

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μηχανισμοί μεταγωγής σήματος και οργάνωση του φυτικού
κυτταροσκελετού: Ο ρόλος των δραστικών μορφών οξυγόνου**

ΠΑΝΤΕΛΕΗΜΩΝ ΛΙΒΑΝΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2015

UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCES
FACULTY OF BIOLOGY
DEPARTMENT OF BOTANY

Ph.D. THESIS

**Mechanisms of signal transduction and organization
of the plant cytoskeleton: The role of reactive oxygen species**

PANTELEIMON LIVANOS
BIOLOGIST

ATHENS 2015

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

N.5343/1932, άρθρο 202

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Αποστολάκος Παναγιώτης, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ (επιβλέπων)

Γαλάτης Βασίλειος, Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Κατσαρός Χρήστος, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αποστολάκος Παναγιώτης, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Γαλάτης Βασίλειος, Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Κατσαρός Χρήστος, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Γαϊτανάκη Αικατερίνη, Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ελευθερίου Ελευθέριος, Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΑΠΘ

Παντερής Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΑΠΘ

Στραβοπόδης Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ. Λίγο πριν από την ολοκλήρωση της προσπάθειας, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της παρούσας διατριβής, Καθηγητή κ. Παναγιώτη Αποστολάκο για την ανάθεση του θέματος, τη διαρκή και ουσιαστική καθοδήγηση, την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη και το αμείωτο ενδιαφέρον του. Είμαι ευτυχής για τη συνεργασία μας και ευγνώμων, διότι αποτέλεσε παράδειγμα για εμένα. Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις θερμές ευχαριστίες μου προς τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Βασίλειο Γαλάτη, για την πολύτιμη συμβολή του καθ' όλη την πορεία της διατριβής. Τον ευχαριστώ πολύ για τη βοήθεια που απλόχερα μου προσέφερε και το χρόνο που αφειδώς διέθεσε για μένα. Κρατώ τις συμβουλές του ως παρακαταθήκη για το μέλλον. Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Χρήστο Κατσαρό, γιατί είχα στη διάθεσή μου την γνώμη του, τη συμβουλή του, τη βοήθεια και τη στήριξή του, όποτε χρειάστηκα.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον Δρα. Hartmut Quader, για την συμβολή του στην επιλογή του θέματος της διατριβής, τη φιλοξενία του στο εργαστήριό του στο Πανεπιστήμιο του Αμβούργου, τις πολύτιμες συμβουλές του και τη ευγενική διάθεσή του να ενημερώνεται και να συμμετέχει στην πορεία της παρούσας διατριβής. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Καθηγήτρια κ. Αικατερίνη Γαϊτανάκη για τη συνεργασία μας, το διαρκές ενδιαφέρον της, τις παρατηρήσεις της και τις συμβουλές της στα θέματα βιοχημείας και οξειδωτικής καταπόνησης. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Ελευθέριο Ελευθέριου, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Παντερή και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Στραβοπόδη για την επικοινωνία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, την υποστήριξή τους, τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή της παρούσας διατριβής και τις εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις τους.

Στην πορεία της παρούσας διατριβής συνέβαλε επίσης καθοριστικά ένας μεγάλος αριθμός καθηγητών, ερευνητών και συναδέλφων εντός και εκτός Τμήματος, οι οποίοι προσέφεραν φυτικό υλικό, αντισώματα, αναλώσιμα, βοήθησαν με τις ιδέες, γνώσεις παρατηρήσεις και συμβουλές τους. Ευχαριστώ, λοιπόν, θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κοσμά Χαραλαμπίδη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ανδρέα Ρούσση, όπως και τους Δρες Liam Dolan, Gerd Jürgens, Martine Pastuglia, David Bouchez και Andrei Smertenko. Για τους παραπάνω λόγους, την πολύτιμη βοήθεια τους και επιπλέον τη συμπαράσταση και την ενίσχυση τους ευχαριστώ θερμά τους Δρες Ιωάννη Αδαμάκη, Ελένη Γιαννούτσου, Γεώργιο Κόμη, Θεοδώρα Νικολακοπούλου, Ιωάννη Παπαϊωάννου, Πηνελόπη Σωτηρίου, Παναγιώτη Τσαγκαμίλη, Αμέρσσα Τσιριγώτη και τους υποψήφιους διδάκτορες Χρυσάνθη Βαλασάκη, Γεώργιο Καπόλα, Μαρία Κουταλιανού, Δέσποινα Μπερή, Ιωάννα Οικονομίδη, Βαρβάρα Ποδιά και τη συνάδελφο Παναγιώτα Τσιορβά. Ευχαριστώ θερμά το συνάδελφο βιολόγο και

φίλο Χρίστο Κούλα, εκτός των άλλων, για τη βοήθεια του σε θέματα δομής και εμφάνισης κειμένου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υποστήριξη που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ και ευγνωμοσύνη στη Μαρία Πάσχου για τη συμπαράστασή και την πολύπλευρη βοήθειά της, αλλά κυρίως για υπομονή και την κατανόηση που επέδειξε.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ	1
Ι.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
I.1 Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και ο ρόλος τους στη βιολογία των φυτών	3
I.1.1 Ελεύθερες ρίζες	3
I.1.2 Χαρακτηριστικά και μηχανισμοί δημιουργίας των ROS	4
I.1.3 Αλληλεπιδράσεις των ROS με βιολογικά μόρια	6
I.1.4 Κυτταρικές θέσεις δημιουργίας ROS	7
I.1.4.1 Μιτοχόνδρια	8
I.1.4.2 Χλωροπλάστες	9
I.1.4.3 Υπεροξειδιοσώματα	10
I.1.4.4 Αποπλάστης	11
I.1.4.5 Άλλες ενδοκυτταρικές θέσεις παραγωγής ROS	12
I.1.5 Ένζυμα που εμπλέκονται στην παραγωγή ROS	13
I.1.5.1 Υπεροξειδάσες 3^{ης} τάξεως	13
I.1.5.2 Λιποξυγονάσες	14
I.1.5.3 Αναγωγάσες κινόνης	14
I.1.5.4 Οξειδάσες αμινών, οξαλικού οξέος και ξανθίνης	14
I.1.5.5 NADPH-οξειδάσες	15
I.1.5.5.1 Γενικά	15
I.1.5.5.2 Δομικά χαρακτηριστικά των Rbohs	16
I.1.5.5.3 Μηχανισμός παραγωγής ROS από τις NADPH-οξειδάσες	17
I.1.5.5.4 Ενεργοποίηση των Rbohs	18
I.1.5.5.5 Πρότυπα έκφρασης	19
I.1.6 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	20
I.1.6.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	21
I.1.6.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	21
I.1.6.1.2 Καταλάση	21
I.1.6.1.3 Υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος	22
I.1.6.1.4 Υπεροξειδάση της γουαϊακόλης	22
I.1.6.1.5 Αναγωγάσες του μονοδεϋδρο- και δεϋδρο-ασκορβικού οξέος	22
I.1.6.1.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης	23
I.1.6.1.7 Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης	23
I.1.6.1.8 Εναλλακτική οξειδάση	24
I.1.6.1.9 Θειορεδοξίνες	24
I.1.6.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	25
I.1.6.2.1 Ασκορβικό οξύ	25
I.1.6.2.2 Γλουταθειόνη	25
I.1.6.2.3 Τοκοφερόλες	26
I.1.6.2.4 Καροτινοειδή	26
I.1.6.2.5 Άλλες ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση	27
I.1.6.2.6 Ρύθμιση της συγκέντρωσης των ιόντων σιδήρου	28
I.1.7 Ο ρόλος των ROS στη βιολογία των φυτών	29
I.1.7.1 Η προσαρμογή των οργανισμών στην παρουσία του ατμοσφαιρικού οξυγόνου	29

I.1.7.2 Οξειδωτική καταπόνηση και οξειδοαναγωγική κατάσταση (redox status)	29
I.1.7.3 Οι ROS ως μόρια μεταγωγής μηνύματος	31
I.1.7.4 Η αντίληψη των ROS από τα κύτταρα	32
I.1.7.5 Μηχανισμοί μεταγωγής μηνύματος	35
I.1.7.5.1 MAPKs	35
I.1.7.5.2 Μεταγραφικοί παράγοντες	38
I.1.7.6 Η συμμετοχή των ROS σε βιολογικές διεργασίες των φυτών	40
I.1.7.6.1 ROS και έλεγχος του κυτταρικού κύκλου	40
I.1.7.6.2. ROS και ανάπτυξη της ρίζας	41
I.1.7.6.3 ROS και κορυφαία αύξηση	42
I.1.7.6.4 ROS, ανάπτυξη του εμβρυοσάκκου και γονιμοποίηση	43
I.1.7.7 Η συμμετοχή των ROS σε διεργασίες, οι οποίες ελέγχονται από ορμονικά ερεθίσματα	45
I.1.7.7.1 ROS και λειτουργία στομάτων	45
I.1.7.7.2 ROS και φύτευση σπερμάτων	46
I.1.7.7.3 ROS και βαρυντροπισμός	47
I.1.7.7.4 ROS και δημιουργία πλάγιων ριζών	47
I.1.7.8 ROS και προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος	49
I.1.7.9 Η συμμετοχή των ROS στις αποκρίσεις σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις	51
I.1.7.9.1. Βιοτικές καταπονήσεις	51
I.1.7.9.2 Αβιοτικές καταπονήσεις	53
I.2 Ο κυτταροσκελετός των φυτικών κυττάρων	56
I.2.1 Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης	56
I.2.2 Ο κυτταροσκελετός της σωληνίνης	58
I.2.2.1 Γενικά	58
I.2.2.2 Γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση της σωληνίνης στα φυτικά κύτταρα	59
I.2.2.3 Τα μονομερή της σωληνίνης στα φυτικά κύτταρα	59
I.2.2.4 Τα ετεροδιμερή της σωληνίνης και η δημιουργία ΜΣ	60
I.2.2.5 Δυναμική συμπεριφορά ΜΣ	62
I.2.2.6 Κέντρα οργάνωσης ΜΣ	64
I.2.2.7 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της σωληνίνης	66
I.2.2.7.1 Τυροσινίωση/αποτυροσινίωση	67
I.2.2.7.2 Ακετυλίωση	68
I.2.2.7.3 Φωσφορυλίωση	69
I.2.2.7.4 Πολυγλουταμυλίωση, πολυγλυκυλίωση, και πολυαμίνωση	69
I.2.2.8. Συσχέτιση ισοτύπων και ισομορφών με τα πολυμερή σωληνίνης	70
I.2.2.9 Πρωτεΐνες που σχετίζονται με ΜΣ (MAPs)	72
I.2.2.9.1 Μοριακές συνοδοί	72
I.2.2.9.2 Πρωτεΐνες του συμπλόκου της γ-σωληνίνης	73
I.2.2.9.3 Σύμπλοκο πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A	73
I.2.2.9.4 MOR1	74
I.2.2.9.5 EB1	74
I.2.2.9.6 CLASP	75
I.2.2.9.7 TPX2	75

I.2.2.9.8 MAP70	76
I.2.2.9.9 SPIRAL	76
I.2.2.9.10 AIR9	77
I.2.2.9.11 EDE1	77
I.2.2.9.12 Η οικογένεια πρωτεϊνών MAP65	78
I.2.2.9.13 TANGLED1	80
I.2.2.9.14 Κινητήριες πρωτεΐνες	80
I.2.2.9.15 Πρωτεΐνες που κατακερματίζουν ή αποσταθεροποιούν τους ΜΣ	82
I.2.2.9.16 Πρωτεΐνες που συνδέονται με ΜΣ και ΜΑ	84
I.2.3. Μηχανισμοί μεταγωγής μηνύματος και κυτταροσκελετός των ΜΣ	85
I.2.4 Λειτουργίες του κυτταροσκελετού των ΜΣ	88
I.2.4.1 Η συμμετοχή του κυτταροσκελετού σε αναπτυξιακές διεργασίες των φυτών	88
I.2.4.1.1 Η συμμετοχή των ΜΣ στην κυτταρική διαίρεση	88
I.2.4.1.1.1 Η διαδικασία οργάνωσης της κυτταρικής πλάκας στα ανώτερα φυτά	90
I.2.4.1.2 Η συμμετοχή των ΜΣ στην κυτταρική μορφογένεση	92
I.2.4.1.3 Η συμμετοχή των ΜΣ στην οργανογένεση	92
I.2.4.1.4 Η συμμετοχή των ΜΣ στην κορυφαία αύξηση	93
I.2.4.1.5 Η συμμετοχή των ΜΣ στη διακυτταρική επικοινωνία	94
I.2.4.2 Οι συμμετοχή του κυτταροσκελετού της σωληνίνης στις αποκρίσεις σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις	95
I.2.5 ROS και κυτταροσκελετός	98
I.2.5.1 ROS και κυτταροσκελετός της ακτίνης	98
I.2.5.2 ROS και κυτταροσκελετός της σωληνίνης	99
I.3 Αντικείμενο μελέτης	102
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	105
II.1 Φυτικό υλικό	105
II.2 Ανάπτυξη φυτικού υλικού	105
II.3 Επιδράσεις	106
II.4 Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στις επιδράσεις	106
II.5 Χρώσεις σε ζωντανό φυτικό υλικό	107
II.6 Χρήση διαγονιδιακών φυτών <i>Arabidopsis</i>	109
II.6.1 Φυτά που παράγουν GFP-σωληνίνη	109
II.6.2 Φυτά που εκφράζουν <i>GUS:Cyclin B1</i>	109
II.7 Ανοσοεντόπιση	110
II.7.1 Προετοιμασία των δειγμάτων	110
II.7.2 Αντισώματα	112
II.7.3 Διαλύματα	113
II.8 Χρώση μικρονηματίων ακτίνης	114
II.9 Μικροσκόπια και στερεοσκόπια που χρησιμοποιήθηκαν	114
II.10 Παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης	115
II.10.1 Προετοιμασία των δειγμάτων και παρατήρηση	115
II.10.2 Διαλύματα	117
II.10.3 Χρώση H ₂ O ₂ με CeCl ₃	117
II.10.4 Ανοσοσήμανση της σωληνίνης με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού	118

Π.10.5 Μέτρηση της διαμέτρου των πολυμερών της σωληνίνης	119
Π.11 Ανοσοαποτύπωση κατά Western	120
Π.11.1 Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων	120
Π.11.2 Ηλεκτροφόρηση και μεταφορά σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης	121
Π.11.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης	122
Π.11.4 Αντισώματα	122
Π.11.5 Πυκνομέτρηση	123
Π.11.6 Διαλύματα	123
Π.12 Προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου <i>TON1a</i>	125
Π.12.1 Απομόνωση ολικού RNA αρτιβλάστων <i>A. thaliana</i>	125
Π.12.2 Αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης	126
Π.12.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	127
Π.12.4 Ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	129
Π.12.5 Πυκνομέτρηση	129
Π.13 Στατιστική επεξεργασία	129
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	131
III.1 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των επιδράσεων των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διατάραξη των επιπέδων των ROS στα ακρόρριζα	131
III.2 Ο πειραματικός χειρισμός των αρτιβλάστων δεν προκαλεί νεκρωτικά φαινόμενα	133
III.3 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει την πορεία του κυτταρικού κύκλου	134
III.3.1 Η πορεία του κυτταρικού κύκλου σε φυσιολογικά και επηρεασμένα ακρόρριζα	134
III.3.2 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου της κυκλίνης B1	136
III.3.3 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει τη συμπεριφορά του πυρηνικού φακέλου κατά τη διάρκεια της μίτωσης	137
III.4 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει την οργάνωση συστημάτων ΜΣ σε μεριστωματικά κύτταρα	140
III.4.1 Μεσόφαση	140
III.4.2 Προ-πρόφαση/Πρόφαση	145
III.4.3 Προμετάφαση/Μετάφαση	149
III.4.4 Ανάφαση/Τελόφαση	151
III.4.5 Κυτοκίνηση/Μετακυτοκίνηση	152
III.5 Οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης σε κύτταρα ακρόρριζου των μεταλλαγμάτων <i>rhb2</i>	156
III.6 Διερεύνηση της φύσης των άτυπων πολυμερών σωληνίνης	160
III.6.1 Μακροσωληνίσκοι	160
III.6.2 Παρακρύσταλλοι σωληνίνης	166
III.7 Μηχανισμοί οργάνωσης των άτυπων πολυμερών σωληνίνης	168
III.7.1 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επάγει αλλαγές στη σωληνίνη	168
III.7.2 Οι MAPs συμμετέχουν στην οργάνωση των άτυπων πολυμερών σωληνίνης	171
III.8 Μηχανισμοί μεταγωγής μηνύματος και δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης	172

III.8.1 Συμμετοχή της PI3-κινάσης στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης των διαιρούμενων κυττάρων	172
III.8.2 Η ενεργοποίηση μίας κινάσης παρόμοιας με την p38-MAPK σχετίζεται με την αντίληψη των επιπέδων των ROS και εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης	174
III.8.2.1 Η φωσφορυλίωση της p46 και τα επίπεδα των ROS	175
III.8.2.2 Η φωσφορυλίωση της p46 και η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης	187
III.9 Συμμετοχή των ROS στους μηχανισμούς ανάπτυξης της κυτταρικής πλάκας και τον καθορισμό του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης	190
III.9.1 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει τη δημιουργία της κυτταρικής πλάκας	190
III.9.1.1 Δεδομένα οπτικού και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου	190
III.9.1.2 Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών ενδοπλασματικού δικτύου	194
III.9.1.3 Ανοσοσήμανση PLDs	195
III.9.1.4 Ανοσοσήμανση της συνταξίνης KNOLLE	197
III.9.1.5 Ανοσοεντόπιση καλλόξης	198
III.9.1.6 Ανοσοεντόπιση μερικών εστεροποιημένων ομογαλακτουρονανών	199
III.9.1.7 Διατάραξη της δομής των δικτυοσωματίων στα επηρεασμένα κύτταρα	201
III.9.2 Οι ROS εμπλέκονται στον καθορισμό του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης	202
III.10 Συμμετοχή των ROS στην αντίληψη και μεταγωγή μορφογενετικών ερεθισμάτων που ελέγχουν την ανάπτυξη των στοματικών συμπλόκων του φυτού <i>Z. mays</i>	212
III.10.1 Γενικά	212
III.10.2 Οντογένεση των στοματικών συμπλόκων σε φυσιολογικά αρτίβλαστα	212
III.10.3 Κατανομή των ROS σε αναπτυσσόμενα στοματικά σύμπλοκα	214
III.10.4 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει την πολική τοποθέτηση του πυρήνα στα ΜΠ	217
III.10.5 Οργάνωση του περιφερειακού κυτταροσκελετού στα επηρεασμένα ΜΠ	219
III.10.6 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει τη δημιουργία των παραστοματικών κυττάρων	224
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	231
IV.1 Γενικά	231
IV.2 ROS και πολυμερή σωληνίνης	233
IV.2.1 Πορεία αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, έπειτα από τη διατάραξη της ομοιόστασης των ROS	233
IV.2.2 Πρότυπα αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της σωληνίνης	237
IV.2.3 Οξειδωτικές τροποποιήσεις της σωληνίνης	242
IV.2.4 ROS και ισότυποι σωληνίνης	245
IV.2.5 ROS και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της σωληνίνης	247
IV.2.6 ROS, άτυπα πολυμερή σωληνίνης και δραστηριότητα των MAPs	250
IV.2.7 Μηχανισμοί μεταγωγής μηνύματος, αντίληψη των επιπέδων των ROS και δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης	252
IV.2.7.1 Ο ρόλος της p46-MAPK στην αντίληψη των επιπέδων των ROS	252

IV.2.7.2 Μεταγωγή μηνύματος και αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης	255
IV.3 ROS και κυτταρική διαίρεση	259
IV.3.1 ROS και οργάνωση συστημάτων της μιτωτικής και κυτοκινητικής συσκευής	259
IV.3.1.1 Προ-προφασική ζώνη ΜΣ	259
IV.3.1.2 Προφασική άτρακτος	261
IV.3.1.3 Μιτωτική άτρακτος	263
IV.3.1.4 Φραγμοπλάστης	265
IV.3.1.5 Επανεμφάνιση του περιφερειακού κυτταροσκελετού κατά την έξοδο του κυττάρου από την κυτταροδιαίρεση	266
IV.3.2 ROS και έλεγχος του κυτταρικού κύκλου	267
IV.3.3 ROS και ανάπτυξη της κυτταρικής πλάκας	272
IV.3.4 ROS και καθορισμός του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης	276
IV.4 ROS, μεταγωγή μορφογενετικών ερεθισμάτων και επαγωγή της ασύμμετρης διαίρεσης	279
IV.4.1 Πολική κατανομή των ROS στα ΜΠ του φυτού <i>Z. mays</i>	279
IV.4.2 ROS και επαγωγή διαίρεσης των ΜΠ	281
IV.4.3 ROS και καθιέρωση πόλωσης στα ΜΠ	281
IV.4.4 Δημιουργία άτυπων παραστοματικών κυττάρων στα επηρεασμένα αρτίβλαστα	285
IV.4.5 Μηχανισμοί μεταγωγής μηνύματος κατά τη δημιουργία των παραστοματικών κυττάρων	287
IV.5 Γενικά συμπεράσματα	291
V.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	295
VI. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	339
VI.1 Περίληψη	339
VI.2 Summary	343
VII. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	347
VII.1 Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά που περιέχουν δεδομένα της διατριβής	
VII.2 Σύντομο βιογραφικό σημείωμα	

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΗΜΗΣΕΩΝ

KOM: Κέντρο Οργάνωσης Μικροσωληνίσκων
 MA: Μικρονημάτια Ακτίνης, actin microfilaments
 MK: Μητρικό κύτταρο του Καταφρακτικού κυττάρου, guard cell mother cell
 MΠ: Μητρικό κύτταρο του Παραστοματικού κυττάρου, subsidiary cell mother cell
 ΜΣ: Μικροσωληνίσκοι, microtubules
 ABA: Absciscic Acid, αποσχιστικό οξύ
 AIR9: Auxin-Induced in Root cultures 9
 ANP: *Arabidopsis* homologues of NPK1, κινάσες του φυτού *Arabidopsis* ομόλογες της NPK1
 AOX: Alternative Oxidase, εναλλακτική οξειδάση
 APC: Anaphase Promoting Complex, σύμπλοκο προώθησης της ανάφασης
 APS: Ammonium Persulfate, υπερθειικό αμμώνιο
 ARF: ADP-Ribosylation Factors, παράγοντας ριβοζυλίωσης ADP
 ARK: Armadillo Repeat domain-containing Kinesin, κινησίνη που περιέχει επαναλήψεις της επικράτειας armadillo
 Arp2/3: Actin Related Protein 2/3, πρωτεΐνη σχετιζόμενη με ακτίνη 2/3
 ATK: *Arabidopsis thaliana* Kinesin, κινησίνη του φυτού *Arabidopsis thaliana*
 ATP: Adenosine Triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη
 BSA: Bovine Serum Albumin, αλβουμίνη ορού βοδινού
 CDK: Cyclin Dependent Kinases, κυκλίνo-εξαρτώμενη κινάση
 cDNA: complementary DNA, συμπληρωματικό DNA
 CDPKs: Calcium Dependent Protein Kinases, πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από ιόντα ασβεστίου
 CIL1: COPPER INDUCED LEAVES 1
 CLASP: CLIP-Associated proteins
 CLIP: Cytoplasmic Linker Protein
 CLSM: Confocal Laser Scanning Microscope, συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης ακτίνων λέιζερ
 DCF: 2,7 Dichlorofluorescein Diacetate, διχλωρο-διοξική φλουορεσκεΐνη
 DMSO: Dimethyl Sulfoxide, διμέθυλοσουλφοξείδιο
 DNA: Deoxy-Ribonucleic Acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
 dNTPs: deoxynucleotide, δεοξυνουκλεοτίδια
 DPI: Diphenylene Iodonium
 DUOX: Dual Oxidase, διπλή οξειδάση

EB1: End Binding Protein 1
 EDE1: Endosperm Defective 1
 EDTA: Ethylene diamine tetraacetic Acid, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
 EGTA: Ethylene glycol tetraacetic acid, Αιθυλένογλυκόλη-δισ(2-αμινοαιθυλο) N,N,N',N' τετραοξικό οξύ
 FAD: Flavin Adenine Dinucleotide, φλαβίνο-αδενίνο-δινουκλεοτίδιο
 FDA: Fluorescein Diacetate, διοξική φλουορεσκεΐνη
 GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης
 γ-TURC: γ-Tubulin Containing Ring Complexes, δακτυλιοειδή σύμπλοκα που περιέχουν γ-σωληνίνη
 GCP: γ-Tubulin Complex Protein, πρωτεΐνη του συμπλόκου της γ-σωληνίνης
 GDP: Guanine Diphosphate, διφωσφορική γουανοσίνη
 GFP: Green Fluorescent Protein, πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
 GTP: Guanine Triphosphate, τριφωσφορική γουανοσίνη
 GUS: β-Glucuronidase, β-γλυκουρονιδάση
 H₂DCF: 2,7 Dihydrodichlorofluorescein Diacetate, 2,7 διωδρο-διχλωρο-διοξική φλουορεσκεΐνη
 HDA: Histone Deacetylase, αποακετυλάση ιστόνης
 IAA: Indole-3-Acetic Acid, Ινδολυλοξικό οξύ
 KCBP: Kinesin-like Calmodulin Binding Protein, πρωτεΐνη όμοια με κινησίνη που δεσμεύει καλμοδουλίνη
 MAP: Microtubule Associated Proteins, πρωτεΐνες που σχετίζονται με ΜΣ
 MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα
 MAPKAPK: MAPK Activated Protein Kinase, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από MAPK
 MAPKK: MAPK Kinase, κινάση της MAPK
 MAPKKK: MAPK Kinase Kinase, κινάση της MAPKK
 MDP: Microtubule Destabilizing Protein, πρωτεΐνη που αποσταθεροποιεί τους ΜΣ
 MEN: Menadione, μεναδιόνη
 MKK: MAPK kinase (*Arabidopsis*)
 MKP: MAPK Phosphatase, φωσφατάση MAPK
 MOR1: Microtubule Organization 1

MPK: MAPK (<i>Arabidopsis</i>)	PTP1: Protein Tyrosine Phosphatase 1
MS: Murashige and Skoog	Rboh: Respiratory Burst Oxidase Homolog, οξειδάση ομόλογη των οξειδασών αναπνευστικής έκρηξης
MSD1: MnSOD 1, υπεροξειδική δισμουτάση μαγγανίου 1	Redox: Reduction-Oxidation, αναγωγή-οξείδωση
MTOC: Microtubule Organizing Center	RHD2: Root Hair Defective 2
NAC: N-Acetyl Cysteine, N-ακετυλοκυστεΐνη	RIC: ROP-interactive CRIB-containing Protein, πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με ROP και φέρει την επικράτεια CRIB
NADPH: Nikotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, φωσφορικό νικοτιναμίδο- αδενίνο-δινουκλεοτίδιο	RIP: ROP-Interacting Protein, πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με ROP
NEDD1: Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 1	RLK: Receptor Like Kinase
NEK: NIMA-related Kinases	RNA: Ribonucleic Acid, ριβονουκλεϊκό οξύ
NOX: NADPH-Oxidase, NADPH-Οξειδάση	ROP: Rho-related GTPases of Plants
NPK: Nucleus and Phragmoplast localizing Kinase	ROS: Reactive Oxygen Species, δραστικές μορφές οξυγόνου
NPR1: Nonexpressor of Pathogenesis-Related genes 1	RT-PCR: Reverse Transcriptase PCR, PCR-αντίστροφης μεταγραφάσης
OXI1: Oxidative Signal-Inducible 1	SCAR: Suppressor of cAMP Receptor, καταστολέας του υποδοχέα του cAMP
ox-IAA: 2-oxindole-3-acetic-acid	SDS: Sodium Dodecyl Sulfate, δωδεκυλοθειικό νάτριο
PA: Phosphatidic Acid, φωσφατιδικό οξύ	SHR: Short Root
PAMP: Pathogen-associated Molecular Patterns, μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα	SIEL: SHR-Interacting Embryonic Lethal
PAN: PANGLOSS	SKOR: Stelar K ⁺ Outward Rectifier
PBS: Phosphate-Buffered Saline	SOD: Superoxide Dismutase, υπεροξειδική δισμουτάση
PCR: Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	SPR: SPIRAL
PDK: Phosphoinositide-Dependent Kinase, κινάση εξαρτώμενη από φωσφοϊνοσιτίδια	TAN: TANGLED
PEM: PIPES, EGTA, MgSO ₄	TBS: Tris-Buffered Saline
PFA: Paraformaldehyde, παραφορμαλδεϋδη	TEMED: Tetramethylethylenediamine, τετραμεθυλενοδιαμίνη
PFT1: PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1	<i>t</i> -BuOOH: <i>t</i> -Butyl-hydroperoxide, <i>t</i> -βουτυλοϋπεροξειδιο του υδρογόνου
PI: Propidium Iodide, ιωδιούχο προπίδιο	TFC: Tubulin Folding Cofactors, Συμπαράγοντες αναδίπλωσης της σωληνίνης
PI3K: Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase, κινάση της 3-φωσφορικής φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης	TOG: Tumor Overexpressing Gene
PI3P: Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphate, 3-φωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη	TON: TONNEAU
PIPES: Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid,	TPC: Two-Pore Channel Protein
PLC: Phospholipase C, Φωσφολιπάση C	TPX2: Targeting Protein for Xkpl2
PLD: Phospholipase D, Φωσφολιπάση D	TGN: <i>trans</i> -Golgi Network, <i>trans</i> -δίκτυο Golgi
+TIPs: plus End-Binding Proteins, πρωτεΐνες που συνδέονται στο (+) άκρο των ΜΣ	WAVE: Wiskott-Aldrich syndrome protein, πρωτεΐνη του συνδρόμου Wiskott- Aldrich
POK: Phragmoplast Orienting Kinesin	Zat: Zing finger of <i>A. thaliana</i> , πρωτεΐνες του φυτού <i>A. thaliana</i> που περιέχουν δάκτυλο ψευδαργύρου
PP2A: Protein Phosphatase 2A, πρωτεϊνική φωσφατάση 2A	
PRC1: Protein Regulating Cytokinesis 1	

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1 ΟΙ ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS) ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

I.1.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν μία κατηγορία μοριακών οντοτήτων ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και οι οποίες δημιουργούνται σε διάφορα χημικά ή βιολογικά συστήματα (Halliwell 2001). Ένα ηλεκτρόνιο θεωρείται ως ασύζευκτο, όταν δεν σχηματίζει ζεύγος με κάποιο άλλο ηλεκτρόνιο (Halliwell 2006). Ο όρος «ελεύθερες» προσδιορίζει την ικανότητα των ριζών να παραμένουν ανεξάρτητες στα συστήματα στα οποία δημιουργούνται (Halliwell και Gutteridge 2006). Οι ελεύθερες ρίζες ταξινομούνται ανάλογα με το κύριο στοιχείο που περιέχουν και στο οποίο μπορεί να ανήκει το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Η πιο απλή ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου, καθώς αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο, ενώ υπάρχουν ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο, το θείο, τον άνθρακα και το άζωτο (Πίνακας 1Α, Halliwell 2001). Αντιπροσωπευτικές ρίζες, στις οποίες το ελεύθερο ηλεκτρόνιο ανήκει στο οξυγόνο, είναι το ανιόν υπεροξειδίου (superoxide, $O_2^{\cdot-}$), η ρίζα υδροξυλίου (hydroxyl, $HO^{\cdot}$) και η ρίζα υπεροξυλίου (peroxyl radical, $ROO^{\cdot}$). Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, υπάρχουν ρίζες θείου ($RS^{\cdot}$) και άνθρακα (π.χ. η ρίζα του τριχλωρομεθυλίου, trichloromethyl, $CCl_3^{\cdot}$). Η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide, $NO^{\cdot}$) έχει ως κεντρικό άτομο το άζωτο, ωστόσο το ελεύθερο ηλεκτρόνιο εντοπίζεται μεταξύ του οξυγόνου και του αζώτου (Halliwell, 2001). Στα επόμενα κεφάλαια θα αναφερθούμε κατά κύριο λόγο σε ενώσεις στις οποίες το κεντρικό άτομο είναι το οξυγόνο.

