CTTGATGCA

Παρατηρήθηκε πως τα δύο μετάγραφα αποτελούνται από μια κοινή περιοχή που επισημαίνεται με πλαίσιο και μια περιοχή στο 5' που είναι διαφορετική για την κάθε μία. Στην περίπτωση της *MtPHGPXα* η περιοχή αυτή έχει μήκος 116bp και στην περίπτωση της *MtPHGPXβ* έχει μήκος 179bp ενώ η κοινή περιοχή έχει μήκος 520bp. Αξίζει να σημειωθεί ότι το εξόνιο 1 και το εξόνιο 2 έχουν ως σημείο έναρξης το κωδικώνιο ATG, όπως επισημαίνεται με μαύρη σκίαση στις αλληλουχίες. Στην κοινή περιοχή συμπεριλαμβάνεται ακόμα ένα κωδικώνιο ATG (γκρίζα σκίαση) που όμως δεν σηματοδοτεί μια διαφορετική για τα δύο μετάγραφα περιοχή. Ενδεχομένως όμως να σηματοδοτεί την αρχή της λειτουργικής ενζυμικής περιοχής των ισομορφών.

Μετά από ομοπαράθεση των αλληλουχιών των δύο μεταγράφων με την αλληλουχία του γονιδιωματικού DNA προέκυψε το μοντέλο που παρουσιάζεται στην Εικόνα 16. Τα μετάγραφα αποτελούνται πάντα από το 3' άκρο του εξονίου 2 και τα εξόνια 3-7 στην κοινή τους περιοχή και εναλλακτικά στο 5' άκρο περιλαμβάνουν το εξόνιο 1 (*MtPHGPXα*) ή το 5' άκρο του εξονίου 2 (*MtPHGPXβ*). Τα ATG των εξονίων 1 και 2 δεν βρίσκονται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης. Τα εξόνια 2-7 ανήκουν στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο. Είναι πολύ πιθανό οι δύο ισομορφές *MtPHGPX* να προκύπτουν με μηχανισμούς εναλλακτικού ματίσματος.

1.3. Οι ισομορφές MtPHGPXα και MtPHGPXβ

Τα μετάγραφα *MtPHGPXα* και *MtPHGPXβ* κωδικοποιούν για δύο ξεχωριστές πεπτιδικές αλυσίδες και συνεπώς δύο ξεχωριστές πρωτεΐνες. Η αλληλουχία των μεταγράφων εισήχθηκε στο πρόγραμμα Translate tool στην πλατφόρμα βιοπληροφοριακών εφαρμογών ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) για να μεταφραστεί σε αμινοξική αλληλουχία. Οι πεπτιδικές αλυσίδες που προέκυψαν είναι οι εξής:

MtPHGPXα

```
MELLGVKYRQIGTWTREEASTRNLRYSVHTHNCRWLSEQRRTDHTMASASNPQSIHDFTVKDAKGNDVNL  
LGDYKGGKVLIIVNVASQCGLTNSNYTELSQLYEKYKSKGLEILAFPCNQFGAQEPGSVEEIQNFVCIRF  
KAEFPVFDKVDVNGATAAPIYKYLKSSKGGFLGDKIKWNFSKFLVDKNGNVVDRYAPTTSPLSIEKDLL  
KLLDA
```

MtPHGPXβ

```
MLCSTSTTTTRIRFISTTKRLLTAPLSSLLRFFSISTTLPNKPIIHKPLFTTLPSTLYFTLRRTDHTMAS  
ASNPQSIHDFTVKDAKGNDVNLGDYKGGKVLIIVNVASQCGLTNSNYTELSQLYEKYKSKGLEILAFPCN  
QFGAQEPGSVEEIQNFVCTRFKAEFPVFDKVDVNGATAAPIYKYLKSSKGGFLGDKIKWNFSKFLVDKN  
GNVVDRYAPTTSPLSIEKDLLKLLDA
```

Η πεπτιδική αλυσίδα της *MtPHGPXα* αποτελείται από 212 αμινοξέα και της *MtPHGPXβ* από 233 αμινοξέα. Και οι δύο αποτελούνται από μια κοινή περιοχή 173 αμινοξέων (μέσα σε πλαίσιο) και ένα διαφορετικό πεπτίδιο στο αμινοτελικό άκρο. Για την *MtPHGPXα* το πεπτίδιο αυτό έχει μήκος 39 αμινοξέα και για την *MtPHGPXβ* 60 αμινοξέα. Η κοινή περιοχή των 173 αμινοξέων πιστεύεται πως περιλαμβάνει το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στην ίδια πλατφόρμα έγινε χρήση του προγράμματος Compute pI/Mw για τον υπολογισμό του ισοηλεκτρικού σημείου (pI) και του μοριακού βάρους (Mw) των δύο ισομορφών. Το pI της *MtPHGPXα* υπολογίστηκε ότι είναι 8.57 και το μοριακό της βάρος 23.84 kDa. Η *MtPHGPXβ* έχει pI ίσο με 9.27 και μοριακό βάρος 25.87 kDa.

1.4. Τα χαρακτηριστικά των MtPHGPX ισομορφών

Οι MtPHGPX διατηρούν κάποια αυστηρά συντηρημένα κοινά χαρακτηριστικά με τις PHGPX μιας πληθώρας οργανισμών. Όπως έχει αναφερθεί, οι PHGPX διαφορετικών οργανισμών παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ τους από αυτή που παρουσιάζει μια PHGPX με τις υπόλοιπες GPX του ίδιου οργανισμού. Η μόνη μεγάλη διαφοροποίηση που παρατηρείται είναι η παρουσία ή απουσία του καταλοίπου σεληνοκυστεΐνης (SeCys) αντί αυτού της κυστεΐνης σε ορισμένους οργανισμούς. Τα αυστηρά συντηρημένα αυτά χαρακτηριστικά γίνονται πιο εύκολα ορατά μετά από σύγκριση αμινοξικών αλληλουχιών PHGPX από διαφορετικούς οργανισμούς.

Οι MtPHGPX στα πλαίσια μιας εκτεταμένης συγκριτικής ανάλυσης αλληλουχιών, ομοπαράτέθηκαν με αμινοξικές αλληλουχίες διαφόρων οργανισμών με τη βοήθεια του προγράμματος ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) Εκτός από διάφορα ανώτερα φυτά, στη συγκριτική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο PHGPX αλληλουχίες από τον άνθρωπο (GPX4) που αντιπροσωπεύουν καλύτερα την ομάδα των θηλαστικών και περιέχουν ένα κατάλοιπο SeCys. Η SeCys στα ανώτερα φυτά, όπως και σε πληθώρα άλλων οργανισμών, αντικαθίσταται με κυστεΐνη.

Η ομοπαράθεση των αλληλουχιών φαίνεται στην Εικόνα 18. Οι σκιασμένες περιοχές με γκρίζο χρώμα υποδηλώνουν τα κοινά αμινοξέα για τις περισσότερες από τις πρωτεΐνες που συγκρίνονται. Οι περιοχές που σκιάζονται με μαύρο χρώμα αποτελούν τις αυστηρά συντηρημένες περιοχές για όλες τις συγκρινόμενες πρωτεΐνες. Ορισμένες από αυτές τις αυστηρά συντηρημένες περιοχές θεωρείται πως συμμετέχουν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι περιοχές αυτές είναι παρούσες και στις ισομορφές της MtPHGPX και είναι οι NVAQCGLT, FPCNQFGAQEPG και KWNFSKFLVD, οι οποίες εμφανίζονται υπογραμμισμένες στην Εικόνα 18. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι περιοχές αυτές περιέχουν δύο από τις τρεις συντηρημένες κυστεΐνες των PHGPX οι οποίες θεωρούνται πολύ σημαντικές για την καταλυτική λειτουργία του ενζύμου και είναι επισημασμένες με αστερίσκους. Η τρίτη σημαντική και συντηρημένη κυστεΐνη, Cys134 της MtPHGPXα και Cys155 της MtPHGPXβ βρίσκεται ανάμεσα στη δεύτερη και την τρίτη υπογραμμισμένη συντηρημένη περιοχή του ενεργού κέντρου. Η πρώτη συντηρημένη κυστεΐνη είναι

trichocarpa (Pt), *Helianthus annuus* (Ha), *Pisum sativum* (Ps), *Lycopersicon esculentum* (Le), *Oryza sativa* (Os), *Raphanus sativus* (Rs) και *Homo sapiens* (Hs). Οι αλληλουχίες ανακτήθηκαν από τη δημόσια προσβάσιμη βάση δεδομένων UniProtKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) και οι κωδικοί τους είναι: AtGPX6, O48646; GPXha1, Y14429; GPXha2, O24031; PtrcGPX3.1, A9PI44; PtrcGPX3.2, B9GWH5; OsPHGPX, Q9FEV2; GPXle-1, O24031; GPXle-2, O24032; PsPHGPX, O24296; RsPHGPX, Q8W2D1; LjGPX1, Q56VU1; HsPHGPXcyt, P36969-2; HsPHGPXmit, P36969-1. Οι αλληλουχίες των MtPHGPXα και MtPHGPXβ προέκυψαν από αλληλούχιση που έγινε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Τα αυστηρά συντηρημένα αμινοξέα είναι σκιασμένα με μαύρο χρώμα και τα λιγότερο συντηρημένα με γκριζό χρώμα. Οι αστερίσκοι επισημαίνουν τις τρεις αυστηρά συντηρημένες κυστεΐνες. Οι υπογραμμισμένες περιοχές αποτελούν τρεις περιοχές που συμμετέχουν θεωρητικά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το κατάλοιπο που συμβολίζεται με το γράμμα U αντιπροσωπεύει την σεληνοκυστεΐνη (SeCys).

Τα ποσοστά ομοιότητας των MtPHGPX ισοφορφών υπολογίστηκαν με βάση το πρόγραμμα ClustalW και παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον. Η πρωτεΐνες που είναι πιο κοντά στην MtPHGPXα είναι η το PtrcGPXs 3.1 του φυτού *Populus trichocarpa* με ποσοστό 77% και η GPXle-1 του φυτού *Lycopersicon esculentum* με ποσοστό 73%. Επίσης υψηλά ποσοστά ομοιότητας παρουσιάζουν οι πρωτεΐνες LjGPX1 του φυτού *Lotus japonicus* (66%) και οι ισομορφές PtrcGPXs 3.2 με 66% και GPXle-2 με 64%. Στα ίδια επίπεδα κυμαίνονται τα ποσοστά που παρατηρούνται για τις AtGPX6 (63%) του φυτού *Arabidopsis thaliana*, GPXha-2 (63%) του φυτού *Helianthus annuus*, OsPHGPX (62%) του φυτού *Oryza sativa* και για την ισομορφή GPXha-1 (61%). Χαμηλότερα ποσοστά παρατηρούνται για τις RsPHGPX (56%) του φυτού *Raphanus sativus* και PsPHGPX (55%) του φυτού *Pisum sativum*. Οι πρωτεΐνες HsPHGPXcyt και HsPHGPXmit από τον άνθρωπο έδωσαν αναμενόμενα χαμηλά ποσοστά ομοιότητας, 48% και 42% αντίστοιχα, σε σύγκριση με αυτά των υπολοίπων οργανισμών, λόγω της μεγάλης εξελικτικής απόστασης μεταξύ των δύο ειδών.

Η ισομορφή MtPHGPXβ παρουσιάζει την μεγαλύτερη ομοιότητα με τις πρωτεΐνες PtrcGPX3.2 και GPXIe-1 με ποσοστά 78% και 74% αντίστοιχα. Εξίσου μεγάλη ομοιότητα παρουσιάζει με την LjGPX1 κατά 70%, την GPXIe-2 κατά 65%, την GPXha-2 κατά 64%, την PtrcGPX3.1 κατά 63% και τις AtGPX6 και OsPHGPX κατά 62%. Χαμηλότερα ποσοστά ομοιότητας παρατηρούνται μεταξύ της MtPHGPXβ και των RsPHGPX (58%), PsPHGPX (52%) και των δύο ανθρώπινων HsPHGPXcyt (48%) και HsPHGPXmit (42%).

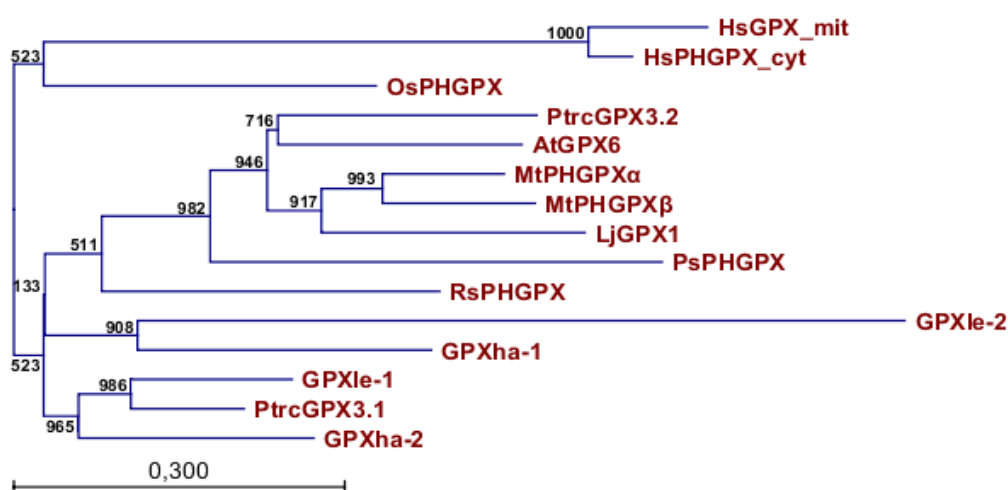
Πίνακας 22: Ποσοστά ομοιότητας των συγκρινόμενων αμινοξικών αλληλουχιών.

	MtPHGPXα	MtPHGPXβ	Common Region
LjPHGPX	66%	70%	87%
AtGPX6	63%	62%	80%
PtrcGPX3.1	77%	63%	79%
PtrcGPX3.2	66%	78%	79%
GPXIe-1	73%	74%	75%
GPXIe-2	64%	65%	64%
GPXha1	61%	61%	64%
GPXha2	63%	64%	69%
PsPHGPX	55%	52%	72%
RsPHGPX	56%	58%	67%
OsPHGPX	62%	62%	63%
HsPHGPXcyt	48%	48%	49%
HsPHGPXmit	42%	42%	49%

Η περιοχή που προβλέπεται ως αυτή που διαμορφώνει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, και από το κατάλοιπο Met46 για την MtPHGPXα και Met67 για την MtPHGPXβ μέχρι τέλους, παρουσιάζει ακόμα μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας με τις αντίστοιχες περιοχές των συγκρινόμενων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, με την

περιοχή της LjGPX1 από την Met73 παρουσιάζει ποσοστό ομοιότητας 87%. Με την περιοχή της AtGPX6 από την Met64 παρουσιάζει ποσοστό ομοιότητας 80%. Χαμηλότερα ποσοστά παρουσιάζει με τις OsPHGPX (63%) και HsPHGPX_{cyt} (49%).

Αυτές οι σχέσεις ομοιότητας απεικονίζονται καλύτερα και πιο κατανοητά στο φυλογενετικό δέντρο της Εικόνας 19, το οποίο κατασκευάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος CLCbio Sequence Viewer (<http://www.clcbio.com>; CLC bio A/S, Denmark). Ο κύριος διαχωρισμός των πρωτεϊνών που συγκρίνονται οδηγεί σε δύο μεγάλες ομάδες και μια μικρότερη που αποτελείται από τις ισομορφές HsPHGPX. Η πρώτη ομάδα περιέχει τις δύο ισομορφές MtPHGPX και τις LjGPX1, PtrcGPX3.2, την AtGPX6, την PsPHGPX και την RsPHGPX. Κατά συνέπεια οι ισομορφές της



Εικόνα 19: Φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει τις σχέσεις ομοιότητας, ως αποτέλεσμα της συγκριτικής μελέτης των πρωτεϊνών AtPHGPX, GPXha1, GPXha2, PtrcGPX3.1, PtrcGPX3.2, OsPHGPX, GPXle-1, GPXle-2, PsPHGPX, RsPHGPX, LjGPX1, HsPHGPX_{cyt}, HsPHGPX_{mit}, και MtPHGPX_α, MtPHGPX_β. Ο σχεδιασμός του έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος CLCbio Sequence Viewer. Διακρίνονται οι τρεις ομάδες του δέντρου, και οι κλάδοι στους οποίους είναι οργανωμένες οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας. Οι MtPHGPX ισομορφές σχηματίζουν έναν κλάδο με την LjGPX1 πρωτεΐνη, η οποία προέρχεται από ένα ψυχανθές.

MtPHGPX είναι πιο κοντά και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με αυτές που κατατάσσονται στην ίδια ομάδα. Μάλιστα με την LjGPX1, που προέρχεται από ένα

άλλο ψυχανθές, ομαδοποιούνται πιο στενά από ότι με τις υπόλοιπες στον ίδιο κλάδο. Παρόλα αυτά δεν παρατηρείται ιδιαίτερη ομοιότητα με την δεύτερη πρωτεΐνη ψυχανθούς, την PsPHGPX. Αντίστοιχα η PtrcGPX3.2 ομαδοποιείται στον ίδιο κλάδο με την AtGPX6. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τις GPXha-1 και -2, την GPXle-1 και -2, και την PtrcGPX3.1. Κατά συνέπεια οι πρωτεΐνες της δεύτερης ομάδας είναι πιο όμοιες μεταξύ τους από τις υπόλοιπες και παρουσιάζουν μικρότερα ποσοστά ομοιότητας με τις ισομορφές της MtPHGPX. Οι GPXle-1, GPXha-2 και Ptrc3.1 ομαδοποιούνται στον ίδιο κλάδο. Η GPXle-2 ομαδοποιείται στον ίδιο κλάδο με την GPXha-1.

II. Υποκυτταρικός εντοπισμός των MtPHGPX ισομορφών

II.1. *In silico* ανάλυση

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ένα επιπλέον χαρακτηριστικό των PHGPX, στους περισσότερους οργανισμούς, είναι ο διττός τους υποκυτταρικός εντοπισμός. Στις περισσότερες των περιπτώσεων η μία ισομορφή εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και η άλλη κατευθύνεται στα μιτοχόνδρια. Η εισαγωγή μιας πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια γίνεται με τη βοήθεια άλλων πρωτεϊνών μεταφορέων ή υδρόφοβων πεπτιδίων που συμπεριλαμβάνονται στην πεπτιδική της αλυσίδα και αναγνωρίζονται από σχετικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων. Η HsPHGPXmit, για παράδειγμα, διαθέτει στο αμινοτελικό της άκρο ένα πεπτίδιο, το οποίο είναι υπεύθυνο για την μεταφορά της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια. Όταν αυτό το πεπτίδιο-οδηγός δεν υπάρχει στην πεπτιδική αλυσίδα της πρωτεΐνης, αυτή παραμένει στο κυτταρόπλασμα (HsPHGPXcyt). Σε άλλες περιπτώσεις, όπως σε αυτή των ισομορφών PtrcGPX3.1 και PtrcGPX3.2, και οι δύο έχουν από ένα πεπτίδιο στο αμινοτελικό τους άκρο. Στην περίπτωση της PtrcGPX3.2 είναι υδρόφοβο και οδηγεί την πρωτεΐνη στο μιτοχόνδριο και στην περίπτωση της PtrcGPX3.1 δεν είναι, οπότε και η πρωτεΐνη παραμένει στο κυτταρόπλασμα.

Οι MtPHGPX ισομορφές περιλαμβάνουν και οι δύο ένα πεπτίδιο στο αμινοτελικό τους άκρο. Θεωρητικά, το ένα πεπτίδιο από τα δύο αποτελεί πεπτίδιο-

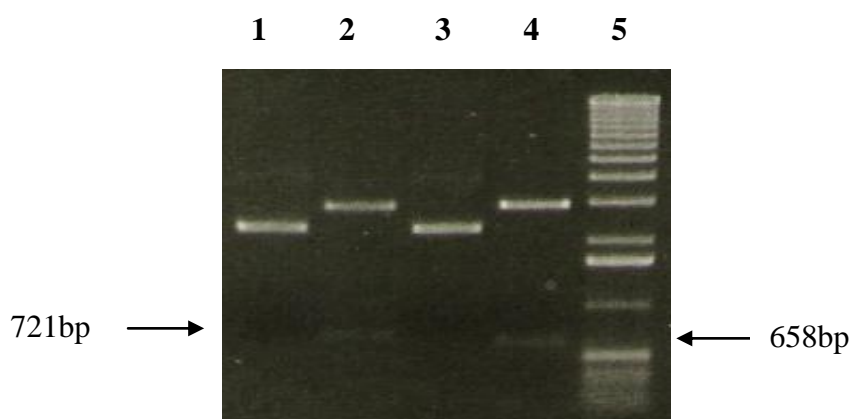
οδηγό και μεταφέρει την υπόλοιπη πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια και το δεύτερο δεν έχει αυτή τη δυνατότητα. Οι δύο αμινοξικές αλληλουχίες των MtPHGPX ισομορφών αναλύθηκαν στο δημόσια προσβάσιμο πρόγραμμα MitoProtII v.1.101 (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) που προβλέπει, με βάση μια σειρά παραμέτρων (πολικότητα αμινοξέων, ομοιότητα με γνωστές αλληλουχίες κ.ά.), τον υποκυτταρικό εντοπισμό των φυτικών πρωτεϊνών υπό διερεύνηση. Η MtPHGPXα βρέθηκε να παρουσιάζει $p=0.0211$ πιθανότητα εντοπισμού σε κάποιο οργανίδιο. Αντίθετα η MtPHGPXβ βρέθηκε να παρουσιάζει $p=0.9894$ πιθανότητα να εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Αυτό σημαίνει πως η MtPHGPXα είναι θεωρητικά η κυτταροπλασματική μορφή της MtPHGPX και η MtPHGPXβ η μιτοχονδριακή μορφή.

Ενδεικτικά αναφέρεται πως η LjGPX1, η οποία παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας με τις MtPHGPX ισομορφές, βρέθηκε να έχει $p=0.9411$ πιθανότητα να εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Αντίστοιχα η PtrcGPX3.2 εμφανίζει $p=0.9723$ πιθανότητα να εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, ενώ η PtrcGPX3.1 προβλέπεται ως κυττοπλασματική καθώς παρουσιάζει $p=0.0211$ πιθανότητα να εντοπίζεται σε κάποιο οργανίδιο. Τα τελευταία δεδομένα έχουν δειχθεί και πειραματικά.

II.2. Μοριακές κατασκευές

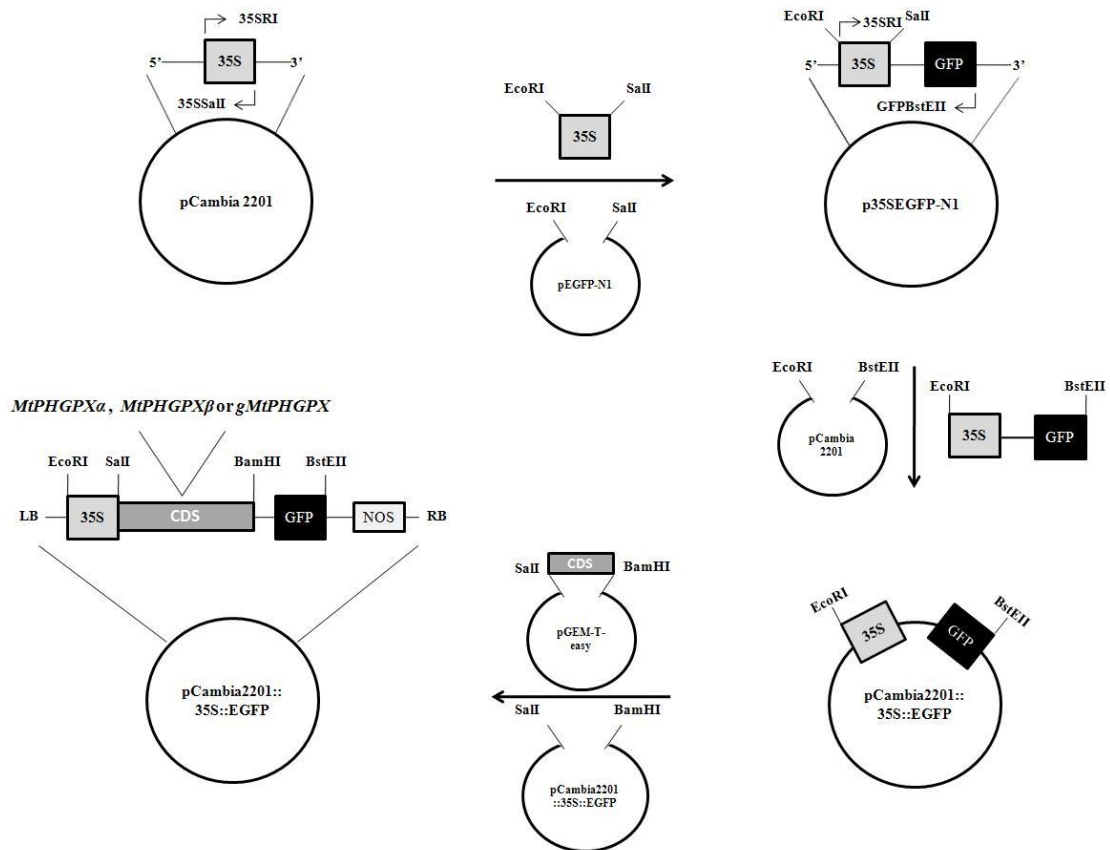
Η διερεύνηση του υποκυτταρικού εντοπισμού των MtPHGPX ισομορφών έγινε με τη βοήθεια της ετερόλογης έκφρασης των προβεπομένων πολυπεπτιδίων σε φύλλα καπνού. Τα φύλλα επιμολύνθηκαν με αγροβακτήριο που έφερε πλασμιδιακούς φορείς με σκοπό τη μεταφορά των επισημασμένων ισομορφών στο γονιδιωματικό υλικό του φυτού, τοπικά. Ο τελικός πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε, αποτέλεσα ανασυνδυασμού τμημάτων DNA από διαφορετικές πηγές, δίνει τη δυνατότητα σύντηξης του υπό διερεύνηση πολυπεπτιδίου με την πρωτεΐνη αναφοράς GFP (Green Fluorescent Protein) στο καρβοξυτελικό άκρο. Το γεγονός αυτό έκανε εφικτή την παρακολούθηση, με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού, της χωροταξικής συσσώρευσης της πρωτεΐνης υπό διερεύνηση.

Οι αλληλουχίες των δύο MtPHGPX μεταγράφων καθώς και της αλληλουχίας του πλήρους γονιδίου ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που εισάγουν θέσεις κοπής Sall στο 5' άκρο και BamHI στο 3' άκρο όπως περιγράφεται στη σελίδα 77 . Τα ενισχυμένα προϊόντα κλωνοποιήθηκαν σε φορείς pGEM T-easy και απεστάλησαν για αλληλούχιση. Με πέψεις αφαιρέθηκαν τα σωστά τμήματα από τους φορείς όπως φαίνεται στην Εικόνα 20 για να εισαχθούν στον τελικό φορέα.



Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0.8% των αντιδράσεων πέψης του πλασμιδιακού φορέα pGEM-T easy με τα ενθέματα MtPHGPXα (658bp) στη διαδρομή 4 και MtPHGPXβ (721bp) στη διαδρομή 2, με τα ένζυμα Sall και BamHI. Ως δείκτης μοριακών βαρών (MB) χρησιμοποιήθηκε ο 1Kb DNA Ladder όπως φαίνεται στη διαδρομή 5. Στη διαδρομή 1 και 3 φαίνονται οι ανασυνδιασμένοι πλασμιδιακοί φορείς pGEM T-easy με τις MtPHGPXβ και MtPHGPXα αντίστοιχα.

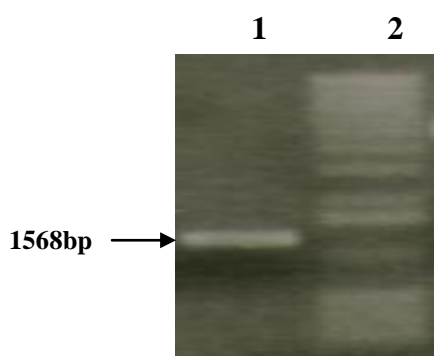
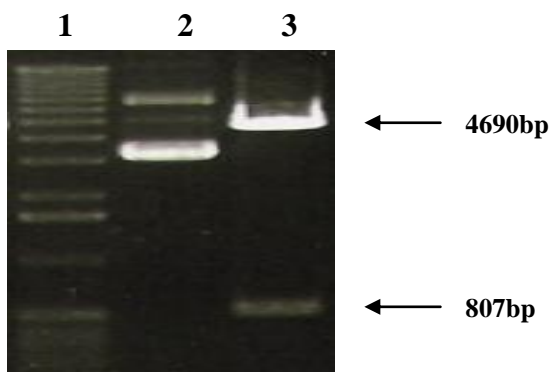
Η συναρμολόγηση του τελικού φορέα έγινε σε τρία βήματα με στόχο την κατασκευή που φαίνεται στην Εικόνα 21. Αρχικά ο προαγωγέας CaMV35S ενισχύθηκε με ειδικούς εκκινητές από τον φορέα pCambia 2201 έτσι ώστε να δημιουργηθούν άκρα με σημεία κοπής EcoRI στο 5' άκρο και Sall στο 3' άκρο. Το προϊόν υποβλήθηκε σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού και συνδέθηκε στον φορέα pEGFP-N1, ο οποίος επίσης υπεβλήθη στην ίδια διαδικασία με σκοπό να αποκτήσει συμβατά άκρα με την ένθεση με αποτέλεσμα τη διαμόρφωση του ενδιάμεσου φορέα p35SEGFP-N1 (Εικόνα 22). Στη συνέχεια ενισχύθηκε από τον p35SEGFP-N1 η περιοχή που περιλαμβάνει τον προαγωγέα CaMV35S και την αλληλουχία που



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση των ενδιάμεσων βημάτων για την κατασκευή του τελικού φορέα *pCambia2201:35S::EGFP*

κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη GFP με εκκινήτες που δημιουργούν τα σημεία κοπής EcoRI στο 5' άκρο στην αρχή του 35S και BstEII στο 3' άκρο στο τέλος της αλληλουχίας GFP (Εικόνα 23). Το προϊόν υποβλήθηκε σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού και συνδέθηκε στον φορέα-δέκτη *pCambia2201* διαμορφώνοντας έτσι τον τελικό φορέα *pCambia2201:35S::EGFP* (Εικόνα 24). Ο τελικός αυτός φορέας χρησιμοποιήθηκε για τον παροδικό μετασχηματισμό φύλλων καπνού και την μελέτη υποκυτταρικού εντοπισμού των MtPHGPX ισομορφών.

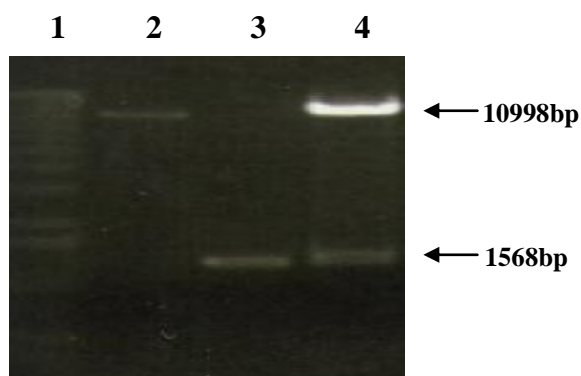
Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% των αντιδράσεων πέψης του πλασμιδιακού φορέα *p35SEGFP-N1* με τα ένζυμα *EcoRI* και *SalI* (διαδρομή 3). Ως δείκτης μοριακών βαρών (MB) χρησιμοποιήθηκε ο 1Kb DNA Ladder όπως φαίνεται στη διαδρομή 1. Στη διαδρομή 2 φαίνεται ο ανασυνδιασμένος φορέας *p35SEGFP-N1*.



Εικόνα 23: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% του προϊόντος ενίσχυσης με PCR του τμήματος του φορέα *p35SEGFP-N1* το οποίο περιλαμβάνει τη θέση κοπής για το τον 35S υποκινητή, τον πολυσυνδέτη, και το γονίδιο αναφοράς *GFP* (διαδρομή 1). Ως δείκτης μοριακών βαρών (MB) χρησιμοποιήθηκε ο 1Kb DNA Ladder όπως φαίνεται στη διαδρομή 2.

Τέλος ο φορέας *pCambia2201:35S:EGFP* υποβλήθηκε σε πέψη με τα ένζυμα *SalI* και *BamHI*, όπως και τα ενθέματα και πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σύνδεσης. Το αποτέλεσμα ήταν φορείς με την ικανότητα να ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του φυτού και να εκφράζουν τις πρωτεΐνες *MtPHGPXα* και *MtPHGPXβ* συντηγμένες με την πρωτεΐνη αναφοράς *GFP*. Οι φορείς αυτοί εισήχθησαν μέσα σε κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* με τα οποία τελικά μολύνθηκαν φύλλα καπνού με σκοπό την υπερέκφραση των συντηγμένων πρωτεϊνών.

Εικόνα 24: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% των αντιδράσεων πέψης του φορέα *pCambia2201:35S:EGFP*, με τα ένζυμα *EcoRI* και *BstEII* (διαδρομή 4). Οι ζώνες των 10998 bp στη διαδρομή 2 και 4 αντιστοιχούν στον *pCambia 2201* ενώ οι ζώνες των 1568 bp στη διαδρομή 3 και 4 αντιστοιχούν στο ένθεμα *35S:EGFP*. Ως δείκτης μοριακών βαρών (MB) χρησιμοποιήθηκε ο 1Kb DNA Ladder (1)

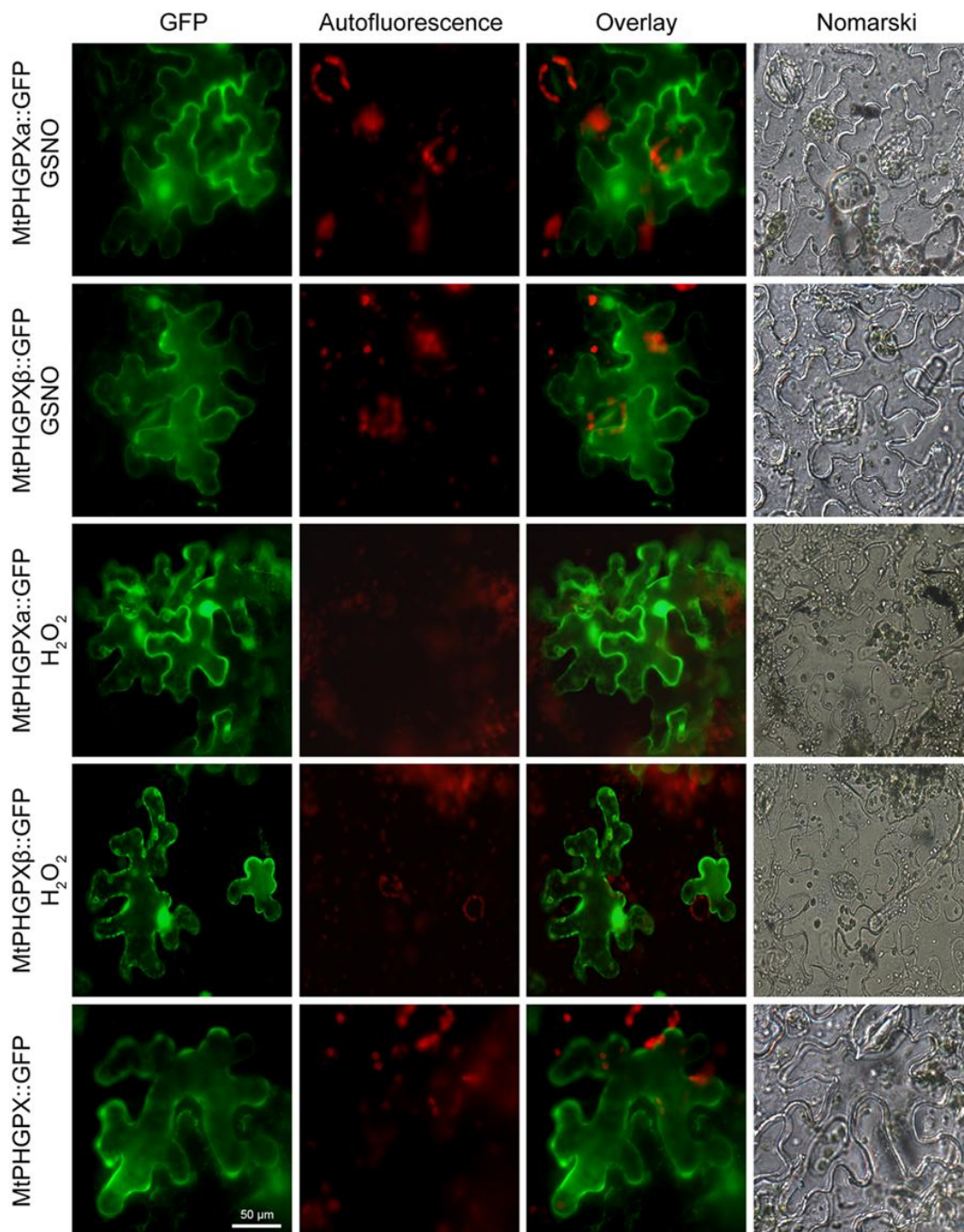


II.3. Ετερόλογη έκφραση και υποκυτταρικός εντοπισμός

Τα μετασηματισμένα κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* με τους φορείς που περιείχαν τα ενθέματα των MtPHGPX μεταγράφων MtPHGPXα και MtPHGPXβ, αλλά και του πλήρους γονιδίου της MtPHGPX ενέθηκαν σε φύλλα καπνού όπως περιγράφεται στη σελίδα 82. Τα φύλλα παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού για την ανίχνευση σήματος εντός των κυττάρων καπνού. Καθώς οι πρωτεΐνες που προέκυψαν από την μεταγραφή και μετάφραση των αλληλουχιών που μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια του φορέα ήταν συντηγμένες με την πρωτεΐνη αναφοράς GFP (MtPHGPXα:GFP, MtPHGPXβ:GFP και MtPHGPX:GFP), το σήμα που ανιχνεύτηκε αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη υπό διερεύνηση. Για τον έλεγχο της ορθότητας της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε μια επιπλέον κατασκευή η οποία δεν περιείχε καμία ένθεση παρά μόνο την αλληλουχία της GFP πρωτεΐνης (GFP control).

Στην περίπτωση της κατασκευής του πλήρους γονιδίου, η πρωτεΐνη GFP δεν βρισκόταν εντός αναγνωστικού πλαισίου μετά την ένθεση. Η GFP πρωτεΐνη βρισκόταν συντονισμένη με το αναγνωστικό πλαίσιο του τελευταίου εξονίου του γονιδίου *mtrhgrx*. Αυτό σημαίνει πως για να εκφραστεί σωστά η GFP πρωτεΐνη και να παραχθεί φθορίζον σήμα έπρεπε να συμβούν γεγονότα εναλλακτικού ματίσματος, που να επιτρέπουν το σχηματισμό ενός από τα δύο μεταγράφα *MtPHGPX*. Η λογική της χρήσης της κατασκευής του πλήρους γονιδίου καλύπτει την ανάγκη ελέγχου της ύπαρξης αλληλουχίας, η οποία δεν συμπεριλαμβάνεται στην αλληλουχία των ώριμων μεταγράφων αλλά είναι απαραίτητη για την εμφάνιση των δύο μεταγράφων από το ίδιο γονιδιακό τμήμα. Θεωρητικά οι αλληλουχίες των ιντρονίων θα μπορούσαν να περιέχουν περιοχές που, με κάποιον άγνωστο και απρόβλεπτο τρόπο, να καθορίζουν ή να επηρεάζουν την συμπεριφορά της πρωτεΐνης. Παράλληλα, η τακτική αυτή θα ήταν σε θέση να ενισχύσει την υπόθεση του εναλλακτικού ματίσματος. Η ένθεση δεν περιείχε κανένα στοιχείο του φυσικού προαγωγέα του γονιδίου, αντιθέτως το γονίδιο τελούσε υπό τον έλεγχο του προαγωγέα 35S. Ο προαγωγέας αυτός δεν θα μπορούσε να επιλέξει και να προωθήσει την έκφραση διαφορετικών μεταγράφων με διαφορετικό σημείο έναρξης μεταγραφής.

Οι κατασκευές ενέθηκαν ξεχωριστά η καθεμία και, όπως φαίνεται στην Εικόνα 25, το σήμα παρατηρήθηκε να συσσωρεύεται μόνο στο κυτταρόπλασμα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως οι πρωτεΐνες MtPHGPXα και β, καθώς και αυτές των



Εικόνα 25: Υποκυτταρικός εντοπισμός των MtPHGPXα, β και MtPHGPX::GFP συντηγμένων πρωτεϊνών σε φύλλα *Nicotiana benthamiana*. Τα μετασχηματισμένα με μία κατασκευή κάθε φορά *Agrobacterium tumefaciens* ενέθηκαν σε νεαρά φύλλα

καπνού. Εντός 12 ωρών πριν την παρατήρηση στο μικροσκόπιο ενέθηκαν 0.5mM GSNO, H₂O₂ ή θρεπτικό διάλυμα ως συνθήκη ελέγχου (control). Η φθορίζουσα πρωτεΐνη βρέθηκε να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε όλες τις συνθήκες και για όλες τις κατασκευές

μεταγράφων που προκύπτουν από την κατασκευή του πλήρους γονιδίου μετά από εναλλακτικό μάτισμα, είναι κυτταροπλασματικές.

Καθώς το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε σύγκρουση με τα θεωρητικά δεδομένα της *in silico* ανάλυσης, σύμφωνα με την οποία η MtPHGPXβ εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, έγινε μια προσπάθεια να προσομοιωθούν συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης. Το γονίδιο έχει δειχθεί και από άλλες μελέτες ότι τουλάχιστο σε επίπεδο έκφρασης αλλά και σε επίπεδο δραστηριότητας, επηρεάζεται από παράγοντες οξειδωτικής καταπόνησης, όπως το NO και το H₂O₂. Για το λόγο αυτό στα μετασηματισμένα κύτταρα ενέθηκε και ποσότητα 0.5mM GSNO ή H₂O₂ για τη διερεύνηση επίδρασης των παραγόντων αυτών στον υποκυτταρικό εντοπισμό των ισομορφών, καθώς και στη διαμόρφωση των ισομορφών από την αλληλουχία του πλήρους γονιδίου. Η διαμερισματοποίηση των MtPHGPX ισομορφών δεν διαφοροποιήθηκε μετά την προσθήκη των παραγόντων οξειδωτικής καταπόνησης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 25. Συνεπώς, οι MtPHGPX ισομορφές είναι κυτταροπλασματικές υπό φυσιολογικές συνθήκες και υπό συνθήκες προσομοίωσης οξειδωτικής καταπόνησης σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης.

Παρατηρήθηκε, σε ορισμένες περιπτώσεις, η διάχυση του σήματος σε όλη την έκταση του κυττάρου. Το γεγονός αυτό είναι αποτέλεσμα της οπτικής δύο διαστάσεων που προσφέρει το μικροσκόπιο φθορισμού, καθώς σε αυτές τις περιπτώσεις το εύρημα οφείλεται στην υπερκάλυψη του χυμοτοπίου από ένα στρώμα κυττοπλάσματος. Ισχυρό σήμα GFP παρατηρείται σε όλες τις συνθήκες και κατασκευές κοντά στην περιοχή της εξωτερικής μεμβράνης των κυττάρων ως αποτέλεσμα του εκτοπισμού του όγκου του κυττοπλάσματος από τα χυμοτόπια. Το σήμα στον πυρήνα, που παρατηρείται σε όλες τις κατασκευές και συνθήκες, είναι ένα λανθάνον σήμα, αποδεκτό για την τεχνική, που οφείλεται στην φυσιολογική

διαμερισματοποίηση της GFP πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται στην κατασκευή ελέγχου GFP, όταν η GFP δεν είναι προσδεσμένη σε άλλη πρωτεΐνη, έχει την τάση να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα.

III. Μελέτη έκφρασης των μεταγράφων *MtPHGPX*

Τα γονίδια *phgpx*, έχει δειχθεί σε πολλούς οργανισμούς και διαφορετικές μελέτες, ρυθμίζονται από περιβαλλοντική καταπόνηση και από μολύνσεις με παθογόνους οργανισμούς, συνθήκες που προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση στα κύτταρα. Οι GPX αποτελούν ένα σημαντικό όπλο της πρώτης γραμμής προστασίας του κυττάρου έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης. Έχει παρατηρηθεί πως το οξειδωτικό στρες συνοδεύεται πάντα από αυξημένα επίπεδα H_2O_2 και NO. Δεν είναι ξεκάθαρο αν τα μόρια αυτά παρουσιάζονται λόγω της ίδιας της καταπόνησης ή συσσωρεύονται φυσιολογικά στο κύτταρο για να συμμετάσχουν στη ρύθμιση της ομοιόστασης μόνο. Μελέτες έδειξαν πως τα μόρια αυτά μπορούν να δρουν και ως σήματα και ότι ένας από τους στόχους τους είναι η κατηγορία των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Οι GPX και οι PHGPX πιο συγκεκριμένα έχει δειχθεί πως επηρεάζονται από τα μόρια αυτά και η επίδρασή τους στα *MtPHGPX* μετάγραφα αποτέλεσε ενδιαφέροντα τομέα διερεύνησης στην παρούσα μελέτη.

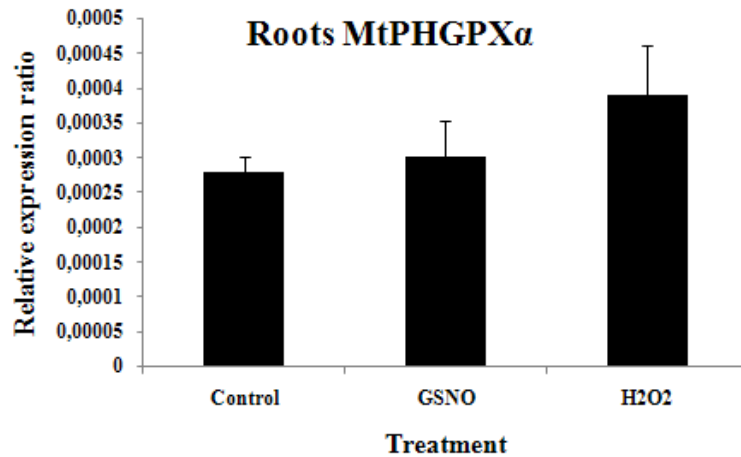
Προηγούμενη μελέτη έδειξε πως το NO επάγει σημαντικά την έκφραση των *MtPHGPX* μεταγράφων (Ferrarrini et al., 2008) χωρίς να γίνεται διαχωρισμός μεταξύ των δύο ισομορφών. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί η διακύμανση της αναλογίας των μεταγράφων υπό φυσιολογικές συνθήκες και υπό συνθήκες προσομοίωσης οξειδωτικού στρες, δηλαδή μετά από μεταχείριση των φυτών με NO και H_2O_2 . Η μεταχείριση έγινε εμβαπτίζοντας τις ρίζες των φυτών ηλικίας 21 ημερών σε θρεπτικό διάλυμα (control), θρεπτικό διάλυμα με 0.5mM GSNO ή θρεπτικό διάλυμα με 0.5mM H_2O_2 για 3 ώρες. Ακολουθήθηκε η διαδικασία απομόνωσης RNA και σύνθεσης cDNA, το οποίο τελικά χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα σε αντιδράσεις Real-time PCR, όπως περιγράφεται στα «Υλικά και μέθοδοι».

Κάνοντας δεκτή την παραδοχή πως το σύνολο της διαθέσιμης μεταγραφόμενης *PHGPX* αποτελείται από τα υποσύνολα των μεταγραφόμενων *MtPHGPXα* και *MtPHGPXβ*, στόχος ήταν ο προσδιορισμός της αναλογίας των δύο, υπό συνθήκες προσομοίωσης οξειδωτικού στρες. Το NO επάγει την έκφραση της *MtPHGPX* στο σύνολο, αλλά το ποια από τις δύο μορφές επηρεάζεται περισσότερο δεν είχε διευκρινιστεί. Δεν υπήρχαν πληροφορίες αν οι δύο μορφές επηρεάζονται με τον ίδιο τρόπο από τους δύο κύριους παράγοντες του οξειδωτικού στρες. Το γεγονός ότι οι δύο μορφές μοιράζονται μια μεγάλη κοινή περιοχή και διαφοροποιούνται μόνο στο 5' άκρο τους, βοήθησε τεχνικά την προσέγγιση αυτή. Η έκφραση των μεταγράφων δεν συγκρίθηκε, όπως συνήθως, με κάποιο γονίδιο σταθερής έκφρασης. Εκφράστηκε ως αναλογία επί του συνόλου των μεταγράφων *MtPHGPX* εκμεταλλευόμενοι την δυνατότητα ανίχνευσης της κοινής περιοχής που είναι παρούσα για όλα τα μετάγραφα.

Αναλυτικότερα, ένα ζεύγος εκκινητών σχεδιάστηκε να ανιχνεύει την κοινή περιοχή των μεταγράφων και χρησιμοποιήθηκε ως έκφραση των επιπέδων του συνόλου των *MtPHGPX* μορφών. Οι δύο μορφές ανιχνεύτηκαν με ζεύγη εκκινητών σχεδιασμένα στα εξόνια 1 και 2 για τις *MtPHGPXα* και *MtPHGPXβ* αντίστοιχα, περιοχές που είναι ξεχωριστές για την κάθε μορφή. Μάλιστα, ο αντίστροφος εκκινητής (reverse primer) για τις δύο μορφές ήταν κοινός, στα πλαίσια της προσπάθειας να ελαχιστοποιηθούν οι διαφορές στα μέσα ανίχνευσης. Στη συνέχεια η ανάλυση των αποτελεσμάτων για κάθε προϊόν ξεχωριστά έγινε με βάση τη συνάρτηση που περιγράφεται στη μελέτη του Pfaffl Michael, 2001. Τέλος, η τιμή της κάθε μορφής που προέκυψε από την επεξεργασία δεδομένων διαιρέθηκε με την τιμή του συνόλου των *MtPHGPX* μεταγράφων, όπως προέκυψε από την ίδια επεξεργασία.

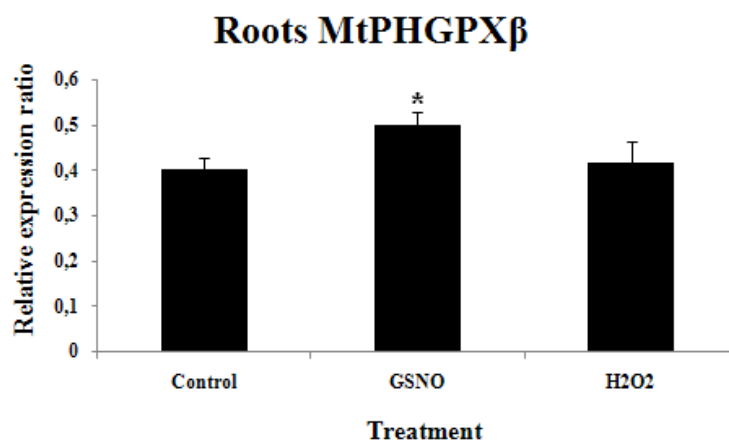
III.1. Ανάλυση αναλογίας των *MtPHGPX* μεταγράφων στη ρίζα

Η αναλογία των επιπέδων των *MtPHGPXα* και *MtPHGPXβ* μεταγράφων στη ρίζα φαίνεται στα γραφήματα 1 και 2 αντίστοιχα. Η ποσόστωση της *MtPHGPXα*



Γράφημα 1: Αναλογικά επίπεδα έκφρασης της *MtPHGPXα* στις ρίζες. Η ποσόστωση της ισομορφής φαίνεται να έχει την τάση να ενισχύεται στο σύνολο των μεταγράφων μετά από μεταχείριση με 0.5mM GSNO, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση μεταχείρισης με 0.5mM H₂O₂. Οι μεταβολές μεταξύ των συνθηκών δε φαίνεται να είναι στατιστικώς σημαντικές.

μορφής φαίνεται να μεταβάλλεται με ελαφρώς αυξητικές τάσεις μετά από μεταχείριση με 0.5mM GSNO και 0.5mM H₂O₂. Οι μεταβολές δεν φαίνεται να είναι στατιστικώς σημαντικές, παρόλα αυτά η προσομοίωση οξειδωτικού στρες δείχνει να επηρεάζει στο ελάχιστο την *MtPHGPXα* μορφή στις ρίζες. Όσον αφορά στα επίπεδα της *MtPHGPXβ* μορφής, αυτά παρουσιάζονται ενισχυμένα επί του συνόλου μετά από μεταχείριση με GSNO με στατιστικώς σημαντική αύξηση της ποσόστωσης ($p=0.0300$). Αντιθέτως, η μεταχείριση με H₂O₂ δεν φαίνεται να μεταβάλλει τα επίπεδα του μεταγράφου επί του συνόλου στις ρίζες.

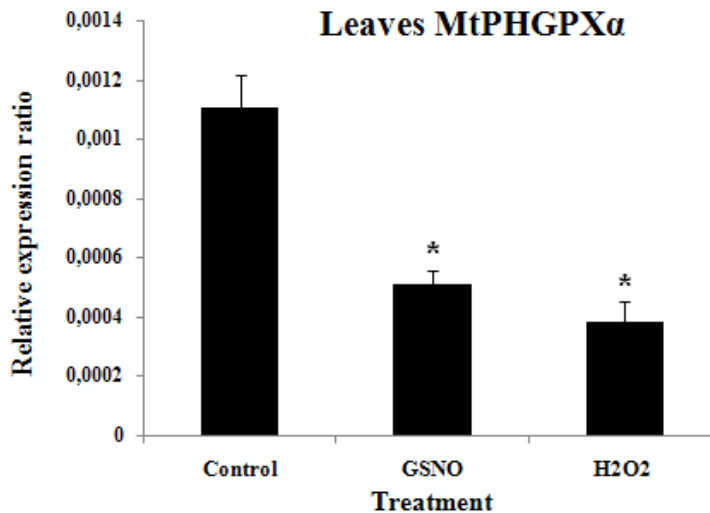


Γράφημα 2: Αναλογικά επίπεδα έκφρασης της *MtPHGPXβ* στις ρίζες. Η ποσόστωση της ισομορφής ενισχύεται στο σύνολο των μεταγράφων μετά από μεταχείριση με 0.5mM GSNO και η μεταβολή είναι στατιστικώς σημαντική, όπως επισημαίνεται και με τον αστερίσκο ($p=0.0300$). Μετά από μεταχείριση με 0.5mM H₂O₂ τα επίπεδα του μεταγράφου δεν δείχνουν να σημειώνουν κάποια μεταβολή επί του συνόλου.

III.2. Ανάλυση αναλογίας των *MtPHGPX* μεταγράφων στα φύλλα

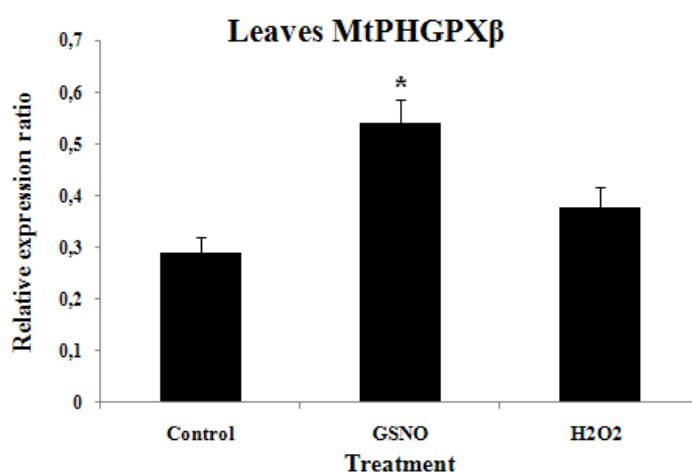
Οι PHGPX είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι είναι παρούσες σε όλους τους ιστούς των ανωτέρων φυτών. Παρόλα αυτά, είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί η έκφραση των ισομορφών και η ποσόστωσή τους σε κάποιον διαφορετικό ιστό εκτός της ρίζας στο φυτό *Medicago truncatula*. Το υπό μελέτη φυτό ανήκει στην κατηγορία των ψυχανθών και έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσει συμβιωτικές δομές στις ρίζες του με συμβιωτικά βακτηριακά στελέχη. Το γεγονός αυτό ίσως να σημαίνει πως η έκφραση ορισμένων γονιδίων έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά σε ιστούς που δεν εμπλέκονται στη διαδικασία της συμβίωσης. Μάλιστα, λόγω της φύσης των PHGPX, καθώς αυτές ενδέχεται να εμπλέκονται άμεσα στην εγκαθίδρυση των συμβιωτικών δομών και την ανοχή των βακτηρίων ως συμβιωτικών και όχι παθογόνων, η ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου σε άλλους ιστούς κρίνεται απαραίτητη.

Η ίδια πειραματική πρακτική υιοθετήθηκε και για τα φύλλα, τα οποία επιλέχθηκαν ως επιπλέον ιστός μελέτης εκτός της ρίζας. Όπως φαίνεται στα γραφήματα 3 και 4, τα *MtPHGPX* μετάγραφα δεν ακολουθούν πλήρως την συμπεριφορά που παρατηρείται στις ρίζες. Η *MtPHGPXα* μορφή φαίνεται να διαφοροποιεί την ποσόστωσή της με δραματικές μεταβολές. Η μείωση των επιπέδων της επί του συνόλου μετά από μεταχείριση με GSNO και H₂O₂ είναι μεγαλύτερη από



Γράφημα 3: Αναλογικά επίπεδα έκφρασης της MtPHGPXα στα φύλλα. Η ποσότητα της ισομορφής φαίνεται να μειώνεται δραματικά μετά από μεταχείριση με 0.5mM GSNO, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση μεταχείρισης με 0.5mM H₂O₂. Οι μεταβολές μεταξύ των συνθηκών είναι στατιστικώς σημαντικές, όπως επισημαίνεται με αστερίσκο, $p=0.0066$ και $p=0.0016$ αντίστοιχα.

50% και οι διαφορές είναι στατιστικώς σημαντικές, όπως επισημαίνεται στο γράφημα 3, κατά $p=0.0066$ και $p=0.0016$. Αντιθέτως, στην περίπτωση της MtPHGPXβ μορφής, το μοτίβο έκφρασης στα φύλλα φαίνεται να είναι ίδιο με αυτό που παρατηρήθηκε στις ρίζες. Μετά από μεταχείριση με GSNO, η ποσότητα της MtPHGPXβ ενισχύεται με στατιστικώς σημαντική μεταβολή ($p=0.0102$), όπως επισημαίνεται στο γράφημα 4. Η μεταχείριση με H₂O₂ δεν φαίνεται να επηρεάζει την αναλογία της μορφής στα φύλλα, όπως συμβαίνει και στις ρίζες.

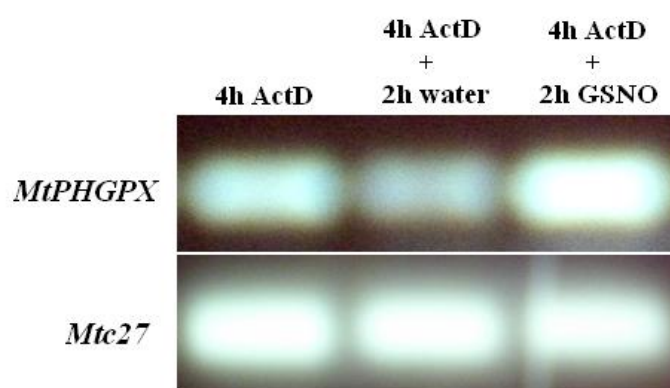


Γράφημα 4: Αναλογικά επίπεδα έκφρασης της MtPHGPXβ στα φύλλα. Η ποσότητα της ισομορφής ενισχύεται μετά από μεταχείριση με 0.5mM GSNO και η μεταβολή είναι στατιστικώς σημαντική, όπως επισημαίνεται και με τον αστερίσκο ($p=0.0102$). Μετά από μεταχείριση με 0.5mM H₂O₂ τα επίπεδα του μεταγράφου δεν δείχνουν να σημειώνουν κάποια μεταβολή επί του συνόλου

IV. Η δράση του NO στην προστασία των *MtPHGPX* μεταγράφων έναντι της αποικοδόμησής τους

Το NO πιστεύεται πως έχει την ικανότητα να προστατεύει συγκεκριμένα mRNA μόρια από την διαδικασία της αποικοδόμησης. Για να διαπιστωθεί αν οι *MtPHGPXs* αποτελούν πιθανούς στόχους προστασίας ακολουθήθηκε αρχικά μια διαδικασία αναστολής της μεταγραφής. Το βήμα αυτό διασφάλισε πως τα επίπεδα mRNA που θα ανιχνεύονταν στη συνέχεια δεν θα προέρχονταν από επαγωγή της μεταγραφής. Μετά το πέρας της μεταχείρισης των φυτών με την προσθήκη ή χωρίς GSNO όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι» μετρήθηκαν τα επίπεδα του συνόλου των *MtPHGPX*. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 26, τα επίπεδα των *MtPHGPX* μετά τις 4 ώρες φαίνονται υψηλά στη διαδρομή 1. Υπό φυσιολογικές συνθήκες μετά από 2 επιπλέον ώρες παρατηρείται μείωση (διαδρομή 2) η οποία αναστέλλεται παρουσία 0.5mM GSNO (διαδρομή 3). Το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε (*Mtc27*) διατηρεί τα επίπεδα έκφρασής του σταθερά σε όλες τις μεταχειρίσεις.

Τα επίπεδα έκφρασης μετά από μεταχείριση με GSNO φαίνονται να είναι υψηλότερα από αυτά πριν τη μεταχείριση και μετά την επώαση με ActD για 4 ώρες. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε ελλιπή αναστολή του μηχανισμού της μεταγραφής από την ActD και την επαγωγή της έκφρασης από το GSNO. Εναλλακτικά μπορούμε να υποθέσουμε πως τα mRNA που προστατεύονται από το GSNO είναι ελάχιστα σε σχέση με αυτά που αποικοδομούνται με αμετάβλητο ρυθμό. Επίσης, οι 6 ώρες είναι ένας μεγάλος σχετικά χρόνος ημιζωής mRNA, γεγονός που



Εικόνα 26: Το NO προστατεύει τα *MtPHGPX* μετάγραφα έναντι της αποικοδόμησης. Στην πρώτη διαδρομή φαίνονται τα επίπεδα των *MtPHGPX* μετά

από 4 ώρες μεταχείριση με Ακτινομυκίνη D (ActD), η οποία έχει την ικανότητα να αναστέλλει την μεταγραφική διαδικασία. Μετά από 2 επιπλέον ώρες επώασης παρουσία ActD παρατηρείται μείωση των επιπέδων υπό control συνθήκες η οποία αναστέλεται με την προσθήκη 0.5mM GSNO (διαδρομή 2 και 3 αντίστοιχα). Η Mtc27 χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς και τα επίπεδά της παρέμειναν σταθερά σε όλες τις μεταχειρήσεις.

σημαίνει πως η πλειοψηφία των μεταγράφων διαφόρων γονιδίων του κυττάρου πιθανότατα αποικοδομείται νωρίτερα. Είναι σημαντικό να τονιστεί πως το cDNA για την ανάλυση συντέθηκε με την ίδια αρχική ποσότητα συνολικού RNA για κάθε δείγμα. Συνδυάζοντας τα παραπάνω δεδομένα, ενδέχεται το δείγμα cDNA που προέκυψε και χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθούν τα επίπεδα των *MtPHGPX* μετά τη μεταχείριση με GSNO να είναι αναλογικά περισσότερο εμπλουτισμένο με mRNA των *MtPHGPX* από αυτό που προέκυψε μετά από τη μεταχείριση με ActD για 4 ώρες. Η υπόθεση αυτή ενισχύει την άποψη ότι το NO προστατεύει τα *MtPHGPX* μετάγραφα από την αποικοδόμηση.

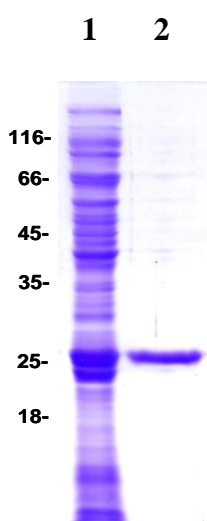
B. Βιοχημική ανάλυση της MtPHGPX

I. Απομόνωση και καθαρισμός της MtPHGPX

Για να μελετηθούν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά της *MtPHGPX*, το πρώτο βήμα ήταν η απομόνωση και ο καθαρισμός του υπερεκφρασμένου ενζύμου. Η αλληλουχία της κοινής περιοχής αποκόπηκε από τον φορέα pGEM T-easy ο οποίος περιείχε την ισομορφή *MtPHGPXβ* και εισήχθη στον φορέα υπερέκφρασης pET30a+. Στη συνέχεια ο φορέας χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό των στελεχών *E.coli*, Rosetta origami, ειδικών κυττάρων για την υπερέκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν και η υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη απομονώθηκε και καθαρίστηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι».

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το κοινό τμήμα των *MtPHGPX* ισομορφών είναι αυτό που πιθανότατα περιέχει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, καθώς είναι το

μόνο σταθερό τμήμα στις δυο μορφές ενώ τα αμινοτελικά πεπτιδία εναλλάσσονται. Η συμμετοχή παρόλα αυτά των αμινοτελικών πεπτιδίων στη σωστή διαμόρφωση του ενεργού κέντρου δεν μπορούσε να αποκλειστεί και για το λόγο αυτό επιχειρήθηκε αρχικά η υπερέκφραση των ισομορφών με τα αμινοτελικά πεπτιδία που διαφέρουν. Οι προσπάθειες δεν οδήγησαν σε επιτυχή υπερέκφραση και απομόνωση των πρωτεϊνών MtPHGPXα και β. Επιλέχθηκε, λοιπόν, να υπερεκφραστεί μόνο η κοινή περιοχή των δύο ισομορφών. Σε άλλες μελέτες αντίστοιχων PHGPX άλλων οργανισμών επιλέχθηκε, επίσης, να υπερεκφραστεί μόνο το κοινό τμήμα των ισομορφών με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η μέτρηση των βιοχημικών παραμέτρων του ενζύμου και της δραστικότητάς του. Συνεπώς, θεωρήθηκε αρκετά ασφαλής η χρήση μόνο του υπερεκφρασμένου κοινού τμήματος των MtPHGPX για τη βιοχημική ανάλυση του ενζύμου.

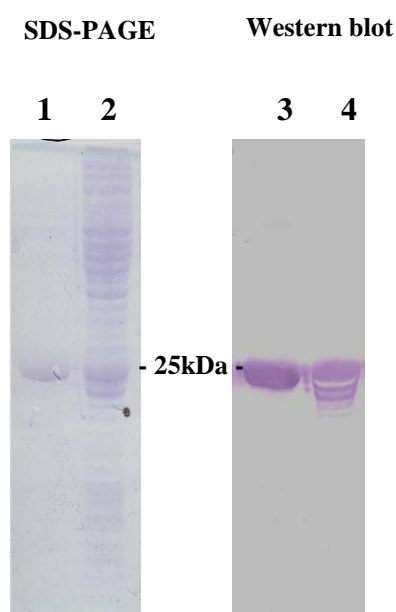


Εικόνα 27: Πηκτική πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE, πυκνότητας 12,5%, μετά από ηλεκτροφόρηση και βαφή με Coomassie. Στη διαδρομή 1 φαίνεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα πριν τη χρωματογραφία συγγένειας. Στη διαδρομή 2 φαίνεται η πρωτεΐνη MtPHGPX μετά τη στήλη συγγένειας νικελίου στο φράγμα έκλουσης. Το μέγεθος της πρωτεΐνης είναι περίπου 25kDa συμπεριλαμβανομένης της περιοχής επισήμανσης της πρωτεΐνης (His-tag), μέγεθος που συμφωνεί με τον θεωρητικό υπολογισμό.

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης από τα βακτήρια με χρωματογραφία συγγένειας, η πρωτεΐνη αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Στην Εικόνα 27 φαίνεται η καθαρισμένη πρωτεΐνη MtPHGPX και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα πριν τη διαδικασία απομόνωσης. Είναι διακριτή η ζώνη της MtPHGPX στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα καθώς εμφανίζεται εντονότερη από τις υπόλοιπες, αποτέλεσμα της υπερέκφρασης. Μετά τη διαδικασία η MtPHGPX παρουσιάζει

εξαιρετική καθαρότητα, γεγονός που είναι απαραίτητο για την ακριβή ανάλυση των βιοχημικών παραμέτρων του ενζύμου, χωρίς την παρεμβολή άλλων βακτηριακών ενζύμων που θα μπορούσαν να αλλοιώσουν τις μετρήσεις.

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης και βαφής των πρωτεϊνών, ακόμα και αν αυτές φαίνεται να έχουν το σωστό μέγεθος, δεν αρκεί για την ταυτοποίησή τους. Η επιβεβαίωση επιτυγχάνεται με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western blot), όπου η πρωτεΐνη υπό διερεύνηση και μόνο αυτή ανιχνεύεται με ειδικό, κατά προτίμηση μονοκλωνικό, αντίσωμα. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που αναγνώριζε την περιοχή σήμανσης της πρωτεΐνης His-tag, μια περιοχή που εισήχθη με τη βοήθεια του φορέα και δεν υπάρχει σε βακτηριακές πρωτεΐνες παρά μόνο στην ανασυνδυασμένη υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη MtPHGPX. Οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Στην Εικόνα 28 φαίνεται η πηκτή ακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε για την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης αριστερά και η μεμβράνη με το σήμα του αντισώματος δεξιά. Στο



Εικόνα 28: Αριστερά φαίνεται αντίστοιχη πηκτή ακρυλαμίδης SDS-PAGE πυκνότητας 12.5% με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης μετά από χρώση με Coomassie. Στη διαδρομή 1 φαίνεται η καθαρισμένη πρωτεΐνη MtPHGPX μετά από χρωματογραφία στήλης. Δεξιά φαίνεται η μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης μετά τη διαδικασία western blot και τη χρώση του αντισώματος που ανιχνεύει την αλληλουχία επισήμανσης πρωτεϊνών His-tag. Στη διαδρομή 3 φαίνεται η καθαρισμένη πρωτεΐνη και στη διαδρομή 4 το εκχύλισμα πρωτεϊνών πριν τη διαδικασία καθαρισμού. Το σήμα και στις δύο τεχνικές επισημαίνει την MtPHGPX στο σωστό προβλεπόμενο μέγεθος των 25kDa.

ύψος των 25kDa περίπου ανιχνεύεται η MtPHGPX και με τις δύο μεθόδους. Στη διαδρομή 3 το αντίσωμα έχει ανιχνεύσει την καθαρισμένη πρωτεΐνη και στη διαδρομή 4 έχει ανιχνεύσει την πρωτεΐνη και μόνο αυτή στο εκχύλισμα ολικής

πρωτεΐνης που απομονώθηκε από τα βακτήρια. Οι ζώνες που διακρίνονται κάτω από τη ζώνη στα 25kDa είναι θραύσματα της MtPHGPX.

II. Ενζυμική δραστικότητα και βιοχημικές παράμετροι της MtPHGPX

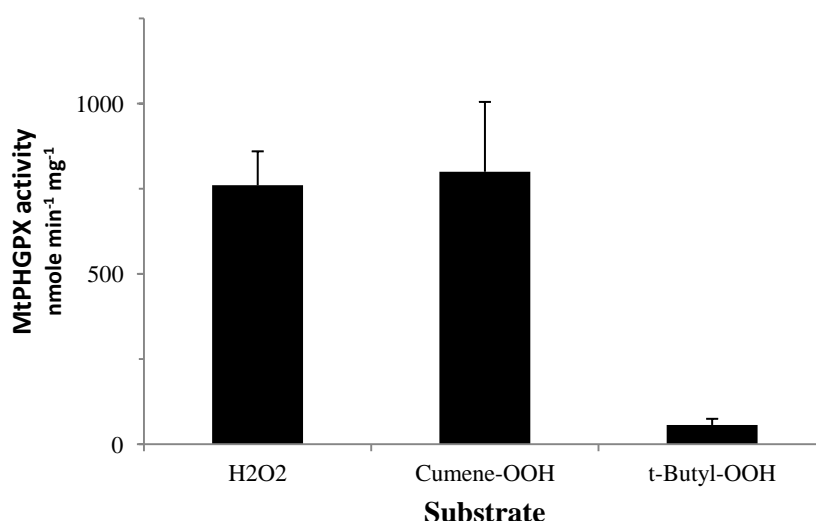
Από μελέτες που έχουν γίνει φάνηκε πως οι PHGPX μπορούν να καταβολίζουν εκτός από H_2O_2 και μόρια λιπιδικών υπεροξειδίων όπως Cumene-OOH και t-butyl-OOH. Σημαντικό ρόλο στην δραστικότητα του ενζύμου παίζει ένας δότης ηλεκτρονίων που επιτρέπει την αναγωγή του υποστρώματος. Στις GPX ο δότης αυτός είναι αποκλειστικά το μόριο της γλουταθειόνης. Στην περίπτωση των PHGPX έχει παρατηρηθεί πως είναι σε θέση να χρησιμοποιούν και την θειορεδοξίνη για να εξυπηρετήσει αυτή την ανταλλαγή. Όπως μπορεί να συμπεράνει κανείς με βάση τη βιβλιογραφία, το υπόστρωμα και ο δότης ηλεκτρονίων που χρησιμοποιεί το εκάστοτε ένζυμο PHGPX μεταβάλλονται από οργανισμό σε οργανισμό. Θεωρήθηκε λοιπόν ενδιαφέρον να προσδιοριστούν το υπόστρωμα και ο δότης ηλεκτρονίων για το φυτό υπό διερεύνηση.

Η βασική αντίδραση περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Επιλέχθηκε να διερευνηθούν ως πιθανά υποστρώματα το H_2O_2 και τα Cumene-OOH και t-Butyl-OOH ως χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι των λιπιδικών υπεροξειδίων. Ως δότες ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικά η γλουταθειόνη και η θειορεδοξίνη. Οι δότες ηλεκτρονίων οξειδώνονται προσφέροντας ένα ηλεκτρόνιο μέσω του ατόμου υδρογόνου και ανάγονται και πάλι ώστε να είναι διαθέσιμοι από ένα παράλληλο σύστημα αναγωγής από τα ένζυμα αναγωγής της γλουταθειόνης (GR) και θειορεδοξίνης (ThxR) αντίστοιχα. Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιούν ένα μόριο NADPH ως δότη ηλεκτρονίων αντίστοιχα και προσφέρουν στην κύρια αντίδραση ανηγμένα τα υποστρώματά τους. Η ταχύτητα των ενζύμων αυτών σχετίζεται άμεσα με τις μετρήσεις και την ταχύτητα της κύριας αντίδρασης υπό μελέτη. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε περίσσεια ενζύμου και δότη ηλεκτρονίων για τις δευτερεύουσες αντιδράσεις αναγωγής γλουταθειόνης και θειορεδοξίνης.

Ακολουθώντας την αντίδραση, όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι» μετρήθηκε και υπολογίστηκε η δραστικότητα του ανασυνδυασμένου ενζύμου

MtPHGPX σε συνάρτηση με τα διαφορετικά υποστρώματα αλλά και τους διαφορετικούς δότες ηλεκτρονίων. Στο γράφημα 5 φαίνεται η δραστηριότητα της MtPHGPX όταν αυτή βρίσκεται σε κορεσμό από τα υποστρώματα. Το ένζυμο φαίνεται να καταβολίζει με μεγαλύτερους ρυθμούς τα υποστρώματα H₂O₂ και Cumene-OOH συγκεκριμένα με ταχύτητα 763±96 nmole min⁻¹ mg⁻¹ και 802±197 nmole min⁻¹ mg⁻¹ αντίστοιχα. Το υπόστρωμα t-Butyl-OOH μεταβολίζεται με πολύ χαμηλούς ρυθμούς, δηλαδή 53±18 nmole min⁻¹ mg⁻¹. Οι μετρήσεις αυτές έγιναν με δότη ηλεκτρονίων τη θειορεδοξίνη σε περίσσεια και αποτέλεσαν τις βέλτιστες μετρήσεις.

Στη συνέχεια μετρήθηκε η συγγένεια των υποστρωμάτων και δοτών ηλεκτρονίων K_m όπως ορίζει η εξίσωση Michaelis-Menten. Για την ακρίβεια, έγινε με

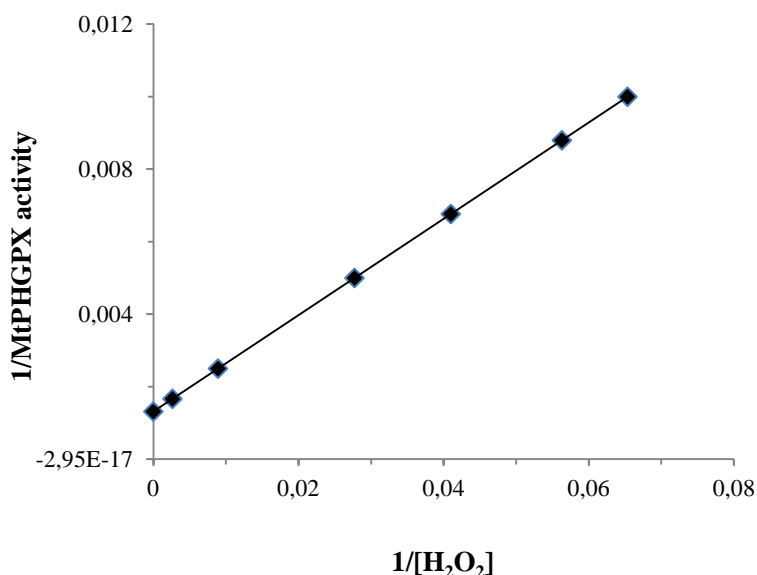


Γράφημα 5: Γραφική απεικόνιση της δραστηριότητας της MtPHGPX σε σχέση με τα υποστρώματα H₂O₂, Cumene-OOH και t-Butyl-OOH. Η αντίδραση και ο υπολογισμός της δραστηριότητας περιγράφεται στη σελίδα 94. Το συγκεκριμένο γράφημα προέκυψε μετά από τις μετρήσεις που έγιναν με δότη ηλεκτρονίων την θειορεδοξίνη. Όλα τα αντιδρώντα και ένζυμο που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση βρισκόταν σε περίσσεια με σκοπό να μην παρεμποδιστεί η μέγιστη ταχύτητα του ενζύμου. Το H₂O₂ και το Cumene-OOH φαίνεται να μεταβολίζονται ταχύτερα με ρυθμούς 763±96 nmole min⁻¹ mg⁻¹ και 802±197 nmole min⁻¹ mg⁻¹ αντίστοιχα. Το υπόστρωμα t-Butyl-OOH μεταβολίζεται με πολύ αργούς ρυθμούς, 53±18 nmole min⁻¹ mg⁻¹.

χρήση της τροποποιημένης εξίσωσης Lineweaver-Burk που έχει ως εξής:

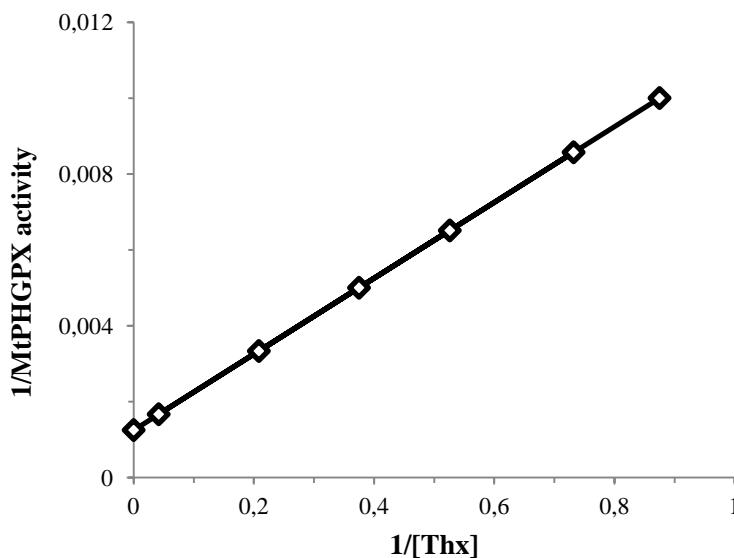
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$$

Στο γράφημα 6 φαίνεται η καμπύλη υπολογισμού της τιμής K_m για το βέλτιστο υπόστρωμα H_2O_2 και στο γράφημα 7 φαίνεται η καμπύλη υπολογισμού της τιμής K_m για τον βέλτιστο δότη ηλεκτρονίων, τη θειορεδοξίνη. Οι τιμές που προκύπτουν είναι $101 \pm 30 \mu M$ για το υπόστρωμα H_2O_2 και $8 \pm 4 \mu M$ για το δότη ηλεκτρονίων θειορεδοξίνη. Οι αντίστοιχες τιμές K_m για τα υπόλοιπα υποστρώματα υπολογίστηκαν να είναι σημαντικά μεγαλύτερες, συγκεκριμένα $478 \pm 153 \mu M$ για το Cumene-OOH και $931 \pm 274 \mu M$ για το t-Butyl-OOH. Η τιμή K_m της γλουταθειόνης βρέθηκε να είναι επίσης υψηλή, $33 \pm 12 \mu M$. Η εξίσωση που προκύπτει για το H_2O_2 είναι $y = 0,132895x + 0,001316$ και η εξίσωση που προκύπτει για τη θειορεδοξίνη είναι $y = 0,01x + 0,00125$. Όλες οι μετρήσεις έγιναν τρεις φορές σε ανεξάρτητες αντιδράσεις και οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν μέσο όρων των μετρήσεων.