Η παρουσία ενός ή περισσότερων ασύζευκτων ηλεκτρονίων καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ασταθείς και εξαιρετικά δραστικές (Valko και συν. 2007). Στη βιβλιογραφία απαντά και ο όρος ROS (Reactive oxygen species, δραστικές μορφές οξυγόνου), που περιλαμβάνει και τις ενώσεις οι οποίες είναι παράγωγα του οξυγόνου, χωρίς ωστόσο να φέρουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Με βάση αυτό τον ορισμό όλες οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι ROS, ωστόσο, δεν είναι όλες οι ROS ελεύθερες ρίζες (Πίνακας 1Β, Halliwell, 2006). Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν επίσης αυξημένη δραστικότητα, ενώ στην κατηγορία αυτή υπάγονται το υπεροξείδιο του υδρογόνου (hydrogen peroxide, H_2O_2), το όζον (O_3), το μονήρες οξυγόνο (singlet oxygen, 1O_2) και το υποχλωριώδες οξύ (hypochlorous acid, $HOCl$). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ROS δεν αποτελούν μια ενιαία οντότητα, αντίθετα, κάθε μία ένωση που ανήκει στις ROS έχει ξεχωριστές χημικές ιδιότητες και δραστικότητα (Halliwell, 2012). Στον Πίνακα 1Β παρουσιάζονται οι κυριότερες ROS και ο χρόνος ημιζωής τους.

Δραστικές μορφές (Ρίζες)	Δραστικές μορφές (όχι ρίζες)	Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)	Σύμβολο	Χρόνος ημιζωής
Reactive Oxygen Species	Reactive Oxygen Species	Superoxide (Ανιόν υπεροξειδίου)	$O_2^{\cdot -}$	10^{-6} s
Superoxide, $O_2^{\cdot -}$	H_2O_2	Hydroxyl radical (Ρίζα υδροξυλίου)	$HO^{\cdot}$	10^{-9} s
Hydroxyl, $OH^{\cdot}$	Hypobromous acid, HOBr	Hydrogen peroxide (Υπεροξειδίο του υδρογόνου)	H_2O_2	σταθερό
Hydroperoxyl, $HO_2^{\cdot}$ (protonated superoxide)	Hypochlorous acid, HOCl	Peroxyl radical (Ρίζα υπεροξυλίου)	$ROO^{\cdot}$	s
Hydroperoxyl, $HO_2^{\cdot}$ (protonated superoxide)	Ozone, O_3	Organic hydroperoxides (Οργανικά υδροϋπεροξειδία)	$ROOH$	σταθερό
Carbonate, $CO_3^{\cdot -}$	Singlet oxygen ($O_2^1\Delta g$)	Singlet oxygen (Μονήρες οξυγόνο)	1O_2	10^{-6} s
Peroxyl, $RO_2^{\cdot}$	Organic peroxides, ROOH	Ozone (Οζόν)	O_3	s
Alkoxy, $RO^{\cdot}$	Peroxynitrite, $ONOO^{\cdot -}$			
	Peroxynitrate, $O_2NOO^{\cdot -}$			
	Peroxynitrous acid, $ONOOH$			
	Peroxomonocarbonate, $HOOCO_2^{\cdot -}$			
Reactive chlorine species	Reactive chlorine species			
Atomic chlorine, $Cl^{\cdot}$	Hypochlorous acid, HOCl			
	Nitryl chloride, NO_2Cl			
	Chloramines			
	Chlorine gas (Cl_2)			
	Bromine chloride ($BrCl$)			
	Chlorine dioxide (ClO_2)			
Reactive bromine species	Reactive bromine species			
Atomic bromine, $Br^{\cdot}$	Hypobromous acid (HOBr)			
	Bromine gas (Br_2)			
	Bromine chloride ($BrCl$)			
Reactive nitrogen species	Reactive nitrogen species			
Nitric oxide, $NO^{\cdot}$	Nitrous acid, HNO_2			
Nitrogen dioxide, $NO_2^{\cdot}$	Nitrosyl cation, NO^+			
Nitrate radical, $NO_3^{\cdot}$	Nitroxyl anion, $NO^{\cdot -}$			
	Dinitrogen tetroxide, N_2O_4			
	Dinitrogen trioxide, N_2O_3			
	Peroxynitrite, $ONOO^{\cdot -}$			
	Peroxynitrate, $O_2NOO^{\cdot -}$			
	Peroxynitrous acid, $ONOOH$			
	Nitronium cation, NO_2^+			
	Alkyl peroxynitrites, $ROONO$			
	Alkyl peroxynitrates, RO_2ONO			
	Nitryl chloride, NO_2Cl			
	Peroxyacetyl nitrate, $CH_3C(O)OONO_2$			

A.

B.

Πίνακας 1. Α. Δραστικές ενώσεις ταξινομημένες σε ελεύθερες ρίζες και μη. Τροποποιημένο από: Halliwell (2006). **Β.** Οι κυριότερες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και ο χρόνος ημιζωής τους. Τροποποιημένο από: Devasagayam και συν. (2004).

1.1.2 Χαρακτηριστικά και μηχανισμοί δημιουργίας των ROS

Η δημιουργία ελευθέρων ριζών είναι αποτέλεσμα της διάσπασης ασταθών δεσμών μεταξύ των ατόμων ενός μορίου. Ωστόσο, οι χημικοί δεσμοί όταν διασπώνται δεν αφήνουν συνήθως μόρια με ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ ασταθείς και αντιδρούν ταχύτατα με άλλα μόρια, στην προσπάθειά τους να εξασφαλίσουν ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο, το οποίο θα τους προσδώσει σταθερότητα. Το μόριο, το οποίο χάνει το ηλεκτρόνιο μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα, γεγονός που πυροδοτεί αλυσιδωτές αντιδράσεις. Ο χρόνος πραγματοποίησης των αντιδράσεων αυτών είναι της τάξεως μερικών ns (Das Sarma και συν. 2010).

Οι ελεύθερες ρίζες λαμβάνουν μέρος σε αντιδράσεις υποκατάστασης ή προσθήκης και συμμετέχουν επίσης ως δραστικά ενδιάμεσα προϊόντα. Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις που

περιλαμβάνουν συμμετοχή ελευθέρων ριζών διαιρούνται σε τρεις κατηγορίες: α) τις αντιδράσεις έναρξης, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των ελευθέρων ριζών, β) τις αντιδράσεις διάδοσης, στις οποίες ο αριθμός των ελευθέρων ριζών μένει σταθερός και γ) τις αντιδράσεις τερματισμού, στις οποίες ο αριθμός των ελευθέρων ριζών ελαττώνεται. Η τελευταία κατηγορία περιλαμβάνει συνήθως αμοιβαίες αντιδράσεις δύο ελευθέρων ριζών με αποτέλεσμα τη δημιουργία πιο σταθερών ενώσεων (Hamilton και συν. 1997). Στη συνέχεια, θα αναφερθούν τα κυριότερα χαρακτηριστικά και οι αντιδράσεις με τις οποίες δημιουργούνται οι ROS και οι οποίες έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη βιολογία των οργανισμών.

Το μοριακό οξυγόνο φέρει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική ηλεκτρονική στιβάδα, τα οποία βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά και επομένως κινούνται σε ξεχωριστές τροχιές (Apel και Hirt 2004). Το $O_2^{\cdot -}$ προκύπτει από την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου. Οι χημικές του ιδιότητες ποικίλλουν ανάλογα με τη σύσταση του περιβάλλοντος στο οποίο είναι διαλυμένο. Το $O_2^{\cdot -}$ είναι ασθενής οξειδωτικός παράγοντας σε υδατικά διαλύματα, ενώ είναι ιδιαίτερα δραστικό όταν ευρίσκεται σε οργανικά διαλύματα (Bergendi και συν. 1999). Σε υδατικά διαλύματα η διάρκεια ζωής του είναι 4 μs , ενώ σε πολικούς διαλύτες η αντίστοιχη διάρκεια είναι 100 μs (Foyer και Harbinson 1994). Το $O_2^{\cdot -}$ δεν μπορεί να διαπεράσει τις βιολογικές μεμβράνες και μετατρέπεται τάχιστα σε H_2O_2 (Bhattacharjee 2005).

Το H_2O_2 προκύπτει επίσης από την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου. Είναι σχετικά δραστικό και έχει αρκετά μεγάλο χρόνο ζωής (1 ms, Bhattacharjee 2005). Ο χρόνος ζωής του H_2O_2 και το μικρό μέγεθός του το καθιστούν ικανό να διαχέεται σε κάποια απόσταση από τον τόπο παραγωγής του, ενώ έχει την ικανότητα να διαπερνά τις βιολογικές μεμβράνες (Petrov και Van Breusegem 2012). Παρουσία μεταλλικών ιόντων (π.χ. δισθενούς χαλκού ή δισθενούς σιδήρου) μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή $HO^{\cdot}$ (Bergendi και συν. 1999).

Οι ρίζες $HO^{\cdot}$, εκτός από την παραγωγή τους κατά την αντίδραση του H_2O_2 με μεταλλικά ιόντα, είναι το κύριο προϊόν που προκύπτει από τη ραδιόλυση του νερού (Gutteridge 1994). Οι ρίζες αυτές είναι πιθανότατα οι πλέον δραστικές ROS γιατί είναι εξαιρετικά ασταθείς με διάρκεια ζωής μόλις 1 μs . Το γεγονός αυτό τις καθιστά ικανές να αντιδρούν με οποιοδήποτε συστατικό του κυττάρου βρεθεί πλησίον τους (Bhattacharjee 2012).

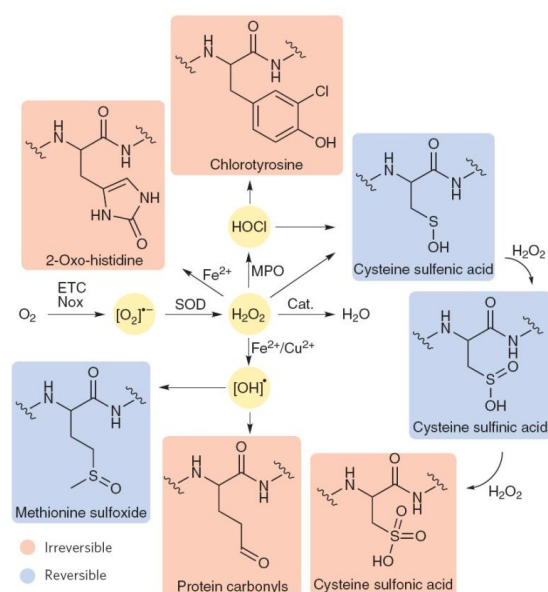
Το μονήρες οξυγόνο, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, δεν ανήκει στις ελεύθερες ρίζες (Kim και συν. 2008). Προκύπτει από τη μεταφορά ενέργειας στο μοριακό οξυγόνο και συνιστά δραστική μορφή οξυγόνου που μπορεί να οξειδώσει αρκετά είδη μορίων (Gutteridge 1994). Το όζον αποτελείται από τρία άτομα οξυγόνου και είναι λιγότερο σταθερό από το μοριακό οξυγόνο. Όλα τα ηλεκτρόνια του σχηματίζουν ζεύγη και επομένως δεν ανήκει στις

ελεύθερες ρίζες. Είναι ισχυρό οξειδωτικό, σχετικά σταθερό, διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες και πολύ λιγότερο διαλυτό στο νερό (Biń 2006, Iriti και Faoro 2008).

1.1.3 Αλληλεπιδράσεις των ROS με βιολογικά μόρια

Δεδομένης της δραστηριότητας των ROS, η παρουσία τους στους οργανισμούς είναι δυνατό να προκαλέσει σειρά οξειδωτικών τροποποιήσεων σε βιολογικά μόρια, οι οποίες μπορεί να είναι αντιστρεπτές ή μη αντιστρεπτές. Τα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρούν οι ROS είναι τα λιπίδια, το DNA και οι πρωτεΐνες (Boguszezwska και Zagdańska 2012). Η χημική δραστηριότητα κάθε μίας από τις ROS εξαρτάται από το εάν προκαλεί την αφαίρεση ενός ή δύο ηλεκτρονίων (Dickinson και Chang 2011). Επιπλέον, οι επιπτώσεις εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το ποια μόρια θα βρεθούν κοντά στις θέσεις παραγωγής των ROS, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στους μικρούς χρόνους ημιζωής των ROS (Dickinson και Chang 2011).

Μια από τις πλέον καταστρεπτικές διεργασίες για τους οργανισμούς, στις οποίες εμπλέκονται οι ROS, είναι η υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η συγκεκριμένη αντίδραση αφορά στην αφαίρεση ηλεκτρονίων από πολυακόρεστα πρόδρομα, στα οποία περιλαμβάνονται μικρού μήκους υδρογονάνθρακες, κετόνες, ορισμένες αλδεΐδες κ.ά. (Boguszezwska και Zagdańska 2012). Η υπεροξείδωση των λιπιδίων προκαλεί καταστροφές στις βιολογικές μεμβράνες, μεταβάλλοντας τη ρευστότητά τους. Η διαδικασία αυτή αφορά τόσο σε αυτές των οργανιδίων όσο και στο πλασμαλήμμα (Das Sarma και συν. 2010). Το αποτέλεσμα είναι να καθίσταται δυνατή η διαρροή μορίων, που φυσιολογικά δεν μπορούν να διαπεράσουν τις μεμβράνες. Η υπεροξείδωση μπορεί να προκαλέσει σοβαρές αλλοιώσεις σε διάφορες μεμβρανικές πρωτεΐνες, να αδρανοποιήσει πρωτεϊνικούς υποδοχείς, ένζυμα και κανάλια μεταφοράς ιόντων (Gill και Tuteja 2010).



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνικών ομάδων και ROS. Από: Dickinson και Chang (2011).

Οι πρωτεΐνες είναι τα βιολογικά μακρομόρια τα οποία οξειδώνονται από τις ROS με μεγαλύτερη συχνότητα, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μακρομόρια. Μάλιστα, έχει υπολογιστεί ότι το 68% των μορίων του κυττάρου που οξειδώνονται από τις ROS είναι πρωτεΐνες (Σχήμα 1, Rinalducci και συν. 2008). Η διεργασία είναι μη αντιστρεπτή, εκτός από τις περιπτώσεις που αφορούν σε κάποια αμινοξέα τα οποία περιέχουν άτομα θείου (Ghezi και Bonetto 2003).

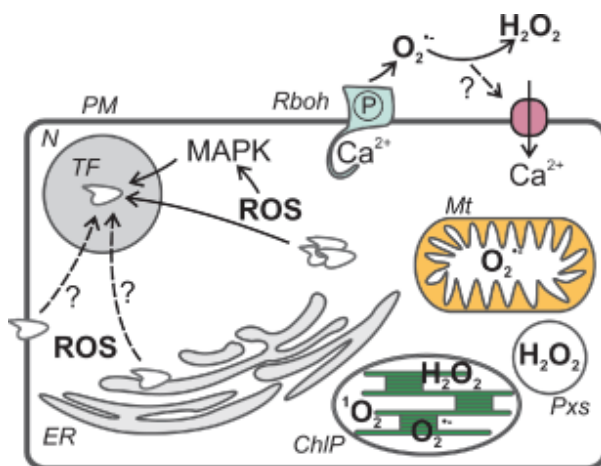
Τα αμινοξέα που είναι περισσότερο δεκτικά σε οξείδωση είναι η κυστεΐνη και η μεθειονίνη. Αμφότερα περιέχουν θείο. Η θειολική ομάδα της κυστεΐνης μπορεί να οξειδωθεί προς δισουλφίδιο από $\text{HO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$ και H_2O_2 (Σχήμα 1). Η οξείδωση της μεθειονίνης δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τη δομή των πρωτεϊνών (Boguszevska και Zagdańska 2012). Αντίθετα, η οξείδωση καταλοίπων τυροσίνης (Σχήμα 1), επειδή μεταβάλλει την υδροφοβικότητα, είναι δυνατό να προκαλέσει αλλαγές στη δομή των πρωτεϊνών, ενώ και η οξείδωση της τρυπτοφάνης είναι μη αντιστρεπτή διαδικασία (Rinalducci και συν. 2008). Η πιο συχνή οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών ονομάζεται καρβονυλίωση (Σχήμα 1). Προκαλείται από την οξείδωση αμινοξέων, όπως η αργινίνη, η λυσίνη, η ιστιδίνη, η προλίνη, η θρεονίνη και η τρυπτοφάνη. Έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ελεύθερων καρβονυλικών ομάδων, οι οποίες μπορούν να αδρανοποιηθούν, διευκολύνοντας το σχηματισμό δεσμών ή την καταστροφή των πρωτεϊνών (Møller και συν. 2007, Foyer και Noctor 2009). Μάλιστα, το ποσοστό της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών συχνά αποτελεί δείκτη για την εκτίμηση της οξειδωτικής καταπόνησης (Stadtman 2006).

Το DNA αποτελεί επίσης στόχο των ROS. Η προσβολή από ROS μπορεί να προκαλέσει τον κατακερματισμό του (Dickinson και Chang 2011). Υψηλά επίπεδα ROS και ιδιαίτερα $\text{HO}\cdot$, μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε οποιοδήποτε από τα συστατικά του DNA, συμπεριλαμβανομένων των πουρινών, των πυριμιδινών αλλά και της δεοξυριβόζης. Το μονήρες οξυγόνο καταστρέφει τη γουανίνη, ενώ το H_2O_2 και το $\text{O}_2\cdot^-$ δεν φαίνεται να αντιδρούν με το DNA (Boguszevska και Zagdańska 2012).

1.1.4 Κυτταρικές θέσεις δημιουργίας ROS

Η παραγωγή ROS στα κύτταρα είναι συνεχής. Η δημιουργία τους επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών, τα οποία λαμβάνουν χώρα εντός όλων σχεδόν των κυτταρικών οργανιδίων των ευκαρυωτικών κυττάρων (Boguszevska και Zagdańska 2012). Οι ROS, στην πλειονότητά τους, προκύπτουν ως παραπροϊόντα μεταβολικών αντιδράσεων και ως συνέπεια διαφόρων μορφών καταπόνησης (Karuppanapandian και συν. 2012). Στα ζωικά κύτταρα, οι ROS παράγονται στον εξωκυττάριο χώρο από ένζυμα που εδράζονται στο πλασμαλήμμα αλλά και σε θέσεις εντός των κυττάρων, επίσης ως αποτέλεσμα ενζυμικής δραστηριότητας. Σε αυτές περιλαμβάνονται τα μιτοχόνδρια, στα οποία παράγεται και το μεγαλύτερο ποσοστό των ROS (Finkel 2011). Στα φυτικά κύτταρα, η δημιουργία των ROS λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες, τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξειδισώματα και τον

αποπλάστη (Σχήμα 2, Karuppanapandian και συν. 2011). Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι ROS μπορεί να δημιουργούνται και σε άλλες θέσεις, όπως ο πυρήνας και το ενδοπλασματικό δίκτυο (Shapiguzov και συν. 2012). Η παραγωγή ROS εντός των διαφόρων κυτταρικών διαμερισμάτων επηρεάζει συχνά και άλλες κυτταρικές θέσεις αλλά και τα γειτονικά κύτταρα (Σχήμα 2, Shapiguzov και συν. 2012). Υποστηρίζεται ότι σε φωτοσυνθετικούς ιστούς, παρουσία φωτός, οι χλωροπλάστες και τα υπεροξειδιοσώματα είναι τα οργανίδια που παράγουν τις μεγαλύτερες ποσότητες ROS ενώ αντίθετα στο σκοτάδι αυτά είναι τα μιτοχόνδρια (Gill και Tuteja, 2010). Στη συνέχεια, αναφέρονται οι κυριότερες κυτταρικές θέσεις και οι σημαντικότερες αντιδράσεις που οδηγούν στη δημιουργία ROS.

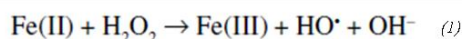


Σχήμα 2. Διαγραμματική απεικόνιση των κυτταρικών θέσεων παραγωγής ROS στα φυτά. Από: Jaspers και Kangasjärvi (2010).

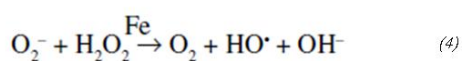
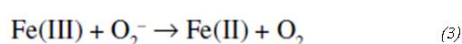
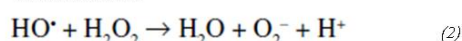
1.1.4.1 Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια θεωρούνται ως «εργοστάσια» παραγωγής ενέργειας του κυττάρου και είναι τα οργανίδια στα οποία παράγονται μεγάλες ποσότητες ROS, όπως για παράδειγμα H_2O_2 και ιόντα $\text{O}_2^{\cdot-}$. Επομένως, τα μιτοχόνδρια είναι τα οργανίδια εκείνα τα οποία υφίστανται κατεξοχήν τις επιπτώσεις της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου. Τα μιτοχόνδρια των φυτικών κυττάρων επιτελούν ή συμμετέχουν σε ορισμένες χαρακτηριστικές λειτουργίες, όπως η φωτοαναπνοή ενώ ορισμένα συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας διαφέρουν από τα αντίστοιχα των ζωικών κυττάρων. Επιπλέον, το περιβάλλον στα μιτοχόνδρια των φυτικών κυττάρων είναι ιδιαίτερο, καθώς είναι πλούσιο σε οξυγόνο και υδατάνθρακες, ως απόρροια της φωτοσυνθετικής λειτουργίας (Gill και Tuteja 2010). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση, από τις κύριες λειτουργίες που επιτελούνται στα μιτοχόνδρια, είναι μια διαδικασία που διεξάγεται στο σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Το τελευταίο χρησιμοποιεί ηλεκτρόνια με ελεύθερη ενέργεια μεγαλύτερη από μια ορισμένη τιμή για την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου. Μέσω αυτής της διαδικασίας, η αερόβια αναπνοή έχει ως παράπλευρη συνέπεια την παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια, σε διάφορα στάδια της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Rhoads και συν. 2006). Τα σύμπλοκα I και III της αναπνευστικής αλυσίδας είναι οι κυριότερες θέσεις παραγωγής $\text{O}_2^{\cdot-}$. Τα ιόντα αυτά, αν και είναι ιδιαιτέρως

δραστικά, μπορεί να αναχθούν περαιτέρω σχηματίζοντας H_2O_2 με αντίδραση ταυτόχρονης οξειδωσης και αναγωγής (dismutation), η οποία καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, SOD). Εκτιμάται ότι το 1/5 του οξυγόνου που καταναλώνεται στα μιτοχόνδρια οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 (Møller 2001). Το H_2O_2 , υπό την παρουσία μεταλλικών ιόντων σιδήρου (Fe^{2+}) και χαλκού (Cu^{2+}), μπορεί να σχηματίσει $\text{HO}\cdot$ μέσω των αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss (Σχήμα 3, Halliwell 2006, Møller και συν. 2007).



Αντίδραση Fenton



Αντίδραση Haber-Weiss

Σχήμα 3. Σχηματισμός $\text{HO}\cdot$, μέσω των αντιδράσεων Fenton (1) και Haber-Weiss (4). Τροποποιημένο από: Liochef και Fridovich (2002).

Οι ρίζες $\text{HO}\cdot$ που σχηματίζονται με τον τρόπο αυτό είναι ιδιαίτερα τοξικές. Αυτές μπορεί να αντιδράσουν με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της μιτοχονδριακής μεμβράνης προκαλώντας σημαντικές αλλοιώσεις, αλλά και να διαπεράσουν τη μεμβράνη και να εξέλθουν από το μιτοχόνδριο (Gill και Tuteja 2010).

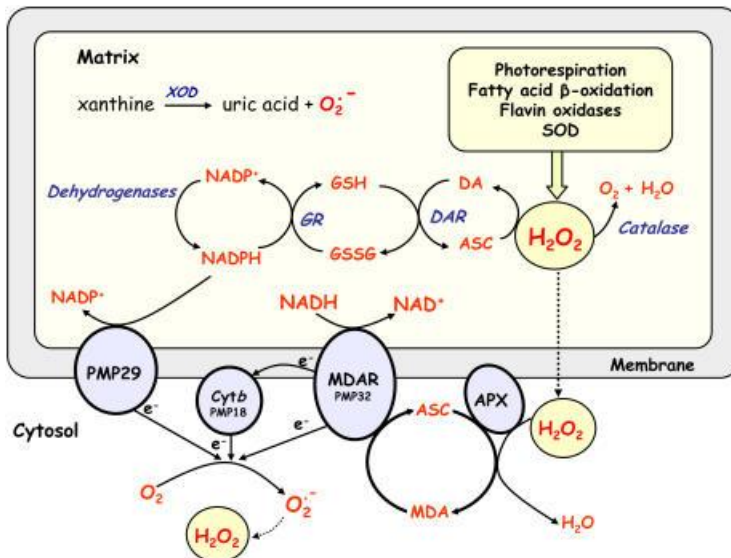
1.1.4.2 Χλωροπλάστες

Ο πλαστιδιακός φάκελος είναι εξίσου πλούσιος σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και, επομένως, είναι ευαίσθητος στην έκθεση σε ROS (Gill και Tuteja 2010). Η δημιουργία ROS εντός των χλωροπλαστών είναι συνυφασμένη με τις λειτουργίες που αυτοί επιτελούν: βιοσύνθεση της χλωροφύλλης και φωτοσύνθεση (Shariguzon και συν. 2012). Οι κύριες μορφές ROS που παράγονται στους χλωροπλάστες είναι το $\text{O}_2^{\cdot-}$, το H_2O_2 και το μονήρες οξυγόνο. Η διέλευση του οξυγόνου, που παράγεται κατά τη φωτοσύνθεση δια μέσου των φωτοσυστημάτων, έχει ως αποτέλεσμα το οξυγόνο να δέχεται ηλεκτρόνια και να μετατρέπεται σε $\text{O}_2^{\cdot-}$. Ο δότης των ηλεκτρονίων είναι η φερρεδοξίνη. Η αντίδραση, μέσω της οποίας πραγματοποιείται η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς $\text{O}_2^{\cdot-}$, ονομάζεται αντίδραση Mehler (Gill και Tuteja 2010). Η SOD που βρίσκεται στη μεμβράνη των θυλακοειδών είναι υπεύθυνη για την παραγωγή H_2O_2 από τα ιόντα $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Σχήμα 4, Asada 2006).

Ωστόσο, μεταξύ των διαφορετικών ROS, η πιο γνωστή ένωση που παράγεται στους χλωροπλάστες είναι το μονήρες οξυγόνο. Προκύπτει ως παραπροϊόν της φωτοσυνθετικής διαδικασίας και παράγεται κυρίως στο φωτοσύστημα II (P680), μέσω αντιδράσεων μεταφοράς ενέργειας μεταξύ των διεγερμένων μορίων των χλωροφυλλών και εκείνων του μοριακού οξυγόνου (Σχήμα 4, Buchert και Forreiter 2010). Συγκεκριμένα, η φωτεινή ακτινοβολία προκαλεί τη διέγερση των χλωροφυλλών και τη μετάβασή τους στην ασυνήθιστη τριπλή ενεργειακή κατάσταση. Στη συνέχεια, αυτές ανάγουν το τριπλά διεγερμένο οξυγόνο (μοριακό οξυγόνο) με αποτέλεσμα την παραγωγή του μονήρους οξυγόνου (Krieger-Liszkay και συν. 2008). Η διαδικασία είναι συνεχής ακόμη και σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού, ενώ εντείνεται όταν τα επίπεδα της φωτεινής ακτινοβολίας είναι υψηλά (Brosché και συν. 2010).