Γράφημα 6: Γραφική παράσταση της καμπύλης υπολογισμού της K_m για το υπόστρωμα H_2O_2 . Οι μετρήσεις δραστηριότητας που φαίνονται στον άξονα y ως πηλίκο $1/MtPHGPX \text{ activity}$ κατεγράφησαν μετά από διαδοχικές αραιώσεις του

υποστρώματος που εκφράζεται ως πηλίκο $1/[H_2O_2]$ στον άξονα x. Η εξίσωση που προκύπτει από την καμπύλη είναι $y=0,132895x+0,001316$.



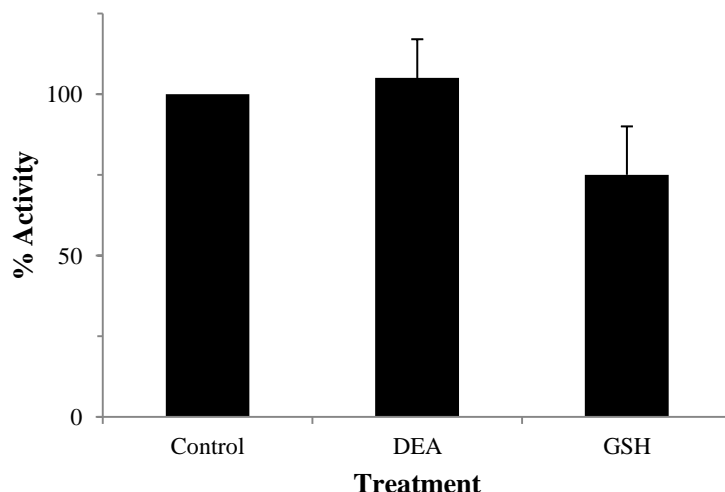
Γράφημα 7: Γραφική παράσταση της καμπύλης υπολογισμού της K_m για τον δότη ηλεκτρονίων θειορεδοξίνη. Οι μετρήσεις δραστηριότητας που φαίνονται στον άξονα y ως πηλίκο $1/MtPHGPX$ activity κατεγράφησαν μετά από διαδοχικές αραιώσεις γλουταθειόνης που εκφράζεται ως πηλίκο $1/[GSH]$ στον άξονα x. Η εξίσωση που προκύπτει από την καμπύλη είναι $y=0,01x+0,00125$.

III. Επίδραση του NO στη δραστηριότητα της MtPHGPX

Μετά τον προσδιορισμό των βιοχημικών παραμέτρων και της δραστηριότητας του ενζύμου καθώς και του βέλτιστου υποστρώματος και δότη ηλεκτρονίων, στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης του NO στο ένζυμο. Έχει δειχθεί σε μελέτες GPX θηλαστικών πως το NO αναστέλλει δραστικά την ενεργότητα του ενζύμου καθώς προκαλεί δομικές αλλαγές στην πρωτεϊνική του δομή με την πρόσδεση του μορίου σε κρίσιμα σημεία που ελέγχουν τη λειτουργικότητα του ενεργού κέντρου. Γενικότερα το NO έχει ενοχοποιηθεί για αναστολή ή τουλάχιστο τροποποίηση της δραστηριότητας μιας σειράς ενζύμων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η GAPDH, η οποία χρησιμοποιείται πλέον και ως δείκτης για την αποτελεσματικότητα μεταχείρισης με NO σε ανάλογα πειράματα.

Το ανασυνδυσασμένο ένζυμο MtPHGPX επωάστηκε με δότες NO και τα αντίστοιχα μόρια ελέγχου. Οι δότες NO αποτελούνται εκτός από την ομάδα NO και από ένα μόριο-σκελετό που φέρει αυτή την ομάδα, η οποία τελικά απελευθερώνεται είτε σε επαφή με κάποιο άλλο μόριο δέκτη, είτε ανεξάρτητα. Αυτά τα μόρια-σκελετοί δεν ήταν γνωστό αν έχουν κάποια επίδραση στη δραστικότητα της MtPHGPX και για το λόγο κρίθηκε σημαντικό να ελεγχθεί αυτό το ενδεχόμενο. Διαφορετικά δεν θα μπορούσαν να εξαχθούν ακριβή συμπεράσματα για το αν η μεταβολή της δραστικότητας οφείλεται στα μόρια NO και όχι στα μόρια-σκελετούς που τα φέρουν. Ως μόριο ελέγχου για τον δότη NO χρησιμοποιήθηκε η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH). Για τον δότη DEANONOate χρησιμοποιήθηκε το μόριο DEA. Και τα δύο μόρια προεπωάστηκαν ξεχωριστά με το ένζυμο για 10min σε θερμοκρασία δωματίου και σε συγκέντρωση 0.5mM, όπως και αυτή των δοτών NO. Στο γράφημα 8 φαίνεται η επίδραση των μορίων σκελετών στην δραστικότητα της ανασυνδυσασμένης MtPHGPX.

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν το βέλτιστο υπόστρωμα, H₂O₂ και ο βέλτιστος δότης ηλεκτρονίων θειορεδοξίνη σε περίσσεια. Τα μόρια-σκελετοί δεν προκαλούν μεταβολές με στατιστικά σημαντικές διαφορές στην δραστικότητα της MtPHGPX. Η επίδρασή τους εκφράστηκε ως ποσοστό επί τοις εκατό της δραστικότητας της αντίδρασης ελέγχου. Η αντίδραση ελέγχου κατείχε το 100% της δραστικότητας και δεν είχε υποστεί κάποια μεταχείριση. Συγκεκριμένα μετά από μεταχείριση με DEA η δραστικότητα της MtPHGPX μετρήθηκε να είναι στο 105±12% της δραστικότητας control και μετά από μεταχείριση με GSH η δραστικότητα βρέθηκε να είναι στο 78±15% της δραστικότητας control.

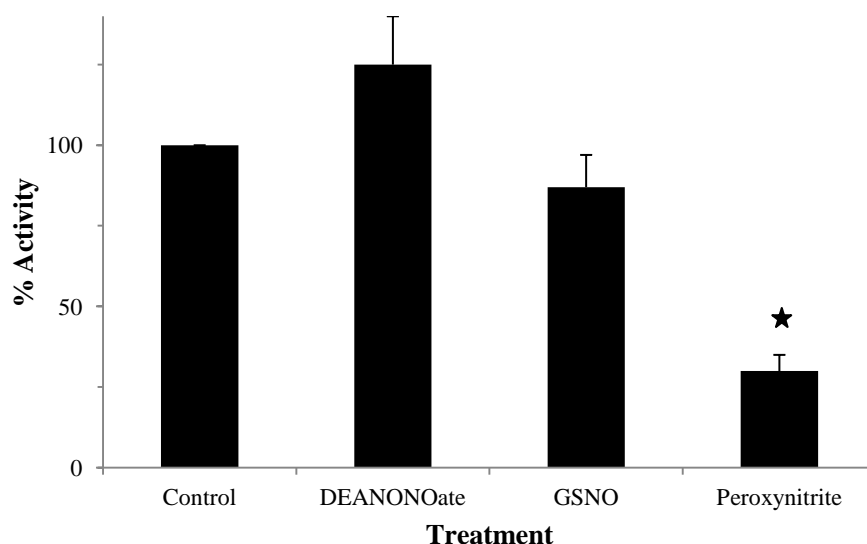


Γράφημα 8: Γραφική παράσταση της επίδρασης των μορίων-σκελετών DEA και GSH στην δραστικότητα της MtPHGPX. Η επίδραση εκφράστηκε ως ποσοστό επί τοις εκατό, όπου 100% είναι η δραστικότητα του ενζύμου που δεν έχει υποστεί μεταχείριση (control). Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως βέλτιστο υπόστρωμα το H_2O_2 και ως βέλτιστος δότης ηλεκτρονίων η θειορεδοξίνη.

Για τη μελέτη επίδρασης του NO στη δραστικότητα της ανασυνδυασμένης MtPHGPX ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος. Οι δότες NO DEANONOate, GSNO και υπεροξυνιτρώδες ($ONOO^-$) προεπώαστηκαν σε ξεχωριστές αντιδράσεις με το ανασυνδυασμένο ένζυμο για 10min σε θερμοκρασία δωματίου και σε συγκέντρωση 0.5mM. Στη συνέχεια προστέθηκαν όλα τα αντιδρώντα και το παράλληλο ενζυμικό σύστημα, εκτός του υποστρώματος για να μηδενιστεί η αντίδραση. Η έναρξη της αντίδρασης έγινε με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας υποστρώματος. Όλοι οι συντελεστές της αντίδρασης προστέθηκαν σε περίσσεια για να μην περιορίσουν τη μέτρηση με την έλλειψή τους. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν H_2O_2 , το οποίο μετρήθηκε να έχει την χαμηλότερη K_m , αυτό δηλαδή για το οποίο το ένζυμο έδειξε να έχει την υψηλότερη συγγένεια. Με βάση την K_m επιλέχθηκε και ο βέλτιστος δότης ηλεκτρονίων για την αντίδραση, η θειορεδοξίνη.

Το γράφημα 9 απεικονίζει την επίδραση των διαφορετικών δοτών NO στη δραστικότητα της MtPHGPX. Η δραστικότητα του ενζύμου εκφράστηκε ως ποσοστό επί τοις εκατό. Η δραστικότητα του ενζύμου χωρίς να υποστεί κανενός είδους

μεταχείρισης control αποτέλεσε το 100% της δραστικότητας. Οι δότες NO DEANONOate και GSNO δεν προκάλεσαν μεταβολές με στατιστικώς σημαντικές



Γράφημα 9: Γραφική παράσταση που απεικονίζει την επίδραση των DEANONOate, GSNO και ONOO⁻ στη δραστικότητα της ανασυνδυασμένης MtPHGPX. Η επίδραση εκφράστηκε ως ποσοστό επί τοις εκατό, όπου 100% είναι η δραστικότητα του ενζύμου που δεν έχει υποστεί μεταχείριση (control). Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως βέλτιστο υπόστρωμα το H₂O₂ και ως βέλτιστος δότης ηλεκτρονίων η θειορεδοξίνη. Ο αστερίσκος επισημαίνει την στατιστικώς σημαντική διαφορά με $p=0.01362$.

διαφορές. Ο DEANONOate μετρήθηκε να προκαλεί μεταβολή της δραστικότητας έτσι ώστε αυτή να αγγίζει τα επίπεδα του 125±17% και ο δότης GSNO τα επίπεδα του 87±11%. Αντιθέτως το ONOO⁻ προκάλεσε δραστική μείωση της δραστικότητας του ενζύμου. Για την ακρίβεια η αναστολή ήταν της τάξης του 70% περίπου. Η τελική δραστικότητα του ενζύμου μετά τη μεταχείριση με ONOO⁻ μετρήθηκε στο ποσοστό του 30±5%. Η διαφορά με το control βρέθηκε να είναι στατιστικώς σημαντική, όπως επισημαίνεται στο γράφημα 9 με αστερίσκο ($p=0.01362$). Οι μετρήσεις για όλες τις αντιδράσεις έγιναν τρεις φορές σε ανεξάρτητες αντιδράσεις και οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τον μέσο όρο των μετρήσεων.

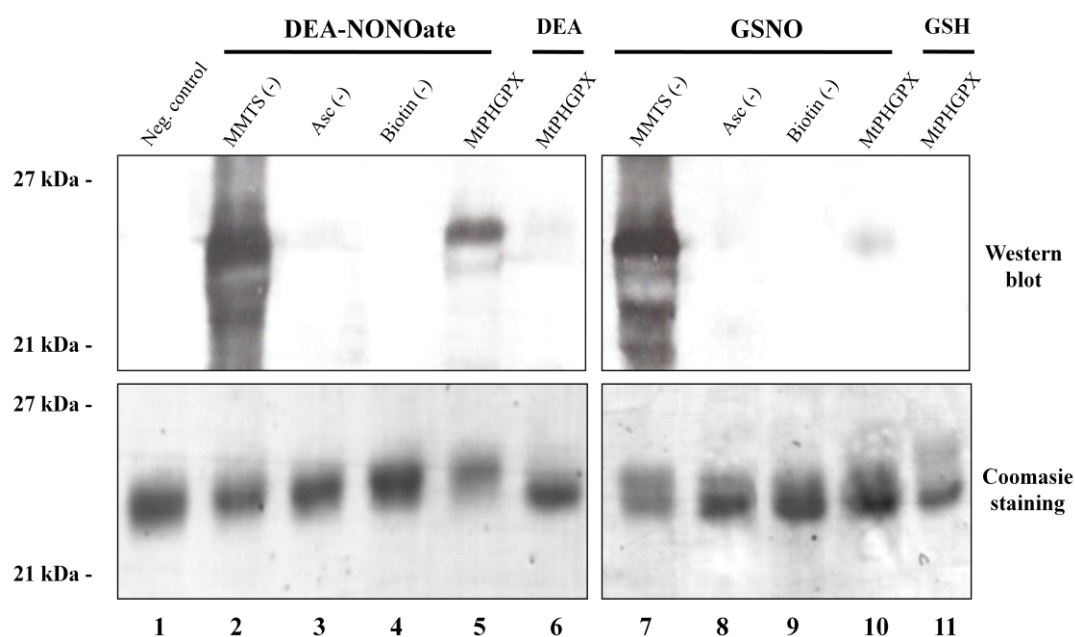
IV. S-νιτροσυλίωση των κυστεϊνών της MtPHGPX

Η επίδραση του NO στη δραστικότητα ενζύμων οφείλεται συχνά σε μια μεταμεταφραστική τροποποίηση, την S-νιτροσυλίωση. Η τροποποίηση αυτή αφορά στην αντικατάσταση του ατόμου υδρογόνου των κυστεϊνών (GS-H) με μια ομάδα NO. Όταν οι κυστεΐνες που τροποποιούνται συμμετέχουν ενεργά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ή συμβάλλουν με κάποιον τρόπο στη σωστή διαμόρφωσή του, η δραστικότητα του ενζύμου μεταβάλλεται. Οι PHGPX έχει βρεθεί πως περιέχουν τρεις κυστεΐνες στην αλληλουχία που πιστεύεται ότι αποτελεί το ενεργό τους κέντρο. Τουλάχιστο δύο από αυτές έχει δειχθεί ότι παίζουν κρίσιμο ρόλο στον καταβολισμό του υποστρώματος. Θεωρητικά το υδρογόνο των κυστεϊνών αυτών αντικαθίσταται με ένα υδροξύλιο από το υπόστρωμα και όταν αυτό απομακρύνεται οι δύο κυστεΐνες σχηματίζουν δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ τους μέχρι να αναχθούν από τους δότες ηλεκτρονίων και να επανέλθουν στην αρχική μορφή.

Μετά την μοριακή ανάλυση της MtPHGPX βρέθηκε πως η κοινή περιοχή διαθέτει τις τρεις συντηρημένες κυστεΐνες οι οποίες ενδέχεται να συμμετέχουν και να διαμορφώνουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η μελέτη επίδρασης των δοτών NO έδειξε πως οι DEANONOate και GSNO βρέθηκε πως δεν επηρεάζουν σημαντικά τη δραστικότητα της ανασυνδυσμένης MtPHGPX. Παρόλα αυτά η μέτρηση αυτή δεν ήταν σε θέση να δώσει πληροφορίες για το αν όντως προσδένονται οι ομάδες NO στα κατάλοιπα κυστεϊνών. Ενδεχομένως οι δότες NO να μην ήταν σε θέση να διοχετεύσουν την NO ομάδα στην πρωτεΐνη MtPHGPX και εκεί να οφείλεται η ανεπηρεάστη δραστικότητα του ενζύμου. Κρίθηκε για το λόγο αυτό απαραίτητο να διαπιστωθεί αν οι κυστεΐνες της MtPHGPX S-νιτροσυλιώνονται από τους DEANONOate και GSNO δότες.

Η αντικατάσταση με βιοτίνη (Biotin Switch Method; BSM) είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ποιοτική ανίχνευση S-νιτροσυλιωμένων κυστεϊνών (GS-NO) με μεγάλη ευαισθησία. Το θεωρητικό υπόβαθρο της τεχνικής και τα βήματα της διαδικασίας περιγράφονται αναλυτικά στα «Υλικά και Μέθοδοι». Στην Εικόνα 29 φαίνονται τα αποτελέσματα της BSM σε δείγματα ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης MtPHGPX που υπέστησαν μεταχείριση με DEANONOate και GSNO. Για τον έλεγχο

αξιοπιστίας της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν ορισμένες αντιδράσεις control που θα βοηθούσαν στη διαπίστωση ενδεχόμενων λαθών στη μέθοδο βήμα προς βήμα.



Εικόνα 29: Εντοπισμός *S*-νιτροσυλιωμένων κυστεϊνών στην *MtpHGPX* μετά από μεταχείριση με τους δότες *NO* *DEA-NONOate* και *GSNO* με την τεχνική της *BSM*. Στη διαδρομή 5 φαίνεται η ανίχνευση *S*-νιτροσυλιωμένων κυστεϊνών μετά από επώαση με *DEANONOate* 0.5mM. Στη διαδρομή 10 φαίνεται η αχνή ανίχνευση *S*-νιτροσυλιωμένων κυστεϊνών μετά από μεταχείριση της *MtpHGPX* με *GSNO* 0.5mM. Στις υπόλοιπες διαδρομές φαίνονται οι αντιδράσεις ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν βοηθητικά για την πιστοποίηση της εγκυρότητας της μεθόδου.

Στη διαδρομή 1 φαίνεται δείγμα *MtpHGPX* που δεν υπέστη τη διαδικασία *BSM* και χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control για την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Στις διαδρομές 2 και 7 φαίνονται δείγματα πρωτεΐνης *MtpHGPX* που επώαστηκαν με *DEANONOate* και *GSNO* αντίστοιχα αλλά οι ελεύθερες από *NO* κυστεΐνες τους δεν αντικαταστάθηκαν με μεθυλομάδες μέσω του *MMTS*. Για το λόγο αυτό όλες οι κυστεΐνες έχουν δεχτεί το μόριο της βιοτίνης με αποτέλεσμα να δίνουν έντονο σήμα ανεξάρτητα από την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας νιτροσυλίωσης. Τα δείγματα αυτά αποτέλεσαν το θετικό control της μεθόδου για τον έλεγχο του ειδικού αντισώματος και την ικανότητα υποκατάστασης με βιοτίνη. Στις διαδρομές 3 και 8 φαίνονται οι αντιδράσεις στις οποίες δεν

προστέθηκε ασκορβικό οξύ με αποτέλεσμα να μην αντικατασταθεί η ομάδα NO από υδρογόνο, γεγονός που απέκλεισε την αντικατάσταση με βιοτίνη. Για τον λόγο αυτό οι αντιδράσεις αυτές δεν έχουν συγκρατήσει μόρια βιοτίνης και δεν ανιχνεύονται από το αντίσωμα. Στις διαδρομές 4 και 9 φαίνονται αντιδράσεις στις οποίες δεν προστέθηκε βιοτίνη με αποτέλεσμα να μην δίνουν σήμα μετά τη χρήση του αντισώματος.

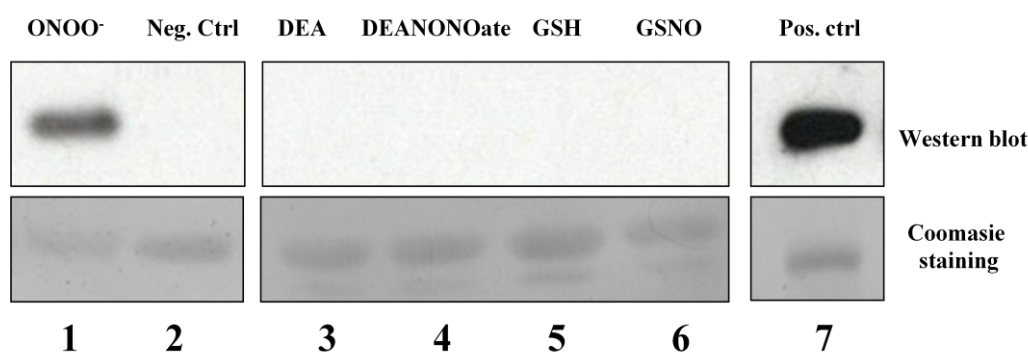
Στις διαδρομές 6 και 11 φαίνονται τα δείγματα MtPHGPX στα οποία το ένζυμο επώαστηκε αρχικά με τα μόρια-σκελετούς DEA και GSH αντί των DEANONOate και GSNO αντίστοιχα. Όπως ήταν αναμενόμενο, στο βήμα της υποκατάστασης με μεθυλομάδες, όλες οι κυστεΐνες υποκαταστάθηκαν και καμία κυστεΐνη δεν είχε προσδεδεμένη NO ομάδα για να αντικατασταθεί με βιοτίνη στη συνέχεια, ώστε να ανιχνευτεί από το αντίσωμα. Τέλος, στις διαδρομές 5 και 10 φαίνονται τα δείγματα MtPHGPX μετά από επώαση με DEANONOate και GSNO αντίστοιχα. Όταν η πρωτεΐνη επώαστηκε με DEANONOate το σήμα ανιχνεύτηκε να είναι ισχυρό, γεγονός που σημαίνει πως κάποια ή κάποιες από τις τρεις κυστεΐνες της MtPHGPX S-νιτροσουλιώθηκαν. Η τεχνική αυτή δεν είναι σε θέση να ταυτοποιήσει τις κυστεΐνες που δέχονται την NO ομάδα καθώς και την ποσότητα κυστεϊνών που τροποποιούνται με αυτόν τον τρόπο. Όταν η πρωτεΐνη επώαστηκε με GSNO ανιχνεύτηκε με πολύ αχνό σήμα η S-νιτροσουλίωση της MtPHGPX. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως ο δότης GSNO δεν είναι αρκετά αποτελεσματικός όσον αφορά στην μεταμεταφραστική αυτή τροποποίηση. Η μέθοδος δεν είναι καθαρά ποσοτική, παρόλα αυτά η διαφορά έντασης του σήματος με τα θετικά control δίνει την ημιποσοτική πληροφορία ότι τα επίπεδα τροποποίησης είναι σχετικά χαμηλά σε αυτήν την περίπτωση.

V. Νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης της MtPHGPX

Εκτός από την S-νιτροσουλίωση κυστεϊνών, άλλη μια μεταμεταφραστική τροποποίηση που επιφέρουν οι δότες NO είναι η νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης. Συγκεκριμένα το υδρογόνο του άνθρακα 3 του αρωματικού δακτυλίου του

καταλοίπου της τυροσίνης αντικαθίσταται με μια ομάδα NO_2 . Η αντικατάσταση αυτή δύναται να προκαλέσει μεταβολές στη δραστικότητα των ενζύμων εφόσον η τυροσίνη-στόχος συμμετέχει ή διαμορφώνει το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Τα κατάλοιπα νιτροτυροσίνης ευθύνονται συχνά για την αναστολή της δραστικότητας ενζύμων.

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε πως η δραστικότητα της MtPHGPX δεν επηρεάζεται από τις ενώσεις DEANONOate και GSNO. Αντιθέτως σημειώθηκε δραματική μείωση της ενεργότητας του ενζύμου μετά από επώαση με ONOO^- . Θεωρήθηκε ενδιαφέρον να διαπιστωθεί αν το μόριο αυτό είναι σε θέση να προκαλέσει δομικές αλλαγές στο ένζυμο, όπως η μετατροπή της τυροσίνης σε νιτροτυροσίνη, που μπορούν να δικαιολογήσουν αυτήν την αναστολή. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στα «Υλικά και Μέθοδοι». Τα αποτελέσματα της μελέτης νίτρωσης καταλοίπων τυροσίνης της ανασυνδυασμένης MtPHGPX φαίνονται στην Εικόνα 30.



Εικόνα 30: Εντοπισμός νιτροτυροσινών στην MtPHGPX μετά από μεταχείριση με τους δότες NO ONOO^- , DEA-NONOate και GSNO σε συγκέντρωση 0.5mM. Στη διαδρομή 1 φαίνεται η ανίχνευση νιτροτυροσίνης μετά από επώαση με ONOO^- . Στη διαδρομή 10 φαίνεται η αχνή ανίχνευση S-νιτροσυλιωμένων κυστεϊνών μετά από μεταχείριση της MtPHGPX με GSNO 0.5mM. Στις διαδρομές 2 και 7 φαίνονται οι αντιδράσεις ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν βοηθητικά για την πιστοποίηση της εγκυρότητας της μεθόδου. Στη διαδρομή 2 η MtPHGPX δεν επώαστηκε με δότη NO , ενώ στη διαδρομή 7 χρησιμοποιήθηκε επιβεβαιωμένος θετικός δείκτης νιτρομένης αλβουμίνης BSA.

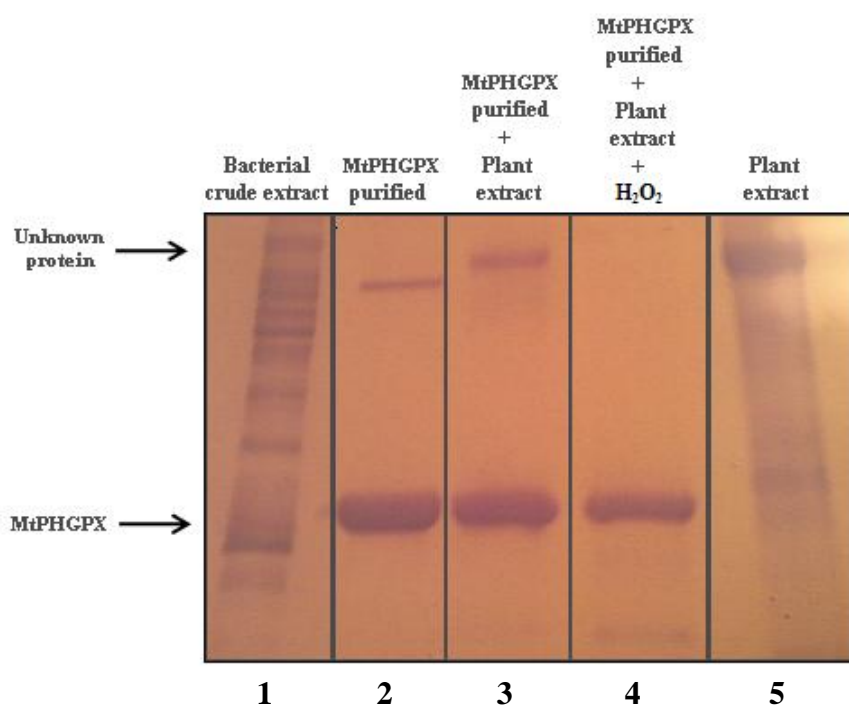
Φαίνεται καθαρά πως η MtPHGPX περιέχει κατάλοιπα νιτροτυροσίνης μετά από επώαση της ανασυνδυασμένης MtPHGPX με ONOO⁻, καθώς το ειδικό αντίσωμα έχει δώσει πολύ έντονο σήμα στη διαδρομή 1. Αντιθέτως, οι DEANONOate και GSNO, όπως και τα μόρια-σκελετοί τους στις διαδρομές 3 μέχρι 6, δεν έχουν προκαλέσει ανιχνεύσιμες μετατροπές στα κατάλοιπα τυροσίνης της MtPHGPX. Στη διαδρομή 7 φαίνεται η θετική αντίδραση ελέγχου, όπου έχει χρησιμοποιηθεί επιβεβαιωμένο πρότυπο αλβουμίνης BSA που περιέχει κατάλοιπα νιτροτυροσίνης. Με τη χρήση αυτού του δείγματος ελέγχθηκε η ικανότητα του αντισώματος να προσδένεται σε κατάλοιπα νιτροτυροσίνης. Στη διαδρομή 2 φαίνεται η αρνητική αντίδραση ελέγχου στην οποία η MtPHGPX δεν υπέστη καμία μεταχείριση.

VI. Αλληλεπίδραση της MtPHGPX με άλλες πρωτεΐνες

Έχει δειχθεί πως ορισμένες PHGPX είναι σε θέση να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες και να τις τροποποιούν με σκοπό τη μετάδοση κάποιου σήματος. Στόχος ήταν να διαπιστωθεί αν η MtPHGPX έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου υπό φυσιολογικές συνθήκες ή υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης. Αρχικά η καθαρή υπερεκφρασμένη MtPHGPX πρωτεΐνη δεσμεύτηκε σε στήλη νικελίου. Στη συνέχεια η στήλη διαποτίστηκε με ποσότητα ολικής πρωτεΐνης ρίζας και φύλλων που απομονώθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι» με ή χωρίς την προσθήκη 0.5mM H₂O₂. Η στήλη με τη δεσμευμένη πρωτεΐνη και το εκχύλισμα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα υπό ελαφρά ανακίνηση. Ακολούθησε μια διαδικασία διαδοχικών πλύσεων και η τελική έκλυση. Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν διαχωρίστηκαν σε SDS-PAGE και τα αποτελέσματα διαχωρισμού των κλασμάτων της έκλυσης φαίνονται στην Εικόνα 31 μετά από χρώση με Coomassie.

Στην πρώτη και την τελευταία διαδρομή φαίνονται τα εκχυλίσματα ολικής πρωτεΐνης από τα βακτήρια που υπερεκφράζουν την MtPHGPX και από ρίζες και φύλλα του φυτού *Medicago truncatula*, αντίστοιχα. Στη δεύτερη διαδρομή φαίνεται η καθαρή MtPHGPX, όπως επισημαίνεται με το βέλος στο σωστό μέγεθος. Παρατηρείται μια δεύτερη ζώνη σε υψηλό μοριακό βάρος η οποία ενδεχομένως να έχει βακτηριακή προέλευση. Στην τρίτη και τέταρτη διαδρομή φαίνονται τα

κλάσματα έκλουσης παρουσία ή απουσία 0.5mM H₂O₂ αντίστοιχα. Και στα δύο κλάσματα φαίνεται η MtPHGPX στο σωστό μέγεθος. Στο έκλουσμα χωρίς την προσθήκη H₂O₂ φαίνεται να εμφανίζεται μια ζώνη οποία δεν έχει το ίδιο μοριακό βάρος με τη ζώνη που εμφανίζεται στην καθαρή πρωτεΐνη (επισημαίνεται με βέλος) και βρίσκεται στο ίδιο ύψος με μια πολύ έντονη ζώνη που παρατηρείται στο εκχύλισμα ολικής πρωτεΐνης από το φυτό. Η ζώνη αυτή εξαφανίζεται με την προσθήκη H₂O₂, γεγονός που θα μπορούσε να σημαίνει ότι η πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ της άγνωστης πρωτεΐνης και της MtPHGPX αναστέλλεται από το H₂O₂.



Εικόνα 31: Αλληλεπίδραση των MtPHGPX με άλλες πρωτεΐνες. Στη διαδρομή 1 φαίνεται το εκχύλισμα ολικής πρωτεΐνης των βακτηρίων που υπερεκφράζουν την MtPHGPX. Στη διαδρομή 5 φαίνεται το εκχύλισμα ολικής πρωτεΐνης ριζών και φύλλων του φυτού *Medicago truncatula*. Στη διαδρομή 2 φαίνεται η καθαρή πρωτεΐνη MtPHGPX. Στη διαδρομή 3 φαίνεται το έκλουσμα της αλληλεπίδρασης της MtPHGPX με ολική πρωτεΐνη του φυτού. Στη διαδρομή 4 φαίνεται το έκλουσμα της αλληλεπίδρασης της MtPHGPX με ολική πρωτεΐνη του φυτού παρουσία 0.5mM H₂O₂. Τα βέλη επισημαίνουν την MtPHGPX και την άγνωστη ζώνη που ενδεχομένως να περιέχει μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την MtPHGPX.

Παρόλο που τα αποτελέσματα παρουσιάζουν μεγάλη επαναληψιμότητα, η εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης δεν είναι δεδομένη. Η ζώνη αυτή ενδέχεται να μην αποτελείται μόνο από μια πρωτεΐνη και επιπλέον μπορεί να δεσμεύεται μη ειδικά πάνω στη στήλη παρουσία της υπερεκφρασμένης MtPHGPX. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως, όταν επώαστηκε καθαρή στήλη με εκχύλισμα ολικής πρωτεΐνης από το φυτό, δεν παρατηρήθηκε καμία ζώνη στο έκλουσμα. Αυτό σημαίνει πως η ζώνη που παρουσιάζεται στη διαδρομή 3 είτε αποτελεί πρωτεΐνη με την οποία πράγματι αλληλεπιδρά η MtPHGPX, είτε προκύπτει από μη ειδική δέσμευση πάνω στη στήλη. Αυτή η μη ειδική πρόσδεση μπορεί να αναστέλλεται από το H_2O_2 .

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

I. Το γονίδιο και οι ισομορφές της MtPHGPX

Οι PHGPX είναι ιδιαίτερα μέλη της οικογένειας των GPX στην πλειοψηφία των οργανισμών, όπως και στα ανώτερα φυτά. Οι αλληλουχίες τους είναι συντηρημένες σε πολύ μεγάλο βαθμό. Περιέχουν περιοχές τόσο αυστηρά συντηρημένες που δίνουν το χαρακτηριστικό στίγμα αναγνώρισης των ενζύμων, το οποίο συχνά χρησιμοποιείται και για την ταυτοποίησή τους μέσω της φασματοσκοπίας μάζας (214). Η MtPHGPX, όπως έδειξε η παρούσα μελέτη, μοιράζεται πιστά τα περισσότερα από αυτά τα χαρακτηριστικά.

Το γονίδιο της *mtphgpX* αποτελείται από επτά εξόνια και 6 ιντρόνια. Τα ιντρόνια 3-7 κωδικοποιούν πιθανότατα για την περιοχή που περιλαμβάνει το ενεργό κέντρο, όπως έχει υπαινιχθεί και για PHGPX άλλων οργανισμών. Για το λόγο αυτό αποτελούν το κοινό καρβοξυ-τελικό άκρο και των δύο ισομορφών MtPHGPXα και MtPHGPXβ. Τα εξόνια 1 και 2 εκφράζονται επιλεκτικά στις δύο ισομορφές και αποτελούν τη μοναδική διαφορά μεταξύ των δύο. Η ισομορφή *MtPHGPXα* περιέχει το εξόνιο 1 και η *MtPHGPXβ* περιέχει το εξόνιο 2 (Εικόνα 16). Το εξόνιο 2 παρεμβάλλεται των 1 και 3, γεγονός που σημαίνει πως, για να σχηματιστεί το *MtPHGPXα* μετάγραφο το εξόνιο αυτό, με κάποιον τρόπο, παραλείπεται. Το φαινόμενο παραπέμπει στο μηχανισμό εναλλακτικού ματίσματος (AS; Alternative Splicing). Αντίστοιχα, για να σχηματιστεί το μετάγραφο *MtPHGPXβ* παραλείπεται το εξόνιο 1. Το τελευταίο μπορεί να δικαιολογείται με την ύπαρξη δύο διαφορετικών σημείων έναρξης της μεταγραφής (TSS; transcription Start Sites). Δηλαδή, το TSS του *MtPHGPXβ* μεταγράφου ενδεχομένως να βρίσκεται σε διαφορετικό σημείο από αυτό του *MtPHGPXα* μεταγράφου και έτσι να προκύπτουν δύο διαφορετικά ανώριμα μετάγραφα από το γονίδιο. Το pre-mRNA που προορίζεται για την ωρίμανση του *MtPHGPXα* μεταγράφου μπορεί να υφίσταται AS και το pre-mRNA που προορίζεται για την ωρίμανση του *MtPHGPXβ* μεταγράφου να ακολουθεί τις φυσιολογικές διαδικασίες ωρίμανσης καθώς το πρώτο εξόνιο που περιέχει είναι το εξόνιο 2. Σε διαφορετική περίπτωση μπορεί κανείς να υποθέσει πως και τα δύο μετάγραφα προκύπτουν από ένα pre-mRNA το οποίο υφίσταται AS και για τις δύο περιπτώσεις, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της συνθάσης NO στους νευρώνες των θηλαστικών (215).

Η συγκριτική μελέτη έδειξε πως οι MtPHGPX ισομορφές αποτελούν μέλη της κατηγορίας των PHGPX. Διατηρούν όλα τα συντηρημένα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών αυτών και, όπως ήταν αναμενόμενο, μοιράζονται μεγαλύτερη ομολογία με την αντίστοιχη ενός ψυχανθούς, του *Lotus japonicus* (Εικόνα 19). Οι αμέσως επόμενες σε ποσοστό ομοιότητας πρωτεΐνες είναι οι ισομορφές του *Populus trichocarpa* PtrcGPX3.1 και 3.2. Στην ίδια ομάδα του φυλογενετικού δέντρου το οποίο οπτικοποιεί την ομοιότητα των πρωτεϊνών ανήκουν και οι GPX1e-1 και AtGPX6. Στην κοινή τους περιοχή περιέχουν τρεις κυστεΐνες, οι οποίες ενδεχομένως συμμετέχουν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, καθώς το φυτό *Medicago truncatula* δεν είναι σε θέση να κωδικοποιεί για το αμινοξύ SeCys. Το γεγονός αυτό δεν προκαλεί έκπληξη καθώς όλα τα ανώτερα φυτά δεν είναι σε θέση να εκφράσουν το αμινοξύ αυτό. Πιστεύεται μάλιστα πως στην έλλειψη αυτή οφείλεται και το γεγονός ότι οι PHGPX των φυτών παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη δραστικότητα σε σχέση με αυτή των PHGPX των θηλαστικών. Βρέθηκε επίσης πως οι τρεις αλληλουχίες πεπτιδίων που θεωρείται ότι συμμετέχουν στη σωστή διαμόρφωση του ενεργού κέντρου του ενζύμου, διατηρούν στις MtPHGPX αυστηρά επίπεδα συντήρησης (Εικόνα 18).

II. Υποκυτταρικός εντοπισμός των MtPHGPX ισομορφών

Είναι χαρακτηριστικό των PHGPX να εκφράζονται σε δύο διαφορετικές ισομορφές. Στα θηλαστικά η GPX4, που έχει χαρακτηριστεί ως PHGPX, απαντάται σε δύο ισομορφές με την επιλεκτική έκφραση ενός επιπλέον πεπτιδίου-οδηγού στο αμινοτελικό άκρο της ενζυμικής περιοχής. Η μοναδική διαφορά μεταξύ των δύο ισομορφών είναι η παρουσία ή απουσία αυτού του αμινοτελικού πεπτιδίου που προηγείται της ενζυμικής περιοχής. Το πεπτίδιο αυτό είναι υδροφοβικό και θεωρείται υπεύθυνο για την κατεύθυνση της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια. Η έλλειψη του πεπτιδίου αυτού δεν επιτρέπει να δοθεί κάποια συγκεκριμένη κατεύθυνση στην πρωτεΐνη. Συνεπώς, όταν το πεπτίδιο αυτό δεν εκφράζεται, η πρωτεΐνη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ σε αντίθετη περίπτωση στα μιτοχόνδρια.

Και στα ανώτερα φυτά παρατηρείται ο διττός υποκυτταρικός εντοπισμός των ισομορφών PHGPX. Η διαφορική διαμερισματοποίηση των φυτικών PHGPX δεν οφείλεται πάντα στην παρουσία ή απουσία του ίδιου πεπτιδίου-οδηγού, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των θηλαστικών. Έχει παρατηρηθεί πως στα φυτά, σε ορισμένες περιπτώσεις, η ενζυμική περιοχή των PHGPX ισομορφών συνοδεύεται πάντα από ένα πεπτίδιο-οδηγό στο αμινοτελικό άκρο. Το πεπτίδιο αυτό έχει διαφορετική αλληλουχία για κάθε ισομορφή και είναι είτε υδρόφοβο είτε υδρόφιλο με αποτέλεσμα να κατευθύνει την πρωτεΐνη που το φέρει είτε στα μιτοχόνδρια είτε στο κυτταρόπλασμα αντίστοιχα. Το μήκος του δεν ξεπερνά συνήθως τα 75 αμινοξέα. Ένα παράδειγμα αυτού του φαινομένου αποτελούν οι ισομορφές GPXha-1 και -2 του ηλιάνθου. Και οι δύο ισομορφές περιέχουν από ένα πεπτίδιο-οδηγό, διαφορετικό για κάθε ισομορφή, που ηγείται της ενζυμικής περιοχής. Η GPXha-1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ενώ η GPXha-2 στα μιτοχόνδρια λόγω του υδροφοβικού χαρακτήρα του πεπτιδίου (65). Αντίθετα, οι ισομορφές PtrcGPX3.1 και PtrcGPX3.2 δεν αποτελούνται από διαφορετικά πεπτίδια στο αμινοτελικό άκρο σε συνδυασμό με την ενζυμική κοινή περιοχή (50). Ο μιτοχονδριακός εντοπισμός της PtrcGPX3.2 είναι αποτέλεσμα παρουσίας ενός υδροφοβικού πεπτιδίου-οδηγού στο αμινοτελικό άκρο, το οποίο στην ισομορφή PtrcGPX3.1 εκλείπει, όπως έδειξε μελέτη με ετερόλογη έκφραση των συντηγμένων με GFP πρωτεϊνών σε φύλλα καπνού.

Άλλες μιτοχονδριακές ισομορφές PHGPX που αναφέρονται στη βιβλιογραφία αφορούν στα φυτά *Raphanus sativus* (Rs) (216), *Arabidopsis thaliana* (At) (51) και *Oryza sativa* (Os). Το αμινοτελικό πεπτίδιο της RsPHGPX συντήχθηκε με την πρωτεΐνη GFP και εκφράστηκε σε φύλλα καπνού. Το φθορίζον σήμα εντοπίστηκε μόνο στα μιτοχόνδρια. Παρόλα αυτά, δεν είναι γνωστό αν υπάρχει άλλη PHGPX ισομορφή στο οργανισμό, η οποία να είναι κυτταροπλασματική και ποια είναι η ακριβής αλληλουχία της. Μελέτες *in silico* αναφέρουν πως η AtGPX6 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στο μιτοχόνδριο (51). Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που να επαληθεύουν τις προβλέψεις αλλά και πώς προκύπτουν οι δύο ισομορφές με βάση την αλληλουχία τους. Αντίστοιχα, μιτοχονδριακή βρέθηκε να είναι και η ισομορφή GPXle-1 του φυτού *Lycopersicon esculentum* (50).

Οι MtPHGPX ισομορφές περιέχουν και οι δύο ένα διαφορετικό πεπτιδιο-οδηγό στο αμινοτελικό άκρο που προηγείται της κοινής ενζυμικής περιοχής. Σύμφωνα με προβλέψεις, το πεπτιδιο που ηγείται της MtPHGPXβ ισομορφής κατευθύνει την πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια και το πεπτιδιο που ηγείται της MtPHGPXα ισομορφής δεν οδηγεί την πρωτεΐνη σε κανένα οργανίδιο, άρα η τελευταία είναι κυτταροπλασματική. Σε αντίθεση με τις προβλέψεις του προγράμματος MitoProt, η ετερόλογη έκφραση των δύο ισομορφών σε φύλλα καπνού έδειξε πως και οι δύο έχουν κυτταροπλασματικό χαρακτήρα. Καμία από τις δύο ισομορφές δεν βρέθηκε να κατευθύνεται στα μιτοχόνδρια των φύλλων καπνού κρίνοντας με βάση τη σύντηξή τους με την πρωτεΐνη GFP.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι cDNA αλληλουχίες των δύο ισομορφών και παρατηρήθηκε πως δίνουν σήμα GFP στο κυτταρόπλασμα. Θεωρήθηκε πως το γεγονός αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί η MtPHGPXβ ενδεχομένως να κατευθύνεται στα μιτοχόνδρια μόνο υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, παρόλο που κάτι τέτοιο δεν αναφέρονταν στη σχετική διαθέσιμη βιβλιογραφία. Οι υπόλοιπες μιτοχονδριακές PHGPX ισομορφές κατευθύνονταν στα μιτοχόνδρια υπό φυσιολογικές συνθήκες και δεν υπήρχαν στοιχεία για τον εντοπισμό τους υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης. Η μεταχείριση των φύλλων καπνού με παράγοντες που συμμετέχουν στις αντιδράσεις οξειδωτικού στρες, όπως το NO και το H₂O₂, δεν διαφοροποίησε τον υποκυτταρικό εντοπισμό των MtPHGPX ισομορφών.

Στη συνέχεια θεωρήθηκε πως οι αλληλουχίες cDNA πιθανότατα να στερούνταν κάποιες απαραίτητες αλληλουχίες που ίσως να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμερισματοποίηση των ισομορφών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε μια κατασκευή σύντηξης της πλήρους αλληλουχίας του γονιδίου στην πρωτεΐνη GFP ώστε να περιέχονται οι αλληλουχίες των ιντρονίων, οι οποίες ενδεχομένως να περιέχουν απαραίτητες πληροφορίες που επηρεάζουν τον εντοπισμό των πρωτεϊνών. Η *in silico* ανάλυση του πρώτου εξονίου και του πρώτου ιντρονίου με το λογισμικό TSSP της Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter>) έδειξε πως δεν περιλαμβάνουν περιοχές που μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση ή σημεία έναρξης της

μεταγραφής. Αξίζει να σημειωθεί πως η GFP πρωτεΐνη σε αυτή την κατασκευή δεν βρισκόταν εντός του αναγνωστικού πλαισίου και η μόνη πιθανότητα έκφρασής της ήταν η επιτυχής διαδικασία AS προς τον σχηματισμό κάποιας από τις δύο ισομορφές MtPHGPX. Η πιθανότητα διαφορετικών TSS στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν μηδενική καθώς δεν συμπεριλαμβάνονταν αλληλουχίες πέραν του πρώτου ATG κωδικωνίου στο 5' άκρο μέχρι το κωδικώνιο λήξης του 3' άκρου. Το σήμα της GFP πρωτεΐνης παρέμεινε κυτταροπλασματικό δίνοντας ταυτόχρονα την πληροφορία ότι διεκπεραιώθηκαν επιτυχώς γεγονότα AS και οδήγησαν στην έκφραση τουλάχιστον μίας ισομορφής MtPHGPX.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης έρχονται σε αντίθεση με τις προβλέψεις της *in silico* ανάλυσης αλλά και με την πλειοψηφία των δημοσιευμένων μελετών. Η εκτενής ανασκόπηση της βιβλιογραφίας αποκάλυψε ορισμένες μελέτες οι οποίες δεν ήταν σε θέση να εντοπίσουν κάποια PHGPX ισομορφή στα μιτοχόνδρια των φυτών υπό διερεύνηση (51, 217). Τα φυτά αυτά, *Lotus japonicus* και *Phaseolus vulgaris*, όπως και το *Medicago truncatula*, ανήκουν στην κατηγορία των ψυχανθών (Fabaceae ή Leguminosae). Μάλιστα η μελέτη που αφορά στο φυτό *Phaseolus vulgaris* υποστηρίζει ευθέως πως η ύπαρξη μιτοχονδριακών PHGPX στα ψυχανθή τίθεται σε αμφιβολία, καθώς σε κανένα φυτό αυτής της κατηγορίας δεν έχουν εντοπιστεί ισομορφές του ενζύμου σε αυτό το οργανίδιο (218). Πιθανότατα λοιπόν, το γεγονός ότι δεν βρέθηκε στα μιτοχόνδρια η MtPHGPXβ, όπως προέκυπτε από την πρόβλεψη, μπορεί αποδοθεί σε κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της οικογένειας που ανήκει το φυτό, δηλαδή των ψυχανθών.

Είναι γνωστό πως τα ψυχανθή είναι τα μόνα ανώτερα φυτά που είναι σε θέση να αναπτύσσουν ειδικές συμβιωτικές δομές στις ρίζες τους με βακτήρια, τα φυμάτια. Κύρια λειτουργία των φυματίων είναι η ανταλλαγή θρεπτικών μεταξύ των δύο οργανισμών και της αζωτοδέσμευσης. Τα συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια με τη βοήθεια του ενζύμου νιτρογενάση δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο και το μετατρέπουν σε αμμωνία (NH₃), η οποία αποτελεί πηγή αζώτου για τα φυτά (219). Το φυτό με τη σειρά του προσφέρει στα βακτήρια διάφορες θρεπτικές οργανικές ενώσεις. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας παράγονται μόρια H₂O₂ και υπεροξειδικής ρίζας, τα οποία με τη σειρά τους αναστέλλουν την ενζυμική

δραστηριότητα της νιτρογενάσης (220). Το γεγονός αυτό καθιστά τον ρόλο των αντιοξειδωτικών ενζύμων κρίσιμο για την αποτελεσματικότητα της συμβίωσης. Ο ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός αναλαμβάνει να προστατέψει τα βακτηριοειδή και τις δομές των φυματίων από ΕΜΟ που παράγονται τοπικά υπό φυσιολογικές συνθήκες και παράγοντες του οξειδωτικού στρες που προκαλούν διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες στη ρίζα (221). Έχει παρατηρηθεί πως η υψηλή δραστηριότητα νιτρογενάσης συνήθως συνδέεται με υψηλή δραστηριότητα καταλάσης που απομακρύνει την περίσσεια H_2O_2 από τα φυμάτια (222).

Παράλληλα πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως η πρώτη επαφή των βακτηρίων και των κυττάρων της ρίζας κατά την επιμόλυνση, εκτός από τα γονίδια επικοινωνίας που εκφράζονται εκατέρωθεν, εξαρτάται από την τοπική συγκέντρωση NO (223, 224). Το NO αποδεικνύεται απαραίτητος παράγοντας για την αναγνώριση και την απαρχή της δόμησης των φυματίων σε συνδυασμό με τον κατευνασμό του κύματος ROS οι οποίες παράγονται αρχικά από τα φυτικά κύτταρα σε απόκριση της επαφής τους με έναν πιθανά παθογόνο οργανισμό, πριν αυτός αναγνωριστεί ως συμβιωτικός. Είναι ξεκάθαρο πως στις ρίζες των ψυχανθών συμβαίνουν φυσιολογικές διεργασίες οι οποίες δεν συμβαίνουν στις ρίζες των υπολοίπων ανώτερων φυτών.

Το αντιοξειδωτικό σύστημα των ψυχανθών είναι πολύ πιθανό να παρουσιάζει ορισμένες διαφορές σε σύγκριση με αυτό των υπολοίπων φυτών. Καθώς η αναγνώριση των βακτηρίων ως συμβιωτικών, η ανάπτυξη των φυματίων και η αζωτοδέσμευση είναι διαδικασίες, η τύχη των οποίων εξαρτάται άμεσα από το οξειδαναγωγικό περιβάλλον της ρίζας, είναι εύκολο να υποθέσει κανείς πως το κατ' εξοχήν αρμόδιο σύστημα για την εξασφάλιση της συνθήκης αυτής ενδέχεται να έχει ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Στο φυτό *Medicago truncatula* εξακολουθούν να υπάρχουν δύο ισομορφές MtPHGPX, όπως και στα μη ψυχανθή φυτά, με τη διαφορά ότι η μιτοχονδριακή ισομορφή μετατράπηκε εξελικτικά σε κυτταροπλασματική. Αυτή η έξοδος της MtPHGPXβ ισομορφής ενδεχομένως να συνέβη με σκοπό να καλυφθεί κάποια επιπλέον ανάγκη του κυττάρου ενός ψυχανθούς, η οποία εκλείπει στα υπόλοιπα φυτά.

Οι PHGPX, παρόλο που αποτελούν μέλη του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, έχει δειχθεί πως σε ορισμένους οργανισμούς μπορεί να διαδραματίζουν, εκτός από την ενζυμική απομάκρυνση τοξικών υπεροξειδίων από το κύτταρο, έναν ρόλο μεταγωγής σήματος (225). Είναι σε θέση για παράδειγμα, όταν οξειδωθούν οι κυστεΐνες του ενεργού τους κέντρου, να αλληλεπιδράσουν και να ενεργοποιήσουν μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με την κινητοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Ένας άλλος πιθανός ρόλος των PHGPX στις ρίζες των ψυχανθών φυτών θα μπορούσε να είναι η δέσμευση ομάδων NO και άλλων ενεργών μορφών αζώτου (Reactive Nitrogen Species; RNS), καθώς τα ένζυμα αυτά αποτελούν στόχο μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων που σχετίζονται με το NO και παράγωγά του. Ο ρόλος της δέσμευσης NO και RNS έχει αποδοθεί και στο ένζυμο της λεγγεμογλοβίνης (leghemoglobin) παρόλο που δεν είναι η κύρια μεταβολική δράση του ενζύμου (226). Οι RNS αποτελούν αναστολείς της νιτρογενάσης γεγονός που καθιστά τη δέσμευση και απομάκρυνσή τους κρίσιμη για τη διατήρηση των υψηλών επιπέδων δραστηριότητάς της. Η ανάγκη αυτή δεν συντρέχει για τα υπόλοιπα ανώτερα φυτά και φέρνει πιο κοντά τη λογική της επιστράτευσης παραγόντων με διαφορετικό φυσιολογικό ρόλο στο κύτταρο για την εξυπηρέτηση πρόσθετων λειτουργιών στα ψυχανθή φυτά. Με βάση αυτόν το συλλογισμό, η MtPHGPXβ και γενικότερα οι ψευδο-μιτοχονδριακές PHGPX, δεν αποκλείεται να αποσχίστηκαν εξελικτικά και να έπαψαν να εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια των ψυχανθών για να εξυπηρετήσουν καλύτερα κάποιον επιπλέον φυσιολογικό ρόλο που τους ανατέθηκε.