Τα υπεροξειδιοσώματα, όπως τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες, είναι θέσεις παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων ενδοκυτταρικών ROS, κυρίως $O_2^{\cdot -}$ και H_2O_2 (Gill και Tuteja 2010). Πιθανότατα, σε αυτά παράγονται οι μεγαλύτερες ποσότητες H_2O_2 (del Río και συν. 2006). Η αυξημένη παραγωγή ROS είναι συνέπεια της φυσιολογικής λειτουργίας των οργανιδίων αυτών (Karuppanapandian και συν. 2011). Συγκεκριμένα, το $O_2^{\cdot -}$ παράγεται σε δύο θέσεις. Στο στρώμα των υπεροξειδιοσωμάτων, η οξειδάση της ξανθίνης (XOD, xanthine oxidase) καταλύει την οξείδωση της ξανθίνης και της υποξανθίνης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ουρικού οξέος και ιόντων $O_2^{\cdot -}$ (Σχήμα 5, Corpas και συν. 2001). Η δεύτερη θέση παραγωγής

ιόντων $O_2^{\cdot-}$ είναι η μεμβράνη των υπεροξειδισωμάτων. Τα ιόντα αυτά απελευθερώνονται στο κυτόπλασμα. Παράγονται από τη δράση μίας μικρής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που απαρτίζεται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μία φλαβοπρωτεΐνη με ενεργότητα αναγωγής, το κυτόχρωμα b και μία άλλη αναγωγή που πιθανολογείται ότι είναι αναγωγή του μονοδεύδρο-ασκορβικού οξέος. Ο δότης των ηλεκτρονίων στην περίπτωση αυτή είναι το $NAD(P)H$, δηλαδή το ανηγμένο $NAD(P)^+$ (nikotinamide dinucleotide phosphate, Σχήμα 5, Karuppanapandian και συν. 2011).



Σχήμα 5. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων οδών παραγωγής ROS στα υπεροξειδισώματα. Από: del Río και συν. (2006).

Το H_2O_2 μπορεί να προκύψει στα υπεροξειδισώματα, όπως συμβαίνει και στις περιπτώσεις των άλλων οργανιδίων, από τη δράση της SOD (Σχήμα 5, Karuppanapandian και συν. 2011). Ωστόσο, οι μεγαλύτερες ποσότητες του H_2O_2 παράγονται κατά τη διαδικασία της φωτοαναπνοής και συγκεκριμένα κατά την οξείδωση του γλυκολικού οξέος από την ομώνυμη οξειδάση (Noctor και συν. 2002). Εκτός από τις περιπτώσεις που μόλις αναφέρθηκαν, στα υπεροξειδισώματα παράγεται H_2O_2 από τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και από τη δραστηριότητα οξειδασών της φλαβίνης (Σχήμα 5, Corpas και συν. 2001).

1.1.4.4 Αποπλάστης

Εκτός από τις θέσεις που περιγράφηκαν προηγουμένως, πολύ σημαντική θέση παραγωγής ROS είναι και ο αποπλάστης. Περιλαμβάνει το κυτταρικό τοίχωμα, το χώρο μεταξύ του κυτταρικού τοιχώματος και του πλασμαλήμματος και τους μεσοκυττάριους χώρους (Sattelmacher 2001). Σε όλους αυτούς τους χώρους έχει καταγραφεί η παρουσία ROS (Rodríguez και συν. 2002). Τα πιο γνωστά μόρια παραγωγής ROS στον αποπλάστη είναι μια κατηγορία ενζύμων που ονομάζονται NADPH-οξειδάσες (Jaspers και Kangasjärvi 2010). Πρόκειται για ένζυμα που εδράζονται στο πλασμαλήμμα και καταλύουν την παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ στο χώρο μεταξύ πλασμαλήμματος και κυτταρικού τοιχώματος, χρησιμοποιώντας ως δότη ηλεκτρονίων το $NADPH$ (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, φωσφορικό

νικοτιναμίδο-αδενίνο-δινουκλεοτίδιο, Sagi και Fluhr 2001, βλέπε ενότητα I.1.5). Τα ιόντα αυτά μετατρέπονται σε H_2O_2 με τη δράση της SOD. Στα ζωικά κύτταρα, το $O_2^{\cdot-}$ μπορεί να εισέλθει στο κυτόπλασμα μέσω ειδικών καναλιών ανιόντων. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, δεν έχει βρεθεί κάτι αντίστοιχο στα φυτικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό η παραγωγή μορίων H_2O_2 στον αποπλάστη θεωρείται σημαντική, διότι αυτά τα μόρια μπορούν με παθητική διάχυση να διαπεράσουν το πλασμαλήμμα και να εισέλθουν στο κυτόπλασμα (Shapiguzov και συν. 2012). Έχει όμως υποστηριχθεί ότι η διέλευση του H_2O_2 μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω καναλιών του πλασμαλήμματος που μεταφέρουν μόρια νερού, τις λεγόμενες υδατοπορίνες (aquaporins, Dynowski και συν. 2008).

Επιπλέον, στην παραγωγή ROS στον αποπλαστικό χώρο συμμετέχουν και άλλα ένζυμα, όπως οι υπεροξειδάσες του κυτταρικού τοιχώματος, η δραστηριότητα των οποίων εξαρτάται από το pH (pH-dependent cell wall peroxidases). Ενεργοποιούνται σε αλκαλικό περιβάλλον και παράγουν H_2O_2 παρουσία αναγωγικού παράγοντα (Mittler 2002). Άλλα ένζυμα που εντοπίζονται στον αποπλάστη και η δραστηριότητά τους οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 είναι διάφορες οξειδάσες, όπως αυτές του οξαλικού οξέος και των αμινών (Gill και Tuteja 2010, Mittler 2002).

1.1.4.5 Άλλες ενδοκυτταρικές θέσεις παραγωγής ROS

Το ενδοπλασματικό δίκτυο συνιστά επίσης θέση παραγωγής ROS, κυρίως $O_2^{\cdot-}$ (Gill και Tuteja 2010). Η άποψη αυτή υποστηρίζεται από την παρουσία κυτοχρωμάτων, όπως π.χ. του κυτοχρώματος P450, με πιο γνωστή περίπτωση κυτοχρώματος P450 στα φυτά αυτήν της υδροξυλάσης του 4-κινναμικού οξέος (Karuppanapandian και συν. 2011).

Σχετικά με την παραγωγή ROS στο κυτόπλασμα δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές, τουλάχιστον για τα φυτικά κύτταρα. Ωστόσο, το κυτόπλασμα είναι ο χώρος στον οποίο συσσωρεύονται οι διάφορες μορφές ROS, οι οποίες παράγονται στον αποπλάστη ή στα οργανίδια που αναφέρθηκαν προηγουμένως (Brosché και συν. 2010).

Είναι επίσης γνωστό ότι στο πυρηνόπλασμα ορισμένων τύπων ζωικών κυττάρων εντοπίζεται μία NADPH-οξειδάση που ονομάζεται NOX4, η οποία εμφανίζει αρκετές διαφορές σε σχέση με τις υπόλοιπες οξειδάσες των ζωικών κυττάρων (Serrander και συν. 2007). Τα φυτικά κύτταρα δεν διαθέτουν τη συγκεκριμένη οξειδάση. Έχει όμως διαπιστωθεί η παρουσία ROS σε πυρήνες φυτικών κυττάρων, γεγονός που μπορεί να εξηγείται με τη μεταφορά ROS, οι οποίες έχουν παραχθεί σε άλλες κυτταρικές θέσεις (Ashtamker και συν. 2007). Ωστόσο, οι Ashtamker και συν. (2007) έδειξαν με σειρά πειραματικών συνδυασμών, σε κύτταρα καλλιεργειών του φυτού *Nicotiana tabacum*, ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ορισμένες περιοχές του πυρήνα των φυτικών κυττάρων να αποτελούν θέσεις παραγωγής ROS.

1.1.5 Ένζυμα που εμπλέκονται στην παραγωγή ROS

Οι ROS, σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια, παράγονται είτε ως παραπροϊόντα διαφόρων κυτταρικών διεργασιών ή από τη δραστηριότητα συγκεκριμένων ενζυμικών αντιδράσεων. Ο τελευταίος τρόπος αναφέρεται συχνά στη βιβλιογραφία ως «εκούσια ή σκόπιμη» παραγωγή (deliberate, Marino και συν. 2012). Αντιπροσωπευτικά ένζυμα που σχετίζονται με τη σκόπιμη παραγωγή ROS είναι οι υπεροξειδάσες της τάξεως III (class III peroxidases), οι οξειδάσες των αμινών και του οξαλικού οξέος, οι λιποξυγονάσες (lipoxygenases), οι αναγωγάσες κινόνης (quinone reductases), οι οξειδάσες της ξανθίνης και οι NADPH-οξειδάσες (Πίνακας 2, Mittler 2002, Marino και συν. 2012).

Μηχανισμός	Θέση παραγωγής	Πρωταρχική ROS
Φωτοσύνθεση	Χλωροπλάστης	O_2^-
Κυτταρική αναπνοή	Μιτοχόνδρια	O_2^-
Οξειδάση του γλυκολικού οξέος	Υπεροξεισωμάτια	H_2O_2
Διεγερμένη χλωροφύλλη	Χλωροπλάστης	$O_2^{\cdot}$
NADPH οξειδάση	Πλασμαλήμμα	O_2^-
Οξειδωση β-λιπαρών οξέων	Υπεροξεισωμάτια	H_2O_2
Οξειδάση του οξαλικού οξέος	Αποπλάστης	H_2O_2
Οξειδάση της ξανθίνης	Υπεροξεισωμάτια	O_2^-
Υπεροξειδάσες, Mn^{2+} και NADH	Κυτταρικό τοίχωμα	H_2O_2, O_2^-
Οξειδάσες αμινών	Αποπλάστης	H_2O_2

Πίνακας 2. Οι κυριότεροι μηχανισμοί παραγωγής ROS στα φυτικά κύτταρα. Στον Πίνακα αναφέρονται το κυτταρικό διαμέρισμα παραγωγής και η πρωταρχική δραστική μορφή οξυγόνου που παράγεται σε κάθε περίπτωση. Τροποποιημένο από: Mittler και συν. (2002).

1.1.5.1 Υπεροξειδάσες 3^{ης} τάξεως

Ο όρος υπεροξειδάση χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένζυμα που καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μεταξύ του H_2O_2 και αναγωγικών μέσων (Hiraga και συν. 2001). Τα ένζυμα αυτά απαντούν σε όλους τους οργανισμούς και κατατάσσονται σε τρεις μεγάλες οικογένειες. Στα φυτά, οι υπεροξειδάσες διακρίνονται σε τρεις τάξεις (τάξεις I, II, III, Hiraga και συν. 2001). Οι υπεροξειδάσες της τρίτης τάξεως συνιστούν μία ομάδα ενζύμων που ανάγουν το H_2O_2 παρέχοντας ηλεκτρόνια σε πολλά διαφορετικά υποστρώματα. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει έναν κύκλο αντιδράσεων, μέσω του οποίου σχηματίζονται ROS, όπως ρίζες $O_2^{\cdot}$ και υδροξυυπεροξυλίου (Passardi και συν. 2005). Μεγάλος αριθμός γονιδίων είναι υπεύθυνος για την παραγωγή αυτών των υπεροξειδασών. Στο φυτό

Arabidopsis thaliana, για παράδειγμα, έχουν ταυτοποιηθεί 73 γονίδια που κωδικοποιούν υπεροξειδάσες της τρίτης τάξεως και τα οποία βρίσκονται διάσπαρτα σε όλα τα χρωμοσώματα (Tognolli και συν. 2002). Τα μέλη της ομάδας αυτής διαφέρουν μεταξύ τους σε ότι αφορά την αλληλουχία των αμινοξέων, ωστόσο διαθέτουν ορισμένα κοινά τμήματα που αφορούν σε τρεις δομικές περιοχές, δύο που προσδένουν ομάδες αίμης και μία κεντρική συντηρημένη περιοχή άγνωστης λειτουργίας (Hiraga και συν. 2001).

1.1.5.2 Λιποξυγονάσες

Οι λιποξυγονάσες είναι πρωτεΐνες που απαντούν στους ζωικούς και τους φυτικούς οργανισμούς. Ανήκουν στην κατηγορία των διοξυγονασών, προσδένουν ιόντα σιδήρου αλλά δεν περιέχουν αίμη. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την προσθήκη του μοριακού οξυγόνου σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, με αποτέλεσμα την υπεροξειδωσή τους. Τα κυριότερα υποστρώματα των λιποξυγονασών στα φυτά είναι το λινολενικό και το λινελαϊκό οξύ (Porta και Rocha-Sosa 2002). Η δραστηριότητα των λιποξυγονασών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ROS διαφόρων μορφών, όπως ριζών αλκοξυλίου, υπεροξυλίου, και $O_2^{\cdot-}$ (Roy και συν. 1994). Στους φυτικούς οργανισμούς έχειδειχθεί ότι το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζει υψηλή ιστοειδική εξειδίκευση (Porta και Rocha-Sosa 2002).

1.1.5.3 Αναγωγάσες κινόνης

Οι αναγωγάσες κινόνης είναι ένζυμα που έχουν ταυτοποιηθεί σε βακτήρια, μύκητες, φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς. Στους φυτικούς οργανισμούς, τα ένζυμα αυτά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις αναγωγάσες της κινόνης που είναι όμοιες με τις φλαβοδοξίνες και τις NADPH-οξειδοαναγωγάσες κινόνης (Heyno και συν. 2013). Η καταλυτική δραστηριότητά τους προκαλεί την αναγωγή των κινονών με τη μεταφορά σε αυτές ενός ή δύο ηλεκτρονίων, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υδρόξυ-κινονών (Deller και συν. 2008). Οι αναγωγάσες κινόνης θεωρούνται μόρια που συνεισφέρουν στην αποτοξίνωση των κυττάρων. Ο λόγος είναι ότι ο κύκλος αντιδράσεων, στον οποίο συμμετέχουν, έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή δημιουργίας ημικινονών, καθώς αυτές είναι πολύ ασταθή ενδιάμεσα προϊόντα που μπορεί να οδηγήσουν στο σχηματισμό ROS (Heyno και συν. 2013). Ωστόσο, είναι γνωστό ότι οι αναγωγάσες αυτές μπορούν, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ορισμένες κατηγορίες κινονών, όπως οι ναφθοκινόνες, να παράγουν ROS εξαιτίας του σχηματισμού διυδροκινονών (Schopfer και συν. 2008).

1.1.5.4 Οξειδάσες αμινών, οξαλικού οξέος και ξανθίνης

Οι οξειδάσες των αμινών είναι ένζυμα, τα οποία καταλύουν την οξειδωτική απαμίνωση των πολυαμινών. Ανήκουν σε δύο ομάδες, τις οξειδάσες των πολυαμινών, οι οποίες περιέχουν

στο μόριο τους φλαβίνη και τις οξειδάσες των αμινών που περιέχουν άτομα χαλκού. Οι πολυαμίνες είναι πολυκατιονικά μόρια που εμπλέκονται σε πλήθος σημαντικών διεργασιών για τη λειτουργία του κυττάρου (Angelini και συν. 2010). Από τις πιο γνωστές πολυαμίνες είναι η σπερμίνη, η σπερμιδίνη και η πουτρεσκίνη (Moschou και συν. 2008). Σε όλες τις αντιδράσεις απαμίνωσης που καταλύονται από τις οξειδάσες των αμινών παράγεται H_2O_2 (Cona και συν. 2006). Για το λόγο αυτό, ο βιολογικός ρόλος που αποδίδεται στα ένζυμα αυτά σχετίζεται περισσότερο με την τοπική παραγωγή H_2O_2 και λιγότερο με το μεταβολισμό των πολυαμινών (Angelini και συν. 2010).

Μία άλλη κατηγορία οξειδασών που συμμετέχουν στην παραγωγή ROS είναι οι οξειδάσες του οξαλικού οξέος, οι οποίες καταλύουν την αποικοδόμησή του. Το οξαλικό οξύ παράγεται σε μεγάλες ποσότητες κατά τη διάρκεια μεταβολικών διεργασιών και είναι τοξικό για τα κύτταρα. Οι οξειδάσες οξαλικού οξέος καταλύουν τη μετατροπή αυτού σε διοξείδιο του άνθρακα, με ταυτόχρονο σχηματισμό H_2O_2 (Svedružić και συν. 2005). Διακρίνονται σε δύο ομάδες. Η πρώτη περιλαμβάνει τις οξειδάσες που είναι ομόλογες με τις πρωτεΐνες γερμίνες (Germins), οι οποίες έχουν βρεθεί σε ορισμένα μονοκοτυλήδονα φυτά και η δεύτερη τις οξειδάσες του οξαλικού οξέος που υπάρχουν σε όλα τα υπόλοιπα φυτά (Lane 2002).

Εκτός από τα παραπάνω ένζυμα, μία άλλη κατηγορία οξειδασών, οι οξειδάσες τις ξανθίνης, καταλύουν την οξείδωση της ξανθίνης και της υποξανθίνης προς ουρικό οξύ (Lin και συν. 2002). Στην περίπτωση αυτή, ο δότης ηλεκτρονίων είναι η ξανθίνη ή η υποξανθίνη (Blokhina και συν. 2003). Τα ένζυμα ανήκουν στις φλαβοπρωτεΐνες και περιέχουν στο μόριο τους μολυβδαίνιο και σίδηρο. Μεταξύ άλλων, προϊόντα των αντιδράσεων που καταλύουν είναι το H_2O_2 και το $O_2^{\cdot-}$ (Hancock και συν. 2001). Τέλος, η πιο γνωστή και επαρκώς μελετημένη ομάδα οξειδασών περιλαμβάνει τις οξειδάσες που χρησιμοποιούν το NADPH ως δότη ηλεκτρονίων. Πληροφορίες για τις οξειδάσες θα αναφερθούν στην επόμενη ενότητα.

1.1.5.5 NADPH-οξειδάσες

1.1.5.5.1 Γενικά

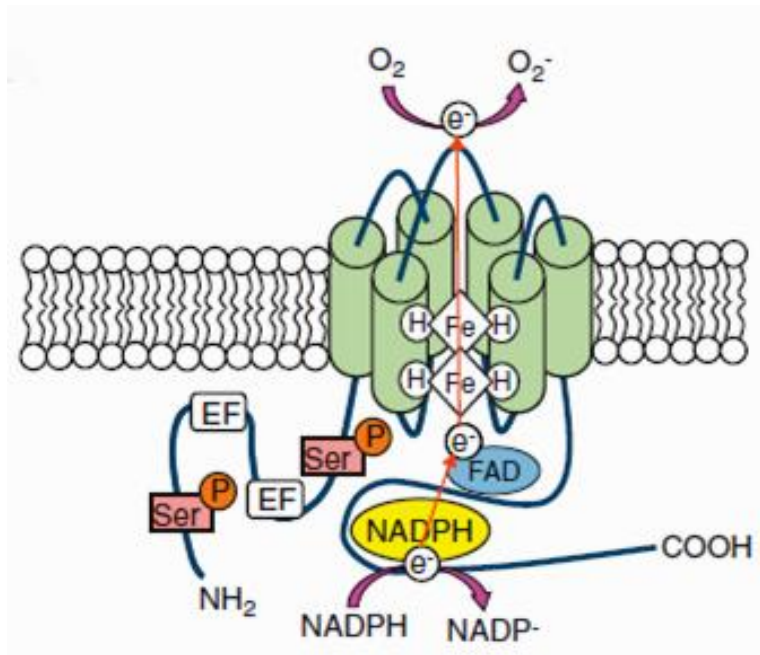
Η αναπνευστική ή οξειδωτική έκρηξη (respiratory or oxidative burst), ως φαινόμενο που λαμβάνει χώρα στα μακροφάγα και σε άλλους τύπους ζωικών κυττάρων, ήταν γνωστό πριν από πολλά χρόνια. Η ανακάλυψη, όμως, στα τέλη της δεκαετίας του 1960, του ενζύμου NADPH-οξειδάση στα ουδετερόφιλα, τα οποία αποτελούν μία κατηγορία λευκών αιμοσφαιρίων, ήταν η πρώτη αναφορά της ύπαρξης ενός μηχανισμού που παράγει ROS σκόπιμα και όχι ως παραπροϊόν κάποιας μεταβολικής αντίδρασης (Bedard και Krause 2007). Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι από την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου αυτού παράγονται ιόντα $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 και ότι η NADPH-οξειδάση εκδηλώνει εκλεκτικότητα προς το NADPH σε σύγκριση με το NADH (Babior και συν. 1975). Σήμερα γνωρίζουμε ότι η NADPH-οξειδάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αναγωγή του οξυγόνου προς ιόντα $O_2^{\cdot-}$

χρησιμοποιώντας ως δότη ηλεκτρονίων το NADPH. Εν συνεχεία, τα ιόντα αυτά αντιδρούν μεταξύ τους είτε αυθόρμητα είτε με τη δράση του ενζύμου SOD και σχηματίζουν H_2O_2 και O_2 (Babior 2002).

Στα κύτταρα του ανθρώπου υπάρχουν 5 ξεχωριστές δομικές κατηγορίες NADPH-οξειδασών (NOX1-5). Οι τρεις πρώτες κατηγορίες (NOX1-3) διαθέτουν τη βασική δομή των NOX και η ενεργοποίησή τους εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή τους με βοηθητικές πρωτεΐνες, κυρίως μία μικρή GTPάση, την Rac (Bedard και Krause 2007). Αντίθετα, η λειτουργία της NOX4 δεν απαιτεί βοηθητικές πρωτεΐνες (Martyn και συν. 2006). Επιπλέον, υπάρχουν και ένζυμα με διαφορετική δομή, τα οποία ονομάζονται NOX5, DUOX1, DUOX2 (Dual Oxidase, διπλή οξειδάση, Fluhr 2009). Οι περισσότεροι ζωικοί οργανισμοί διαθέτουν κάποιες από τις παραπάνω μορφές, οι περισσότερες ομάδες μυκήτων διαθέτουν τρεις από αυτές, ενώ οι σακχαρομύκητες στερούνται πρωτεϊνών ομολόγων των NOX (Kawahara και συν. 2007, Takemoto και συν. 2007). Στα φυτικά κύτταρα υπάρχουν πρωτεΐνες που είναι ομόλογες με τις NADPH-οξειδάσες και χαρακτηρίζονται «ομόλογες των οξειδασών της αναπνευστικής έκρηξης» (Respiratory burst oxidase homologue, Rboh, Sagi και Fluhr, 2006). Αυτές είναι ομόλογες με τις NOX και συγκεκριμένα με εκείνη των φαγοκυττάρων (NOX2, gp91^{phox}), ωστόσο διαθέτουν και δομικές επικράτειες που είναι παρούσες σε άλλες NOX, όπως η NOX5 (Suzuki και συν. 2011). Οι Rbohs συνιστούν μία πολυγονιδιακή οικογένεια και έχουν ταυτοποιηθεί σε πολλά μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά (Kaur και συν. 2014). Στο γονιδίωμα του φυτού *A. thaliana* υπάρχουν 10 γονίδια που κωδικοποιούν τις Rbohs (Torres και Dangl 2005).

1.1.5.5.2 Δομικά χαρακτηριστικά των Rbohs

Οι Rbohs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και, όπως οι περισσότερες πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας, δεν είναι εύκολο να κρυσταλλωθούν ώστε να διαλευκανθεί πλήρως η δομή τους. Ωστόσο, έχουν προκύψει αρκετά δεδομένα από τη μελέτη της δομής τους (Fluhr 2009). Η κύρια επικράτειά τους, η οποία είναι όμοια με την αντίστοιχη των NOX, αποτελείται από έξι διαμεμβρανικά τμήματα που συνδέονται με πέντε θηλιές (Σχήμα 6, Kaur και συν. 2014). Τα τμήματα αυτά συγκρατούν δύο ομάδες αίμης, οι οποίες συνδέονται σε συγκεκριμένες ιστιδίνες που ανήκουν στο 3ο και 5ο διαμεμβρανικό τμήμα και είναι συντηρημένες (Σχήμα 6, Fluhr 2009). Το καρβοξυτελικό άκρο αποτελείται από δύο υδρόφιλες επικράτειες, στις οποίες συνδέεται το FAD (flavin adenine dinucleotide, φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο) και το NADPH (Segal και συν. 1992). Το αμινοτελικό άκρο των Rbohs είναι υδρόφιλο και αποτελείται από 300 περίπου αμινοξέα. Πιστεύεται ότι σε ορισμένα σημεία του σχηματίζει διμερή, ενώ φέρει και επικράτειες EF (Oda και συν. 2008). Αυτές αποτελούν θέσεις δέσμευσης των RHO GTPασών, ενώ ορισμένα αμινοξέα των περιοχών αυτών αποτελούν θέσεις δέσμευσης ιόντων ασβεστίου (Wong και συν. 2007, Kaur και συν. 2014).



Σχήμα 6. Σχηματική απεικόνιση της δομής των φυτικών NADPH-οξειδασών (Rbohs). Τροποποιημένο από: Suzuki και συν. (2011).

I.1.5.5.3 Μηχανισμός παραγωγής ROS από τις NADPH-οξειδάσες

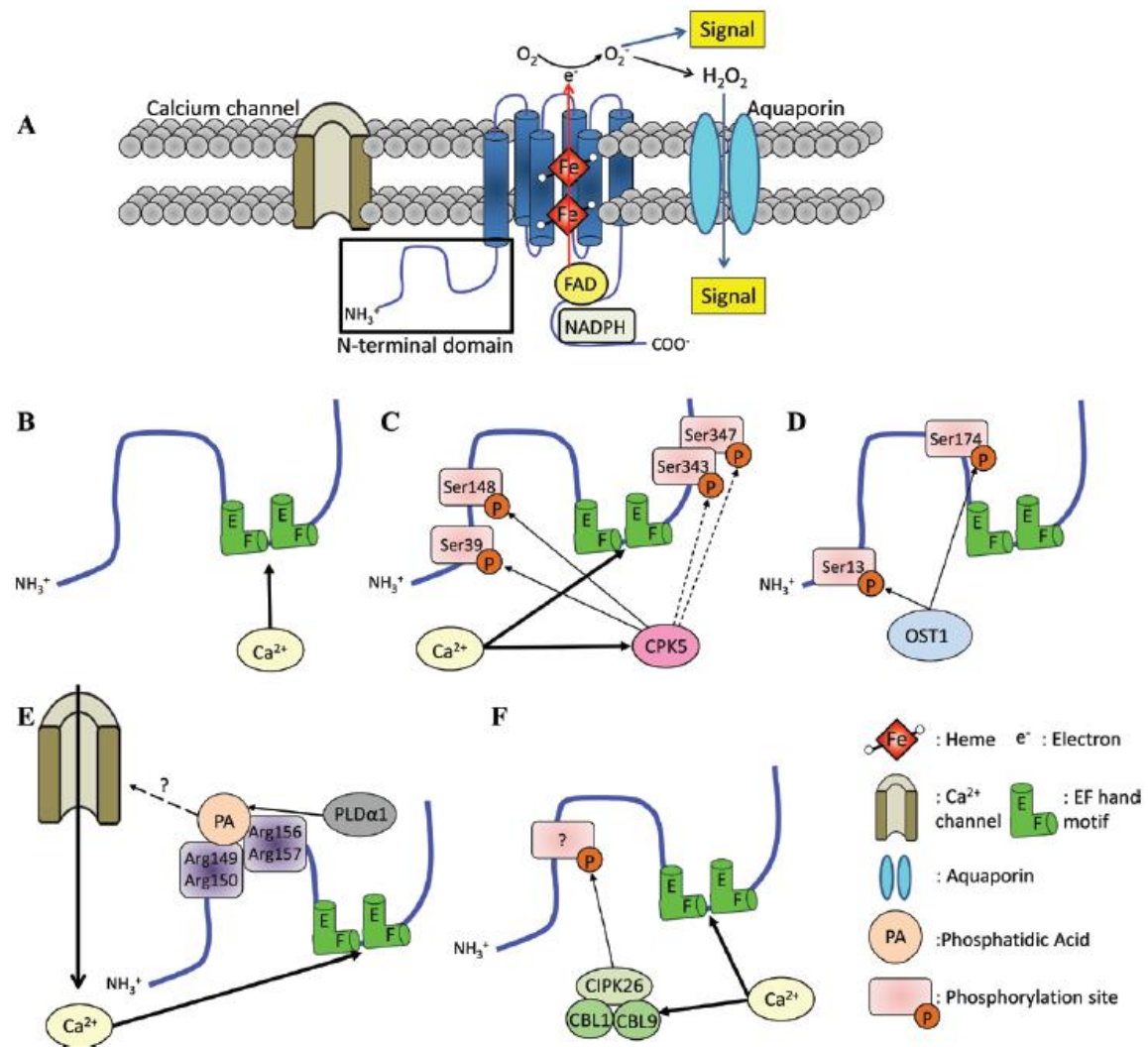
Οι NOX, γενικά, λειτουργούν ως αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο δότης ηλεκτρονίων είναι το NADPH, το οποίο παρέχει δύο ηλεκτρόνια και βρίσκεται στην κυτοπλασματική πλευρά του πλασμαλήματος, ενώ ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι δύο μόρια οξυγόνου που βρίσκονται στην πλευρά του αποπλάστη (Σχήμα 6). Στο πρώτο στάδιο, τα δύο ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο FAD, το οποίο ανάγεται σε FADH₂. Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια αυτά μεταφέρονται ένα-ένα στο άτομο του σιδήρου που βρίσκεται στην εσωτερική ομάδα της αίμης. Το άτομο του σιδήρου μπορεί να λάβει μόνο ένα ηλεκτρόνιο κάθε φορά και, για το λόγο αυτό, πριν δεχτεί το επόμενο πρέπει να δώσει το πρώτο ηλεκτρόνιο στην αίμη που βρίσκεται προς την εξωτερική πλευρά του πλασμαλήματος (Σχήμα 6). Η μεταφορά του ηλεκτρονίου στην εξωτερική αίμη είναι αντίθετη με την ηλεκτροχημική κλίση μεταξύ των δύο ομάδων αίμης. Η επιθυμητή ενεργειακή κατάσταση διαμορφώνεται με την πρόσδεση ενός οξυγόνου στην εξωτερική αίμη. Ακολούθως, το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται από την αίμη στο οξυγόνο, αν και δεν είναι πλήρως κατανοητός ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται αυτή η μεταφορά. Πιστεύεται ότι καθίσταται εφικτή μόνο έπειτα από ενεργοποίηση και αλλαγή της διαμόρφωσης του ενζυμικού μορίου. Η μεταφορά του ηλεκτρονίου στο οξυγόνο έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό O₂⁻ στον αποπλαστικό χώρο. Τα ιόντα αυτά δεν μπορούν να διαπεράσουν το πλασμαλήμα, τουλάχιστον των ζωικών κυττάρων, όμως μπορούν να πρωτονιωθούν και να προκύψουν ρίζες υδροϋπεροξυλίου ή να μετατραπούν, αυθόρμητα ή με τη δράση μίας SOD, σε H₂O₂, ενώσεις οι οποίες μπορούν να διαπεράσουν το πλασμαλήμα και να εισέλθουν στο κυτόπλασμα (Sagi και Fluhr 2006).