III. Μελέτη έκφρασης των *MtPHGPX* μεταγράφων

Το οξειδωτικό στρες αφορά στη διαταραχή της οξειδαναγωγικής ισορροπίας του κυττάρου λόγω περιβαλλοντικών ερεθισμάτων και αλληλεπίδρασης με άλλους οργανισμούς, όπου επιτρέπεται η συσσώρευση EMO. Η διαταραχή αυτή γίνεται αντιληπτή από αισθητήρες του κυττάρου και ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί αποκατάστασης της ισορροπίας, με κύρια γραμμή αντιμετώπισης τον ενζυμικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας παράγονται

διάφορα μόρια που ελέγχουν τις επιμέρους αποκρίσεις των αντιοξειδωτικών γονιδίων και ενζύμων, μεταξύ αυτών τα NO και H₂O₂. Οι PHGPX είναι πολύ ευαίσθητα ένζυμα στις μεταβολές της οξειδαναγωγικής ισορροπίας και αποκρίνονται στα μόρια NO και H₂O₂.

Το γονίδιο της *MtPHGPX* και η αναλογία των δύο μεταγράφων που προκύπτουν από αυτό φάνηκε να παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπό συνθήκες προσομοίωσης οξειδωτικού στρες με τη χρήση GSNO και H₂O₂. Η *MtPHGPXβ* μορφή ενισχύεται έναντι της *MtPHGPXα* μετά από μεταχείριση με 0.5mM GSNO στα φύλλα και στις ρίζες, ενώ η μεταχείριση με 0.5mM H₂O₂ δεν προκαλεί μεταβολή στην ποσόστωση των μεταγράφων σε σύγκριση με το πείραμα ελέγχου σε κανέναν από τους δύο ιστούς. Η *MtPHGPXα* μορφή έχει αυξητική τάση έναντι της *MtPHGPXβ* στις ρίζες μετά από αντίστοιχη μεταχείριση, παρόλο που οι μεταβολές δεν μετρήθηκαν να είναι στατιστικώς σημαντικές. Αντίθετα, στα φύλλα η ποσόστωση της *MtPHGPXα* μορφής φαίνεται να συρρικνώνεται έναντι της *MtPHGPXβ* μετά από μεταχείριση με GSNO και σε μεγαλύτερο βαθμό μετά από μεταχείριση με H₂O₂ σε σχέση με το control.

Η μελέτη της έκφρασης των *MtPHGPX* μεταγράφων μετά από μεταχείριση με παράγοντες που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες έδειξε πως αυτή ενδέχεται να υπόκειται σε διαφορετικούς μηχανισμούς ρύθμισης. Οι δύο μορφές δεν φαίνεται να αποκρίνονται με τον ίδιο τρόπο στα ερεθίσματα εντός του ίδιου ιστού και, επιπλέον, η διαφοροποίηση στην απόκρισή τους φαίνεται να μην ταυτίζεται και για τις δύο μορφές στους δύο ιστούς υπό διερεύνηση. Η ανάγκη για διαφοροποιημένη ρύθμιση στην έκφραση των ισομορφών συνιστά πιθανή ένδειξη για διαφορετικούς και διακριτούς λειτουργικούς ρόλους. Το κύτταρο ίσως επιλέγει να καλύψει διαφορετικές φυσιολογικές αποκρίσεις με την καθεμία από τις ισομορφές *MtPHGPX*. Ένα αντίστοιχο παράδειγμα διαφοροποιημένης ρύθμισης έκφρασης των δύο PHGPX ισομορφών αναφέρθηκε από τους Derege et al., 2000 (227) στην τομάτα. Το εξωτερικό μηχανικό ερέθισμα του μεσογονάτιου χώρου προκάλεσε την επαγωγή των δύο ισομορφών *GPXle-1* και *GPXle-2*. Η επαγωγή της μεταγραφής των δύο ισομορφών δεν έγινε ταυτόχρονα με την *GPXle-1* να επάγεται εντός της πρώτης ώρας μετά το ερέθισμα και την *GPXle-2* να επάγεται με χρονοκαθυστέρηση 4-5

ωρών. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι τα επίπεδα H_2O_2 που ανιχνεύτηκαν δεν συμβαδίζουν με τα επίπεδα έκφρασης των ισομορφών. Με λίγα λόγια, η αύξηση των επιπέδων εντός της πρώτης ώρας και μετά από πέντε ώρες των δύο ισομορφών δεν συνοδεύονται από αυξημένα επίπεδα H_2O_2 .

Το NO και το H_2O_2 έχουν αναφερθεί να εμπλέκονται στον έλεγχο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού παρόλο που δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα με ποιόν τρόπο επικοινωνούν τα δύο μονοπάτια που ελέγχονται από τα μόρια και ποιο προηγείται. Είναι γνωστό πως το NO αναστέλλει την παραγωγή H_2O_2 μετά από τραυματισμό και παράλληλα ενεργοποιεί τη μεταγραφή των σχετικών αποκρινόμενων γονιδίων (228, 229). Στην αντίδραση υπερευαισθησίας ενισχύει τη δράση των ROS και συμβάλλει στον κυτταρικό θάνατο με σκοπό την αντιμετώπιση μολύνσεων από παθογόνους μικροοργανισμούς, ενώ η χημική του απομάκρυνση αυξάνει την ευαισθησία του φυτού *Arabidopsis* σε παθογόνα βακτήρια και ιούς (228). Οι EMO αντίστοιχα επηρεάζουν την ενεργότητα των ενζύμων που παράγουν NO με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή του (230). Τέλος NO και EMO αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους και παράγουν $ONOO^-$, ένα εξίσου τοξικό με τις EMO μόριο για τα κύτταρα το οποίο όμως μπορεί να δρα επίσης ως σηματοδοτικό μόριο (114, 231). Η αλληλεπίδραση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των NO και EMO και μπορεί να αποτελέσει και μηχανισμό ελέγχου των επιπέδων τους.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι που ελέγχεται από το NO εξαπλώνεται κυρίως από το cGMP και την απελευθέρωση κατιόντων Ca^{+} , όπως συμβαίνει και στα θηλαστικά (232). Ακολουθεί η ενεργοποίηση των MAPK κινασών με κατάληξη τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στόχων (233). Το H_2O_2 είναι επίσης σε θέση να ενεργοποιήσει τον καταρράκτη MAPK κινασών με τελικούς αποδέκτες σήματος μεταγραφικούς παράγοντες όπως τους HSF (Heat stress factor), WRKY και DREBA (dehydration responsive element binding A) με στόχο τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στόχων. Τα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια έχουν στόχο και γονίδια του αντιοξειδωτικού μηχανισμού και πιθανότατα μπορεί να ελέγχουν την έκφραση των *PHGPX* γονιδίων. Αν τα *MtPHGPX* μετάγραφα υπόκεινται σε αυτή τη διαδικασία ρύθμισης η διαφοροποιημένη τους έκφραση θα μπορούσε να εξηγηθεί με την

υπόθεση ότι τελούν υπό τον έλεγχο δύο διαφορετικών υποκινητών και μεταγράφονται ως δύο διαφορετικά pre-mRNA.

Η ρύθμιση της έκφρασης των *MtPHGPX* μορφών όμως φαίνεται να είναι ιδιαίτερα περίπλοκη και να προκύπτει από συνδυασμό μηχανισμών ελέγχου. Η διαφορά δεν αφορούν μόνο στην ρύθμιση σε σχέση με το ερέθισμα αλλά και σε σχέση με τον ιστό γεγονός που προδίδει διακριτή αντίληψη σήματος σε τουλάχιστο δύο επίπεδα. Η πιθανότητα του εναλλακτικού ματίσματος, AS, το οποίο καθοδηγείται από το NO και το H₂O₂ για τον επιλεκτικό σχηματισμό των δύο ισομορφών μπορεί να θεωρηθεί μια ασφαλής υπόθεση. Οι δύο μορφές, όπως έχει αναφερθεί, αποτελούνται από τα εξόνια 3-7 και εναλλακτικά από τα εξόνια 1 ή 2 κατά περίπτωση.

Το AS είναι ένας μεταμεταγραφικός μηχανισμός ο οποίος συμβαίνει σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και προσφέρει τον σχηματισμό πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα γονίδιο. Τα πρωτεϊνικά αυτά προϊόντα μπορεί να παρουσιάζουν διαφορές στην ενζυμική τους δραστηριότητα, τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό, την προσβασιμότητά τους για μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και την τελική διαμόρφωσή τους στο χώρο. Η διαδικασία του AS μπορεί να είναι ιστοειδική, να σχετίζεται με το αναπτυξιακό στάδιο ή να επηρεάζεται από εξωτερικούς παράγοντες και ερεθίσματα (234). Στα θηλαστικά το AS λαμβάνει χώρα με την αλληλεπίδραση των pre-mRNA με πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία ονομάζονται spliceosomes ή transcriptosomal complexes. Μέλη αυτών των συμπλόκων φωσφορυλιώνονται από κινάσες τυροσίνης, σερίνης/θρεονίνης και άλλες. Η τροποποίηση αυτή μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα του συμπλόκου να προσδέεται στα μόρια RNA και να ελέγξει την επιλογή των θέσεων κοπής και ματίσματος (235).

Ορισμένες από τις κινάσες που τροποποιούν τα σύμπλοκα έχει βρεθεί ότι μπορεί να ενεργοποιούνται από το cGMP, έναν παράγοντα που εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του NO (236). Το οξειδωτικό στρες έχει βρεθεί ότι καθοδηγεί το AS δύο γονιδίων σε καρκινικές σειρές ανθρώπινων κυττάρων του γαστρικού σωλήνα, παρόλα αυτά ο ακριβής μηχανισμός που επιτρέπει τον έλεγχο της διαδικασίας από περιβαλλοντικούς παράγοντες δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως

(237). Κατά τον ίδιο τρόπο θα μπορούσαν οι δύο ισομορφές να προκύπτουν από κατευθυνόμενα γεγονότα AS, τα οποία πυροδοτούνται από τα μόρια NO και H₂O₂.

Στα φυτά ο μηχανισμός AS είναι γνωστό πως συμβάλει στην ομαλή λειτουργία των κυττάρων, αλλά δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως η διαδικασία που ακολουθείται και οι παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτή. Είναι γνωστό πως το γονίδιο της ασκορβικής υπεροξειδάσης των χλωροπλαστών (cAPX) στο σπανάκι (*Spinacia oleracea*) είναι σε θέση να δώσει 4 διαφορετικά μετάγραφα που οδηγούν στην μετάφραση διαφορετικών πρωτεϊνών. Τα μετάγραφα προκύπτουν μέσω AS και οι διαφορές εντοπίζονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο των πρωτεϊνών επηρεάζοντας έτσι την πρόσδεσή τους στη μεμβράνη του στρώματος ή του θυλακοειδούς (238). Στο κριθάρι, ο μεταγραφικός παράγοντας Wdreb2 μεταγράφεται σε τρεις ισομορφές μέσω AS σε απόκριση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων όπως το κρύο, η ξηρασία και η αλατότητα και μεταφέρει το σήμα μεταγραφής γονιδίων που ενεργοποιούνται υπό τις συνθήκες αυτές (239). Στο *Arabidopsis* και στο ρύζι έχει δειχθεί ότι τα γεγονότα AS μεσολαβούνται από πρωτεΐνες πλούσιες σε σερίνη/θρεονίνη (240). Οι πρωτεΐνες αυτές υποβάλλονται οι ίδιες σε AS και μετά από φωσφορυλίωση προσδένονται σε πρωτεΐνες των συμπλεγμάτων spliceosome, προωθώντας έτσι την αναγνώριση των συνενώσεων ιντρονίων/εξονίων που αποτελούν στόχους και οδηγούν στην επιλογή των τελικών αλληλουχιών (241).

Ο πιο πιθανός μηχανισμός που μπορεί να χρησιμοποιείται στην περίπτωση των *MtPHGPX* μεταγράφων είναι αυτός της παράλειψης εξονίου (Exon Skipping, ExonS). Έχει αναφερθεί ότι στο σύνολο των γονιδίων που εκφράζονται στο φυτό *Medicago truncatula* 9.6% από αυτά υφίστανται AS, 10.7% εκ των οποίων πρικόπτον μέσω του μηχανισμού ExonS. Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί AS γεγονότα στα οποία ένα εξόνιο που είναι παρόν σε ένα μετάγραφο του γονιδίου υπό διερεύνηση μπορεί να λείπει από κάποιο άλλο. Στην περίπτωση των *MtPHGPX* μεταγράφων το εξόνιο 1 παραλείπεται στο *MtPHGPXβ* μετάγραφο και το εξόνιο 2 παραλείπεται στο *MtPHGPXα* μετάγραφο. Έχει παρατηρηθεί πως τα μετάγραφα των glutathione-S-transferases (GSTs) με αριθμούς πρόσβασης AC151526_21, AC170582_25 και AC172743_27 περιέχουν περιοχές συνένωσης ιντρονίων/εξονίων οι οποίες συμμετέχουν σε AS γεγονότα με τον μηχανισμό ExonS, όπως αναφέρεται

στην εξειδικευμένη βάση δεδομένων www.plantgdb.org/ASIP. Οι αλληλουχίες αυτές παρουσιάζουν ομολογία με τις *MtPHGPX* πάνω από 50%, μάλιστα η AC151526_21 βρίσκεται στον ίδιο γονιδιακό τόπο με το *MtPHGPX* γονίδιο.

Η διαφορετική αντιπροσώπευση των δύο μεταγράφων στα φύλλα και στις ρίζες γεννά ερωτηματικά για τον μηχανισμό που τα ρυθμίζει, λαμβάνοντας υπόψη ότι πιθανότατα προκύπτουν από AS. Η μορφή *MtPHGPXβ* ρυθμίζεται κατά τον ίδιο τρόπο στις ρίζες και στα φύλλα, ενισχύεται από το NO και δεν μεταβάλλεται η απόκρισή της στο H₂O₂. Αντίστοιχη ενίσχυση παρατηρείται και για την AtGPX6 μετά από μεταχείριση με NO. Αντιθέτως, η *MtPHGPXα* μορφή φαίνεται να μην αποκρίνεται με τον ίδιο τρόπο στις ρίζες και στα φύλλα. Στις ρίζες η μεταχείριση με NO και H₂O₂ έχει την τάση να ενισχύσει την ισομορφή επί του συνόλου αλλά στα φύλλα παρατηρείται μια ευαισθησία στη μεταχείριση που προκαλεί το αντίθετο. Η μεταχείριση με NO και H₂O₂ στα φύλλα περιορίζει την αντιπροσώπευση της *MtPHGPXα* προκαλώντας στατιστικώς σημαντικές μεταβολές.

Είναι γνωστό πως το NO και το H₂O₂ μπορούν να αποτελέσουν εκτός από τοξικούς παράγοντες του οξειδωτικού στρες, σηματοδοτικά μόρια με στόχο την προστασία των κυττάρων υπό συνθήκες καταπόνησης και τη διεκπεραίωση φυσιολογικών διεργασιών. Η συγκέντρωση των δύο μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταχείριση θεωρείται πως γίνεται αντιληπτή από το κύτταρο ως τοξική, μιμούμενη τις συνθήκες που ισχύουν υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες (242, 243). Η συγκέντρωση των GSNO και H₂O₂ στα 0.5mM θεωρείται αρκετά υψηλότερη από αυτή που χρησιμοποιείται σε μελέτες για την διερεύνηση της ωφέλιμης δράσης του μορίου όπου και είναι μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη. Τα επίπεδα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη τείνουν να προκαλούν στρες (nitrosative stress και oxidative stress). Η επιλογή αυτή έγινε με στόχο να διερευνηθεί η δράση των μορίων αυτών στην *MtPHGPX* υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Το GSNO είναι ένας δότης NO ο οποίος απελευθερώνει την ομάδα NO μόνο μετά από επαφή με μόρια-δέκτες σε αντίθεση με άλλους δότες NO που απελευθερώνουν τις ομάδες NO ανεξάρτητα από τον περιβάλλοντα χώρο. Το γεγονός αυτό καθιστά το GSNO έναν πολύ σταθερό δότη με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής και ταυτόχρονα άκρως επιλεκτικό. Το H₂O₂ είναι ένα επίσης πολύ σταθερό

μόριο σε σχέση με τις υπόλοιπες ROS και οξειδώνει και αυτό μόνο τα μόρια-δέκτες με τα οποία ανταλλάσει ομάδες OH. Ο τρόπος δράσης των δύο μορίων τους επιτρέπει να προκαλούν στοχευμένες επιδράσεις διασυστημικά όσο διοχετεύονται στον οργανισμό, ταυτόχρονα όμως η συγκέντρωσή τους μειώνεται σταδιακά μέσω των διαρκών επαφών τους με μόρια-δέκτες στην πορεία τους. Συνεπώς η συγκέντρωση των GSNO και H₂O₂ είναι σημαντικά χαμηλότερη όταν φτάνουν στα φύλλα, ενδεχομένως και μια τάξη μεγέθους μικρότερη. Για όλα τα συστήματα πρόσληψης μηνυμάτων και ανίχνευσης αλλαγών στο περιβάλλον, πόσο μάλλον για αυτά που σχετίζονται με συνθήκες στρες, υπάρχει ένα παράθυρο (εύρος) συγκέντρωσης του παράγοντα-ερέθισμα. Σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από το παράθυρο αυτό δεν ανιχνεύεται κάποιο μήνυμα και το κύτταρο δεν προβαίνει σε καμία ενέργεια. Σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από αυτό το παράθυρο ανιχνεύεται ένα μήνυμα κινδύνου για την διαταραχή της ομοιόστασης του κυττάρου και πυροδοτείται ένας καταρράκτης αντιδράσεων που συνήθως καταλήγει στη μεταγραφή γονιδίων άμυνας. Εντός του παραθύρου, η αντιδράσεις των γονιδίων-στόχων ενδέχεται να καταγράφονται με αντίθετο τρόπο από αυτόν που καταγράφεται εκτός των ορίων του παραθύρου (244).

Συγκεκριμένα, καταγράφηκε πως το μετάγραφο της *MtPHGPXβ* επιδεικνύει την ίδια συμπεριφορά στις ρίζες και στα φύλλα, παρόλο που η συγκέντρωση των GSNO και H₂O₂ προφανώς μειώνεται στην πορεία. Αυτό σημαίνει πως ο μηχανισμός που ελέγχει την έκφραση και διαμόρφωση της *MtPHGPXβ* αντιλαμβάνεται την συγκέντρωση στους δύο ιστούς με τον ίδιο τρόπο. Αντίθετα, στην περίπτωση της έκφρασης της *MtPHGPXα*, αυτή μεταβάλλεται στους δύο ιστούς, καθώς η συγκέντρωση των παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν για τις μεταχειρίσεις μειώνεται. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να σημαίνει πως η μειωμένη συγκέντρωση των GSNO και H₂O₂ που φτάνει στα φύλλα πιθανώς βρίσκεται εντός του παραθύρου για τον μηχανισμό που ελέγχει την έκφραση και διαμόρφωση της *MtPHGPXα* και για το λόγο αυτό δεν συμπεριφέρεται με τον ίδιο τρόπο όπως και στις ρίζες. Ενδεχομένως, η συγκέντρωση των μορίων προσομοίωσης οξειδωτικού στρες που φτάνει στα φύλλα να τείνει προς τα όρια που αντιλαμβάνεται το κύτταρο ως ωφέλιμα και να προκαλεί αντίθετη συμπεριφορά στην *MtPHGPXα*. Οι παρατηρήσεις

αυτές ίσως να σημαίνουν πως οι μηχανισμοί που ελέγχουν τα δύο μεταγράφα είναι διαφορετικοί για κάθε περίπτωση αλλά και ότι οι δύο μορφές πιθανά επιτελούν διαφορετικούς ρόλους μέσα στο κύτταρο. Η εξαγωγή συμπερασμάτων σε κάθε περίπτωση χρίζει περαιτέρω διερεύνησης, καθώς παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Τέλος, η μελέτη προστασίας των mRNA των *MtPHGPX* μεταγράφων μέσω του NO έναντι της αποικοδόμησης άφησε περιθώρια περαιτέρω διερεύνησης της υπόθεσης. Ο μηχανισμός με τον οποίο σταθεροποιούνται συγκεκριμένα mRNA μόρια μέσω του NO δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα. Πρόσφατες μελέτες (245) αναφέρουν πως ορισμένες πρωτεΐνες στα θηλαστικά περιέχουν ένα συγκεκριμένο μοτίβο το οποίο επιτρέπει την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη HuR, η οποία είναι μια πρωτεΐνη που προσδέεται σε RNA μόρια (RNA-binding protein; RBP). Τα επίπεδα της HuR παρατηρείται πως αυξάνονται μετά από μεταχείριση με NO. Παρόλα αυτά στην ίδια μελέτη επισημαίνεται πως δεν περιέχουν όλα τα mRNA μόρια που προστατεύονται το μοτίβο πρόσδεσης της HuR. Οι *MtPHGPX* δεν περιέχουν το μοτίβο πρόσδεσης της HuR. Δύο από τα mRNA που φαίνεται να σταθεροποιούνται έναντι της αποικοδόμησης μετά από μεταχείριση με NO είναι η οξυγενάση της αίμης-1 (heme oxygenase-1; HO-1; 245) και η πρωτεΐνη που ρυθμίζει τη συγκέντρωση του σιδήρου (Iron-regulatory protein; IRP; 246). Καθώς τα αποτελέσματα της μελέτης δεν καταλήγουν σε ένα ασφαλές συμπέρασμα θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί με διαφορετική προσέγγιση η πιθανότητα της σταθεροποίησης των *MtPHGPX* μεταγράφων μέσω του NO.

IV. Ενζυμική δραστηριότητα και βιοχημικά χαρακτηριστικά της *MtPHGPX*

Οι PHGPX ανακαλύφθηκαν αρχικά στα θηλαστικά και κατά το χαρακτηρισμό τους διαπιστώθηκε πως παράλληλα με το H₂O₂ μεταβολίζουν και φωσφολιπιδικά υπεροξείδια χρησιμοποιώντας σαν δότη ηλεκτρονίων τη γλουταθειόνη. Το μέγεθός τους είναι κοντά στα 19kDa και στην αλληλουχία τους περιέχουν ένα κατάλοιπο SeCys το οποίο συμμετέχει στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παίζει κυριαρχικό ρόλο στην ενεργότητά του (247, 248).

Η MtPHGPX βρέθηκε να μεταβολίζει με μεγαλύτερη συγγένεια το H_2O_2 , χρησιμοποιώντας ως δότη ηλεκτρονίων την θειορεδοξίνη. Το μέγεθος των δύο ισομορφών βρέθηκε να είναι 23.84kDa για την MtPHGPXα και 25.87kDa για την MtPHGPXβ. Οι αλληλουχίες δεν περιέχουν κατάλοιπα SeCys, όπως είναι σύνηθες για την συντριπτική πλειοψηφία των ανωτέρων φυτών. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί τη χαμηλή δραστικότητα της MtPHGPX, καθώς όλες οι PHGPX που δεν περιέχουν SeCys έχει βρεθεί πως υπολείπονται αυτών που την περιέχουν σε δραστικότητα κατά μία τάξη μεγέθους περίπου (38). Το βέλτιστο υπόστρωμα και ο βέλτιστος δότης ηλεκτρονίων δεν είναι σταθερές παράμετροι για όλες τις PHGPX των ανώτερων φυτών. Κοινό χαρακτηριστικό είναι τα χαμηλά επίπεδα δραστικότητας καθώς δεν περιέχουν SeCys αλλά και η αυστηρά συντηρημένη αλληλουχία τους με την απαραίτητη παρουσία τριών περιοχών και τριών κυστεϊνών.

Στο φυτό *Populus trichocarpa* οι PHGPX ισομορφές, PtrcGPX3.1 και PtrcGPX3.2, έχουν μέγεθος περί τα 19 και 26kDa αντίστοιχα και περιέχουν κυστεΐνη αντί για SeCys στην πεπτιδική τους αλληλουχία. Έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν H_2O_2 και φωσφολιπιδικά υπεροξειδία με τη χρήση θειορεδοξίνης. Το Cumene-OOH βρέθηκε να παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με το ένζυμο παρόλο που και το H_2O_2 έδειξε να έχει πολύ μικρή διαφορά. Διαδοχικές σημειακές μεταλλάξεις των κυστεϊνών προκάλεσαν μείωση της δραστικότητας του ενζύμου για δύο από αυτές υπογραμμίζοντας τον κρίσιμο ρόλο που αυτές παίζουν στην διαμόρφωση και τη σωστή λειτουργία του ενεργού κέντρου. Συγκεκριμένα προτείνεται πως η πρώτη σε σειρά κυστεΐνη (C107) αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα και δεσμεύει ένα υδροξύλιο. Στη συνέχεια σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με την τρίτη κατά σειρά κυστεΐνη (C155), ο οποίος τελικά λύεται με την παρέμβαση του δότη ηλεκτρονίων θειορεδοξίνης και το ένζυμο επανέρχεται στην αρχική του δομή (50).

Η αντίστοιχη PHGPX στο φυτό *Oryza sativa*, OsPHGPX, έχει μέγεθος περίπου 21kDa και αποτελείται κατά 12.2% από α-έλικες, 30.7% β-πτυχωτά φύλλα, 18.5% γ-στροφές και 38.5% τυχαίες αναδιπλώσεις. Το ένζυμο σημειώνει μεγαλύτερη συγγένεια προς το υπεροξειδίο φωσφατιδοχολίνης και ακολουθούν με διαφορά μιας τάξης μεγέθους το H_2O_2 και άλλης μιας τάξης μεγέθους το *t*-Butyl-OOH. Ο

συμβατός δότης ηλεκτρονίων είναι η γλουταθειόνη (249). Η GPX6 του φυτού *Arabidopsis thaliana* έχει μέγεθος 22kDa και χρησιμοποιεί θειορεδοξίνη ως δότη ηλεκτρονίων. Το H₂O₂ αποτελεί βέλτιστο υπόστρωμα, αλλά το ένζυμο είναι σε θέση να μεταβολίζει με μικρότερη συγγένεια και λιπιδικά υπεροξειδία. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η GPX6 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια προς το H₂O₂ σε σύγκριση με τις GPX1, -2 και -5 καθώς και μεγαλύτερη δραστικότητα (52).