I.1.5.5.4 Ενεργοποίηση των Rbohs

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας παράγουν ROS «σκόπιμα». Επομένως, είναι εύλογο να υποθέσουμε ότι θα πρέπει να υπάρχουν συγκεκριμένοι μηχανισμοί με τους οποίους ενεργοποιούνται οι NADPH-οξειδάσες (Σχήμα 7). Τα τελευταία χρόνια έχουν προκύψει πολλά δεδομένα σχετικά με μηχανισμούς που ενεργοποιούν τις NADPH-οξειδάσες και αφορούν κατά κύριο λόγο σε διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίστανται τα ενζυμικά μόρια (Marino και συν. 2012). Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς είναι η φωσφορυλίωση του ενζυμικού μορίου σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα. Στο αμινοτελικό άκρο του μορίου των φυτικών NADPH-οξειδασών έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί αρκετές θέσεις φωσφορυλίωσης που αντιστοιχούν σε θέσεις σερίνης (Fluhr 2009). Διάφορες κινάσες εμπλέκονται στη φωσφορυλίωσή τους (Σχήμα 7Α-Γ). Για παράδειγμα, στο φυτό *A. thaliana*, η φωσφορυλίωση της AtRbohF πραγματοποιείται από την κινάση OSK1 (Open Stomata Kinase 1, Sirichandra και συν. 2009), ενώ σε κύτταρα του φυτού *Solanum tuberosum* δύο CDPKs (Calcium Dependent Protein Kinases, πρωτεϊνικές κινάσες που εξαρτώνται από ιόντα ασβεστίου) φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη StRbohB σε θέσεις σερίνης (Kobayashi και συν. 2007). Επιπλέον, τα μοτίβα EF που απαντούν στο αμινοτελικό άκρο αποτελούν θέσεις στις οποίες δεσμεύονται ιόντα ασβεστίου (Sagi και Fluhr 2006, Σχήμα 7). Η πρόσδεση των ιόντων ασβεστίου προκαλεί αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση των μοτίβων αυτών, γεγονός που πυροδοτεί την παραγωγή ROS από τις NADPH-οξειδάσες (Baxter και συν. 2014). Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης απαιτεί συνδυασμό φωσφορυλίωσης και πρόσδεσης ιόντων ασβεστίου (Kimura και συν. 2012). Είναι ενδιαφέρον ότι, στο φυτό *A. thaliana*, η AtRbohD ενεργοποιείται με την πρόσδεση φωσφατιδικού οξέος (PA, phosphatidic acid), το οποίο παράγεται από την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου φωσφολιπάση D (phospholipase D, PLD, Σχήμα 7). Το PA προσδένεται σε συγκεκριμένα κατάλοιπα αργινίνης που βρίσκονται στο μόριο της AtRbohD (Zhang και συν. 2009). Ωστόσο, στο μόριο της NADPH-οξειδάσης μπορούν να προσδεθούν ολόκληρα πρωτεϊνικά μόρια και να την ενεργοποιήσουν.

Είναι γνωστό από τα ζωικά κύτταρα, ότι ορισμένες NADPH-οξειδάσες καθίστανται πλήρως λειτουργικές μόνο έπειτα από τη δράση Rac GTPάσης. Ωστόσο, αμφισβητείται η αναγκαιότητα μικρών G-πρωτεϊνών (GTP-binding proteins) για τη δραστηριότητα των Rbohs. Ο λόγος είναι ότι από αυτές απουσιάζουν τα αμινοξέα, τα απαραίτητα για την αλληλεπίδραση των NADPH-οξειδασών με Rac GTPάσες (Fluhr 2009). Πειράματα όμως που έχουν πραγματοποιηθεί στο φυτό *Oryza sativa* έδειξαν ότι μία πρωτεΐνη, ομόλογη με τη Rac GTPάση (ROPs, Rho-related GTPases of Plants), αλληλεπιδρά με περιοχές του αμινοτελικού άκρου της OsRbohB, οι οποίες βρίσκονται κοντά στα μοτίβα EF και την ενεργοποιεί (Wong και συν. 2007). Υποστηρίζεται ότι σε αυτή την περίπτωση ο ρυθμιστής της πρόσδεσης είναι η

συγκέντρωση των κυτοπλασματικών ιόντων ασβεστίου (Oda και συν. 2010). Αξίζει να σημειωθεί ότι στα κύτταρα του φυτού *Nicotiana tabacum* μία ROP GTPάση, η NtRac, καταστέλλει τη δραστηριότητα της NtRbohD (Morel και συν. 2004).



Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών μηχανισμών ενεργοποίησης των Rbohs. Τροποποιημένο από: Baxter και συν. (2014).

I.1.5.5.5 Πρότυπα έκφρασης

Παράλληλα με την ύπαρξη πλήθους μηχανισμών, με τους οποίους ρυθμίζεται η δραστηριότητα των Rbohs, τα πρότυπα έκφρασης των διαφορετικών αντιπροσώπων εξαρτώνται από το φυτικό είδος, τον ιστό, τον κυτταρικό τύπο και τις συνθήκες, οι οποίες κινητοποιούν την παραγωγή ROS. Οι πιο γνωστές αιτίες που ευθύνονται για αυξημένη δραστηριότητα των NADPH-οξειδασών είναι οι αβιοτικές καταπονήσεις και ο τραυματισμός ή η ύπαρξη κάποιου παθογόνου. Από τις Rbohs, η RbohD διαδραματίζει τον πιο σημαντικό ρόλο στην απόκριση έναντι των διαφόρων καταπονήσεων (Suzuki και συν. 2011). Στο φυτό *A. thaliana*, η AtRbohD, όπως και η AtRbohF, παράγονται σε όλους τους ιστούς, οι

AtRbohA-G και AtRbohI στις ρίζες και οι AtRbohH και J στα άνθη και τους γυρεοσωλήνες (Fluhr 2009). Ο ρόλος της κατευθυνόμενης παραγωγής ROS από τις Rbohs στη βιολογία των φυτών θα συζητηθεί σε επόμενη ενότητα.

1.1.6 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Η παραγωγή ROS μπορεί να έχει καταστρεπτικές συνέπειες για τα κύτταρα. Για παράδειγμα, οι ρίζες $\text{HO}\cdot$, οι οποίες είναι από τις πλέον δραστικές ROS, μπορούν να προκαλέσουν ανεπανόρθωτες βλάβες. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς με τους οποίους διαχειρίζονται την παρουσία των ROS ή επηρεάζουν την παραγωγή τους (ApeI και Hirt 2004). Συχνά, στη βιβλιογραφία οι μηχανισμοί αυτοί αναφέρονται συνολικά ως «αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί». Ο όρος χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα μεγάλο εύρος δράσεων (Πίνακας 3). Αντιοξειδωτική θεωρείται οποιαδήποτε ουσία βρίσκεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, σε σύγκριση με ένα υπόστρωμα ικανό να οξειδωθεί, και μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει σε μεγάλο βαθμό την οξείδωση του (Halliwell 2005).

Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	Αντίδραση	Θέση
Καταλάση	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$	Υπεροξεισωμάτια, Γλυοξυσωμάτια, Μιτοχόνδρια
Υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος <i>AA</i> , ασκορβικό οξύ, <i>DHA</i> , δευδροασκορβικό οξύ	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AA} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{DHA}$	Κυτόπλασμα, Υπεροξεισωμάτια, Χλωροπλάστες, Μιτοχόνδρια
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης <i>GSH</i> , γλουταθειόνη <i>GSSG</i> , δισουλφίδιο της γλουταθειόνης	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{GSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$	Χλωροπλάστες, Κυτόπλασμα, Μιτοχόνδρια, Ενδοπλασματικό δίκτυο
Υπεροξειδική διαμουτάση	$\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	Κυτόπλασμα, Χλωροπλάστες, Υπεροξεισωμάτια, Μιτοχόνδρια
Αναγωγή του μονοδευδροασκορβικού οξέος <i>MDHA</i> , μονοδευδροασκορβικό οξύ	$\text{MDHA} + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{AA} + \text{NAD(P)}^+$	Χλωροπλάστες, Μιτοχόνδρια, Κυτόπλασμα
Αναγωγή του δευδροασκορβικού οξέος <i>DHA</i> , δευδροασκορβικό οξύ	$\text{DHA} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{AA} + \text{GSSG}$	Χλωροπλάστες, Μιτοχόνδρια, Κυτόπλασμα
Αναγωγή της γλουταθειόνης	$\text{GSSG} + \text{NAD(P)H} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NAD(P)}^+$	Κυτόπλασμα, Χλωροπλάστες, Μιτοχόνδρια
Αντιοξειδωτικές ενώσεις		Θέση
Ασκορβικό οξύ	Υπόστρωμα για την υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος. Εξουδετερώνει το H_2O_2	Χλωροπλάστες, Κυτόπλασμα, Μιτοχόνδρια, Υπεροξεισωμάτια, Χυμοτόπιο, Αποπλάση
Γλουταθειόνη	Υπόστρωμα για τις οξειδάσες των πολυαμινών, τρανσφεράσες και αναγωγάσες της γλουταθειόνης. Εξουδετερώνει το H_2O_2 και τοξικές ενώσεις	Χλωροπλάστες, Κυτόπλασμα, Μιτοχόνδρια, Υπεροξεισωμάτια, Χυμοτόπιο, Αποπλάση
Τοκοφερόλες	Προστατεύουν τα λιπίδια των μεμβρανών από υπεροξειδωση	Μεμβράνες
Καροτινοειδή	Αποτρέπουν τη δημιουργία μονήρους οξυγόνου	Χλωροπλάστες, Χρωμοπλάστες, Ελαιοπλάστες, Αμυλοπλάστες
Φλαβονοειδή	Αντιδρούν με H_2O_2 και $\text{OH}\cdot$	Χυμοτόπιο

Πίνακας 3. Οι κυριότεροι ενζυμικοί και μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί που λειτουργούν στα φυτικά κύτταρα. Αναφέρονται οι χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα και τα οργανίδια στα οποία διεξάγονται. Τροποποιημένο από: Karuppanarandian και συν. (2011).

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τους ενζυμικούς και τους μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι, για παράδειγμα, η SOD, η καταλάση, η υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος και άλλες υπεροξειδάσες, οι αναγωγάσες της γλουταθειόνης ή οι αναγωγάσες του μονοδευδρο- και

δεϋδρο-ασκορβικού οξέος. Στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά ανήκουν, μεταξύ άλλων, η γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ, η προλίνη, τα καροτινοειδή, τα φλαβονοειδή και οι τοκοφερόλες (Πίνακας 3, Gill και Tuteja 2010). Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δρουν με πολλούς τρόπους. Ενεργούν απομακρύνοντας το οξυγόνο ή μειώνοντας τη συγκέντρωσή του, απομακρύνοντας απαραίτητα μεταλλικά ιόντα για τη διεξαγωγή αντιδράσεων που παράγουν ROS, ή αντιδρούν και εξουδετερώνουν ROS, όπως οι ρίζες υδροξυλίου, αλκοξυλίου και αλκυλοϋπεροξυλίου αλλά και το μονήρες οξυγόνο (Gutteridge 1994).

1.1.6.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1.1.6.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Το ένζυμο SOD είναι από τα κύρια ένζυμα, τα οποία σχετίζονται με την αποφυγή βλαβών που προκαλούνται από τις ROS, και απαντά σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς. Η λειτουργία του εξαρτάται από την παρουσία μεταλλικών ιόντων (Gill και Tuteja 2010). Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενα κεφάλαια, η παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ στα φυτικά κύτταρα πραγματοποιείται σε διάφορα οργανίδια, ειδικά σε περιπτώσεις που λειτουργούν αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το γεγονός εξηγεί την παρουσία του ενζύμου αυτού σε πολλά διαφορετικά κυτταρικά οργανίδια, καθώς η SOD σχετίζεται με την απομάκρυνση των ιόντων $O_2^{\cdot-}$ (Alscher και συν. 2002). Οι SODs κατατάσσονται σε τρεις τύπους με βάση το μεταλλικό ιόν που φέρουν ως συμπράγοντα: α) Cu/ZnSOD, β) FeSOD και γ) MnSOD. Οι SODs που απαιτούν για τη δραστηριότητά τους ιόντα χαλκού και ψευδαργύρου εντοπίζονται στους χλωροπλάστες και το κυτόπλασμα, οι FeSODs μόνο στους χλωροπλάστες, ενώ στα μιτοχόνδρια και τα υπεροξειδωσώματα απαντούν οι SODs μαγγανίου. Επιπλέον, SODs εντοπίζονται και στον αποπλάστη (Mittler 2002). Παρά την ύπαρξη διαφορετικού μεταλλικού ιόντος στο ενεργό κέντρο των ενζύμων, σε όλες τις περιπτώσεις οι SODs καταλύουν την αντίδραση αυτο-οξειδοαναγωγής των ιόντων $O_2^{\cdot-}$ με αποτέλεσμα το σχηματισμό δύο μορίων H_2O_2 και ενός μορίου οξυγόνου (Gill και Tuteja 2010, Πίνακας 3). Η αντίδραση θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική, διότι μειώνει τον κίνδυνο σχηματισμού των εξαιρετικά επιβλαβών ριζών υδροξυλίου. Για τον έλεγχο των συγκεντρώσεων του παραγόμενου H_2O_2 λειτουργούν ένζυμα, όπως οι καταλάσες και διάφορες υπεροξειδάσες (Broshé και συν. 2010).

1.1.6.1.2 Καταλάση

Η καταλάση, η οποία απαντά σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, είναι το πρώτο ένζυμο με αντιοξειδωτική δράση που ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε. Είναι ένζυμο, το οποίο περιέχει ομάδα αίμης και καταλύει την αντίδραση αυτο-οξειδοαναγωγής δύο μορίων H_2O_2 με αποτέλεσμα την παραγωγή δύο μορίων νερού και ενός μορίου οξυγόνου (Πίνακας 3). Τα ένζυμα συγκροτούν τετραμερή, στα οποία το κάθε μονομερές έχει μοριακό βάρος 50-70 kDa (Boguszewska και Zagdańska 2012). Στα φυτά, έχουν βρεθεί αρκετές ισομορφές καταλασών,

οι οποίες εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και το κυτόπλασμα και, κατά κύριο λόγο, στα υπεροξειδιοσώματα. Η καταλάση είναι ιδιαίτερα σημαντική για την απομάκρυνση του H_2O_2 που παράγεται στα υπεροξειδιοσώματα από τη β-οξείδωση λιπαρών οξέων, τη φωτοαναπνοή και το μεταβολισμό των πουρινών (Gill και Tuteja 2010). Παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλό ρυθμό μετατροπής του H_2O_2 , καθώς ένα μόριο καταλάσης μπορεί να διασπάσει έξι εκατομμύρια μόρια H_2O_2 . Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι, εκτός από το H_2O_2 , μπορεί να αντιδρά και με κάποια υδροϋπεροξειδία (Gill και Tuteja 2010).

I.1.6.1.3 Υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος

Ενώ η καταλάση ευθύνεται για τη μείωση της συγκέντρωσης του H_2O_2 κυρίως στα υπεροξειδιοσώματα, η υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος διαδραματίζει αντίστοιχα σημαντικό ρόλο στους χλωροπλάστες και το κυτόπλασμα (Karuppanapandian και συν. 2011). Η υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος ανήκει στην πρώτη τάξη των υπεροξειδασών που περιέχουν αίμη. Οι διάφορες ισομορφές ταξινομούνται ανάλογα με το υποκυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο εντοπίζονται. Υπάρχουν διαλυτές μορφές του ενζύμου, οι οποίες βρίσκονται στο κυτόπλασμα, τα μιτοχόνδρια και το στρώμα των χλωροπλάστων, αλλά και ισομορφές που προσδένονται σε μεμβράνες και απαντούν στα υπεροξειδιοσώματα, τα γλυοξυσώματα και τα θυλακοειδή των χλωροπλάστων (Cavreza και συν. 2012). Οι υπεροξειδάσες αυτές καταλύουν τη διάσπαση του H_2O_2 και την παραγωγή δύο μορίων νερού και οφείλουν την ονομασία τους στο γεγονός ότι ο δότης ηλεκτρονίων είναι το ασκορβικό οξύ (Boguszevska και Zagdańska 2012). Ως αποτέλεσμα, παράγεται μονοδεϋδρο-ασκορβικό οξύ που περιέχει ελεύθερο ηλεκτρόνιο, το οποίο μολονότι είναι ελεύθερη ρίζα, δεν αντιδρά άμεσα με άλλα μόρια και δεν είναι ιδιαίτερα δραστικό (Navas και συν. 1994).

I.1.6.1.4 Υπεροξειδάση της γουαϊακόλης

Ένα ακόμη ένζυμο που σχετίζεται με τη μείωση των συγκεντρώσεων H_2O_2 είναι η υπεροξειδάση της γουαϊακόλης. Φέρει ομάδα αίμης και οξειδώνει διάφορα υποστρώματα, όπως φαινόλες, αρωματικές αμίνες και υδροκινόνες, δαπανώντας μόρια H_2O_2 (Karuppanapandian και συν. 2011). Τα κυριότερα υποστρώματά της είναι η γουαϊακόλη και η πυρογαλλόλη, ενώ η παρουσία της ανιχνεύεται στο κυτόπλασμα και τον αποπλάστη (Boguszevska και Zagdańska 2012). Για το λόγο αυτό θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικό, πιστεύεται δε ότι ενεργοποιείται σε περιπτώσεις καταπονήσεων (Karuppanapandian και συν. 2011).

I.1.6.1.5 Αναγωγάσες του μονοδεϋδρο- και δεϋδρο-ασκορβικού οξέος

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το ασκορβικό οξύ μπορεί να χάσει ηλεκτρόνια και να μετατραπεί σε μονοδεϋδρο-ασκορβικό οξύ. Το μονοδεϋδρο-ασκορβικό οξύ μετατρέπεται

αυτόματα σε δεϋδρο-ασκορβικό οξύ (Apel και Hirt 2004). Αυτές οι μορφές του ασκορβικού οξέος μετατρέπονται σε ασκορβικό με τη δράση δύο αναγωγασών, του μονοδεϋδρο-ασκορβικού και του δεϋδρο-ασκορβικού οξέος, αντίστοιχα. Η πρώτη χρησιμοποιεί ως δότη ηλεκτρονίων το NADPH, με αποτέλεσμα την παραγωγή ασκορβικού οξέος. Ωστόσο, το μονοδεϋδρο-ασκορβικό οξύ λειτουργώντας και μόνο του ως δέκτης ηλεκτρονίων μπορεί να δεχτεί ηλεκτρόνια από τη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Karuppanapandian και συν. 2011). Η αναγωγή του μονοδεϋδρο-ασκορβικού οξέος εντοπίζεται σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, όπως οι χλωροπλάστες, το κυτόπλασμα, τα μιτοχόνδρια και τα υπεροξειδισώματα (Boguszezewska και Zagdańska 2012).

Η δεύτερη αναγωγή εντοπίζεται επίσης στους χλωροπλάστες, τα μιτοχόνδρια και το κυτόπλασμα, και καταλύει τη μετατροπή του δεϋδρο-ασκορβικού οξέος σε ασκορβικό οξύ. Θεωρείται σημαντικός ρυθμιστής της ανακύκλωσης του ασκορβικού οξέος. Η ενζυμική αντίδραση για την παραγωγή του ασκορβικού οξέος απαιτεί την οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης για το σχηματισμό δισουλφιδίου της γλουταθειόνης. Το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης σχηματίζεται από την ένωση δύο ανηγμένων μορίων γλουταθειόνης με δισουλφιδικό δεσμό (Potters και συν. 2002). Οι αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα αυτά και εκείνη που πραγματοποιείται με τη βοήθεια της υπεροξειδάσης του ασκορβικού οξέος θεωρούνται σημαντικές, τόσο γιατί συμμετέχουν στη διάσπαση και διαχείριση του H_2O_2 , όσο και διότι συμμετέχουν στην ανακύκλωση του ασκορβικού οξέος (Karuppanapandian και συν. 2011), το οποίο είναι πολύ αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό. Οι τρεις αυτές αντιδράσεις εντάσσονται σ' έναν κύκλο αντιδράσεων που ονομάζεται κύκλος του ασκορβικού οξέος-γλουταθειόνης. Σε αυτόν εντάσσεται και η αντίδραση που καταλύεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης (Apel και Hirt 2004).

I.1.6.1.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης

Η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι μία οξειδοαναγωγή που περιέχει ομάδα φλαβίνης. Καταλύει τη αναγωγή του δισουλφιδικού δεσμού στο δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, με αποτέλεσμα την παραγωγή γλουταθειόνης (Noctor και συν. 2012), μίας πολύ σημαντικής αντιοξειδωτικής ένωσης, της οποίας ο ρόλος θα περιγραφεί στη συνέχεια. Απαντά τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και, παρόλο που εντοπίζεται κυρίως στους χλωροπλάστες, μπορεί να βρίσκεται και στα μιτοχόνδρια και το κυτόπλασμα (Gill και Tuteja 2010). Η αντίδραση, η οποία καταλύεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης, εξαρτάται από το NADPH (Πίνακας 3).

I.1.6.1.7 Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης συνιστούν μία μεγάλη οικογένεια ενζύμων που χρησιμοποιούν τη γλουταθειόνη για την αναγωγή του H_2O_2 και διαφόρων οργανικών και

λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων. Η αντίδραση που καταλύουν έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή νερού και δισουλφιδίου της γλουταθειόνης (Apel και Hirt 2004). Επομένως, θεωρούνται ένζυμα που βοηθούν τα φυτικά κύτταρα να αντιμετωπίσουν τις επιπτώσεις της οξειδωτικής καταπόνησης, διότι εμπλέκονται στη μείωση του H_2O_2 και άλλων ROS (Noctor και συν. 2002). Στο φυτό *A. thaliana* έχουν ταυτοποιηθεί 7 μέλη, τα οποία εντάσσονται σε αυτή την οικογένεια ενζύμων και απαντούν στο κυτόπλασμα, τους χλωροπλάστες, τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο (Millar και συν. 2003). Οι αναγωγάσες και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης είναι τα ένζυμα που συμμετέχουν στον λεγόμενο κύκλο της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Apel και Hirt 2004).

I.1.6.1.8 Εναλλακτική οξειδάση

Η εναλλακτική οξειδάση (alternative oxidase, AOX) είναι πρωτεΐνη που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδριακού φακέλου (Maxwell και συν. 1999) και συμμετέχει στην πορεία της μιτοχονδριακής αναπνοής, καταλύοντας την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό (Polidoros και συν. 2009). Εκτός από τα μιτοχόνδρια, όπου ο δότης των ηλεκτρονίων είναι η ανηγμένη ουμπικινόνη, εντοπίζεται και στους χλωροπλάστες (Mylona και Polydoros 2010). Σε αυτή την περίπτωση, δότης είναι η ανηγμένη πλαστοκινόνη (Asada 2006). Η AOX ενεργοποιείται όταν η διαθεσιμότητα των αναπνευστικών υποστρωμάτων είναι υψηλή ενώ η δραστηριότητά της επάγεται όταν αυξάνεται η συγκέντρωση των ROS. Επειδή η δράση της αποτρέπει την παραγωγή ROS, συχνά δεν κατατάσσεται στα ένζυμα με αμιγώς αντιοξειδωτική δράση. Ορισμένοι συγγραφείς θεωρούν ότι η δράση της εντάσσεται σε ξεχωριστή κατηγορία αμυντικών μηχανισμών που ονομάζονται μηχανισμοί αποφυγής των ROS (Mittler 2002). Ωστόσο, σε διαγονιδιακά φυτά *Nicotiana tabacum*, τα οποία υπερεξέφραζαν το γονίδιο *AOX1*, τα επίπεδα των ROS ήταν πολύ χαμηλά σε σύγκριση με των φυτών-μαρτύρων. Αντίστοιχα, σε φυτά, τα οποία στερούνταν τη λειτουργία του συγκεκριμένου ενζύμου, τα επίπεδα ROS που ανιχνεύτηκαν ήταν ιδιαίτερα υψηλά. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση της *AOX1* πιθανόν σχετίζεται και με την επαγωγή άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων ή μηχανισμών και συμμετέχει στους μηχανισμούς με τους οποίους ελέγχονται οι συγκεντρώσεις των ROS (Maxwell και συν. 1999).

I.1.6.1.9 Θειορρεδοξίνες

Στην κατηγορία των ενζύμων που δεν έχουν αμιγώς αντιοξειδωτική δράση, αλλά η δραστηριότητά τους εντάσσεται στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, ανήκουν και οι θειορρεδοξίνες (Dos Santos και Rey 2006). Οι θειορρεδοξίνες είναι πρωτεΐνες μικρού MB, οι οποίες καταλύουν την αναγωγή δισουλφιδίων. Μεγάλος αριθμός γονιδίων τις κωδικοποιεί στα φυτά. Χωρίζονται σε διάφορες ομάδες, ενώ αντιπροσωπευτικά μέλη των θειορρεδοξινών βρίσκονται στα μιτοχόνδρια, τους χλωροπλάστες, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τον πυρήνα

(Buchanan και Balmer 2005). Στα κύτταρα των θηλαστικών, τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν στους μηχανισμούς που ελέγχουν την ομοιόσταση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων (redox, reduction-oxidation, αναγωγή-οξείδωση). Αντίστοιχα, στα φυτικά κύτταρα έχει βρεθεί ότι η μεταγραφή των γονιδίων των θειορρεδοξινών επάγεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των ROS, ενώ οι σουλφυδρυλικές ομάδες πολλών ενζύμων, τα οποία εμπλέκονται στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, αποτελούν υποστρώματα της δραστηριότητας των θειορρεδοξινών. Ένζυμα αυτής της κατηγορίας είναι οι καταλάσες, οι υπεροξειδάσες του ασκορβικού οξέος και οι αναγωγάσες του δεϋδρο-ασκορβικού οξέος, όπως επίσης και η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Dos Santos και Rey 2006). Οι τρεις τελευταίες ομάδες ενζυμικών μορίων σχετίζονται με τις συγκεντρώσεις των πολύ σημαντικών για τα κύτταρα αντιοξειδωτικών ουσιών, του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης.

1.1.6.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1.1.6.2.1 Ασκορβικό οξύ

Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) είναι ένα από τα πιο σημαντικά και άφθονα αντιοξειδωτικά, το οποίο δρα περιορίζοντας ή εμποδίζοντας τις καταστροφές που προκαλούν οι ROS στα φυτά (Gill και Tuteja 2010). Απαντά σε όλους τους ιστούς των φυτών αλλά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίζεται στους φωτοσυνθετικούς ιστούς, κυρίως σε φύλλα που διαθέτουν πλήρως διαφοροποιημένους χλωροπλάστες. Εκτιμάται ότι το 30-40% του ασκορβικού οξέος παράγεται στους χλωροπλάστες (Shao και συν. 2008α). Εκτός από τα πλαστίδια, εντοπίζεται στο κυτόπλασμα και σε όλα σχεδόν τα υπόλοιπα οργανίδια, όπως στα χυμοτόπια, τα υπεροξειδιοσώματα και τα μιτοχόνδρια, αλλά και στον αποπλάστη (Πίνακας 3, Smirnoff και Wheeler 2000). Αξίζει να σημειωθεί με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους η εντόπιση εξαιρετικά υψηλών συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος και στον πυρήνα κυττάρων των φυτών *A. thaliana* και *Nicotiana tabacum* (Zechmann και συν. 2011). Εκτός από τη συμμετοχή του στην ενζυμική απομάκρυνση του H_2O_2 , μέσω της υπεροξειδάσης του ασκορβικού οξέος, η οποία αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, το ασκορβικό οξύ μπορεί να αντιδράσει απευθείας με πολλές ROS, όπως με τις ρίζες υδροξυλίου και υπεροξυλίου και με εκείνες των ανιόντων $O_2^{\cdot-}$ (Halliwell 2006). Επιπλέον, το ασκορβικό οξύ επηρεάζει τις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης και συμμετέχει στην ανακύκλωση της τοκοφερόλης και των καροτινοειδών, ενώσεων οι οποίες έχουν επίσης αντιοξειδωτική δράση (Potters και συν. 2002).

1.1.6.2.2 Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλ-κυστεϊνυλ-γλυκίνη) είναι ένα τριπεπτίδιο, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς. Η γλουταθειόνη βρίσκεται σε ανηγμένη κατάσταση ή, όπως αναφέρθηκε, σε μία οξειδωμένη κατάσταση, κατά την οποία δύο μόρια γλουταθειόνης ενώνονται με δισουλφιδικό δεσμό (Rouchier και συν.

2008). Αποτελεί την κύρια πηγή θειολικών ομάδων (θειολών, thiols), οι οποίες δεν συνιστούν συστατικά κάποιας πρωτεΐνης (Shao και συν. 2008α). Ανιχνεύεται σε όλα τα κυτταρικά οργανίδια, συμπεριλαμβανομένων των χλωροπλάστων και των μιτοχονδρίων, καθώς και στο κυτόπλασμα (Πίνακας 3, Foyer και Noctor 2003). Η γλουταθειόνη συμμετέχει σε πλήθος φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών. Ειδικά για τους χλωροπλάστες, η δράση της γλουταθειόνης είναι εξαιρετικά σημαντική, διότι προστατεύει τη φωτοσυνθετική συσκευή από τις οξειδωτικές βλάβες (Boguszevska και Zagdańska 2012). Εκτός από τη συνεισφορά της στην αναγέννηση του ασκορβικού οξέος, μέσω των αντιδράσεων του κύκλου ασκορβικού-γλουταθειόνης, η αντιοξειδωτική δράση της γλουταθειόνης έγκειται και στη δυνατότητά της να αντιδρά απευθείας με το μονήρες οξυγόνο, το H_2O_2 και με ρίζες υδροξυλίου (Gill και Tuteja 2010). Η θειολική ομάδα της κυστεΐνης, η οποία παρουσιάζει από χημική άποψη, εξαιρετικά πυρηνόφιλο χαρακτήρα, ευθύνεται γι' αυτές τις ιδιότητες της γλουταθειόνης. Η τελευταία μπορεί να δεσμεύει επιπλέον και μεταλλικά ιόντα. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη σταθερότητα που έχει η γλουταθειόνη σε υδατικά διαλύματα, την καθιστά σημαντικό προστατευτικό μόριο για τα κύτταρα (Shao και συν. 2008β).

I.1.6.2.3 Τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες είναι μία ομάδα λιποδιαλυτών χημικών ενώσεων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Είναι απαραίτητα συστατικά των βιολογικών μεμβρανών (Kiffin και συν. 2006). Ειδικότερα, θεωρείται ότι προστατεύουν τη σταθερότητα της μεμβράνης, αφού, μεταξύ άλλων, εξουδετερώνουν ROS, όπως το μονήρες οξυγόνο, και εμποδίζουν την επιτέλεση των αντιδράσεων επιμήκυνσης κατά τη διάρκεια της αυτο-οξείδωσης των λιπιδίων. Με τον τρόπο αυτό προστατεύονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Gill και Tuteja 2010). Οι τοκοφερόλες εντοπίζονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών και συμβάλλουν στη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας του φωτοσυστήματος II. Παράλληλα, η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη σύνθεσή τους επάγεται σε περιπτώσεις οξειδωτικής καταπόνησης (Wu και συν. 2007). Οι τοκοφερόλες αποτελούνται από τέσσερις κατηγορίες ισομερών ενώσεων (α-δ). Από αυτές, οι α-τοκοφερόλες (βιταμίνη E) παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα, εξαιτίας της παρουσίας τριών μεθυλομάδων στο μόριό τους (Boguszevska και Zagdańska 2012).

I.1.6.2.4 Καροτινοειδή

Τα καροτινοειδή συνιστούν μία ομάδα με περισσότερα από 600 μέλη χρωστικών ενώσεων, οι οποίες βρίσκονται στους φυτικούς οργανισμούς και αρκετούς μικροοργανισμούς (Boguszevska και Zagdańska 2012). Είναι λιποδιαλυτές και απαντούν στα πλαστίδια φωτοσυνθετικών και μη φωτοσυνθετικών ιστών (Karuppanapandian και συν. 2011). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των καροτινοειδών οφείλονται στην ικανότητά τους να αντιδρούν

με ελεύθερες ρίζες, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και ROS. Για παράδειγμα, τα καροτινοειδή μπορούν να αντιδρούν με ρίζες υπεροξυλίου που προκύπτουν από την αυτο-οξειδωση των λιπιδίων (Gill και Tuteja 2010). Οι αντιδράσεις των καροτινοειδών με ελεύθερες ρίζες μπορεί να προκαλέσουν το σχηματισμό ριζών καροτινοειδών. Η αναγέννηση των καροτινοειδών σε αυτή την περίπτωση γίνεται έπειτα από αντίδραση με άλλα αντιοξειδωτικά, όπως το ασκορβικό οξύ ή οι τοκοφερόλες (El-Agamey και συν. 2004). Παράλληλα, η παρουσία τους παρέχει προστασία στα φωτοσυστήματα των χλωροπλαστών, επειδή μπορεί να αποτρέπει τη δημιουργία μονήρους οξυγόνου. Αυτό επιτυγχάνεται με την αντίδραση διεγερμένων μορίων χλωροφύλλης με τα καροτινοειδή, με αποτέλεσμα η ενέργεια από τα μόρια της χλωροφύλλης να μη μεταφέρεται στο μοριακό οξυγόνο (Karuppanapandian και συν. 2011, βλέπε ενότητα I.1.4.2).

I.1.6.2.5 Άλλες ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση

Εκτός από τις ενώσεις που αναφέρθηκαν μέχρι τώρα, υπάρχουν και άλλες κατηγορίες ενώσεων, οι οποίες κατατάσσονται στα αντιοξειδωτικά, όπως το αμινοξύ προλίνη και τα φλαβονοειδή (Boguszevska και Zagdańska 2012). Η προλίνη είναι γνωστή στα φυτικά κύτταρα, εξαιτίας του γεγονότος ότι η παραγωγή της σε αρκετές περιπτώσεις καταπόνησης είναι αυξημένη και επειδή είναι μία ωσμωτικά ενεργή ένωση που συμμετέχει στην ωσμωρύθμιση (Gill και Tuteja 2010). Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η προλίνη εμφανίζει και αντιοξειδωτική δράση, επειδή αντιδρά και εξουδετερώνει ROS, ενώ αποτρέπει την παραγωγή μονήρους οξυγόνου (Szabados και Savouré 2010). Επίσης, η επίδραση με προλίνη σε κύτταρα μυκήτων μειώνει τα επίπεδα των ROS και λειτουργεί ως αναστολέας της πορείας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Chen και Dickman 2005).

Τα φλαβονοειδή είναι μία κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών, τα οποία είναι άφθονα στους φυτικούς ιστούς και απαντούν στα φύλλα, τα άνθη και τους γυρεοκκόκκους. Με κριτήριο τη δομή τους χωρίζονται σε φλαβόνες, φλαβονόλες, ισοφλαβόνες και ανθοκυανίνες (Gill και Tuteja 2010). Λόγω της δομής τους, οι ενώσεις αυτές μπορούν να δεσμεύουν ROS και θεωρούνται πολύ σημαντικά αντιοξειδωτικά. Μάλιστα, έχει υπολογιστεί σε *in vitro* μελέτες ότι είναι πιο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά από το ασκορβικό οξύ και τις τοκοφερόλες (Karuppanapandian και συν. 2011). Έχουν τη δυνατότητα να λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων, να αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες και να τις εξουδετερώνουν (Ahmad και συν. 2010). Τέλος, η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών έχει ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό, πολύ σημαντικό για την προστασία των κυττάρων από την οξειδωτική καταπόνηση: είναι ικανές να δεσμεύουν χηλικά διάφορα μεταλλικά ιόντα, μεταξύ των οποίων και ιόντα χαλκού και σιδήρου (Rice-Evans και συν. 1997).

I.1.6.2.6 Ρύθμιση της συγκέντρωσης των ιόντων σιδήρου

Ορισμένες ROS, όπως το $O_2^{\cdot-}$ ή το H_2O_2 , παρουσιάζουν μικρής εμβέλειας κυτταροτοξικότητα, τουλάχιστον σε σύγκριση με τις εξαιρετικά δραστικές και καταστρεπτικές ρίζες υδροξυλίου. Οι τελευταίες είναι υπεύθυνες για το μεγαλύτερο μέρος της οξειδωτικής βλάβης που προκαλείται στα βιολογικά συστήματα (Halliwell και Gutteridge 2006). Η ανάγκη εξουδετέρωσης του $O_2^{\cdot-}$ ή του H_2O_2 σχετίζεται συχνά όχι τόσο με τη δραστικότητα των ίδιων των ενώσεων, όσο με την αποτροπή δημιουργίας ριζών υδροξυλίου μέσω των αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss (Halliwell 2012, Ravet και Pilon 2012, βλέπε ενότητα I.1.4.1). Ιόντα σιδήρου και χαλκού καταλύουν τις συγκεκριμένες αντιδράσεις. Επομένως, είναι προφανής η ανάγκη ελέγχου των συγκεντρώσεων των ιόντων αυτών, προς αποφυγή παραγωγής των ιδιαίτερα τοξικών ριζών υδροξυλίου (Ravet και Pilon 2012).

Η τοξικότητα ορισμένων μετάλλων, όπως ο σίδηρος, ρυθμίζεται με τη χηλική δέσμευση των ιόντων σε αποθηκευτικές πρωτεΐνες, στην περίπτωση του σιδήρου σε σιδηροπρωτεΐνες. Επίσης, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι πρωτεΐνες αυτές, όπως για παράδειγμα η φερριτίνη, παρεμποδίζουν την αντίδραση του σιδήρου με το οξυγόνο (Briat και συν. 1999). Στα φυτικά κύτταρα, η φερριτίνη εντοπίζεται κυρίως στους χλωροπλάστες και λιγότερο στα μιτοχόνδρια (Ravet και Pilon 2012). Η στενή σχέση της οξειδωτικής καταπόνησης με την ομοιόσταση των ιόντων σιδήρου είναι καλύτερα θεμελιωμένη στα ζωικά κύτταρα (Galaris και Pantopoulos 2008). Τα τελευταία χρόνια, η άποψη αυτή φαίνεται να επικρατεί και στους φυτικούς οργανισμούς, γεγονός που υποστηρίζεται από διάφορα πειραματικά δεδομένα. Για παράδειγμα, η επίδραση με H_2O_2 προκαλεί αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων που κωδικοποιούν τη φερριτίνη (Petit και συν. 2001). Επιπλέον, τριπλά μεταλλάγματα *Arabidopsis*, τα οποία στερούνται γονιδίων της φερριτίνης, εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα ROS (Ravet και συν. 2009, Briat και συν. 2010). Αξίζει πάντως να σημειωθεί ότι, αφενός η φερριτίνη δεν είναι η μοναδική θέση αποθήκευσης σιδήρου στα φυτικά κύτταρα και αφετέρου ότι οι ρίζες $O_2^{\cdot-}$ μπορούν να προκαλέσουν την αποδέσμευση ιόντων σιδήρου, τα οποία είναι δεσμευμένα στις σιδηροπρωτεΐνες (Ravet και συν. 2009, Ravet και Pilon 2012).

Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν μέχρι τώρα, φαίνεται ότι τα κύτταρα διαθέτουν πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς που συχνά αλληλοεπικαλύπτονται, τόσο για την παραγωγή των ROS όσο και για την εξουδετέρωσή τους. Η ύπαρξη ενός τόσο πολύπλοκου τρόπου ελέγχου της παραγωγής των ROS υποδηλώνει την ανάγκη λειτουργίας ομοιοστατικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί αφενός αποτρέπουν τον κίνδυνο πρόκλησης βλαβών στα κύτταρα, λόγω της έκθεσής τους στις ROS, και αφετέρου επιτρέπουν στις ROS να συμμετέχουν σε διάφορες σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως θα δούμε στη συνέχεια.

1.1.7 Ο ρόλος των ROS στη βιολογία των φυτών

1.1.7.1 Η προσαρμογή των οργανισμών στην παρουσία του ατμοσφαιρικού οξυγόνου

Η εισαγωγή σημαντικών ποσοτήτων μοριακού οξυγόνου στην ατμόσφαιρα συνέβη πριν από περισσότερα από 2,2 δισεκατομμύρια έτη. Η αλλαγή αυτή οφείλεται κυρίως στους προγόνους των σημερινών κυανοβακτηρίων που απέκτησαν την ικανότητα να φωτοσυνθέτουν. Η φωτοσυνθετική λειτουργία επέτρεψε την αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας, αλλά συγχρόνως είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του οξυγόνου ως παραπροϊόντος της φωτοσύνθεσης (Halliwell 2006). Παράλληλα, οι αερόβιοι οργανισμοί εξαρτώνται από το οξυγόνο για την παραγωγή ενέργειας, παρόλο που το στοιχείο αυτό είναι τοξικό. Όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί υφίστανται βλάβες, όταν εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (Schippers και συν. 2012). Η προσαρμογή των οργανισμών στην παρουσία του οξυγόνου περιλαμβάνει την ενσωμάτωσή του σε βιοχημικά μονοπάτια και την αντικατάσταση ορισμένων μονοπατιών ουσιώδους σημασίας για τους αναερόβιους οργανισμούς (Reymond και Segre 2006). Επιπλέον, το οξυγόνο διαθέτει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με διαφορετική τιμή κβαντικού αριθμού spin και μπορεί να λειτουργήσει ως δέκτης ηλεκτρονίων. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται παράγωγα του οξυγόνου, τα οποία εξαιτίας της φύσης τους, είναι πολύ δραστικά και μπορούν να αλληλεπιδρούν με άλλα βιολογικά μόρια και να τα καταστρέφουν (del Rio και Purpo 2009). Η έννοια της «οξειδωτικής καταπόνησης» (oxidative stress) χρησιμοποιείται για να περιγράψει αυτήν ακριβώς τη βλαβερή επίδραση που δυνητικά προκαλεί η παραγωγή ROS στα κύτταρα των οργανισμών. Ωστόσο, η ανάπτυξη διαφόρων αντιοξειδωτικών μηχανισμών και άλλων προσαρμογών, που εξασφαλίζουν την αντοχή των οργανισμών στην παρουσία των ROS, επέτρεψε τη χρήση αυτών των δραστικών μορίων προς όφελός τους (del Rio και Purpo 2009). Η αξιοποίηση της αναπόφευκτης παραγωγής ROS οδήγησε στην καθιέρωση μίας άλλης έννοιας, η οποία συνεχώς κερδίζει έδαφος, της «οξειδωτικής σηματοδότησης» (oxidative signaling, Foyer και Noctor, 2005α). Στα επόμενα κεφάλαια θα περιγραφούν οι σχέσεις των ROS με περιβαλλοντικά ερεθίσματα, ορμονικές και αναπτυξιακές διαδικασίες, και γενικότερα ο ρόλος τους ως σηματοδοτικών μορίων στη βιολογία των φυτών. Για την επίτευξη αυτού του ρόλου, οι ROS κατέστησαν αναπόσπαστο μέρος πολύπλοκων μονοπατιών μεταγωγής σήματος (Mittler και συν. 2004). Ωστόσο, οι βλαβερές συνέπειες που τα μόρια αυτά μπορεί να προκαλέσουν, έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη ομοιοστατικών μηχανισμών, με τους οποίους οι οργανισμοί ρυθμίζουν τα επίπεδα των ROS στο εσωτερικό τους περιβάλλον (Mittler και συν. 2011).

1.1.7.2 Οξειδωτική καταπόνηση και οξειδοαναγωγική κατάσταση (redox status)

Παραδοσιακά, ως οξειδωτική καταπόνηση ορίζεται η σημαντική διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ROS και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας, στην οποία επικρατεί η παραγωγή ROS (Halliwell 2011). Η οξειδωτική καταπόνηση μπορεί να προέλθει είτε από τη

μεγάλη μείωση των αντιοξειδωτικών ενώσεων, είτε από την αυξημένη παραγωγή ROS (Halliwell και Whiteman 2004). Η καταστροφή που προκαλείται από την υπερπαραγωγή ROS στα κύτταρα και τους ιστούς ονομάζεται οξειδωτική καταστροφή (Halliwell 2011). Αφορά στις βλάβες των βιολογικών μορίων που προκαλούνται από τις ROS (Halliwell και Whiteman 2004). Η αλληλεπίδραση των ROS με τα διάφορα βιολογικά μόρια είναι σε θέση να προκαλέσει αντιστρεπτές ή μη αντιστρεπτές τροποποιήσεις της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των μορίων αυτών (Dickinson και Chang 2011). Κατά συνέπεια, είναι προφανές ότι η ομοιόσταση των ROS που αποσκοπεί στη διατήρηση της ισορροπίας των συγκεντρώσεων τους επηρεάζει άμεσα την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων (cellular redox state). Η τελευταία διαμορφώνεται από το σύνολο των οξειδοαναγωγικών ενεργών μορίων, τα οποία είναι ικανά προς οξείδωση ή αναγωγή (Potters και συν. 2010). Ρυθμιστικά στοιχεία της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων είναι οι διάφορες ROS, τα ένζυμα που τις παράγουν, τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, οι οξειδωμένες μορφές τους και η οξειδοαναγωγική τους κατάσταση (Foyer και Noctor 2005α, Foyer και Noctor 2005β). Σε αυτή την περίπτωση, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ομοιόσταση εξαρτάται από την αντίστοιχη κατάσταση των κυριότερων ζευγών ενώσεων, οι οποίες είναι οξειδοαναγωγικά ενεργές και συνεισφέρουν στη διαμόρφωση της συνολικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου (Πίνακας 4, Foyer και Noctor 2009). Παρότι οι ROS ευθύνονται σε πολύ μεγάλο βαθμό για την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων, αυτή επηρεάζεται και από τις δραστικές ενώσεις και άλλων στοιχείων, κυρίως των δραστικών μορφών αζώτου (Halliwell 2011).

Οξειδοαναγωγικό ζεύγος	Οξειδοαναγωγικό δυναμικό (V)	Εύρος συγκέντρωσης (μM)
O_2/H_2O	+0.82	200–300 (O_2)
$O_2/O_2^{\cdot-}$	-0.30	<0.001 ($O_2^{\cdot-}$)
$O_2^{\cdot-}/H_2O_2$	+0.94	1–100 (H_2O_2)
$H_2O_2/OH^{\cdot}$	+0.54	Αμελητέα ($OH^{\cdot}$)
$OH^{\cdot}/H_2O$	+2.20	–
DHA/ASC	-0.10	10,000–20,000
GSSG/GSH	-0.24	2,000–5,000
TRX_{ox}/TRX_{red}	-0.33	10–100
NAD(P)/NAD(P)H	-0.32	200–500
Fd_{ox}/Fd_{red}	-0.42	10–100

Πίνακας 4. Τα κυριότερα οξειδοαναγωγικώς ενεργά ζεύγη ενώσεων που συνεισφέρουν στη διαμόρφωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των φυτικών κυττάρων. Για κάθε ένα από αυτά αναφέρεται το οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Τροποποιημένο από: Foyer και Noctor (2005β).

Η ομοιόσταση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης (redox state) του κυττάρου είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη λειτουργία του, διότι του επιτρέπει να διαχειρίζεται γεγονότα όπως, η οξειδωτική καταπόνηση (Potters και συν. 2010). Επομένως, η ισορροπία εξαρτάται

από διάφορες παραμέτρους, μεταξύ των οποίων είναι οι μηχανισμοί διατήρησης ομοιόστασης των ROS. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως ότι οι ROS, εκτός από τις βλαβερές συνέπειες που προκαλούν, λειτουργούν και ως μόρια μεταφοράς μηνυμάτων. Θεωρείται ότι η συγκεκριμένη δραστηριότητά τους επιτυγχάνεται με την τροποποίηση πρωτεϊνικών μορίων-στόχων ή επηρεάζοντας τη συνολική οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου (Bartosz 2009).

1.1.7.3 Οι ROS ως μόρια μεταγωγής μηνύματος

Είναι σκόπιμο η αναφορά στις ROS και στις επιπτώσεις τους στη βιολογία των οργανισμών να συνοδεύεται από τη διευκρίνιση ποια μόρια ROS εμπλέκονται σε ποιες διεργασίες. Ο λόγος είναι ότι οι ROS αποτελούν μία ευρεία ομάδα δραστικών ενώσεων, παρά το ότι συχνά θεωρείται λανθασμένα ότι πρόκειται για όμοιες ενώσεις (Murphy και συν. 2011). Οι κυριότερες ROS των οργανισμών είναι το $O_2^{\cdot-}$, το H_2O_2 , το HOCl, το μονήρες οξυγόνο, τα υπεροξειδία των λιπιδίων, το όζον και οι ρίζες υδροξυλίου (Dickinson και Chang 2011).

Η ικανότητα των κυττάρων να χρησιμοποιούν τις ROS ως σηματοδοτικά μόρια είναι πιθανόν αποτέλεσμα εξελικτικής διαδικασίας, που ακολούθησε την απόκτηση της ικανότητας των κυττάρων να διαχειρίζονται της επιπτώσεις της αυξημένης δραστικότητας των ROS (Mittler και συν. 2004). Παράλληλα, η καταλληλότητά τους ως μορίων, τα οποία υπεισέρχονται σε διαδικασίες μεταγωγής μηνύματος, πρέπει να σχετίζεται με ορισμένα πλεονεκτήματα. Χαρακτηριστικά πλεονεκτήματα είναι η ικανότητα των κυττάρων να παράγουν και να εξουδετερώνουν τις ROS σε πολύ μικρούς χρόνους και ο υψηλός βαθμός ελέγχου της τοπικής παραγωγής ROS στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα. Οι ROS μπορούν να μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις ενώ η ύπαρξη μορφών με διαφορετικές ιδιότητες, όπως ο χρόνος ημιζωής, η σταθερότητα και η ικανότητα μεταφοράς δια μέσου των μεμβρανών, τους προσδίδει αρκετά μεγάλη ευελιξία. Παράλληλα, η παραγωγή τους είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το μεταβολισμό των κυττάρων και την ομοιόστασή τους. Το γεγονός αυτό τις καθιστά χρήσιμα μόρια για την αντίληψη αλλαγών που συμβαίνουν στον κυτταρικό μεταβολισμό (Mittler και συν. 2011). Ωστόσο, διερευνάται ακόμη ο τρόπος και οι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται η στοχευμένη δράση τους, παρότι οι ROS κινητοποιούν ή επηρεάζουν πολλά διαφορετικά μονοπάτια μεταγωγής μηνύματος, (Møller και Sweetlove 2010).

Λόγω της μικρής διάρκειας ζωής τους, η δραστικότητα των ROS ως μορίων, τα οποία μεταφέρουν κάποιο μήνυμα, εκδηλώνεται σε συνάρτηση με το είδος των βιολογικών μορίων που βρίσκονται κοντά στις θέσεις παραγωγής τους (Dickinson και Chang 2011). Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι ROS αντιδρούν με τα βιολογικά μόρια και μπορούν να προκαλέσουν αντιστρεπτές ή μη αλλαγές σε αυτά ή και να τα καταστρέψουν. Σε κάθε περίπτωση, οι αλλαγές αυτές είναι σε θέση να δρομολογήσουν συγκεκριμένες αποκρίσεις (Bartosz 2009). Οι ROS μπορούν να προκαλέσουν σειρά οξειδωτικών τροποποιήσεων στις

πλευρικές ομάδες αμινοξέων και με τον τρόπο αυτό να επηρεάσουν τη λειτουργία της εκάστοτε πρωτεΐνης.

Η πιο γνωστή και πιο καλά μελετημένη τροποποίηση είναι η οξείδωση των θειολικών ομάδων της κυστεΐνης από το H_2O_2 (Dickinson και Chang 2011). Η οξείδωση αυτή οδηγεί είτε στη δημιουργία σουλφονικών οξέων, είτε δισουλφιδικών δεσμών, έπειτα από αντίδραση με κυστεΐνες άλλων πρωτεϊνών ή με γλουταθειόνη. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί μπορούν να αναχθούν από γλουταρεδοξίνες, θειορρεδοξίνες ή γλουταθειόνη. Για το λόγο αυτό, είναι αντιστρεπτή διαδικασία (Bartosz 2009). Ειδικά, η γλουταθειονυλίωση θεωρείται τόσο συχνή, ώστε να μπορεί να συγκριθεί με τη φωσφορυλίωση (Townsend 2007). Οξείδωση της μεθειονίνης προκαλείται από όλες σχεδόν τις ROS. Είναι αντιστρεπτή, λόγω της παρουσίας αναγωγασών του σουλφοξειδίου της μεθειονίνης (methionine sulfoxide reductases, Cabreiro και συν. 2006).

Επιπλέον, η οξείδωση άλλων αμινοξικών καταλοίπων, όπως της λυσίνης, της αργινίνης ή της ιστιδίνης, οδηγεί στη μετατροπή των αμινομάδων των αμινοξέων σε καρβονυλομάδες, η οποία μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία μίας πρωτεΐνης. Παρότι παραδοσιακά η καρβονυλίωση θεωρείται ως μη αντιστρεπτή τροποποίηση (Møller και συν. 2007), έχει διατυπωθεί η άποψη ότι αποτελεί μέρος των μηχανισμών σηματοδότησης μέσω ROS, αλλά και ότι η αποκαρβονυλίωση είναι εφικτή (Wong και συν. 2008). Εξαιτίας των αποτελεσμάτων της δράσης τους, οι ROS μπορούν να επηρεάζουν μονοπάτια μεταγωγής μηνύματος. Έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα διάφορες οξειδωτικές τροποποιήσεις που συμμετέχουν στη ρύθμιση της λειτουργίας πλήθους πρωτεϊνικών μορίων, όπως υποδοχέων, μεταγραφικών παραγόντων, κινασών, φωσφατασών ή καναλιών μεταφοράς ιόντων (Bartosz 2009).

1.1.7.4 Η αντίληψη των ROS από τα κύτταρα

Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι η περισσότερο μελετημένη κατηγορία πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία συμμετέχουν στις αποκρίσεις, οι οποίες επάγονται από την αύξηση των επιπέδων των ROS. Μεταγραφικοί παράγοντες που ανταποκρίνονται στις αλλαγές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων έχουν βρεθεί σε αρκετές κατηγορίες οργανισμών, ακόμη και σε βακτήρια (Brigelius-Flohé και Flohé, 2011). Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα στα φυτά αποτελεί η πρωτεΐνη TGA1, η οποία αλληλεπιδρά με τον συμπάραγοντα NPR1 (Nonexpressor of Pathogenesis-Related genes 1), δρομολογώντας τις αποκρίσεις σε βιοτικές καταπονήσεις ή ορμονικά ερεθίσματα που προκαλούν μεταβολές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη NPR1 βρίσκεται σε οξειδωμένη μορφή στο κυτόπλασμα, όπου σχηματίζει ολιγομερή. Η αλλαγή στην οξειδοαναγωγική κατάσταση προκαλεί την αναγωγή της από μία θειορρεδοξίνη, γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μονομερών μορφών της NPR1. Οι

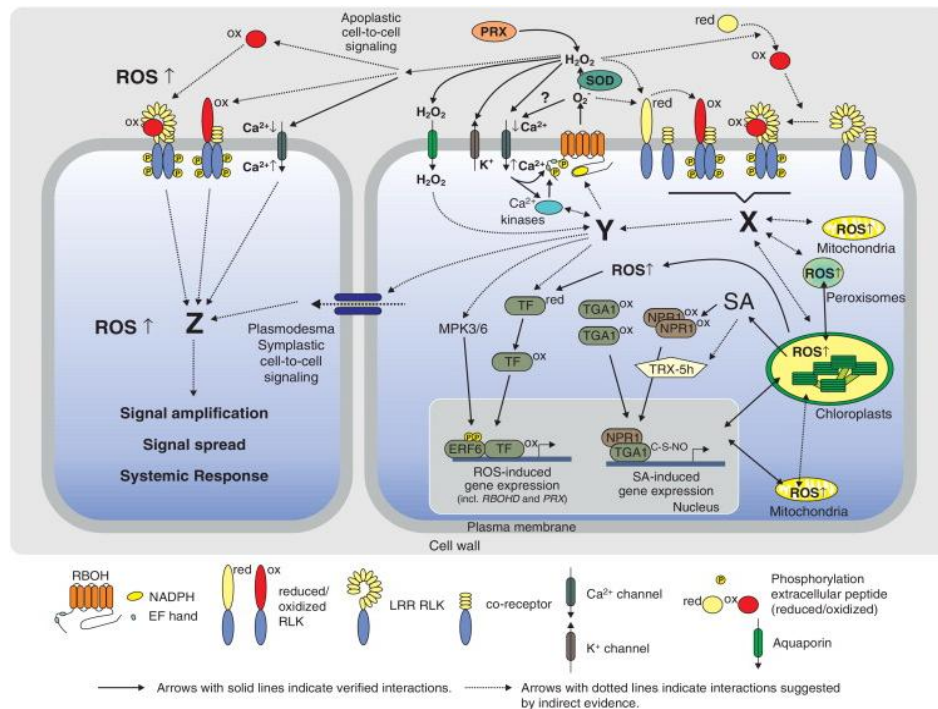
μονομερείς αυτές μορφές εισέρχονται στον πυρήνα (Σχήμα 8, Wrzaczek και συν. 2013). Παράλληλα, η πρωτεΐνη TGA1 υφίσταται μια άλλη κατηγορία οξειδωτικής τροποποίησης, εκείνη της νιτροζυλίωσης των καταλοίπων κυστεΐνης (S-nitrosylation, Wrzaczek και συν. 2013). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, αυτή προστατεύει τις κυστεΐνες από άλλες τροποποιήσεις και ευνοεί την δέσμευση της TGA1 στο DNA (Lindemayer και συν. 2010). Η ρύθμιση της λειτουργίας μεταγραφικών παραγόντων, μέσω του ελέγχου της κατάστασης καταλοίπων κυστεΐνης, πραγματοποιείται και σε άλλα μέλη της οικογένειας TGA (Wrzaczek και συν. 2013).