Η PHGPX του φυτού *Helianthus annuus*, GPX_{ha}, μπορεί να χρησιμοποιήσει γλουταθειόνη και θειορεδοξίνη ως δότες ηλεκτρονίων, παρόλα αυτά η θειορεδοξίνη φαίνεται να έχει μεγαλύτερη συγγένεια. Το ένζυμο μπορεί να μεταβολίσει όλα τα υποστρώματα με παρόμοια ταχύτητα αλλά το βέλτιστο υπόστρωμα είναι το *t*-Butyl-OOH (65). Αντίστοιχα, η GPX_{le} του φυτού *Lycopersicon esculentum* χρησιμοποιεί επίσης θειορεδοξίνη ως βέλτιστο δότη ηλεκτρονίων παράλληλα όμως μπορεί να χρησιμοποιήσει και γλουταθειόνη με πολύ μικρή συγγένεια. Μεταβολίζει όλα τα υποστρώματα, αλλά το *t*-Butyl-OOH είναι το βέλτιστο χωρίς να παρουσιάζει μεγάλες διαφορές με τα υπόλοιπα (65). Τέλος, η PHGPX του φυτού *Citrus sinensis* μεταβολίζει το υπεροξειδίο φωσφατιδοχολίνης με δότη ηλεκτρονίων την γλουταθειόνη (250).

V. Η επίδραση του NO στην MtPHGPX

Έχει βρεθεί στα θηλαστικά πως, ενώ το NO ενισχύει την μεταγραφή των PHGPX, ταυτόχρονα, αναστέλλει σημαντικά την ενεργότητα του ενζύμου που κωδικοποιείται από αυτά στα θηλαστικά (247). Η μείωση της δραστικότητας της GPX4 μετά από μία ώρα επώαση με SNAP (*S*-nitro-*N*-acetyl-DL-penicillamine), έναν δότη NO, μειώνεται στο 4.2% της αρχικής δραστικότητας control. Αναγωγή του ενζύμου με DTT μπόρεσε να επαναφέρει το 50% της δραστικότητας του ενζύμου όταν αυτό είχε επωαστεί με SNAP για μια ώρα, αλλά η αναστολή ήταν μη αναστρέψιμη μετά από επώαση μεγαλύτερη της μίας ώρας.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε πως οι δότες NO GSNO και DEANONOate δεν ήταν σε θέση να αναστείλουν την δραστικότητα της MtPHGPX. Παρόλα αυτά, η RNS peroxynitrite προκάλεσε δραστική μείωση της ενεργότητας του

ενζύμου μετά από μόλις 10min επώασης με το καθαρό ανασυνδυασμένο ένζυμο. Είναι γνωστό πως η μεταβολή της δραστηριότητας των ενζύμων από ομάδες NO και NO₂ έγκεινται σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως την S-νιτροσουλίωση των κυστεϊνών και τη νίτρωση τυροσίνης. Η MtPHGPX βρέθηκε πως υφίσταται και τις δύο αυτές τροποποιήσεις, παρόλο που η πρώτη δε δείχνει να επηρεάζει την ενεργότητά της.

Ο μηχανισμός της S-νιτροσουλίωσης βασίζεται στην ανταλλαγή του υδρογόνου της κυστεϊνης στόχου με μια ομάδα NO και το σχηματισμό μιας νιτροσοθειόλης. Το σύμπλοκο αυτό είναι σε θέση να καλύψει σαν μάσκα την κυστεϊνη και να την εμποδίσει να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που έρχεται σε επαφή υπό φυσιολογικές συνθήκες. Αυτό σημαίνει πως, αν η κυστεϊνη στόχος συμμετέχει στο ενεργό κέντρο και είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα ή ακόμα και για τη σωστή διαμόρφωση του ενζύμου, τότε η αλληλεπίδραση αυτή είναι αδύνατη και η δραστηριότητα μειώνεται. Στην περίπτωση της MtPHGPX, παρόλο που παρατηρήθηκε η τροποποίηση σε ικανοποιητικό και ανιχνεύσιμο βαθμό, η δραστηριότητα δεν επηρεάστηκε. Πιθανότατα η νιτροσοθειόλη που σχηματίστηκε δεν εμπλέκεται στη σωστή λειτουργία και διαμόρφωση του ενζύμου, με αποτέλεσμα να μην την παρεμποδίζει.

Έχει παρατηρηθεί πως η τροποποίηση αυτή είναι πολύ πιθανό να είναι κατευθυνόμενη από παρακείμενες αλληλουχίες αμινοξέων αμφιπλεύρως του καταλοίπου-στόχου, όπως συμβαίνει με την φωσφορυλίωση. Οι πιθανές αλληλουχίες που μπορεί να προσελκύουν και να επιτρέπουν την S-νιτροσουλίωση δεν είναι γνωστές ακόμα. Το γεγονός ότι η τροποποίηση μπορεί να είναι ελεγχόμενη προκαλεί προβληματισμό σχετικά με την έλλειψη κάποιας εμφανούς επίδρασής της στην ενεργότητα της MtPHGPX. Μια εξήγηση είναι ότι η κυστεϊνη στόχος δεν συμμετέχει στο μεταβολικό μηχανισμό του ενζύμου ή τη σωστή του διαμόρφωση και ο λόγος για τον οποίο αποτελεί στόχο ενδεχομένως έχει να κάνει με κάποια άλλη φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου που δεν είναι γνωστή ακόμα. Έχει αναφερθεί πως ορισμένα ένζυμα μπορούν να λειτουργήσουν και ως εργαλεία ελέγχου των επιπέδων του NO στα κύτταρα των ψυχανθών. Εκτός της φυσιολογικής τους λειτουργίας έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μόρια NO και να περιορίζουν

την ανασταλτική τους δράση στην αζωτοδέσμευση. Θα μπορούσε λοιπόν η MtPHGPX να παίζει αυτό το ρόλο μέσω μιας κυστεΐνης που δεν συμμετέχει ενεργά στη μεταβολική διαδικασία του ενζύμου. Μια άλλη εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι το σύμπλοκο R-GS-NO που διαμορφώνεται δεν είναι αρκετά σταθερό και ανάγεται πολύ εύκολα από τους δότες ηλεκτρονίων που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση. Έτσι το ένζυμο επιστρέφει στην αρχική του μορφή και διατηρεί τα επίπεδα ενζυμικής του δραστηριότητας.

Η νίτρωση τυροσίνης συνίσταται στην αντικατάσταση του υδρογόνου του άνθρακα 3 του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης-στόχου με μια ομάδα NO₂. Η επίδραση της τροποποίησης αυτής βασίζεται στην ίδια αρχή με την S-νιτροσυλίωση. Αφορά στην κάλυψη των καταλοίπων τυροσίνης με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η αλληλεπίδρασή τους με άλλα μόρια. Για να προκαλέσει κάποια μεταβολή στη δραστηριότητα του ενζύμου η τροποποίηση αυτή, το κατάλοιπο τυροσίνης πρέπει να συμμετέχει στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ή να παίζει ρόλο στη διαμόρφωσή του. Η δραστηριότητα της MtPHGPX μειώθηκε δραστικά μετά από μεταχείριση με peroxynitrite που αποδεδειγμένα προκάλεσε το σχηματισμό καταλοίπων νιτροτυροσίνης στο ένζυμο. Το γεγονός αυτό μπορεί να σημαίνει εμπλοκή της τυροσίνης στόχου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ή στη σωστή του διαμόρφωση. Το σύμπλοκο, αντίθετα με την νιτροσοθειόλη, φαίνεται να είναι αρκετά σταθερό, καθώς η υποκατάσταση, παρόλο που βάλλεται από αναγωγικούς παράγοντες όπως η θειορεδοξίνη και το NADPH, εξακολουθεί να είναι σε θέση να αναστείλει την ενεργότητα του ενζύμου.

Ο ρόλος της επίδρασης αυτής θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως μηχανισμός ελέγχου της φυσιολογικής δραστηριότητας του ενζύμου σε μεταμεταφραστικό επίπεδο. Τα υψηλά επίπεδα NO έχει δειχθεί ότι είναι ικανά να γίνουν αντιληπτά ως παράγοντας καταπόνησης και να οδηγήσουν το κύτταρο σε θάνατο. Ο κυτταρικός θάνατος πολύ συχνά οφείλεται σε μόνιμες βλάβες που υφίστανται μακρομόρια του κυττάρου, όπως το DNA, διάφορες πρωτεΐνες και τα λιπίδια των μεμβρανών. Η MtPHGPX φαίνεται να συμβάλει ενεργά στην αναγωγή οξειδωμένων λιπιδίων και του παράγοντα που προκαλεί την οξείδωσή τους, το H₂O₂. Η αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου ενδεχομένως να είναι το κλειδί του μηχανισμού

επαγωγής του κυτταρικού θανάτου από το NO. Αν λάβει κανείς υπόψη ότι το peroxynitrite είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του NO με H₂O₂ και ότι η συνένωση αυτή είναι ικανή να ελέγχει τις συγκεντρώσεις και των δυο μορίων, τότε η αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου μπορεί να έχει λάβει άλλη σημασία. Καθώς το ένζυμο απομακρύνει τα μόρια H₂O₂ από το κύτταρο δεν επιτρέπει την αλληλεπίδρασή του με το NO με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο περιορισμός της συγκέντρωσης του τελευταίου, με ολέθρια αποτελέσματα στην αζωτοδεσμευτική ικανότητα των φυματίων. Η αναστολή της ενεργότητας από το προϊόν της αλληλεπίδρασης επιτελεί έναν αυτόματο κυκλικό έλεγχο που επιτρέπει τον ανενόχλητο και αέναο σχηματισμό του peroxynitrite μέχρι να ελεγχθούν τα επίπεδα των δύο τοξικών μορίων.

VI. Πιθανός εναλλακτικός ρόλος της MtPHGPX και μελοντικές προοπτικές

Τα κύτταρα των φυτών έχουν σαφώς πολλά κοινά σημεία με αυτά των θηλαστικών και των ζωικών οργανισμών εν γένει. Τα συστήματα και οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται στα δύο βασίλεια παρουσιάζουν ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους σε επίπεδο κυτταρικών διαδικασιών. Μεταξύ αυτών των διαφορών είναι και η απουσία των ενζύμων ασκορβικής υπεροξειδάσης (APX) από τα ζωικά κύτταρα. Στα φυτά η APX καταβολίζει το H₂O₂ με μεγάλη συγγένεια προς το υπόστρωμα, παρόμοια με αυτή της καταλάσης. Οι APX αποτελούν μια οικογένεια ενζύμων που εντοπίζονται και δρουν σε πολλά κυτταρικά διαμερίσματα, όπως τους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια πέραν του κυτταροπλάσματος. Σε σχέση με τις GPX παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερη δραστηριότητα και συγγένεια προς το υπόστρωμά τους. Είναι άλλωστε γνωστό πως οι GPX των φυτών δεν περιέχουν κατάλοιπο SeCys με αποτέλεσμα η δραστηριότητα τους να είναι μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη από αυτή των θηλαστικών. Το κενό που δημιουργείται στην άμυνα του κυττάρου έναντι οξειδωτικών καταπονήσεων στα θηλαστικά λόγω της έλλειψης των APX καλύπτουν οι GPX και οι καταλάσεις. Αντίθετα στα φυτά, εφόσον υπάρχουν οι αποτελεσματικότερες APX και η δραστηριότητα των GPX είναι εξαιρετικά χαμηλή εγείρεται το ερώτημα μιας ενδεχόμενης εναλλακτικής λειτουργίας τους.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα μιας μελέτης στη ζύμη και αφορούν σε έναν εναλλακτικό ρόλο που μπορεί να παίζει ένα μέλος της οικογένειας των GPX, η Orp1 (225). Πέρα από τον καταβολισμό του H₂O₂ η Orp1 έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά άμεσα και να ενεργοποιεί την πρωτεΐνη YAP1, ένα μεταγραφικό παράγοντα που έχει βρεθεί ότι ελέγχει τη μεταγραφή γονιδίων άμυνας έναντι του οξειδωτικού στρες. Το H₂O₂ οξειδώνει την κυστεΐνη 36 της Orp1 η οποία με τη σειρά της σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με την κυστεΐνη 598. Στη συνέχεια η κυστεΐνη 303 της YAP1 επιτίθεται στο δεσμό και σχηματίζει νέο δισουλφιδικό δεσμό με την κυστεΐνη 598. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται μια νέα διαμόρφωση της πρωτεΐνης στο χώρο που την καθιστά ενεργοποιημένη και λειτουργική, έτοιμη να επιτελέσει το ρόλο της ως μεταγραφικό παράγοντα. Ο δισουλφιδικός αυτός δεσμός εντός της YAP1 λύεται μετά την αναγωγική παρέμβαση της θειορεδοξίνης που επιτίθεται σε αυτόν. Έτσι η πρωτεΐνη επανέρχεται στην αρχική της ανενεργή δομή και είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει και πάλι με την οξειδωμένη Orp1, η οποία επίσης ανάγεται παράλληλα από τη θειορεδοξίνη.

Αυτός ο μηχανισμός εναλλακτικής δράσης της GPX στη ζύμη προδίδει δύο ξεχωριστούς ρόλους που μπορούν να αναλαμβάνουν τα ένζυμα αυτά. Καθώς η διαδικασία λαμβάνει χώρα μόνο μετά την οξείδωση μιας κυστεΐνης του ενζύμου, η GPX δύναται να αποτελέσει ενός είδους αισθητήρα της οξειδαναγωγικής ισορροπίας του κυττάρου. Η GPX αυτή λειτουργεί και ως καταβολικό ένζυμο οπότε η παράλληλη δράση μάλλον πυροδοτείται υπό συγκεκριμένες συνθήκες που είναι πιθανό να αφορούν κυρίως στο εύρος της συγκέντρωσης του H₂O₂. Σε δεύτερη φάση η GPX λειτουργεί και ως μεταβιβαστής σήματος αφού μετατρέπει το σήμα της οξειδαναγωγικής ανισορροπίας σε μεταγραφή αμυντικών γονιδίων μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα YAP1.

Η MtPHGPX θεωρητικά θα μπορούσε να επιτελέσει έναν ανάλογο ρόλο στο κύτταρο. Όπως όλες οι GPX περιέχει τις αυστηρά συντηρημένες αλληλουχίες που τις χαρακτηρίζουν και περιέχονται και στην πεπτιδική αλυσίδα της Orp1. Στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκε μια πιθανή ζώνη που θα μπορούσε να περιέχει μια πρωτεΐνη η οποία να αλληλεπιδρά με τις MtPHGPX. Μελλοντικά θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να διερευνηθεί σε μεγαλύτερο βάθος και με διαφορετικά εργαλεία η πιθανότητα μιας

εναλλακτικής λειτουργίας του ενζύμου που αφορά σε αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες και τον διπλό ρόλο αισθητήρα-μεταβιβαστή σήματος. Η μελέτη αυτή είναι απαραίτητο να γίνει υπό το πρίσμα της φυσιολογίας του φυτού υπό διερεύνηση ως ψυχανθούς, καθώς είναι πιθανό να εμπλέκεται σε διαδικασίες που σχετίζονται με την αζωτοδέσμευση ή ακόμα και με την αναγνώριση των συμβιωτικών οργανισμών. Τέλος ο μηχανισμός έκφρασης των δύο ισομορφών υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες οφείλει να διαλευκανθεί έχοντας ίσως σαν σημείο εκκίνησης την υπόθεση του εναλλακτικού ματίσματος. Οι GPX και ειδικά οι PHGPX στα φυτά φαίνεται να αποτελούν σημαντικά και ιδιαίτερα μέλη της άμυνας του φυτού έναντι του οξειδωτικού στρες με προεκτάσεις που μπορούν να προφέρουν σημαντική γνώση για την λειτουργία του κυττάρου υπό αυτές τις συνθήκες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9): 405-410
2. Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. Kyle DJ (Ed.) *et al.*, *Photoinhibition*, Elsevier, 227-287
3. Dat J, Vandenamee S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(5): 779-795
4. Keunen E, Remans T, Bohler S, Vangronsveld J, Cuypers A (2011) Metal-induced oxidative stress and plant mitochondria. *International Journal of Molecular Science*, 12(10):6894-6918
5. Sharma SS, Dietz KJ (2009) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, 14: 43-50
6. Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2): 139-158
7. Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-930
8. Grant JJ, Loake GJ (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology*, 124: 21-29
9. Wang S, Xie B, Yin L, Duan L, Li Z, Eneji AE, Tsuji W, Tsunekawa A (2010) Increased UV-B radiation affects the viability, reactive oxygen species accumulation and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) pollen. *Photochemistry and Photobiology*, 86(1): 110-6
10. Miner B, Sultan S, Morgan S, Padilla D, Relyea R (2005). Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(12); 685-692
11. Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96(14): 8271-8276
12. Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science*, 6(4): 145-150
13. Girotti AW (2001) Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects and cytoprotective mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 63: 103-113
14. Allan AC, Fluhr R (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, 9: 1559-1572
15. Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, Distefano S, Palma JM, Lupiáñez JA, Del Río LA (1998) A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *Biochemistry Journal*, 330(2): 777-784
16. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, 39: 67-101
17. Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, and Dolan L (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422: 442-446
18. Lam E, Kato N, Lawton M (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411(6839): 848-853
19. Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH (1996) Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell*, 8(10): 1793-1807
20. Fath A, Bethke P, Beligni V, Jones R (2002) Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1273-1282
21. Noctor G, Foyer C (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249-279
22. Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 601-639

23. Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Reviews of Plant Biology*, 55: 373–399
24. Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiology of Plant*, 119: 355–364
25. Giacomelli L, Masi A, Ripoll DR, Lee MJ, van Wijk KJ (2007) *Arabidopsis thaliana* deficient in two chloroplast ascorbate peroxidases shows accelerated light-induced necrosis when levels of cellular ascorbate are low. *Plant Molecular Biology*, 65: 627–644
26. Miyake C, Shinzaki Y, Nishioka M, Horiguchi S, Tomizawa K (2006) Photoinactivation of ascorbate peroxidase in isolated tobacco chloroplasts: *Galdieria partita* APX maintains the electron flux through the water-water cycle in transplastomic tobacco plants. *Plant Cell Physiology*, 47(2): 200-210
27. Payton P, Webb R, Korniyev D, Allen R, Holaday AS (2001) Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. *Journal of Experimental Botany* 52(365): 2345-2354.
28. Khanna-Chopra R, Jajoo A, Semwal VK (2011) Chloroplasts and mitochondria have multiple heat tolerant isozymes of SOD and APX in leaf and inflorescence in *Chenopodium album*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412(4): 522-525
29. Pilon M, Ravet K, Tapken W (2011) The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(8): 989-998.
30. Abreu IA, Cabelli DE (2010) Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(2): 263-274
31. Fernández-Ocaña A, Chaki M, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Carreras A, Valderrama R, Begara-Morales JC, Hernández LE, Corpas FJ, Barroso JB (2011) Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. *Journal of Plant Physiology*, 168(11): 1303-1308
32. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10): 490-498.
38. Herbet S, Drevet PR, Drevet JR (2007) Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS Journal*, 274: 2163-2180
39. Mills GC (1957) Hemoglobin catabolism. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry* 266: 20752–20760.
40. Flohe L, Gunzler WA, Schock HH (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Letters*, 32: 132–134.
41. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179: 588–590
42. Rocher C, Lalanne JL, Chaudiere J (1992) Purification and properties of a recombinant sulfur analog of murine selenium-glutathione peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 205: 955–960.
43. Maiorino M, Aumann KD, Brigelius-Flohe R, Doria D, Van den Heuvel J, McCarthy J, Roveri A, Ursini F, Flohe L (1995) Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, 376: 651–660.
44. Stadtman TC (1996) Selenocysteine. *Annual Reviews in Biochemistry*, 65: 83–100.
45. Fu LH, Wang XF, Eyal Y, She YM, Donald LJ, Standing KG, Ben-Hayyim G (2002) A selenoprotein in the plant kingdom. Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 25983–25991
46. Kong BW, Kim H, Foster DN (2003) Cloning and expression analysis of chicken phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Animal Biotechnology*, 14: 19–29.

47. Thisse C, Degrave A, Kryukov GV, Gladyshev VN, Obrecht-Pflumio S, Krol A, Thisse B, Lescure A (2003) Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. *Gene Expression Patterns*, 3: 525–532.
48. Dufaure JP, Lareyre JJ, Schwaab V, Mattei MG, Drevet JR (1996) Structural organisation, chromosomal localization, expression and phylogenetic evaluation of mouse glutathione peroxidase encoding genes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, 319: 559–568.
49. Brigelius-Flohe R, Aumann K, Blocker H, Gross G, Kiess M, Kloppel K, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Ursini F (1994) Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 7342–7348.
50. 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
51. Rodriguez-Milla MA, Maurer A, Rodriguez-Huete A, Gustafson JP (2003) Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *The Plant Journal*, 36: 602–615
52. Iqbal A, Yabuta Y, Takeda T, Nakano Y, Shigeoka S (2006) Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*, 273: 5589–5597
53. Criqui MC, Jamet E, Parmentier Y, Marbach J, Durr A, Fleck J (1992) Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidases. *Plant Molecular Biology*, 18: 623–627.
54. Schuckelt R, Brigelius-Flohe R, Maiorino M, Roveri A, Reumkens J, Strassburger W, Ursini F, Wolf B, Flohe L (1991) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a selenoenzyme distinct from the classical glutathione peroxidase as evident from cDNA and amino acid sequencing. *Free Radical Research Communications*, 14: 343–361.
55. Epp O, Ladenstein R, Wendel A (1983) The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *European Journal of Biochemistry*, 133: 51–69
56. Zhang L, Maiorino M, Roveri A, Ursini F (1989) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1006: 140–43
57. Sztajer H, Gamain B, Aumann KD, Slomianny C, Becker K, Brigelius-Flohe R, Flohe L (2001) The putative glutathione peroxidase gene of *Plasmodium falciparum* codes for a thioredoxin peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 7397–7403
58. Tang L, Gounaris K, Griffiths C, Selkirk ME (1995) Heterologous expression and enzymatic properties of a selenium-independent glutathione peroxidase from the parasitic nematode *Brugia pahangi*. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 18313–18318.
59. Avsian-Kretchmer O, Eshdat Y, Gueta-Dahan Y, Ben-Hayyim G (1999) Regulation of stress-induced phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in citrus. *Planta*, 209: 469–477
60. Roeckel-Drevet P, Gagne G, Tourvieille de Labrouhe D, Dufaure JP, Nicolas P, Drevet JR (1998) Molecular cloning, organ distribution and stress-mediated induction of two glutathione peroxidase-encoding mRNAs in sunflower (*Helianthus annuus*). *Physiology of Plant*, 103: 385–394
61. Wendel A, Cikryt P (1980) The level and half-life of glutathione in human plasma. *FEBS Letters*, 120: 209–211
62. Bjornstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, Holmgren A (1994) The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 29382–29384

63. Holmgren A (1985) Thioredoxin. *Annual Reviews of Biochemistry*, 54: 237–271
64. Eklund H, Cambillau C, Sjoberg B, Holmgren A, Jornvall H, Hoog J, Branden C (1984) Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO Journal*, 3: 1443–1449
65. Herbet S, Lenne C, Leblanc N, Julien JL, Drevet JR, Roedel-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
66. Jung BG, Lee KO, Lee SS, Chi YH, Jang HH, Kang SS, Lee K, Lim D, Yoon SC, Yun DJ, Inoue Y, Cho MJ, Lee SY (2002) A chinese cabbage cDNA with high sequence identity to phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases encodes a novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 12572–12578
67. Tanaka T, Izawa S, Inoue Y (2005) GPX2, encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue, codes for an atypical 2-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 42078–42087
68. Maiorino M, Ursini F, Bosello V, Toppo S, Tosatto SC, Mauri P, Becker K, Roveri A, Bulato C, Benazzi L, et al. (2007) The thioredoxin specificity of *Drosophila* GPx: a paradigm for a peroxiredoxin-like mechanism of many glutathione peroxidases. *Journal of Molecular Biology*, 365: 1033–1046
69. Iqbal A, Yabuta Y, Takeda T, Nakano Y, Shigeoka S (2006) Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*, 273: 5589–5597
70. Fomenko DE, Gladyshev VN (2003) Identity and functions of CxxC-derived motifs. *Biochemistry*, 42: 11214–11225
71. Balmer Y, Vensel W, Tanaka C, Hurkman W, Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot J, Manieri W, Schurmann P, Droux M, et al. (2004) Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 101: 2642–2647
72. Wong J, Cai N, Balmer Y, Tanaka C, Vensel W, Hurkman W, Buchanan B (2004) Thioredoxin targets of developing wheat seeds identified by complementary proteomic approaches. *Phytochemistry*, 65: 1629–1640
73. Avery AM, Avery SV (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 33730–33735
74. Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO Journal*, 19: 5157–5166
75. Avery A, Willetts S, Avery S (2004) Genetic dissection of the phospholipid hydroperoxidase activity of yeast gpx3 reveals its functional importance. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 46652–46658
76. Depege N, Drevet J, Boyer N (1998) Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like proteins. *European Journal of Biochemistry*, 253: 445–451
77. Willekens H, Van Camp W, Van Montagu M, Inze D, Langebartels C, Sandermann H (1994) Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiology*, 106: 1007–1014
78. Sugimoto M, Sakamoto W (1997) Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stress. *Genes and Genetic Systems*, 72: 311–316
79. Mullineaux PM, Karpinski S, Jimenez A, Cleary SP, Robinson C, Creissen GP (1998) Identification of cDNAs encoding plastid-targeted glutathione peroxidase. *The Plant Journal*, 13: 375–379

- 80.** Churin Y, Schilling S, Borner T (1999) A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (Barley). *FEBS Letters*, 459: 33–38
- 81.** King K, Horenstein J, Caparon M (2000) Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology*, 182: 5290–5299
- 82.** Yoshimura K, Miyao K, Gaber A, Takeda T, Kanaboshi H, Miyasaka H, Shigeoka S (2003) Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol. *The Plant Journal*, 37: 21–33
- 83.** Chen S, Vaghchhipawala Li W, Asard H, Dickman M (2004) Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by Bax and oxidative stresses in yeast and plants. *Plant Physiology*, 135: 1630–1641.
- 84.** Gaber A, Tamoi M, Takeda T, Nakano Y, Shigeoka S (2001) NADPH-dependent glutathione peroxidase-like proteins (Gpx-1, Gpx-2) reduce unsaturated fatty acid hydroperoxides in *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Letters*, 499: 32–36.
- 85.** Takeda T, Miyao K, Tamoi M, Kanaboshi H, Miyasaka H, Shigeoka S (2003) Molecular characterization of glutathione peroxidase-like protein in halotolerant *Chlamydomonas* sp. W80. *Physiology of Plant*, 117: 467–475
- 86.** Gaber A, Yoshimura K, Tamoi M, Takeda T, Nakano Y, Shigeoka S (2004) Induction and functional analysis of two reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutathione peroxidase-like proteins in *Synechocystis* PCC 6803 during the progression of oxidative stress. *Plant Physiology*, 136: 2855–2861
- 87.** Utomo A, Jiang X, Furuta S, Yun J, Levin D, Wang Y, Desai K, Green J, Chen P, Lee W (2004) Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 43522–43529
- 88.** Herbette S, Lenne C, Tourvieille de Labrouhe D, Drevet JR, Roedel-Drevet P (2003) Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, phytohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors. *Physiology of Plant*, 119: 418–428.
- 89.** Leisinger U, Rufenacht K, Fischer B, Pesaro M, Spengler A, Zehnder AJB, Eggen RIL (2001) The glutathione peroxidase homologous gene from *Chlamydomonas reinhardtii* is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen. *Plant Molecular Biology*, 46: 395–408
- 90.** Fischer BB, Eggen RI, Trebst A, Krieger-Liszkay A (2006) The glutathione peroxidase homologous gene Gpxh in *Chlamydomonas reinhardtii* is upregulated by singlet oxygen produced in photosystem II. *Planta*, 223: 583–590.
- 91.** Farr S, Kogoma T (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiology Reviews*, 55: 561–585
- 92.** Horsburgh M, Clements M, Crossley H, Ingham E, Foster S (2001) PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infections and Immunology*, 69: 3744–3754
- 93.** Rusterucci C, Montillet JL, Agnel JP, Battesti C, Alonso B, Knoll A, Bessoule JJ, Etienne P, Suty L, Blein J et al. (1999) Involvement of lipoxygenase dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 36446–36455
- 94.** Govrin E, Levine A (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10: 751–757

95. Imai H, Narashima K, Arai M, Sakamoto H, Chiba N, Nakagawa Y (1998) Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 1990–1997
96. Sakamoto H, Imai H, Nakagawa Y (2000) Involvement of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the modulation of prostaglandin D2 synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 40028–40035
97. Brigelius-Flohe R, Friedrichs B, Maurer S, Schultz M, Streicher R (1997) Interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. *Biochemistry Journal*, 328: 199–203
98. Nomura K, Imai H, Koumura T, Arai M, Nakagawa Y (1999) Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 29294–29302
99. Schnurr K, Belkner J, Ursini F, Schewe T, Kuhn H (1996) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 4653–4658.
100. Huang HS, Chen CJ, Lu HS, Chang WC (1998) Identification of a lipoxygenase inhibitor in A431 cells as a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *FEBS Letters*, 424: 22–26
101. Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO Journal*, 19: 5157–5166
102. Miao Y, Liv D, Wang P, Wang XC, Chen J, Miao C, Song CP (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
103. Mouaheb N, Thomas D, Verdoucq L, Monfort P, Meyer Y (1998) *In vivo* functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 95: 3312–3317
104. Meyer Y, Verdoucq L, Vignols F (1999) Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends in Plant Science*, 4: 388–394
105. Schenk H, Klein M, Erdbrugger W, Droge W, Schulze-Osthoff K (1994) Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 91: 1672–1676
106. Li D, Blasevich F, Theopold U, Schmidt O (2003) Possible function of two insect phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidases. *Journal of Insect Physiology*, 49: 1–9.
107. Herbet S, Le Menn A, Rousselle P, Ameglio T, Faltin Z, Branlard G, Eshdat Y, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P (2005) Modification of photosynthetic regulation in tomato overexpressing glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1724: 108–118
108. Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997) Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum*, 100: 241–254
109. Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17: 1866–1875
110. Girotti AW (2001) Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects and cytoprotective mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 63: 103–113
111. Elstner EF (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: *Active Oxygen/Oxidative Stress in Plant Metabolism*, edited by Pelland EJ and Steffen KL. *American Society of Plant Physiologists*, Rockville, MD 13–25.