Μία σειρά μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζεται με παρόμοιο τρόπο, όπως για παράδειγμα ο ANAC089, ο RAP2.4a και ο R2R3. Η ενεργοποίηση του ANAC089 έχει άμεση σχέση με την αντίληψη της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων. Η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται με το πλασμαλήμμα. Η επικράτηση ισχυρών αναγωγικών συνθηκών στα κύτταρα προκαλεί την απελευθέρωσή της και τη μετακίνησή της στον πυρήνα. Εκεί προσδένεται στο DNA, μέσω μίας επικράτειας που διαθέτει στο αμινοτελικό άκρο, και καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου της υπεροξειδάσης του ασκορβικού οξέος, ένζυμου, το οποίο εντοπίζεται στο στρώμα των χλωροπλαστών (Klein και συν. 2012). Οι RAP2.4 και R2R3, η ενεργοποίηση των οποίων εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων, επίσης προσδένονται στο DNA, μέσω bZIP και MYB επικρατειών αντίστοιχα, και με τον τρόπο αυτό ρυθμίζουν τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων (Wrzaczek και συν. 2013). Ο RAP2.4 μάλιστα, ενεργοποιείται από ROS και η παρουσία του στον πυρήνα προκαλεί τη μεταγραφή αντιοξειδωτικών γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα, τα οποία εντοπίζονται στα πλαστίδια (Shaikhali και συν. 2008).

Μία άλλη κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων, η λειτουργία των οποίων σχετίζεται επίσης με την παραγωγή ROS, είναι αυτή των παραγόντων του θερμικού σοκ (Heat Shock Factors). Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η πρόσφατη διαπίστωση στο φυτό *A. thaliana* ενός μεταγραφικού παράγοντα θερμοκρασιακού σοκ (HsfA1, heat shock factor A1), ο οποίος ενεργοποιείται όταν μεταβάλλεται η οξειδοαναγωγική του κατάσταση, μετά από έκθεση σε διαφόρους τύπους καταπόνησης, όπως η υψηλή θερμοκρασία, οι αλλαγές του pH και η επίδραση με H₂O₂ (Liu και συν. 2013).

Τα τελευταία χρόνια πληθαίνουν οι πληροφορίες σχετικά με νέους μηχανισμούς ρύθμισης από τις ROS της δραστηριότητας άλλων λειτουργικών πρωτεϊνικών ομάδων που αφορούν στα φυτικά κύτταρα. Για παράδειγμα, απενεργοποιείται μία ATPάση τύπου V που βρίσκεται στον τονοπλάστη, όταν οξειδωθεί ένα συγκεκριμένο κατάλοιπο κυστεΐνης. Το ίδιο συμβαίνει και με μία κινάση των χλωροπλαστών που ονομάζεται cPK2 (Wrzaczek και συν. 2013). Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν τα πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση μίας πρωτεΐνης μπορεί να επηρεάζεται από την οξειδωτική της κατάσταση, συγκεκριμένα ότι η φωσφορυλίωση που καταλύεται από κινάσες Ser/Thr εξαρτάται από την

αναγνώριση ενός υδρόφοβου αμινοξικού καταλοίπου. Στο φυτό *A. thaliana*, για παράδειγμα, η νιτρική αναγωγή φωσφορυλιώνεται από μία CDPK. Σε αυτή την περίπτωση, το υδρόφοβο κατάλοιπο της νιτρικής αναγωγής είναι η μεθειονίνη. Όταν αυτή οξειδωθεί, π.χ. έπειτα από επίδραση με H_2O_2 , αναστέλλεται η φωσφορυλίωση από CDPKs (Hardin και συν. 2009).



Σχήμα 8. Διαγραμματική απεικόνιση μηχανισμών αντίληψης των επιπέδων των ROS. Τροποποιημένο από: Wrzaczek και συν. (2013).

Εκτός όμως από τις πρωτεΐνες οι οποίες ανταποκρίνονται στις αλλαγές των επιπέδων των ROS στον πρωτοπλάστη, υπάρχουν και άλλες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αντίληψη των επιπέδων των ROS στον αποπλάστη. Είναι λογικό ότι η κατευθυνόμενη παραγωγή ROS στον αποπλάστη θα πρέπει να συνδέεται με μηχανισμούς που μεταφέρουν αυτή την πληροφορία εντός των κυττάρων. Ωστόσο, είναι λίγες οι διαθέσιμες πληροφορίες γι' αυτούς τους μηχανισμούς (Wrzaczek και συν. 2013). Για παράδειγμα, στο φυτό *A. thaliana*, κάποια κανάλια μεταφοράς καλίου (SKOR, stelar K^+ outward rectifier) τα οποία εδράζονται στο πλασμαλήμμα, θεωρείται ότι συμμετέχουν στην αντίληψη των επιπέδων των ROS. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η είσοδος ιόντων καλίου στο κυτόπλασμα επιτυγχάνεται μόνο έπειτα από αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης των καναλιών, την οποία προκαλούν οι ROS που βρίσκονται στον αποπλάστη (Garcia-Mata και συν. 2010). Ομοίως, έχει δειχθεί ότι η παρουσία όζοντος στον αποπλάστη προκαλεί την είσοδο ιόντων ασβεστίου στο κυτόπλασμα, έπειτα από ενεργοποίηση καναλιών μεταφοράς ασβεστίου, που πραγματοποιείται με τρόπο αντίστοιχο με εκείνο των καναλιών SKOR (Kangasjärvi και Kangasjärvi 2014). Τα μόρια του όζοντος μπορούν να προκαλέσουν επίσης την ενεργοποίηση

RLKs (Receptor Like Kinases), λόγω του ότι οι πρωτεΐνες αυτές φέρουν μεγάλο αριθμό κυστεϊνών στο τμήμα του μορίου, το οποίο βρίσκεται στον αποπλάστη (Σχήμα 8, Wzaczek και συν. 2010). Παράλληλα, το γεγονός ότι διάφορες πρωτεΐνες, οι οποίες εκκρίνονται από τον πρωτοπλάστη μέσω εξωκύτωσης είναι πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης, τις καθιστά πιθανούς υποδοχείς ή αισθητήρες της παρουσίας ROS στον αποπλάστη, χωρίς ωστόσο να έχει επιβεβαιωθεί αυτό το ενδεχόμενο (Wzaczek και συν. 2013). Τέλος, πιστεύεται ότι η ρύθμιση των υδατοπορινών, που θεωρείται ότι ευθύνονται για την είσοδο H_2O_2 από τον αποπλάστη στο συμπλάστη, εξαρτάται από τις ROS, κατ' αντιστοιχία του μηχανισμού αντίληψης των ROS που παράγονται από την NADPH-οξειδάση στα κύτταρα θηλαστικών (Kangasjärvi και Kangasjärvi 2014).

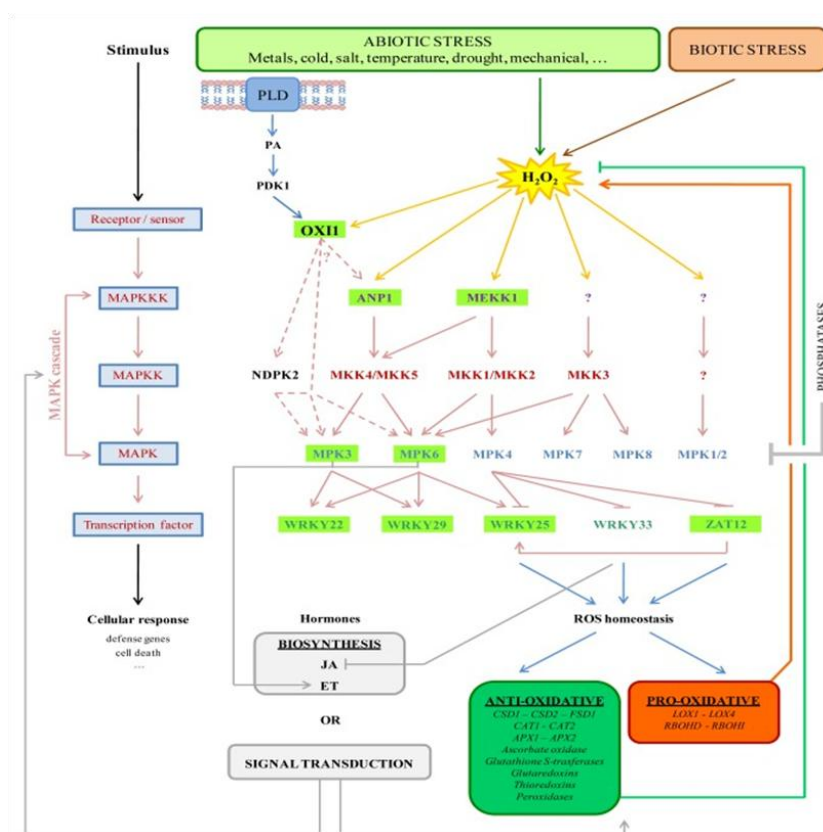
1.1.7.5 Μηχανισμοί μεταγωγής μηνύματος

1.1.7.5.1 MAPKs

Οι μηχανισμοί σηματοδότησης που σχετίζονται με τις ROS εντάσσονται σε διάφορα μονοπάτια μεταγωγής μηνύματος. Αυτά περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, μεταβολικά μονοπάτια, μονοπάτια πρωτεϊνικών κινάσεων και μηχανισμούς σηματοδότησης του ασβεστίου. Ένα από τα πιο καλά μελετημένα παραδείγματα της σύνδεσης των ROS με τους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος είναι τα μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPKs, Mitogen Activated Protein Kinase). Διάφορα πειραματικά δεδομένα δείχνουν αφενός ότι οι ROS ενεργοποιούν μονοπάτια σηματοδότησης MAPKs και αφετέρου ότι οι ROS παράγονται ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ενός MAPK μονοπατιού (Pitzschke και συν. 2009α, Mittler και συν. 2011). Σε καθένα μονοπάτι MAPK συμμετέχουν τουλάχιστον μία MAPK κινάση κινάση (MAPKKK), μία MAPK κινάση (MAPKK) και μία MAPK. Η ενεργοποίηση μίας MAPKKK προκαλεί τη μεταγωγή του μηνύματος μέσω φωσφορυλίωσης της MAPKK, η οποία με τη σειρά της καταλύει τη φωσφορυλίωση της MAPK (Pitzschke και συν. 2009α). Οι MAPKs στοχεύουν στη συνέχεια διάφορες πρωτεΐνες, όπως άλλες κινάσες, ένζυμα ή μεταγραφικούς παράγοντες (Suarez Rodriguez και συν. 2010). Στο γονιδίωμα του φυτού *A. thaliana* περιέχονται γονίδια που κωδικοποιούν περισσότερες από 60 MAPKKKs, 20 MAPKKs και 10 MAPKs (Xu και Zhang 2015).

Ανάλογα με το ερέθισμα που δέχονται τα κύτταρα ή το αναπτυξιακό τους στάδιο, οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να δρουν σε μονοπάτια MAPKs, αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους σε διάφορους συνδυασμούς (MAPK group, Ichimura και συν. 2002). Η επίδραση με H_2O_2 προκαλεί την ενεργοποίηση των MAPKs, MPK3 και MPK6 (Σχήμα 9). Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του H_2O_2 σε πρωτοπλάστες κυττάρων φύλλου του φυτού *A. thaliana* έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μίας MAPKKK, της ANP1 (*Arabidopsis* Nicotiana Protein kinase 1-like). Το γεγονός αυτό σχετίζεται με την έναρξη σειράς

φωσφορυλιώσεων, οι οποίες τελικά ενεργοποιούν τις MPK3 και MPK6 (Kontun και συν. 2000). Οι τελευταίες δύο MAPKs μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν από τις MAPKKs, MKK4 και MKK5. Είναι ενδιαφέρον ότι, έπειτα από επίδραση με H_2O_2 , αυτές οι MAPKKs με τη δραστηριότητά τους ενεργοποιούν τις MPK3/MPK6, αλλά συμμετέχουν και σε ένα κύκλο ανάδρασης, ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή H_2O_2 , λόγω της ενεργοποίησης των MPK3/MPK6 (Ren και συν. 2002, Colcombet και Hirt 2009). Ωστόσο, ενεργοποίηση των MPK3 και MPK6 από το H_2O_2 μπορεί να επιτευχθεί και έπειτα από την αλληλεπίδρασή τους με την κινάση NDPK2 (Σχήμα 9, Nucleoside-diphosphate kinase 2). Μάλιστα, στην περίπτωση αυτή έχει αναφερθεί ότι η απόκριση γίνεται προς την κατεύθυνση της μείωσης των επιπέδων του H_2O_2 (Moon και συν. 2003). Μία επιπλέον πρωτεϊνική κινάση, η οποία ονομάζεται OXI1 (oxidative signal Induced 1), είναι και αυτή ικανή να προκαλέσει την ενεργοποίηση των MPK3 και MPK6 (Rentel και συν. 2004). Είναι ενδιαφέρον ότι η ενεργοποίηση της OXI1 καταλύεται από την PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1, κινάση εξαρτώμενη από φωσφοϊνοσιτίδια 1), η οποία ενεργοποιείται από την παρουσία PA (Opdenakker και συν. 2012).



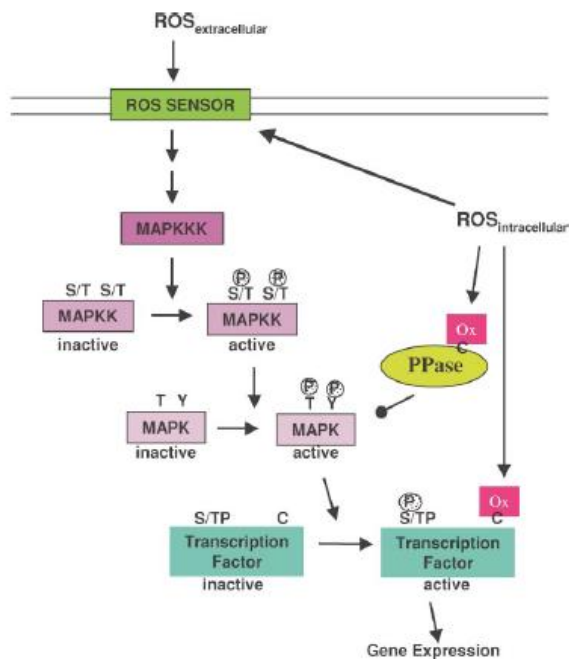
Σχήμα 9. Διαγραμματική απεικόνιση των κυριότερων μονοπατιών μεταγωγής μηνύματος που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση MAPKs. Τροποποιημένο από: Opdenakker και συν. (2012).

Ένα άλλο μονοπάτι MAPK, που επάγεται από το H_2O_2 , είναι το μονοπάτι MEKK1-MKK1/2-MPK4 (Σχήμα 9, Colcombet και Hirt 2009), το οποίο λειτουργεί ως ένας από τους πολύ σημαντικούς συντελεστές των μηχανισμών μεταγωγής μηνύματος που σχετίζονται με τις ROS και ειδικότερα με την ομοιόστασή τους. Η MEKK1 είναι μία MAPKKK η οποία, εκτός των άλλων, μπορεί να ενεργοποιήσει και τις MPK3 και MPK6, ενώ είναι απολύτως απαραίτητη για την ενεργοποίηση της MPK4 (Σχήμα 9). Φυτά *Arabidopsis*, τα οποία στερούνται της δράσης της MEKK1 και της MPK4 έχουν παρόμοιο φαινότυπο, ενώ διαφέρουν από τα μεταλλάγματα *mpk3* και *mpk6* (Nakagami και συν. 2006). Στα φυτά αυτά, εκτός των άλλων προβλημάτων που εμφανίζουν ως προς την ανάπτυξη, ανιχνεύονται πολύ υψηλά επίπεδα ROS. Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων στα μεταλλάγματα *mekk1*, *mpk1/2* και *mpk4* με τη βοήθεια μικροσυστοιχιών αποκάλυψε ότι διαταράσσεται το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με τις αποκρίσεις στην παραγωγή ROS, αλλά και εκείνων που αφορούν σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Pitzschke και συν. 2009β). Ένα ακόμη μονοπάτι που ενεργοποιείται από την παραγωγή ROS είναι το MKK3-MPK7. Ειδικότερα, σε πρωτοπλάστες *A. thaliana* βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση της MPK7 πραγματοποιείται όταν η συγκέντρωση H_2O_2 υπερβεί κάποια επίπεδα και εξαρτάται από την ενεργοποίηση της MKK3 (Doczi και συν. 2007). Ασφαλώς, εκτός από τα κύρια αυτά μονοπάτια μεταγωγής μηνύματος, στα οποία εμπλέκονται οι ROS, υπάρχουν και άλλα που περιλαμβάνουν τη συμμετοχή και άλλων MAPKs.

Η δραστηριότητα των μονοπατιών μεταγωγής μηνύματος MAPK τερματίζεται από άλλες πρωτεΐνες που ονομάζονται φωσφατάσες (Σχήμα 9) και έχουν την ικανότητα να αποφωσφορυλιώνουν τα φωσφορυλιωμένα αμινοξικά κατάλοιπα. Χωρίζονται σε κατηγορίες, με κριτήριο τα κατάλοιπα τα οποία μπορούν να αποφωσφορυλιώσουν. Με βάση την κατηγοριοποίηση αυτή έχουν προκύψει τρεις ομάδες φωσφατάσων, οι φωσφατάσες τυροσίνης, σερίνης-θρεονίνης και οι φωσφατάσες που έχουν διπλή ειδικότητα και μπορούν να αποφωσφορυλιώσουν κατάλοιπα τυροσίνης και σερίνης-θρεονίνης. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στην τελευταία ομάδα φωσφατάσων, η οποία στο γονιδίωμα του φυτού *A. thaliana* αριθμεί πέντε μέλη, καθώς για την πλήρη απενεργοποίηση των MAPKs είναι απαραίτητη η αποφωσφορυλίωση και των δύο παραπάνω καταλοίπων (Bartels και συν. 2010). Σε *in vitro* πειράματα έχειδειχθεί ότι μια από τις φωσφατάσες αυτές, η DsPTP1 (Dual-specificity protein tyrosine phosphatase 1) αποφωσφορυλιώνει την MPK4. Αντίστοιχα, η MKP2 (MAPK Phosphatase 2, φωσφατάση MAPK 2) καταλύει την αποφωσφορυλίωση των MPK3 και MPK6. Όπως έχειδειχθεί σε πειράματα διπλού υβριδισμού σε σακχαρομύκητες (yeast two hybrid), η PTP1 αποφωσφορυλιώνει επίσης την MPK6 (Andreasson και Ellis 2010). Επιπλέον, με την ίδια πειραματική διαδικασία βρέθηκε ότι η MKP1 (MAP Kinase Phosphatase 1) μπορεί και αλληλεπιδρά με τις MPK3, MPK4 και MPK6, ενώ έχει διαπιστωθεί η ικανότητά της να απενεργοποιεί την MPK6 σε πρωτοπλάστες (Bartels και συν. 2010).

1.1.7.5.2 Μεταγραφικοί παράγοντες

Σε προηγούμενη ενότητα, συζητήθηκε η απευθείας επίδραση της παραγωγής ROS στη λειτουργία μεταγραφικών παραγόντων, μέσω οξειδωτικών τροποποιήσεων. Εκτός αυτού, ένα από τα βήματα που ακολουθούν την ενεργοποίηση των MAPK μονοπατιών από τις ROS είναι η στρατολόγηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με τη ρύθμιση της μεταγραφής (Σχήμα 10). Είναι γνωστό ότι η έκφραση αρκετών κατηγοριών μεταγραφικών παραγόντων, όπως μελών των πρωτεϊνικών οικογενειών WRKY, Zat, RAV, GRAS και MYB, επάγεται από τις ROS μέσω μηχανισμών μεταγωγής μηνύματος (Mittler και συν. 2004).

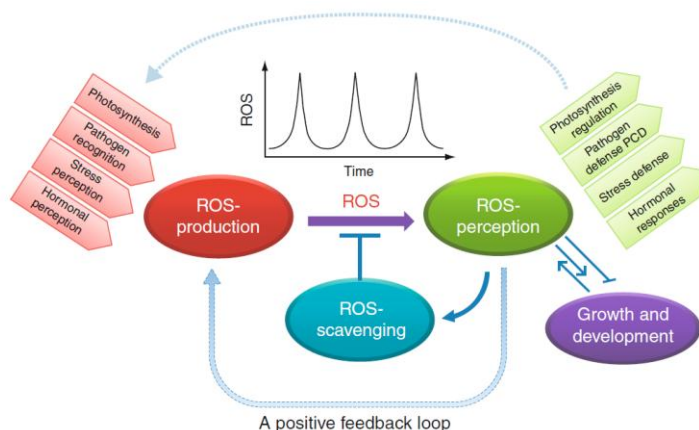


Σχήμα 10. Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών αντίληψης των επιπέδων των ROS και των μηχανισμών μεταγωγής σήματος, οι οποίοι επάγονται από αυτές και σχετίζονται με τη ρύθμιση της μεταγραφής. Τροποποιημένο από: Apel και Hirt (2004).

Οι πρωτεΐνες WRKY οφείλουν την ονομασία τους στο γεγονός ότι περιέχουν την αλληλουχία WRKY (Trp-Arg-Lys-Tyr). Προσδένονται στο DNA στα W-μοτίβα (W-box) και ρυθμίζουν θετικά ή αρνητικά την έκφραση των γονιδίων-στόχων (Euglem και συν. 2000). Η οικογένεια αυτών των μεταγραφικών παραγόντων είναι πολυπληθής και μόνο στο φυτό *A. thaliana* αριθμεί περισσότερα από 74 μέλη (Euglem και Somssich 2007). Οι WRKY διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις αποκρίσεις σε διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις, συμπεριλαμβανομένης και της οξειδωτικής καταπόνησης (Miller και συν. 2008). Δεδομένα από την ανάλυση των μεταγραφημάτων με τη βοήθεια μικροσυστοιχιών, έπειτα από επίδραση με μονήρες οξυγόνο, όζον και $O_2^{\cdot-}$, έδειξαν ότι επάγεται η έκφραση του γονιδίου της WRKY22 (Gadjev και συν. 2006). Επίσης, έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων πρωτεΐνης WRKY22, μετά την επίδραση με H_2O_2 (Zhou και συν. 2011). Η WRKY22, όπως και η ομόλογη της WRKY29, ενεργοποιούνται από μονοπάτια MAPK, όπως για παράδειγμα το MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 (Opdenakker και συν. 2012). Έχει δειχθεί ότι ένα

άλλο μέλος της οικογένειας, η WRKY53, αλληλεπιδρά απευθείας με την MEKK1 (Miao και συν. 2007). Μάλιστα, η WRKY53 εμπλέκεται και στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με αντιοξειδωτική δράση (Miao και συν. 2004). Ωστόσο, η αύξηση της έκφρασης αντιπροσωπευτικών μελών της οικογένειας WRKY υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης εξαρτάται και από τη δραστηριότητα άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Για παράδειγμα, η WRKY25 ενεργοποιείται μετά τη μεσολάβηση της πρωτεΐνης Zat12 (Rizhsky και συν. 2004).

Η οικογένεια πρωτεϊνών Zat (Zing finger of *A. thaliana*) περιλαμβάνει περισσότερα από 20 μέλη, τα οποία λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Το όνομά τους οφείλεται στην παρουσία ενός συγκεκριμένου μοτίβου στο μόριο τους που ονομάζεται δάκτυλος ψευδαργύρου (zing finger). Διάφορα μέλη της θεωρείται ότι συμμετέχουν στη σηματοδότηση που επάγεται από τις ROS (Miller και συν. 2008). Για παράδειγμα, έχειδειχθεί ότι η υπερέκφραση των γονιδίων των πρωτεϊνών Zat12 και Zat10 σχετίζεται με τη ρύθμιση της έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα. Πολλά από αυτά τα γονίδια φαίνεται ότι επάγονται και έπειτα από την επίδραση με H_2O_2 , η οποία παράλληλα έχειδειχθεί ότι προκαλεί την αύξηση των μεταγράφων των Zat12 και Zat10, αλλά και άλλων μελών των Zat, όπως της πρωτεΐνης Zat7 (Rizhsky και συν. 2004, Davletova και συν. 2005). Ωστόσο, αρκετές άλλες κατηγορίες μεταγραφικών παραγόντων σχετίζονται με την απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση. Μάλιστα, η ανάλυση δεδομένων, τα οποία έχουν προκύψει με τη βοήθεια μικροσυστοιχιών, αποκάλυψε ότι το πρότυπο της έκφρασης περισσότερων των 500 μεταγραφικών παραγόντων αλλάζει έπειτα από επίδραση με ROS (Gadjiev και συν. 2006). Η επαγωγή συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, ως απόκριση στην παραγωγή ROS, συχνά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες αναπτυξιακές και άλλες βιολογικές διεργασίες, στις αποκρίσεις σε ορμονικά ερεθίσματα, όπως και στις αποκρίσεις έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Kim και συν. 2009, Σχήμα 11). Επιπλέον, η παραγωγή ROS εμπλέκεται, μεταξύ άλλων, στην προώθηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Kim και συν. 2009, Σχήμα 11).



Σχήμα 11. Η παραγωγή ROS επάγεται από ποικίλα ερεθίσματα και συγχρόνως μπορεί και επηρεάζει διάφορες βιολογικές διεργασίες. Τροποποιημένο από: Kim και συν. (2009).

1.1.7.6 Η συμμετοχή των ROS σε βιολογικές διεργασίες των φυτών

1.1.7.6.1 ROS και έλεγχος του κυτταρικού κύκλου

Ο κυτταρικός κύκλος είναι ένας βασικός κυτταρικός μηχανισμός, στον οποίο φαίνεται να εμπλέκονται οι ROS. Διάφορα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι, τόσο στους ζωικούς όσο και στους φυτικούς οργανισμούς, η οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων σχετίζεται με την πορεία του κυτταρικού κύκλου (Vivancos και συν. 2010). Στους ζωικούς οργανισμούς έχουν μελετηθεί εκτενέστερα οι μηχανισμοί που διέπουν την ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου που επάγεται από τις ROS (Considine και Foyer 2014). Στα φυτά είναι γνωστό ότι οι συγκεντρώσεις των ROS και διαφόρων αντιοξειδωτικών ενώσεων παρουσιάζουν διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Potters και συν. 2002, Vivancos και συν. 2010). Επίσης, έχειδειχθεί ότι, σε καλλιέργεια πρωτοπλαστών από κύτταρα φύλλων του φυτού *Medicago sativa*, η μετάβαση των κυττάρων από τη φάση ηρεμίας G_0 στη G_1 απαιτεί την παραγωγή ROS, η οποία σχετίζεται με την ενεργοποίηση κινάσων που εξαρτώνται από κυκλίνες (cyclin dependent kinases, κυκλίνο-εξαρτώμενες κινάσες, CDKs). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η παραγωγή των ROS επάγεται από τη δράση μίας φυτοορμόνης, της αυξίνης (Fehér και συν. 2008). Παράλληλα, στα σημεία ελέγχου της μετάβασης του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G_1 στην S , αλλά και από τη φάση S στη G_2 , παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης των ROS, η οποία ακολουθείται από την ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Potters και συν. 2002, Kadota και συν. 2005). Οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης του H_2O_2 σε κύτταρα καλλιεργειών από το φυτό *Nicotiana tabacum* σχετίζονται με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου και έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση καναλιών ασβεστίου, τα οποία προκαλούν ελεγχόμενη είσοδο ιόντων ασβεστίου στο κυτόπλασμα (Kadota και συν. 2005).