- 112.** Pitzschke A, Forzani C, Hirt H (2006) Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8(9): 1757-1764
- 113.** Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411: 826–833
- 114.** Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98: 13454–13459
- 115.** Mittler R, Herr EH, Orvar BL, van Camp W, Willekens H, Inze D, Ellis BE (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96: 14165–14170
- 116.** Hammond-Kosack K, Jones JDG (2000) Responses to plant pathogens. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, edited by Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. *American Society of Plant Physiologists*, Rockville, MD 1102–1156
- 117.** Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97: 8849–8855
- 118.** Desikan R, Reynolds A, Hancock JT, Neill SJ (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochemistry Journal*, 330: 115–120
- 119.** Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 11: 431–443
- 120.** Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79: 583–593
- 121.** Alvarez ME, Pennell RI, Meijer P-J, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92: 773–784
- 122.** Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, Rombauts S, Langebartels C, Seidlitz HK, Zabeau M, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F (2004) Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 39: 45–58
- 123.** Mustilli A-C, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *The Plant Cell*, 14: 3089–3099
- 124.** Delledonne M (2005) NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 390-396
- 125.** Wendehenne D, Durner J, Klessig DF (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:449-455
- 126.** Murphy MP (1999) Nitric oxide and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411: 401-414
- 127.** Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*, 159: 11-35
- 128.** Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago E, Delledonne M (2004) Nitric oxide signalling functions in plant pathogen interaction. *Cell Microbiology*, 6: 795-803
- 129.** Sokolovski S, Blatt MR (2004) Nitric oxide block of outward-rectifying K⁺ channels indicates direct control by protein nitrosylation in guard cells. *Plant Physiology*, 136: 4275-4284
- 130.** Zeidler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase

(NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101: 15811-15816.

131. Planchet E, Gupta KJ, Sonoda M, Kaiser WM (2005) Nitric oxide (NO) emission from tobacco leaves and cell suspensions: ratelimiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *The Plant Journal*, 41: 732-743

132. Gaston, B., J. M. Drazen, J. Loscalzo, J. S. Stamler. 1994. The biology of nitrogen oxides in the airways. *American Journal of Respiratory Critical Care Medication*, 149: 538–551

133. Lancaster JR (1994) Simulation of the diffusion and reaction of endogeneously produced nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91: 8137–8141

134. Arredondo-Peter R, Hargrove MS, Moran JF, Sarath G, Klucas KV (1998) Plant hemoglobins. *Plant Physiology*, 118: 1121-1125

135. Dordas C, Rivoal J, Hill RD (2003) Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. *Annual Botany (Lond)*, 91: 173-178

136. Perazzolli M, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago E, Zeier J, Sonoda M, Lamb C, Delledonne M (2004) *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *The Plant Cell*, 16: 2785-2794

137. Dordas C, Hasinoff BB, Igamberdiev AU, Manach N, Rivoal J, Hill RD (2003) Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *The Plant Journal*, 35: 763-770

138. Igamberdiev AU, Seregelyes C, Manach N, Hill RD (2004) NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. *Planta*, 219: 95-102

139. Seregelyes C, Igamberdiev AU, Maassen A, Hennig J, Dudits D, Hill RD (2004) NO-degradation by alfalfa class 1 hemoglobin (Mhb1): a possible link to PR-1a gene expression in Mhb1-overproducing tobacco plants. *FEBS Letters*, 571: 61-66

140. Trujillo M, Alvarez MN, Peluffo G, reeman BA, Radi R (1998) Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 7828-7834

141. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K (1997) Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 27812-27817

142. Diaz M, Achkor H, Titarenko E, Martinez MC (2003) The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Letters*, 543: 136-139

143. Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *The Plant Journal*, 24: 667-677

144. Zhang H, Shen WB, Zhang W, Xu LL (2005) A rapid response of α -amylase to nitric oxide but not gibberellin in wheat seeds during the early stage of germination. *Planta*, 220: 708-716

145. Bethke PC, Gubler F, Jacobsen JV, Jones RL (2004) Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta*, 219: 847-855

146. Simontacchi M, Jasid S, Puntarulo S (2004) Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Science*, 167: 839-847

147. Bethke PC, Badger MR, Jones RL (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell*, 16: 332-341

148. Pagnussat GC, Lanteri ML, Lombardo MC, Lamattina L (2004) Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiology*, 135: 279-286

149. Correa-Aragunde N, GrazianoM, Lamattina L (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218: 900-905

150. Gabaldon C, Gomez Ros LV, Pedreno MA, Ros Barcelo A (2005) Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytologist*, 165: 121-130

- 151.** He Y, Tang R-H, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F et al. (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science*, 305: 1968-1971
- 152.** Prado AM, Porterfield DM, Feijo JA (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development*, 131: 2707-2714
- 153.** Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quiros M, Leon AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM et al. (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology*, 136: 2722-2733
- 154.** Hu X, Neill SJ, Tang Z, Cai W (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology*, 137: 663-670
- 155.** Ludidi N, Gehring C (2003) Identification of a novel protein with guanylyl cyclase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 6490-6494
- 156.** Barna B, Fodor J, Harrach BD, Pogány M, Király Z (2012) The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry* (online edition)
- 157.** Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J (2000) In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *The Plant Journal*, 23: 817-824
- 158.** Zhang C, Czymmek KJ, Shapiro AD (2003) Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *Arabidopsis* hypersensitive response. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 16: 962-972
- 159.** Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany*, 53: 103-110
- 160.** Mur LAJ, Santosa IE, Laarhoven L-JJ, Harren F, Smith AR (2003) A new partner in the danse macabre: the role of nitric oxide in the hypersensitive response. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, (special issue): 110-123.
- 161.** Conrath U, Amoroso G, Kohle H, Sultemeyer DF (2004) Non-invasive online detection of nitric oxide from plants and some other organisms by mass spectrometry. *The Plant Journal*, 38:1015-1022
- 162.** Vanin AF, Svistunenko DA, Mikoyan VD, Serezhenkov VA, Fryer MJ, Baker NR, Cooper CE (2004) Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 24100-24107
- 163.** Mengiste T, Chen X, Salmeron J, Dietrich R (2003) The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15: 2551-2565
- 164.** Govrin EM, Levine A (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10: 751-757
- 165.** Van Baarlen P, Staats M, Van Kan JAL (2004) Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular Plant Pathology*, 5: 559-574
- 166.** Tada Y, Mori T, Shinogi T, Yao N, Takahashi S, Betsuyaku S, Sakamoto M, Park P, Nakayashiki H, Tosa Y et al. (2004) Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17: 245-253
- 167.** Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ, Durner J (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 218: 938-946
- 168.** Murgia I, Tarantino D, Vannini C, Bracale M, Carravieri S, Soave C (2004) *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance

to paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *The Plant Journal*, 38: 940-953

- 169.** Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science*, 6: 177-183
- 170.** Lamotte O, Gould K, Lecourieux D, Sequeira-Legrand A, Lebrun-Garcia A, Durner J, Pugin A, Wendehenne D (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology*, 135: 516-529
- 171.** Parani M, Rudrabhatla S, Myers R, Weirich H, Smith B, Leaman DW, Goldman SL (2004) Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal*, 2: 359-366
- 172.** Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 10328-10333
- 173.** Stamler JS (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78: 931-936.
- 174.** Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89: 444-448
- 175.** Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Review of Molecular Cell Biology*, 6: 150-166
- 176.** Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA (1997) Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*, 276: 2034-2037
- 177.** Lindermayr C, Saalbach G, Durner J (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 137: 921-930
- 178.** Wang Y, Yun BW, Kwon EJ, Hong JK, Yoon J, Loake GJ (2006) S-Nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(8): 1777-1784
- 179.** Inoue K, Akaike T, Miyamoto Y, Okamoto T, Sawa T, Otagiri M, Suzuki S, Yoshimura T, Maeda H (1999) Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 27069-27075
- 180.** Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS (2001) Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature*, 409: 622-626
- 181.** Durner J, Klessig (1999) Nitric oxide as signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 369-374
- 182.** Gaston B, Reilly J, Drazen JM, et al (1993) Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90: 10957-10961
- 183.** Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature*, 41: 490-494
- 184.** Stubauer G, Giuffre A, Sarti P (1999) Mechanism of S-nitrosothiol formation and degradation mediated by copper ions. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 28128-28133
- 185.** Eu J, Sun J, Xu L, Stamler J, Meissner G (2000) The skeletal muscle calcium release channel coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell*, 102: 499-509
- 186.** Hess DT, Matsumoto A, Nudelman R, Stamler JS (2001) S-Nitrosylation: spectrum and specificity. *Nature Cell Biology*, 3: E46-E49.
- 187.** Lai TS, Hausladen A, Slaughter TF, Eu JP, Stamler JS, Greenberg CS (2001) Calcium regulates S-nitrosylation, denitrosylation, and activity of tissue transglutaminase. *Biochemistry*, 40: 4904-4910

- 188.** Funaiya EFDA, Seligmana SP, Finlay TH (1997) S-Nitrosohemoglobin in the fetal circulation may represent a cycle for blood pressure regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239: 875–877
- 189.** James PE, Tufnell-Barret T, Milsom AB, Frenneaux MP, Lang D (2004) Red blood cell-mediated hypoxic vasodilatation: a balanced physiological viewpoint. *Circulation Research*, 95: e8–e9
- 190.** Singel DJ, Stamler JS (2005) Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells. *Annual Review of Physiology*, 67: 99–145
- 191.** Hao G, Derakhshan B, Shi L, Campagne F, Gross SS. 2006. SNOSID, a proteomic method for identification of cysteine S-nitrosylation sites in complex protein mixtures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103: 1012–1017
- 192.** Huber SC, Hardin SC (2004) Numerous posttranslational modifications provide opportunities for the intricate regulation of metabolic enzymes at multiple levels. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 318–322
- 193.** Lindermayr C, Saalbach G, Bahnweg G, Durner J (2006) Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 4285–4291
- 194.** Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB, Klessig DF (2002) The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 11640–11645
- 195.** Sakamoto A, Tsukamoto S, Yamamoto H, Ueda-Hashimoto M, Takahashi M, Suzuki H, Morikawa H (2003) Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species. *The Plant Journal*, 33: 841–851
- 196.** Corpas FJ, Chaki M, Leterrier M, Barroso JB (2009) Protein tyrosine nitration. A new challenge in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 4(10): 920-923
- 197.** Bartesaghi S, Ferrer-Sueta G, Peluffo G, Valez V, Zhang H, Kalyanaraman B, et al. (2007) Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino Acids*, 32: 501-515
- 198.** Radi R (2004) Nitric oxide, oxidants and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101: 4003-8
- 199.** Shi W-Q, Cai H, Xu D-D, Su X-Y, Lei P, Zhao Y-F, et al. (2007) Tyrosine phosphorylation/dephosphorylation regulates peroxynitrite-mediated peptide nitration. *Regulation of Peptides*, 144: 1-5
- 200.** Rayala SK, Martin E, Sharina IG, Molli PR, Wang X, Jacobson R, et al. (2007) Dynamic interplay between nitration and phosphorylation of tubulin cofactor B in the control of microtubule dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104: 19470-5
- 201.** Greenacre SA, Ischiropoulos H (2001) Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radical Research*, 34: 541-81
- 202.** Souza JM, Peluffo G, Radi R (2008) Protein tyrosine nitration—functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Biology and Medicine*, 45: 357-66
- 203.** Rubbo H, Radi R (2008) Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780: 1318-24
- 204.** Aulak KS, Miyagi M, Yan L, West KA, Massillon D, Crabb JW, et al. (2001) Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98: 12056-61
- 205.** Tyther R, Ahmeda A, Johns E, Sheehan D (2007) Proteomic identification of tyrosine nitration targets in kidney of spontaneously hypertensive rats. *Proteomics*, 7: 4555-64

- 206.** Ischiropoulos H (2008) Protein tyrosine nitration—an update. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 484: 117-21
- 207.** Morot-Gaudry-Talarmain Y, Rockel P, Moureaux T, Quillere I, Leydecker MT, Kaiser WM, Morot-Gaudry JF (2002) Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta*, 215: 708–715
- 208.** Saito S, Yamamoto-Katou A, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K (2006) Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in Tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiology*, 5: 324-339
- 209.** Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED, Delledonne M (2004) Nitric oxide signaling functions in plant–pathogen interactions. *Cell Microbiology*, 6:795–803
- 210.** Chaki M, Fernández-Ocapa AM, Valderrama R, Carreras A, Esteban FJ, Luque F, et al. (2009) Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant Cell Physiology*, 50: 265-79
- 211.** Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Fernandez-Ocana A, Chaki M, Luque F, Gomez-Rodriguez MV, Colmenero- Varera P, del Rio LA, Barroso JB (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters*, 581: 453–461
- 212.** Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, León AM, et al. (2006) Constitutive argininedependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta*, 224: 246-254
- 213.** Ferrarini A, De Stefano M, Baudouin E, Pucciariello C, Polverari A, Puppo A, Delledonne M (2008) Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Molecular Plant Microbe Interactions* 21(6): 781-790
- 214.** Ballihaut G, Mounicou S, Lobinski R (2007) Multitechnique mass-spectrometric approach for the detection of bovine glutathione peroxidase selenoprotein: focus on the selenopeptide. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388: 585–591
- 215.** Brenman JE, Xia H, Chao DS, Black SM, Bredt DS (1997) Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Dev Neuroscience*, 19(3): 224-231
- 216.** Yang XD, Dong CJ, Liu JY (2006) A plant mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: its precise localization and higher enzymatic activity. *Plant Molecular Biology*, 62: 951–962
- 217.** Ramos J, Matamoros MA, Naya L, James EK, Rouhier N, Sato S, Tabata S, Becana M (2008) The glutathione peroxidase gene family of *Lotus japonicus*: characterization of genomic clones, expression analyses and immunolocalization in legumes. *New Phytologist*, 181: 103–114
- 218.** Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC, Dalton DA, Becana M (2001) The antioxidants of legume nodule mitochondria. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 14(10): 1189-1196
- 219.** 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
- 220.** 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
- 221.** Zhao W, Guo Q, Zhao J (2007) A membrane-associated Mn-superoxide dismutase protects the photosynthetic apparatus and nitrogenase from oxidative damage in the *Cyanobacterium Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiology*, 48(4): 563-572
- 222.** Tejera NA, Campos R, Sanjuan J, Lluch C (2004) Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 161(3): 329-338
- 223.** Meilhoc E, Boscari A, Bruand C, Puppo A, Brouquisse R (2011) Nitric oxide in legume-rhizobium symbiosis. *Plant Science*, 181(5): 573-81

- 224.** del Giudice J, Cam Y, Damiani I, Fung-Chat F, Meilhoc E, Bruand C, Brouquisse R, Puppo A, Boscardi A (2011) Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytologist*, 191(2): 405-17
- 225.** Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, 111(4): 471-81
- 226.** Mathieu C, Moreau S, Frendo P, Puppo A, Davies MG (1998) Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free Radical Biology Med*, 24: 1242-1249
- 227.** Dépège N, Varenne M, Boyer N (2000) Induction of oxidative stress and GPX-like protein activation in tomato plants after mechanical stimulation. *Physiology of Plant*, 10: 209-214
- 228.** Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394: 585-588
- 229.** Orozco-Cárdenas ML, Ryan CA (2002) Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiology*, 130: 487-493
- 230.** Lum HK, Butt YK, Lo SC (2002) Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Nitric Oxide*, 6: 205-213
- 231.** Klotz LO, Schroeder P, Sies H (2002) Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(6): 737-743
- 232.** Mayer B, Hemmens B (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in Biochemistry Science*. 22(12): 477-481.
- 233.** Grant JJ, Yun BW, Loake GJ (2000) Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *The Plant Journal*, 24(5): 569-582
- 234.** Hui J (2009) Regulation of mammalian pre-mRNA splicing. *Science China C Life Science*, 52(3): 253-260
- 235.** Daoud R, Stoilov P, Stoss O, Hóbenner M, da Penha Berzaghi M, Hartmann AM, Olbrich M, Stamm S (2000) Control of pre-mRNA processing by extracellular signals: emerging molecular mechanisms. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 5: 121-130
- 236.** Wang BB, Brendel V (2006) Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103(18): 7175-7180
- 237.** Takeo K, Kawai T, Nishida K, Masuda K, Teshima-Kondo S, Tanahashi T, Rokutan K (2009) Oxidative stress-induced alternative splicing of *transformer β* (*SFRS10*) and *CD44* pre-mRNAs in gastric epithelial cells. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, 297: 330-338
- 238.** Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S (2002) Identification of a cis element for tissue-specific alternative splicing of chloroplast ascorbate peroxidase pre-mRNA in higher plants. *Journal of Biological Chemistry*, 277(43): 40623-40632
- 239.** Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, Nakamura T, Nakamura C, Takumi S (2006) Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat. *Genes and Genetic Systems*, 81: 77-91
- 240.** Golovkin M, Reddy AS (1996) Structure and expression of a plant U1 snRNP 70K gene: alternative splicing of U1 snRNP 70K pre-mRNAs produces two different transcripts. *The Plant Cell*, 8(8): 1421-1435
- 241.** Isshiki M, Tsumoto A, and Shimamoto K (2006) The Serine/Arginine-rich protein family in rice plays important roles in constitutive and alternative splicing of pre-mRNA. *The Plant Cell*, 18: 146-158

- 242.** Callahan HL, Chouch RK, James ER (1990) Hydrogen peroxide is the most toxic oxygen species for *Onchocerca cervical* microfilariae. *Parasitology*, 100: 407-415
- 243.** Hufton CA, Besford RT, Wellburn AR (1996) Effects of NO (+NO₂) pollution on growth, nitrate reductase activities and associated protein contents in glasshouse lettuce grown hydroponically in winter CO₂ enrichment. *New Phytologist*, 133: 495–501
- 244.** 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. *Journal of Plant Physiology*, 148: 258–263
- 245.** Kuwano Y, Rabinovic A, Srikantan S, Gorospe M, Demple B (2009) Analysis of nitric oxide-stabilized mRNAs in human fibroblasts reveals HuR-dependent heme oxygenase 1 upregulation. *Molecular Cell Biology*, 29(10): 2622-2635
- 246.** Pantopoulos K, Hentze MW (1995) Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein. *EMBO Journal*, 14(12):2917-2924
- 247.** Asahi M, Fujii J, Suzuki K, Seo HG, Kuzuya T, Hori M, Tada M, Fujii S, Taniguchi N (1995) Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 270(36):21035-21039
- 248.** Ursini F, Bindoli A (1987) The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chemistry and Physiology of Lipids*, 44(2-4):255-276
- 249.** Wang Z, Wang F, Duan R, Liu JY (2007) Purification and physicochemical characterization of a recombinant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from *Oryza sativa*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3):412-418
- 250.** 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(5):923-927

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H_2O_2), the superoxide radical (O_2^-), and the hydroxyl radical (OH^\cdot) are produced in plant cells during physiological metabolic processes such as photosynthesis and respiration. ROS production is also induced in plants under both biotic and abiotic stress, including high salinity conditions, drought, intense light, high concentration of heavy metals in the soil and microbial attack. ROS are cytotoxic and, due to their increased activity, interact with macromolecules such as proteins, lipids and nucleic acids, causing irreversible damages which can lead to cell death. In order to cope with ROS accumulation, plants have evolved defense mechanisms of enzymatic or non-enzymatic nature to scavenge or block the production of these hazardous molecules. In addition to the hazardous effect, ROS also play signalling functions within cells and participate in several developmental and functional processes in plants. Thus, besides from scavenging ROS, antioxidative enzymes are responsible for maintaining redox balance in the cell.

Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases (PHGPXs) are members of the antioxidant mechanism, metabolizing organic hydroperoxides or H_2O_2 to water with the use of an electron provided by either glutathione or thioredoxin. PHGPXs are highly conserved and exhibit certain characteristics such as their subcellular localization, which in plants is usually both cytosolic and mitochondrial and depends on an N'-terminal leading peptide. They do not form homopolymers, and their genomic sequences are comprised by six, seven or eight exons. Finally, PHGPXs would also act as redox state sensors and signal transducers, other than ROS scavenging enzymes.

Nitric oxide (NO), as well as H_2O_2 , are positive regulators of abiotic- and biotic-induced stress defense response in plants. NO is a hydrophobic gaseous molecule that has the ability to easily and rapidly diffuse between and within cells. It interacts with metal complexes, proteins and nucleic acids and is implicated in several physiological procedures like lateral root elongation, stomatal closure, apoptosis and response to biotic and abiotic stresses. It can also be coupled to a reactive cysteine thiol, forming S-nitrosothiol (SNO), a post-translational modification that modifies the enzymatic activity of target enzymes. NO can interact

with ROS to form reactive nitrogen species (RNS) such as peroxynitrite, a molecule which causes the post-translational modification of tyrosine nitration.

The aim of this thesis was to analyze the existence of putative PHGPX homologues in *M. truncatula*, characterize them and study their response to NO on a transcriptional and protein level. To this end, two PHGPX isoforms (*MtPHGPX α* and *MtPHGPX β*) were isolated and compared to other known PHGPX from other species. They were found to be containing all conserved regions and two alternatively spliced leading peptides. In order to investigate whether these peptides are responsible for the subcellular localization of the isoforms, the full length gene and the two coding regions of *MtPHGPX α* and *β* were fused to GFP protein tags and overexpressed in tobacco leaflets. Both isoforms were found to be located in the cytosol whereas the full length gene construct also gave a protein which was located in the cytosol as well. The effect of NO and H₂O₂ on the representation of the two transcripts was also studied in roots and leaves and different patterns were observed. To elucidate the mechanism by which NO could control MtPHGPX levels an mRNA stabilization assay was performed, which showed that NO could extend *MtPHGPX* transcripts half-life.

Another objective was to specify the substrate and the electron donor used by MtPHGPX. The protein was overexpressed in bacteria and purified. It was found that the substrate and electron donor with the greatest affinity was H₂O₂ and thioredoxin, although cumene hydroperoxide showed similar affinity. NO was not found to influence MtPHGPX activity but peroxynitrite showed a strong inhibition effect. MtPHGPX cysteine residues were shown to be S-nitrosylated by NO donor DEANOate and tyrosine residues were found to be nitrated by peroxynitrite. Finally, a protein-protein interaction assay showed that MtPHGPX could possibly interact with an unknown protein of the plant, an interaction which is probably inhibited by H₂O₂.

This work gave insight into two MtPHGPX isoforms and their responses to oxidative stress simulation conditions mimicked by NO and H₂O₂. It was found that these isoforms are products of alternative splicing and their representation is controlled by NO and H₂O₂ in roots and leaves. The isoforms are closely related to other legume species and contain all conserved regions except for two leading

peptides alternatively present. Interestingly both isoforms were found to be cytosolic, an observation which seems to be common for legume plants.

The activity of the enzyme was not found to be affected by NO, but it was strongly inhibited by peroxynitrite. This could mean that NO is not bound to a cysteine that is crucial for the formation and the function of the active site of the enzyme, whereas a tyrosine residue must be very important. This could also point towards an NO binding role served by MtPHGPX and when combined with the fact that both isoforms are cytosolic a functional role could arise. MtPHGPX might be able to protect nitrogenase in nodules from inhibitory excess NO levels, in parallel with ROS scavenging, which has the same effects.

As future perspectives, these results could be very useful for further investigation in line with the broad research field on the antioxidant mechanism and dealing with oxidative stress. The information on MtPHGPX could be proven helpful to develop new approaches towards a more efficient yield policy. Nevertheless, the specification of the exact mechanism by which MtPHGPX transcripts are accumulated in the cell and the identity of the protein interacting with MtPHGPX are very interesting issues to be studied. The effect of NO on the stability of the protein and the functional role of the enzyme are also considered to be of high importance.