Σε αντιστοιχία με ό,τι ισχύει για τους ζωικούς οργανισμούς, φαίνεται ότι και στα φυτά η αύξηση της συγκέντρωσης των ROS στη φάση G_1 σχετίζεται με την ενεργοποίηση μηχανισμών μεταγωγής μηνύματος, οι οποίοι προωθούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Menon και Goswami 2007, Vivancos και συν. 2010). Σε καλλιέργειες κυττάρων *A. thaliana* έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση των ROS συμπίπτει χρονικά με τη συσσώρευση γλουταθειόνης στον πυρήνα. Το γεγονός αυτό θεωρείται μέρος των μηχανισμών ρύθμισης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του πυρήνα, οι οποίοι εξασφαλίζουν ότι η αντιγραφή του DNA θα λάβει χώρα σε περιβάλλον απαλλαγμένο από τον κίνδυνο οξειδωτικής καταπόνησης (Vivancos και συν. 2010). Η επίδραση με menadione (μεναδιόνη, MEN), μία ουσία που προκαλεί οξειδωτική καταπόνηση (βλέπε παρακάτω), σταματά τη μετάβαση των κυττάρων από τη G_1 στη φάση S και επηρεάζει τη σύνθεση του DNA, επιβραδύνοντας την ολοκλήρωσή της (Reichheld και συν. 1999). Το γεγονός ότι οι ROS επηρεάζουν τόσο αποφασιστικά την πορεία του κυτταρικού κύκλου, θετικά ή αρνητικά, μπορεί ως ένα βαθμό να ερμηνεύσει διάφορες παρατηρήσεις που αφορούν στα κύτταρα του κέντρου ηρεμίας του ακραίου

μεριστώματος της ρίζας (Considine και Foyer 2014). Ενώ η δομή των κυττάρων του κέντρου ηρεμίας δεν διαφέρει από εκείνη των υπολοίπων κυττάρων του ακραίου μεριστώματος, τα περισσότερα από αυτά βρίσκονται στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου και παρουσιάζουν χαμηλό ρυθμό κυτταροδιαιρέσεων. Οι συγκεντρώσεις των ιόντων O₂⁻ και του H₂O₂ σε αυτά είναι αρκετά μεγαλύτερες σε σύγκριση με εκείνες των γειτονικών μεριστωματικών κυττάρων, τα οποία παρουσιάζουν υψηλό ρυθμό κυτταροδιαιρέσεων (Jiang και συν. 2003). Συγχρόνως, στα κύτταρα αυτά οι συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης και του ασκορβικού οξέος είναι χαμηλές (Kerk και συν. 2000). Συνεπώς, η ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων του ακραίου μεριστώματος της ρίζας σχετίζεται και με τη διατήρηση της ταυτότητας των κυττάρων (Considine και Foyer 2003).

I.1.7.6.2 ROS και ανάπτυξη της ρίζας

Εκτός από τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, οι ROS εμπλέκονται και στη διαφοροποίηση των κυττάρων της ρίζας. Ειδικότερα, στη ρίζα του φυτού *A. thaliana* ο λόγος της συγκέντρωσης O₂⁻ προς H₂O₂ σχετίζεται άμεσα με τη διαφοροποίηση. Στα κύτταρα της ζώνης επιμήκυνσης εντοπίζεται περισσότερο H₂O₂ και λιγότερα ιόντα O₂⁻. Αντίθετα, περισσότερα ιόντα O₂⁻ συσσωρεύονται στα κύτταρα του μεριστώματος (Tsukagoshi και συν. 2010). Η διατήρηση αυτής της διαβάθμισης σχετίζεται με τη δραστηριότητα ενός μεταγραφικού παράγοντα που ονομάζεται UPBEAT1, ο οποίος ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση γονιδίων υπεροξειδασών. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μετάλλαγμα του φυτού *Arabidopsis*, το οποίο στερείται της δράσης αυτού του μεταγραφικού παράγοντα, το πρότυπο της κατανομής των ROS στη ρίζα αντιστρέφεται και σε αυτή ο αριθμός των μεριστωματικών κυττάρων είναι αυξημένος (Tsukagoshi και συν. 2010). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας εντοπίζεται και στις καταβολές των πλάγιων ριζών. Στη θέση αυτή παράγονται επίσης O₂⁻ και H₂O₂, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ROS εμπλέκονται και στη δημιουργία πλάγιων ριζών (Manzano και συν. 2014, βλέπε παρακάτω).

Παράλληλα, η χρήση εξειδικευμένων αναστολέων της παραγωγής ROS και τεχνικών εντόπισής τους, έδειξε ότι η παραγωγή ROS από τις NADPH-οξειδάσες σχετίζεται με την ανάπτυξη των φύλλων και της ρίζας του φυτού *Zea mays* (Rodríguez και συν. 2002, Liskay και συν. 2004). Πειραματικά δεδομένα από μεταλλάγματα *Arabidopsis*, τα οποία στερούνται κάποιων NADPH-οξειδασών, αποκάλυψε ότι η αναστολή της παραγωγής ROS επηρεάζει την ανάπτυξη των φυτών (Swanson και Gilroy 2010). Για παράδειγμα, τα φυτά *rhd2* (*root hair defective 2*), από τα οποία απουσιάζει η δραστηριότητα της NADPH-οξειδάσης AtRbohC, έχουν 20% πιο κοντές ρίζες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των φυτών άγριου τύπου (Foreman και συν. 2003). Ωστόσο, το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των φυτών αυτών είναι η παρουσία ριζικών τριχιδίων μικρού μήκους. Ο ρόλος που διαδραματίζουν οι ROS στην καθιέρωση της κορυφαίας αύξησης έχει μελετηθεί διεξοδικά. Πρόκειται για μία

από τις πιο καλά θεμελιωμένες περιπτώσεις συμμετοχής των ROS στην κυτταρική μορφογένεση των φυτών (Swanson και Gilroy 2010).

I.1.7.6.3 ROS και κορυφαία αύξηση

Το γονίδιο *RHD2* κωδικοποιεί μία NADPH-οξειδάση όμοια με την *gp91^{phox}* των θηλαστικών (Foreman και συν. 2003). Αν και η πρωτεΐνη αυτή παράγεται σε όλα τα κύτταρα της ζώνης επιμήκυνσης της ρίζας, έχει ιδιαίτερη παρουσία στους τριχοβλάστες, δηλαδή στα κύτταρα που θα δημιουργήσουν τα ριζικά τριχίδια. Συγκεκριμένα, εντοπίζεται στο πολικό άκρο του τριχοβλάστη, όπου θα σχηματιστεί το ριζικό τριχίδιο, παραμένει σταθερά στην κορυφαία περιοχή του αναπτυσσόμενου ριζικού τριχιδίου και εξαφανίζεται μετά την περάτωση της ανάπτυξής του (Takeda και συν. 2008). Αντίστοιχα, οι ROS συσσωρεύονται αρχικά στη θέση δημιουργίας των ριζικών τριχιδίων και εν συνεχεία στην κορυφή των αναπτυσσόμενων ριζικών τριχιδίων (Foreman και συν. 2003, Carol και συν. 2005). Στη ριζοδερμίδα του μεταλλάγματος *rhd2*, το οποίο στερείται πλήρως της δράσης της NADPH-οξειδάσης, οι τριχοβλάστες δημιουργούν κυτταρική προεκβολή, η οποία όμως στη συνέχεια αποτυγχάνει να επιμηκυνθεί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άτυπων ριζικών τριχιδίων, τα οποία είναι διογκωμένα και κοντά (Foreman και συν. 2003). Συγχρόνως, διαταράσσεται το πρότυπο κατανομής των ROS στους τριχοβλάστες και τα ριζικά τριχίδια των *rhd2* μεταλλαγμάτων. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι, μετά από επίδραση με diphenylene iodonium (DPI), ουσία που αναστέλλει τη δραστηριότητα των NADPH-οξειδασών (βλέπε παρακάτω), τα ριζικά τριχίδια που δημιουργούνται σε φυτά αγρίου τύπου, είναι συγκρίσιμα με εκείνα του μεταλλάγματος (Foreman και συν. 2003). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η τοπική παραγωγή ROS από τις NADPH-οξειδάσες είναι απαραίτητη για την καθιέρωση της κορυφαίας αύξησης κατά την ανάπτυξη των ριζικών τριχιδίων (Carol και Dolan 2006).

Ένα άλλο πρωτεϊνικό μόριο, σημαντικό για την πορεία δημιουργίας των ριζικών τριχιδίων, είναι η κινάση της 3-φωσφορικής φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase). Η ανάσχεση της δραστηριότητας της PI3K, με τη χρήση του εξειδικευμένου αναστολέα LY294002, προκαλεί μείωση των επιπέδων των ROS στα αναπτυσσόμενα ριζικά τριχίδια, με συνέπεια τα επηρεασμένα ριζικά τριχίδια να μοιάζουν μορφολογικά με εκείνα του *rhd2* μεταλλάγματος (Lee και συν. 2008). Είναι ενδιαφέρουσα η διαπίστωση ότι η PI3K και το προϊόν που παράγεται από την καταλυτική δραστηριότητά της, η 3-φωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PIP₃, phosphatidylinositol-3-phosphate), σχετίζονται με την ενεργοποίηση των NADPH-οξειδασών (Liu και συν. 2012α). Επιπλέον, οι ROS που παράγονται από τη δραστηριότητα των NADPH-οξειδασών έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση καναλιών ασβεστίου του πλασμαλήμματος (Foreman και συν. 2003). Η παρουσία ιόντων ασβεστίου στην κορυφή του αναπτυσσόμενου ριζικού τριχιδίου προκαλεί, μεταξύ άλλων, και την ενεργοποίηση των NADPH-οξειδασών (βλέπε ενότητα I.1.5.5.4),

γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ενός ρυθμιστικού μηχανισμού ανάδρασης στις περιοχές όπου λαμβάνει χώρα η κορυφαία αύξηση των ριζικών τριχιδίων (Takeda και συν. 2008).

Η ανάγκη της στοχευμένης παραγωγής ROS, κατά την ανάπτυξη διαφόρων κυτταρικών τύπων, φαίνεται ότι υπόκειται σε μεταγραφικό έλεγχο. Για παράδειγμα, ο μεταγραφικός παράγοντας PFT1 (PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1) συμμετέχει στην ομοιοστάση των ROS, ελέγχοντας την έκφραση γονιδίων υπεροξειδασών και NADPH-οξειδασών. Φυτά *Arabidopsis*, στα οποία δεν λειτουργεί ο PFT1, σχηματίζουν κοντά ριζικά τριχίδια. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η επίδραση στα συγκεκριμένα φυτά με H_2O_2 αναστρέφει το φαινότυπό τους και ότι αυτά διαθέτουν ριζικά τριχίδια όμοια με εκείνα του αγρίου τύπου (Sundaravelpandian και συν. 2013).

Η πορεία ανάπτυξης των ριζικών τριχιδίων δεν είναι η μόνη περίπτωση κορυφαίας αύξησης, στην οποία συμμετέχουν οι ROS. Με παρόμοιο τρόπο, τα μόρια αυτά εμπλέκονται και στη διαδικασία ανάπτυξης των γυρεοσωλήνων. Στην κορυφή του αναπτυσσόμενου γυρεοσωλήνα παρατηρείται συσσώρευση ROS αλλά και ιόντων ασβεστίου (Swanson και Gilroy 2010). Σε γυρεοκόκκους από το φυτό *Nicotiana tabacum*, η ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα αναστέλλεται, τόσο μετά την επίδραση με DPI όσο και έπειτα από απενεργοποίηση του γονιδίου μίας NADPH-οξειδάσης, το οποίο εκφράζεται ειδικά στα συγκεκριμένα κύτταρα (Potocký και συν. 2007). Επομένως, η συσσώρευση ROS στο πολικό άκρο και η παραγωγή τους από τις NADPH-οξειδάσες φαίνεται ότι αποτελεί ένα γενικότερο φαινόμενο των κυττάρων που αναπτύσσονται με κορυφαία αύξηση (Swanson και Gilroy 2010).

Εκτός από αυτές τις περιπτώσεις, οι ROS εμπλέκονται και στην ανάπτυξη του ζυγώτη στο φύκος *Fucus serratus*. Στην αναπτυσσόμενη κορυφή των ριζοειδών του ζυγώτη εντοπίζεται διαβάθμιση της συγκέντρωσης των ROS, η οποία συμπίπτει με αντίστοιχη διαβάθμιση της συγκέντρωσης ιόντων Ca^{2+} , ενώ η ανασχεση της παραγωγής ROS προκαλεί αναστολή της πολικής ανάπτυξης του ζυγώτη (Coelho και συν. 2008). Στα αναπτυσσόμενα ριζικά τριχίδια και τους αναπτυσσόμενους γυρεοσωλήνες, οι ROP GTPάσες εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των NADPH-οξειδασών (Carol και συν. 2005, Potocký και συν. 2007). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι ROP GTPάσες παρουσιάζουν πολική κατανομή στα ριζοειδή του φύκου *Fucus distichus* (Fowler και συν. 2004). Επομένως, η συμμετοχή των ROS στην καθιέρωση της κυτταρικής πολικότητας μπορεί να λαμβάνει χώρα μέσω ROP GTPασών.

1.1.7.6.4 ROS, ανάπτυξη του εμβρυοσάκκου και γονιμοποίηση

Η δημιουργία του θηλυκού γαμετοφύτου (εμβρυοσάκκου) των ανωτέρων τραχεοφύτων είναι μία αναπτυξιακή πορεία, η οποία επίσης σχετίζεται με την ομοιοστάση των ROS (Martin και συν. 2013α). Μία MnSOD, η MSD1 εντοπίζεται σε όλο τον εμβρυόσακκο κατά τα αρχικά

στάδια της ανάπτυξής του. Σε ετερόζυγα μεταλλάγματα *Arabidopsis*, στα οποία η δραστηριότητα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι μειωμένη, τα επίπεδα των ROS είναι ιδιαίτερα υψηλά στον αναπτυσσόμενο εμβρυόσακκο (Martin και συν. 2013β). Η ανάπτυξη των εμβρυοσάκκων στα μεταλλαγμένα φυτά διαταράσσεται, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μικρότερος αριθμός πυρήνων σε σύγκριση με εκείνων των εμβρυοσάκκων των φυσιολογικών φυτών. Στην περίπτωση που οι εμβρυόσακκοι κατορθώσουν να φθάσουν στο στάδιο των οκτώ πυρήνων, οι τελευταίοι δεν εμφανίζουν την κατανομή εκείνων του αγρίου τύπου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ανεξέλεγκτη αύξηση των επιπέδων των ROS επηρεάζει και τη μετανάστευσή τους στη σωστή θέση (Martin και συν. 2013α).

Η ανίχνευση ROS σε ώριμους εμβρυοσάκκους φυτών αγρίου τύπου έδειξε ότι στο κεντρικό διαμέρισμα (central cell) του εμβρυοσάκκου τα επίπεδα των ROS είναι πολύ υψηλά. Η παρουσία πολλών μιτοχονδρίων και η απουσία της MSD1 στη θέση αυτή υποστηρίζουν τα παραπάνω ευρήματα (Martin και συν. 2013β, 2014). Η παρουσία ROS στο κεντρικό διαμέρισμα του εμβρυόσακκου έχει συσχετιστεί με τις λειτουργίες που αυτό επιτελεί, συγκεκριμένα, με την καθοδήγηση του γυρεοσωλήνα, την καταστροφή των αντίποδων μετά τη γονιμοποίηση, και τη δημιουργία του ενδοσπερμίου κατά την ανάπτυξη του σπέρματος (Martin και συν. 2013α, 2013β). Πριν από τη γονιμοποίηση, έχει διαπιστωθεί αυξημένη παραγωγή ROS στις συνεργίδες, ενώ μετά την είσοδο του γυρεοσωλήνα δεν ανιχνεύονται ROS στον εμβρυόσακκο (Martin και συν. 2013β). Πρόσφατα, στο φυτό *A. thaliana* βρέθηκε ότι η εντοπισμένη παραγωγή ROS σε περιοχές του εμβρυόσακκου κοντά στη μικροπύλη της σπερματικής βλάστης διευκολύνει τη διάρρηξη της κορυφής του γυρεοσωλήνα, όταν αυτός εισέρχεται στον εμβρυόσακκο. Η πειραματική μείωση των επιπέδων των ROS προκάλεσε ανασχεση της διάρρηξης, με αποτέλεσμα να συνεχίζεται η ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα εντός του εμβρυόσακκου. Επιπροσθέτως, σε πειράματα *in vitro*, βρέθηκε ότι περιβάλλον πλούσιο σε ROS είναι ικανό να προκαλέσει τη διάρρηξη της κορυφής των γυρεοσωλήνων (Duan και συν. 2014). Στην επικοινωνία και αναγνώριση των συνεργίδων από το γυρεοσωλήνα φαίνεται ότι εμπλέκεται μία RLK που ονομάζεται FERONIA και η οποία ενεργοποιείται στην επιφάνεια των συνεργίδων (Escobar-Restrepo και συν. 2007). Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η FERONIA εμπλέκεται, μεταξύ άλλων, στην ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης, μέσω της αλληλεπίδρασής της με ROP GTPάσες. Όπως επιβεβαιώθηκε και μετά την επίδραση με DPI, η παραγωγή ROS μέσω της NADPH-οξειδάσης, είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση των αρσενικών γαμετών στο εσωτερικό του εμβρυοσάκκου και κατ' επέκταση για την πραγματοποίηση της γονιμοποίησης (Duan και συν. 2014).

1.1.7.7 Η συμμετοχή των ROS σε διεργασίες, οι οποίες ελέγχονται από ορμονικά ερεθίσματα

1.1.7.7.1 ROS και λειτουργία στομάτων

Σε αρκετές περιπτώσεις, η συμμετοχή των ROS σε διάφορες βιολογικές διεργασίες των φυτών, ως μορίων μεταγωγής μηνύματος, σχετίζεται με την ύπαρξη ενός ορμονικού ερεθίσματος (Kwak και συν. 2006). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η λειτουργία των στομάτων. Τα φυτά ρυθμίζουν το άνοιγμα και κλείσιμο του στοματικού πόρου διατηρώντας την ισορροπία μεταξύ της απώλειας νερού και της πρόσληψης διοξειδίου του άνθρακα. Η ορμόνη ABA (abscisic acid, αποσχισικό οξύ) επάγει το κλείσιμο των στομάτων, ως απόκριση σε συνθήκες ξηρασίας. Ο μηχανισμός με τον οποίο αυτό επιτυγχάνεται έχει ως βάση τις αλλαγές που προκαλεί το ABA στα ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά διαφόρων καναλιών ιόντων των καταφρακτικών κυττάρων, όπως αντλιών H^+ , καναλιών καλίου, καναλιών ασβεστίου και, πιθανόν, υδατοπορινών (Mori και συν. 2009). Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι η απόκριση των στομάτων στο ABA περιλαμβάνει την επαγόμενη από H_2O_2 ενεργοποίηση καναλιών ασβεστίου (Köhler και συν. 2003). Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι υπεύθυνες για την παραγωγή ROS στα καταφρακτικά κύτταρα, μετά την επίδραση με ABA, ήταν οι NADPH-οξειδάσες AtRbohD και AtRbohF (Kwak και συν. 2006). Στο μηχανισμό ενεργοποίησης των οξειδασών θεωρείται ότι συμμετέχει και η PI3K. Στο φυτό *Vicia faba*, η πειραματική ανάσχεση της καταλυτικής δραστηριότητας της PI3K εμποδίζει το κλείσιμο των στομάτων, έπειτα από επίδραση με ABA. Στην προκειμένη περίπτωση, ο ρόλος της PI3K στην παραγωγή ROS, η οποία είναι απαραίτητη για την απόκριση των στομάτων στο ABA, επιβεβαιώθηκε μετά τη διαπίστωση ότι το εξωγενώς παρεχόμενο H_2O_2 προκαλεί κλείσιμο των στομάτων σε φυτά επηρεασμένα ταυτόχρονα με ABA και αναστολείς της δραστηριότητας της PI3K (Park και συν. 2003). Σε φυτά *Arabidopsis*, στα οποία δεν λειτουργούσε το γονίδιο *PLD1a*, διαπιστώθηκε ότι αντίστοιχο ρόλο στην επαγωγή του κλεισίματος των στομάτων από το ABA διαδραματίζει και η PLD μέσω της παραγωγής PA. Σε φυτά *pld1a*, τα οποία είχαν επηρεαστεί με ABA, ανιχνεύτηκαν μειωμένα επίπεδα ROS στα καταφρακτικά κύτταρα, γεγονός που συνοδευόταν από ανάσχεση του κλεισίματος του στοματικού πόρου (Zhang και συν. 2009). Στην ίδια μελέτη, αναφέρεται ότι το PA δεσμεύεται στην κυτοπλασματική πλευρά της NADPH-οξειδάσης AtRbohD και την ενεργοποιεί (βλέπε ενότητα 1.1.5.5.4). Αν και θεωρείται βέβαιο ότι η παραγωγή ROS συνδέεται με την ενεργοποίηση καναλιών ασβεστίου, ο τρόπος με τον οποίο αυτό επιτυγχάνεται ή ποιες ακριβώς ROS ενεργοποιούν τα κανάλια ασβεστίου αποτελούν ερωτήματα, τα οποία δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί (Mori και συν. 2009). Επισημαίνεται ότι η επίδραση με μεθυλο-ιασμονικό οξύ, ένα παράγωγο του ιασμονικού οξέος, προκαλεί με τον ίδιο τρόπο το κλείσιμο των στομάτων, δηλαδή μέσω της ενεργοποίησης NADPH-οξειδασών και της παραγωγής ROS (Mori και συν. 2009).

I.1.7.7.2 ROS και φύτρωση σπερμάτων

Κατά τη διάρκεια της δημιουργίας του σπέρματος, το ποσοστό υγρασίας σε αυτό μεταβάλλεται. Οι αλλαγές της υγρασίας έχουν αντίκτυπο στην παραγωγή ROS στα σπέρματα. Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των σπερμάτων, πηγή παραγωγής ROS είναι τα πλαστίδια, ενώ σε επόμενα στάδια ROS παράγονται στα μιτοχόνδρια, τα υπεροξειδιοσώματα και τον αποπλάστη από τις NADPH-οξειδάσες του πλασμαλήμματος. Ωστόσο, μετά τη μείωση της υγρασίας στα σπέρματα και την εφαρμογή ληθάργου σε αυτά, κατά την οποία η ενζυμική δραστηριότητα μειώνεται σημαντικά, η παραγωγή των ROS προκαλείται πιθανότατα από μη ενζυμικούς μηχανισμούς (El-Maarouf-Bouteau και Bailly 2008). Η φύτρωση των σπερμάτων προϋποθέτει επανεκκίνηση του μεταβολισμού τους, μετά τη διάβρεξή τους. Στα αρχικά στάδια διάβρεξης των σπερμάτων πολλών φυτικών ειδών συσσωρεύεται H_2O_2 σε αυτά, ενώ και άλλα είδη ROS παράγονται κατά τη διάρκεια της φύτρωσης (Barba-Espin και συν. 2010). Το H_2O_2 θεωρείται ότι δρα ευνοϊκά, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι σε πολλά είδη η επίδραση με H_2O_2 προωθεί τη φύτρωση των σπερμάτων (Katzman και συν. 2001).

Στον έλεγχο του ληθάργου και της φύτρωσης των σπερμάτων εμπλέκονται όλες σχεδόν οι ομάδες των φυτικών ορμονών, συμπεριλαμβανομένων του ABA, των γιββερελινών, του αιθυλενίου, της αυξίνης, των μπρασσινοστεροειδών και του ιασμονικού οξέος (Finkelstein και συν. 2008), με τη συμμετοχή των ROS ως μορίων μεταγωγής των ορμονικών μηνυμάτων (Gomes και Garcia 2013). Είναι γνωστό ότι το ABA παρατείνει τη διατήρηση του ληθάργου και αναστέλλει τη φύτρωση των σπερμάτων. Η επίδραση με H_2O_2 προκαλεί μείωση των επιπέδων του ABA στα σπέρματα, γεγονός που προωθεί τη φύτρωσή τους (Wang και συν. 1998). Επιπλέον, το H_2O_2 προκαλεί την απενεργοποίηση δύο φωσφατασών τύπου 2C, των ABI1 και ABI2 (ABA-insensitive), οι οποίες συμμετέχουν στους μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος του ABA (Barba-Espin και συν. 2010). Παράλληλα, το H_2O_2 επάγει την παραγωγή γιββερελινών, η παρουσία των οποίων προωθεί τη φύτρωση, ενώ συγχρόνως αναστέλλει τη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (Gomes και Garcia 2013). Η χρήση ουσιών που επάγουν την παραγωγή ROS στο φυτό *Helianthus annuus*, έδειξε ότι τα αυξημένα επίπεδα ROS προωθούν τη φύτρωση και σχετίζονται με την ενεργοποίηση γονιδίων που συμμετέχουν στην απόκριση στο αιθυλένιο. Το τελευταίο εμπλέκεται στην άρση του ληθάργου των σπερμάτων του φυτού αυτού (Oracz και συν. 2009). Διάφορα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι υπόλοιπες κατηγορίες ορμονών εμπλέκονται στη φύτρωση των σπερμάτων, όμως δεν είναι γνωστό εάν αυτή η δράση επιτυγχάνεται με μηχανισμούς σηματοδότησης μέσω ROS (El-Maarouf-Bouteau και Bailly 2008).

I.1.7.7.3 ROS και βαρυτροπισμός

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η διαπίστωση ότι οι ROS αποτελούν μέρος του σηματοδοτικού μηχανισμού μεταγωγής του μηνύματος της αυξίνης, η οποία έχει βασικό αναπτυξιακό ρόλο στα φυτά (Tognetti και συν. 2012). Μεταξύ άλλων, οι ROS συμμετέχουν στην αντίληψη της βαρύτητας από τη ρίζα, φαινόμενο το οποίο εξαρτάται κατεξοχήν από τη δράση της αυξίνης (Pasternak και συν. 2005). Όταν η κύρια ρίζα τοποθετείται οριζόντια, η φυσιολογική συμπεριφορά της είναι να κάμπτεται και να συνεχίζει να αναπτύσσεται προς τα κάτω, κάθετα στον οριζόντιο άξονα. Σε ρίζες του φυτού *Zea mays*, οι οποίες τοποθετήθηκαν οριζόντια, διαπιστώθηκε αλλαγή της κατανομής των ROS εντός μικρού χρονικού διαστήματος, με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους στο φλοιό της ρίζας που βρίσκεται προς την πλευρά του εδάφους. Η ασύμμετρη κατανομή των ROS φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την απόκριση της ρίζας στη δύναμη της βαρύτητας, καθώς η επίδραση με H_2O_2 στα κύτταρα του φλοιού στη συγκεκριμένη πλευρά της ρίζας προκαλεί πιο έντονη βαρυτροπική απόκριση, η οποία αναστέλλεται, όταν η επίδραση γίνεται στα κύτταρα του φλοιού που βρίσκονται στην απέναντι πλευρά (Joo και συν. 2001). Είναι ενδιαφέρον ότι η παραγωγή ROS στα κύτταρα του φλοιού της ρίζας οφείλεται στην καταλυτική δραστηριότητα της NADPH-οξειδάσης, η οποία εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα της PI3P (Joo και συν. 2005).

Επίσης, είναι γνωστό ότι για τη βαρυτροπική απόκριση της ρίζας είναι αναγκαία η ανακατανομή της αυξίνης. Οι Joo και συν. (2001) πραγματοποίησαν επίδραση με ινδολυλοξικό οξύ (IAA, indole-3-acetic acid) στις δύο πλευρές ακρόρριζων του φυτού *Zea mays* που ήταν τοποθετημένες κατακόρυφα. Στην πλευρά στην οποία εφαρμόστηκε η επίδραση με αυξίνη, διαπιστώθηκε συσσώρευση ROS και κάμψη της ρίζας. Το γεγονός ότι η αυξίνη επάγει την παραγωγή ROS επιβεβαιώθηκε και σε πρωτοπλάστες κυττάρων ρίζας του φυτού *Zea mays* (Joo και συν. 2001). Επιπλέον, η παραγωγή ROS η οποία επάγεται από την αυξίνη ανεστάλη σε πρωτοπλάστες του φυτού *Arabidopsis*, οι οποίοι έπειτα από κατάλληλο μετασχηματισμό διέθεταν ένα πεπτίδιο που δεσμεύει την PI3P (δακτύλιος FYVE της ανθρώπινης πρωτεΐνης EEA1, Joo και συν. 2005). Το γεγονός αυτό υποστηρίζει ότι στην απόκριση της ρίζας στη βαρύτητα συμμετέχει η αυξίνη, η οποία μέσω της PI3K κατευθύνει την παραγωγή ROS από την NADPH-οξειδάση (Joo και συν. 2001, 2005). Η ασύμμετρη κατανομή της αυξίνης και η σχέση της με τις ROS έχει αναφερθεί και σε άλλες αναπτυξιακές διαδικασίες που αφορούν στη ρίζα, όπως η δημιουργία πλάγιων ριζών (Ma και συν. 2014).

I.1.7.7.4 ROS και δημιουργία πλάγιων ριζών

Η έναρξη της δημιουργίας πλάγιων ριζών στο φυτό *A. thaliana* πραγματοποιείται με την ασύμμετρη διαίρεση δύο κυττάρων του περικυκλίου. Μετά τη δημιουργία της καταβολής της πλάγιας ρίζας, τα κύτταρά της υφίστανται συνεχείς σύμμετρες διαιρέσεις που οδηγούν στη δημιουργία ενός πληθυσμού μεριστωματικών κυττάρων. Στη συνέχεια, η καταβολή της

πλάγιας ρίζας αναπτύσσεται με επιμήκυνση των κυττάρων της και διασχίζοντας τον φλοιό και τη ριζοδερμίδα προεκβάλλει στο εξωτερικό περιβάλλον, κάθετα στον άξονα της κύριας ρίζας (Lucas και συν. 2008). Η αυξίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε όλα τα στάδια δημιουργίας πλάγιων ριζών. Συμμετέχει τόσο στα γεγονότα που προηγούνται της ασύμμετρης διαίρεσης των κυττάρων που θα δημιουργήσουν την καταβολή της πλάγιας ρίζας, όσο και μετά, στη διαδικασία της ανάπτυξής της (Lucas και συν. 2008). Η εξωγενής χορήγηση IAA ή συνθετικών αυξινών, όπως το ναφθαλενοξικό οξύ (NAA, 1-naphthylacetic acid) επάγει τη δημιουργία πλάγιων ριζών, ενώ επίδραση με αναστολείς μεταφοράς αυξίνης αναστέλλει την έναρξη σχηματισμού τους (Casimiro και συν. 2001). Έχει διαπιστωθεί ότι, η παραγωγή αυξίνης σε νεαρά αρτίβλαστα, τόσο από τα φύλλα, όσο και από την κύρια ρίζα είναι απαραίτητη για τη δημιουργία πλάγιων ριζών (Bhalerao και συν. 2002). Η αυξίνη εμπλέκεται, εκτός των άλλων, στην ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου, προωθώντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G₁ στην S και τη μετάβαση από τη φάση G₂ στην M (Himanen και συν. 2004). Η δράση της ορμόνης περιλαμβάνει την επαγωγή της παραγωγής H₂O₂. Επιδράσεις με ουσίες που δεσμεύουν το H₂O₂, όπως το ασκορβικό οξύ και η διμεθυλθειουρία, έδειξαν ότι η παραγωγή ROS είναι απαραίτητη για την επαγόμενη από την αυξίνη δημιουργία πλάγιων ριζών, καθώς στα επηρεασμένα αρτίβλαστα δεν δημιουργούνται πλάγιες ρίζες (Ma και συν. 2014). Στην ίδια μελέτη, οι Ma και συν. διαπίστωσαν ότι αρχικά είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση μίας οξυγενάσης της αίμης, της HY1, η δράση της οποίας σχετίζεται με την παραγωγή ROS μέσω NADPH-οξειδάσης.

Εκτός όμως από την αυξίνη, το ABA εμπλέκεται στη δημιουργία και ανάπτυξη των πλάγιων ριζών, έχοντας αντίθετη δράση από αυτή της αυξίνης (Deak και Malami 2005). Το γεγονός αυτό παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς και οι δύο ορμόνες προκαλούν την παραγωγή ROS. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η αυξίνη επάγει την έκφραση γονιδίων, τα οποία ρυθμίζουν αρνητικά την παραγωγή ROS, ως απόκριση στο ABA. Συγκεκριμένα, στις ρίζες του φυτού *Brassica carinata* η παραγωγή της πρωτεΐνης CIL1 (COPPER INDUCED LEAVES 1), μίας GPI-συνδεδεμένης πρωτεΐνης (GPI, glycosylphosphatidyl-inositol) η οποία εδράζεται στο πλασμαλήμμα και τον αποπλάστη, επάγεται από την αυξίνη (Gibson και συν. 2012). Όταν επιδρούν συγχρόνως δύο ορμονικά ερεθίσματα, εκείνα της αυξίνης και του ABA, η CIL1 ενεργοποιείται από την αυξίνη και ρυθμίζει τη δράση διαφόρων ενζύμων που εμπλέκονται στην παραγωγή και ανακύκλωση των ROS, όπως η NADPH-οξειδάση, η SOD, η υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Με τον τρόπο αυτό επηρεάζεται η συγκέντρωση ROS στον αποπλάστη (Gibson και συν. 2012). Υποστηρίζεται ότι η απελευθέρωση της CIL1 από το πλασμαλήμμα, η οποία σχετίζεται με την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (phospholipase

C, PLC) λόγω της παρουσίας ABA, έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της CIL1 και την αυξημένη παραγωγή ROS από τη δράση της NADPH-οξειδάσης (Gibson και συν. 2012).

Παράλληλα με την προγραμματισμένη και ορμονικά ελεγχόμενη δημιουργία πλάγιων ριζών, σχηματισμό πλάγιων ριζών μπορούν να προκαλέσουν και οι μηχανικές καταπονήσεις που ασκούνται στη ρίζα (Richter και συν. 2009). Αυτές οι καταπονήσεις μπορεί να προκληθούν είτε από την κάμψη της ρίζας ως απόκριση στη βαρύτητα, είτε από την εφαρμογή εξωτερικής δύναμης (Ditengou και συν. 2008). Και σε αυτές τις περιπτώσεις, πριν από τη δημιουργία της πλάγιας ρίζας, παρατηρείται στο κεκαμμένο τμήμα συσσώρευση αυξίνης, η οποία συμβάλλει στη διαφοροποίηση συγκεκριμένων κυττάρων του περικυκλίου και στη μετατροπή τους σε αρχικά κύτταρα που θα δημιουργήσουν στη συνέχεια την πλάγια ρίζα (Ditengou και συν. 2008). Ο τρόπος με τον οποίο η μηχανική καταπόνηση γίνεται αντιληπτή φαίνεται ότι σχετίζεται με τη συσσώρευση ιόντων ασβεστίου, καθώς στην κεκαμμένη πλευρά της ρίζας διαπιστώθηκε αύξηση της συγκέντρωσής τους στα κύτταρα της ριζοδερμίδας, του φλοιού και του περικυκλίου (Richter και συν. 2009). Τουλάχιστον στην περίπτωση της δημιουργίας ριζικών τριχιδίων, η αύξηση των ιόντων ασβεστίου προκαλεί την ενεργοποίηση της παραγωγής ROS μέσω της NADPH-οξειδάσης (Takeda και συν. 2008). Επομένως, είναι λογικό να υποθεθεί ότι και κατά τη δημιουργία των πλάγιων ριζών που επάγονται από μηχανικές καταπονήσεις συμμετέχουν οι ROS, οι οποίες παράγονται ως απόκριση στην αύξηση των ιόντων ασβεστίου (βλέπε επίσης Steinhorst και Kudla 2013).

Κατά τη δημιουργία των επιγενών ριζών συμμετέχει μία άλλη ορμόνη, το αιθυλένιο, το οποίο επίσης προκαλεί την παραγωγή ROS. Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή, η παραγωγή ROS σχετίζεται με την πρόκληση κυτταρικού θανάτου στα επιδερμικά κύτταρα του βλαστού, στο σημείο όπου θα δημιουργηθεί η καταβολή της επιγενούς ρίζας (Steffens και συν. 2012).

1.1.7.8 ROS και προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος

Η οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων σχετίζεται και με τις διαδικασίες της γήρανσης και του κυτταρικού θανάτου. Συχνά, ο κυτταρικός θάνατος αποτελεί αναπόσπαστο μέρος διαφόρων αναπτυξιακών διαδικασιών και σε αυτή την περίπτωση θεωρείται ως προγραμματισμένος (Kocsy και συν. 2013). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο θάνατος των κυττάρων της στιβάδας της αλευρόνης των σπερμάτων. Σε πολλά μονοκοτυλήδονα φυτά, τα κύτταρα της στιβάδας αυτής υφίστανται τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, η οποία επάγεται από γιβερελλίνη και αναστέλλεται από ABA (Kwak και συν. 2006). Στο φυτό *Hordeum vulgare*, το H_2O_2 είναι μία από τις κύριες ROS που συμμετέχουν στο θάνατο των κυττάρων της αλευρόνης (Bethke και Jones 2001). Επιπλέον, όταν τα κύτταρα αυτά υφίστανται την επίδραση γιβερελλίνης, μειώνεται η έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα, ενώ αντίθετα η επίδραση με ABA επάγει τη μεταγραφή ενός γονιδίου που κωδικοποιεί την καταλάση (Fath και συν. 2001).

Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος εκδηλώνεται και κατά τα τελικά στάδια διαφοροποίησης των τραχειακών στοιχείων, διαδικασία που προωθείται από το αιθυλένιο (Pesquet και Tuominen 2011), όπως επίσης και κατά την εμβρυογένεση (Filonova και συν. 2002), τη γαμετογένεση (Wang και συν. 1999), την αδρανοποίηση ασύμβατων γυρεοκόκκων (Thomas και Franklin-Tong 2004) και το θάνατο των φύλλων και των πετάλων των ανθέων που βρίσκονται σε διαδικασία γήρανσης (Bell και συν. 2009, Kocsy και συν. 2013). Στις διαδικασίες αυτές, ο κυτταρικός θάνατος συνοδεύεται από την παραγωγή ROS, χωρίς ωστόσο να είναι πάντα κατανοητός ο ρόλος που διαδραματίζουν σε κάθε περίπτωση (Bell και συν. 2009). Σε αρκετές από αυτές τις περιπτώσεις, ένα η περισσότερα ορμονικά ερεθίσματα προκαλούν την παραγωγή ROS, γεγονός που οδηγεί στην επαγωγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Mori και συν. 2009).

Επιπλέον, πολλοί αβιοτικοί παράγοντες, όπως οι αέριοι ρύποι, η υπερϊώδης ακτινοβολία, η αλατότητα και οι ακραίες θερμοκρασίες μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτική καταπόνηση, η οποία με τη σειρά της είναι δυνατό να οδηγήσει σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Gadjev και συν. 2008). Για παράδειγμα, το όζον, το οποίο ανήκει στις ROS και θεωρείται αέριος ρύπος, με την είσοδό του στον αποπλάστη των κυττάρων πυροδοτεί την παραγωγή επιπλέον ROS, κυρίως H_2O_2 (Pellinen και συν. 2002). Στα γεγονότα, τα οποία συνοδεύουν την πρόκληση κυτταρικού θανάτου υπό την επίδραση του όζοντος, περιλαμβάνονται αλλαγές στην υποκυτταρική κατανομή διαφόρων ιόντων, συρρίκνωση του πυρήνα, συμπύκνωση της χρωματίνης, κατακερματισμός του DNA, αλλαγές στο πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης και μεταβολές στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος (Overmyer και συν. 2005). Η παρουσία βαρέων μετάλλων μπορεί επίσης να προκαλέσει το θάνατο των κυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση, οι ROS συσσωρεύονται, κυρίως στα μιτοχόνδρια και τον αποπλάστη. Για παράδειγμα, έπειτα από επίδραση με κάδμιο, μία από τις αιτίες πρόκλησης του θανάτου των κυττάρων αποτελεί η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου που επάγει την παραγωγή ROS, μέσω της ενεργοποίησης της NADPH-οξειδάσης. Οι ROS προκαλούν και υπεροξειδωση των λιπιδίων, γεγονός που οδηγεί στην καταστροφή των μεμβρανών (Garnier και συν. 2006). Και άλλα βαρέα μέταλλα, όπως το αργίλιο ή ο χαλκός, επιφέρουν το θάνατο των κυττάρων με παρόμοιο τρόπο, δηλαδή διαταράσσοντας την ομοιόσταση των ROS (Gadjev και συν. 2008).

Κυτταρικός θάνατος εκδηλώνεται και κατά την αντίδραση υπερευαισθησίας των φυτών, έπειτα από αλληλεπίδραση με παθογόνα. Η διαδικασία χαρακτηρίζεται από ταχύτατη καταστροφή των κυττάρων κοντά στο σημείο της προσβολής, η οποία αποσκοπεί στην προστασία του φυτού από τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση του παθογόνου μικροοργανισμού (Gadjev και συν. 2008). Ο μηχανισμός νέκρωσης των κυττάρων στις περιπτώσεις των αντιδράσεων υπερευαισθησίας έχει ορισμένες ομοιότητες με την απόπτωση (Lam 2004). Και σε αυτή την περίπτωση, οι ROS, που συνήθως παράγονται από NADPH-

οξειδάσες του πλασμαλήμματος και από υπεροξειδάσες που βρίσκονται στον αποπλάστη συμμετέχουν στη νέκρωση των κυττάρων (Gadjev και συν. 2008).

Θα πρέπει, τέλος, να σημειωθεί ότι στα φυτά η έννοια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου εμπεριέχει διάφορες μορφές κυτταρικής καταστροφής, οι οποίες δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως (de Pinto και συν. 2012). Αντίθετα, στους ζωικούς οργανισμούς λειτουργούν τρεις διαφορετικοί τύποι προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου: η απόπτωση, η αυτοφαγία και ένας τρίτος τύπος, ο οποίος αναφέρεται συνήθως ως όμοιος της νέκρωσης (Portt και συν. 2011). Οι ROS που παράγονται ως απόκριση στις διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις συμμετέχουν στις διαδικασίες του κυτταρικού θανάτου, τόσο ως τοξικά μόρια, όσο και ως μόρια μεταγωγής μηνύματος (Gadjev και συν. 2008). Η τελευταία περίπτωση σχετίζεται με τον πολύ σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι ROS στην αντίληψη των διαφορετικών μορφών καταπόνησης από τους οργανισμούς και τις αποκρίσεις τους σε αυτές (Hong-bo και συν. 2008).

1.1.7.9 Η συμμετοχή των ROS στις αποκρίσεις σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις

1.1.7.9.1 Βιοτικές καταπονήσεις

Οι ROS συμμετέχουν στα γεγονότα που ακολουθούν την προσβολή των φυτικών κυττάρων από παθογόνους μικροοργανισμούς. Για την αναγνώριση του παθογόνου είναι απαραίτητη η ταχύτατη παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ROS, απόκριση που συχνά περιγράφεται και ως οξειδωτική έκρηξη (Torres και συν. 2005). Η παραγωγή των ROS πραγματοποιείται συνήθως σε δύο φάσεις (Σχήμα 12). Αρχικά παράγονται ROS λίγα λεπτά από τη στιγμή της προσβολής και αργότερα μετά από κάποιες ώρες. Η πρώτη φάση σχετίζεται με την αναγνώριση, ενώ η δεύτερη με τις δρομολογούμενες αποκρίσεις (Torres 2010). Στο σημείο στο οποίο γίνεται η απόπειρα εισβολής του παθογόνου μικροοργανισμού, παράγονται στον αποπλάστη H_2O_2 ή $O_2^{\cdot-}$ αλλά και άλλες ROS (Foyer και Noctor 2005β). Παραγωγή ROS πραγματοποιείται τόσο στις αλληλεπιδράσεις των φυτών με κάποιο παθογόνο μικροοργανισμό, όσο και στις συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις (Nanda και συν. 2010).

Το πρώτο βήμα για την άμυνα του φυτού έναντι ενός παθογόνου μικροοργανισμού είναι η αναγνώριση της παρουσίας μικροβιακών επιτόπων στην επιφάνειά τους, οι οποίοι συχνά αναφέρονται συνολικά ως μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα (PAMP, pathogen-associated molecular patterns). Αυτά είναι μικρά μόρια, συχνά κοινά για μία ομάδα μικροβίων, και μπορεί να είναι δομές που βρίσκονται στην επιφάνεια των βακτηρίων, όπως, για παράδειγμα, η φλαγγελίνη, λιποπολυσακχαρίτες, πεπτιδογλυκάνες ή συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων, όπως γλουκάνες ή χιτοζάνες (Pitzschke και συν. 2009α, Torres 2010). Η αναγνώριση γίνεται από υποδοχείς που εδράζονται στο πλασμαλήμμα και συνήθως η ενεργοποίησή τους επιφέρει αλλαγές στην κατανομή των

άλλες κινάσες, όπως για παράδειγμα η κινάση OXI1, η οποία ενεργοποιεί τα μονοπάτια των MPK3 και MPK6. Στα μεταλλάγματα *oxi1* του φυτού *A. thaliana*, τα οποία δεν διαθέτουν τη συγκεκριμένη κινάση, δεν παρατηρείται ενεργοποίηση των MPK3 και MPK6 έπειτα από επίδραση με H_2O_2 . Επιπλέον, όταν τα φυτά προσβάλλονται από τον παθογόνο μύκητα *Peronospora parasitica* εμφανίζουν μειωμένη αντίσταση (Rentel και συν. 2004).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή ROS, κατά τη στιγμή της προσβολής από κάποιο παθογόνο οργανισμό, μπορεί να πυροδοτήσει σειρά γεγονότων διακυτταρικής επικοινωνίας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κύματος ROS που ξεκινά από μία μικρή ομάδα κυττάρων και διαδίδεται στους γειτονικούς ιστούς, ακόμη και σε ολόκληρο το φυτό (Mittler και συν. 2011, Baxter και συν. 2014). Η μετάδοση του σήματος προϋποθέτει τη συνεχή παραγωγή H_2O_2 από NADPH οξειδάσες, το οποίο εισέρχεται στα γειτονικά κύτταρα και ενεργοποιεί με τη σειρά του τις NADPH-οξειδάσες των κυττάρων αυτών (Wong και Shimamoto 2009). Μετά τη μόλυνση φυτών *A. thaliana* από φυτοφάγα έντομα διαπιστώθηκε εξάπλωση της παραγωγής ROS σε όλο το φυτό (Miller και συν. 2009). Όταν μολυνθήκαν φυτά *rbohD*, τα οποία δεν διέθεταν την NADPH-οξειδάση RbohD, το κύμα αυτό δεν μεταδιδόταν, ενώ τα φυτά αυτά ήταν πιο ευαίσθητα. Υπολογίζεται ότι το σήμα ROS μπορεί να μετακινείται με ταχύτητα μερικών εκατοστών ανά λεπτό. Η ανατροφοδοτούμενη επέκταση της παραγωγής ROS σε όλο το φυτό έχει διαπιστωθεί και σε περιπτώσεις αβιοτικών καταπονήσεων (Miller και συν. 2009).

I.1.7.9.2 Αβιοτικές καταπονήσεις

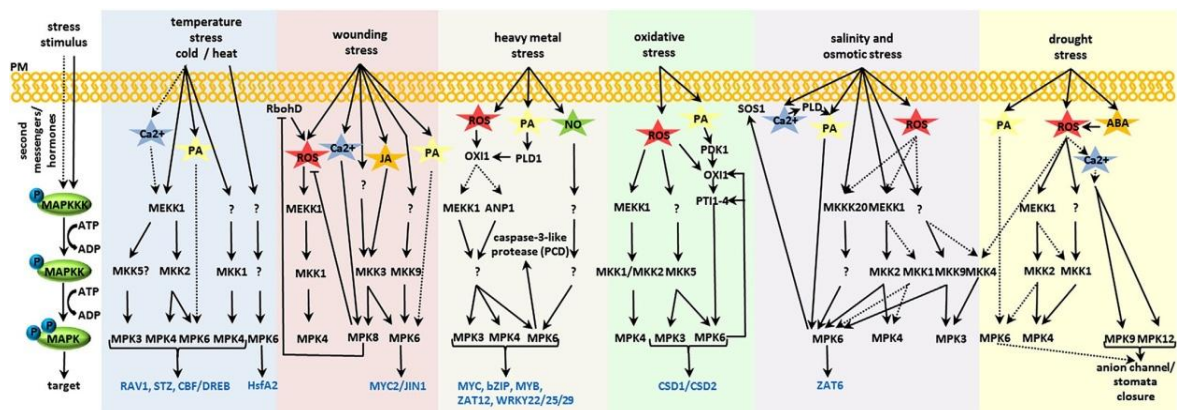
Η αντίδραση και προσαρμογή των φυτών στις αλλαγές του περιβάλλοντος περιλαμβάνει την ενεργοποίηση πλειάδας μηχανισμών με σκοπό τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης (Miller και συν. 2010). Η διατάραξη της τελευταίας από την επίδραση των διακυμάνσεων ορισμένων περιβαλλοντικών παραμέτρων συχνά συνδέεται με την παραγωγή ROS (Mittler και συν. 2002). Η επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων αυξάνει δραματικά την παραγωγή ROS, με πιθανή συνέπεια την πρόκληση οξειδωτικών βλαβών των κυτταρικών συστατικών. Συγχρόνως, όμως, οι ROS φαίνεται να δρουν και ως μόρια μεταγωγής μηνύματος. Η αύξηση των ROS που οφείλεται στην επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων θεωρείται έως και μονόδρομος για την αντίληψη των καταπονήσεων και τη δρομολόγηση των αποκρίσεων (Σχήμα 13, Mittler και συν. 2004, Miller και συν. 2010).

Αύξηση της παραγωγής ROS έχει καταγραφεί σε περιπτώσεις αβιοτικών καταπονήσεων, στις οποίες περιλαμβάνονται οι ακραίες θερμοκρασίες, η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, η έλλειψη νερού, η αυξημένη αλατότητα, η ωσμωτική καταπόνηση, ο τραυματισμός ή η παρουσία βαρέων μετάλλων (Σχήμα 13, Smékalonά και συν. 2014α).

Οι Rbohs έχουν κυρίαρχο ρόλο στην αντίληψη πολλών αβιοτικών καταπονήσεων (Kaur και συν. 2014). Όπως συμβαίνει στις βιοτικές καταπονήσεις, το μήνυμα των ROS σε

συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, μεταφέρεται σε μεγάλες αποστάσεις στο φυτικό σώμα με τη βοήθεια των Rbohs (Miller και συν. 2009). Για την ενεργοποίησή τους είναι απαραίτητο να προηγηθούν διάφορα γεγονότα, όπως η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου στο κυτόπλασμα, η φωσφορυλίωση CDPKs, η συμμετοχή ROP GTPασών και η ενεργοποίηση των PLDs, οι οποίες παράγουν PA (Σχήμα 13, Wong και Shimamoto 2009). Ωστόσο, οι ROS δεν παράγονται μόνο από τη δραστηριότητα των ενζύμων του πλασμαλήμματος. Τα διάφορα μεταβολικά μονοπάτια που λειτουργούν στα οργανίδια είναι ευαίσθητα στις τροποποιήσεις των συνθηκών του περιβάλλοντος. Οι αλλαγές στις αντιδράσεις του μεταβολισμού συντελούν στην παραγωγή και συσσώρευση ROS στα κυτταρικά οργανίδια (Suzuki και συν. 2012). Η οξειδοαναγωγική κατάσταση των οργανιδίων, ειδικά των χλωροπλαστών και των μιτοχονδρίων, τροποποιεί τα σήματα που κατευθύνονται προς τον πυρήνα. Η μοριακή συνομιλία μεταξύ των διαφόρων οργανιδίων και του πυρήνα έχει πολύ μεγάλη σημασία για την απόκριση των φυτικών κυττάρων στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Pogson και συν. 2008). Κατά συνέπεια, το κυτόπλασμα, το οποίο αποτελεί θέση συσσώρευσης ROS διαφορετικών πηγών προέλευσης, θα πρέπει να συμμετέχει στη διαχείριση αυτών των διαφορετικών σημάτων. Ένας τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό είναι η παρουσία συστατικών που δεσμεύουν ROS στο κυτόπλασμα (Suzuki και συν. 2012). Παρά το γεγονός ότι οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί στοχεύουν στην αποκατάσταση της ομοιόστασης, η αύξηση των ROS είναι ικανή να πυροδοτήσει μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος, κυρίως μονοπάτια MAPK (Σχήμα 13, Smékalonά και συν. 2014α).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα αυξημένα επίπεδα των ROS ενεργοποιούν τις MPK3 και MPK6, αλλά και την MPK4 μέσω του μονοπατιού MEKK1-MKK1/2 (Pitzschke και συν. 2009β, Lumberras και συν. 2010). Η OXI1, η οποία εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των MPK3 και MPK6, φαίνεται ότι συμμετέχει στην αντίληψη της αύξησης των επιπέδων των ROS και στις αβιοτικές καταπονήσεις (Rentel και συν. 2004). Αξίζει να επισημανθεί ότι το PA, το οποίο παράγεται από την καταλυτική δραστηριότητα των PLCs και PLDs, ενεργοποιεί όχι μόνο τις Rbohs αλλά και την PDK1, η οποία ενεργοποιεί στη συνέχεια την OXI1 (Σχήμα 13, Smékalonά και συν. 2014α). Ακολουθεί η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, γεγονός ουσιώδους σημασίας, καθώς είναι αυτό που συγκεκριμενοποιεί τις αποκρίσεις στις διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις, μέσω της επαγωγής της έκφρασης συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων (Atkinson και Urwin 2012).



Σχήμα 13. Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών μεταγωγής μηνύματος στο φυτό *A. thaliana*, οι οποίοι εμπλέκονται στις αποκρίσεις έναντι διαφόρων μορφών αβιοτικών καταπονήσεων. Τροποποιημένο από: Σμέκαλονά και συν. (2014α).

Μία άλλη κατηγορία μορίων που συμμετέχει στη διαδικασία προσαρμογής των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις είναι οι φυτοορμόνες, οι οποίες μεταξύ άλλων επηρεάζουν συχνά τη μεταγραφή γονιδίων (Peleg και Blumwald 2011). Από τις περισσότερο μελετημένες περιπτώσεις ορμονών που συμβάλλουν στην ανοχή, ειδικά στην περίπτωση της υδατικής καταπόνησης και χαμηλών θερμοκρασιών, είναι το ABA. Στο φυτό *A. thaliana* έχει ταυτοποιηθεί μεγάλος αριθμός γονιδίων που εκφράζονται ως απόκριση στην παραγωγή ABA, ενώ είναι γνωστό ότι η ορμόνη αυτή σχετίζεται και με την παραγωγή ROS (Σχήμα 13, Xing και συν. 2008). Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με το σαλικυλικό οξύ, το ιασμονικό οξύ και τα μπρασισινοστεροειδή (Peleg και Blumwald 2011). Τα μπρασισινοστεροειδή παρέχουν προστασία σε περιπτώσεις υψηλών ή χαμηλών θερμοκρασιών, ξηρασίας και υψηλής αλατότητας (Kagale και συν. 2007). Η δράση τους σχετίζεται με την έκφραση γονιδίων που επάγονται κατά τις καταπονήσεις, τη συσσώρευση ωσμωλυτών και την ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ειδικότερα, το τελευταίο έχει ενδιαφέρον, καθώς για την αντιοξειδωτική δράση των μπρασισινοστεροειδών είναι απαραίτητη η παραγωγή H_2O_2 , η οποία επάγεται από τα ίδια τα μπρασισινοστεροειδή (Zhang και συν. 2010). Παρόμοια είναι και η περίπτωση του σαλικυλικού οξέος, που προσφέρει αντοχή σε καταπονήσεις, όπως στην υψηλή αλατότητα, την υπερϊώδη ακτινοβολία, την ξηρασία, και την επίδραση με βαρέα μέταλλα (Metwally και συν. 2003). Το σαλικυλικό οξύ επάγει την παραγωγή ROS, ενώ συγχρόνως οι ROS μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή σαλικυλικού οξέος. Ωστόσο, διάφορα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι, παρουσία σαλικυλικού οξέος, ενεργοποιούνται διάφοροι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί (Holuigue και συν. 2007). Τέλος, το ιασμονικό οξύ, το οποίο συντίθεται κατά τον τραυματισμό των φυτών και είναι απαραίτητο για τη μετέπειτα δρομολόγηση αμυντικών αποκρίσεων, προκαλεί περαιτέρω αύξηση των επιπέδων του H_2O_2 , καθώς επάγει την ενεργοποίηση των NAPDH οξειδασών (Hu και συν. 2009).

1.2 Ο ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο φυτικός κυτταροσκελετός διαδραματίζει μοναδικό ρόλο σε μια σειρά αναπτυξιακών βιολογικών διεργασιών των φυτών, στις οποίες περιλαμβάνονται η κυτταρική διαίρεση, η κυτταρική μορφογένεση και η οργανογένεση (Kost και συν. 1999). Επιπλέον, συμμετέχει στις αποκρίσεις των φυτών σε ορμονικά ή περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Wasteneys και Yang 2004). Σε αντίθεση με τα ζωικά κύτταρα, στα οποία ο κυτταροσκελετός αποτελείται από τρεις τύπους πρωτεϊνικών πολυμερών, τα μικρονημάτια της ακτίνης (MA, actin microfilaments), τους μικροσωληνίσκους (ΜΣ, microtubules) και τα ενδιάμεσα νημάτια, ο κυτταροσκελετός των φυτικών κυττάρων συγκροτείται από MA και ΜΣ. Δεδομένα, τα οποία αναφέρονται στην παρουσία ενδιάμεσων νηματίων στα φυτά, είναι σπάνια και συχνά αντικρουόμενα (Kost και Chua 2002).

1.2.1 Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης

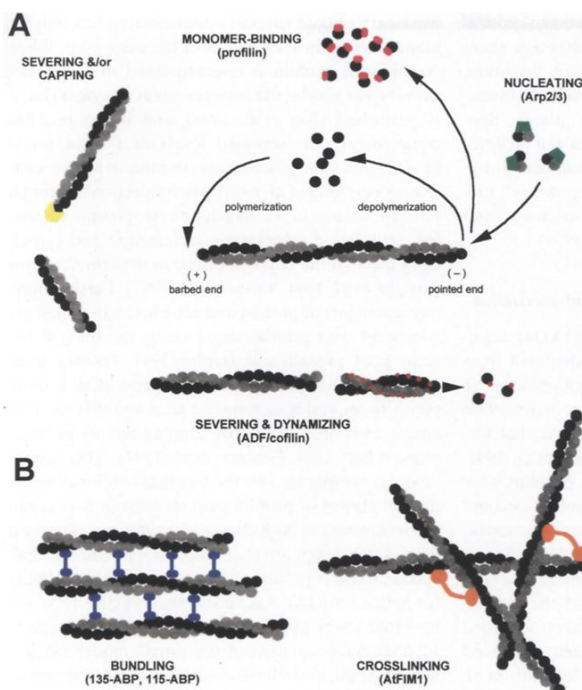
Η ακτίνη είναι από τις πιο συντηρημένες και διαδεδομένες πρωτεΐνες των ευκαρυωτικών οργανισμών, απαντά σε αφθονία στο κυτόπλασμα, ενώ εντοπίζεται και στον πυρήνα (Meagher και συν. 2011, Thomas 2012). Στα κύτταρα, οι σφαιρικές υπομονάδες (G-ακτίνη) της ακτίνης πολυμερίζονται σε MA (F-ακτίνη), τα οποία διαμορφώνουν στο χώρο δεσμίδες παράλληλων MA ή δίκτυα. Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης διαθέτει μεγάλο βαθμό «πλαστικότητας», γεγονός που επιτρέπει τη δημιουργία, την καταστροφή ή την αναδιοργάνωση διάφορων νηματοειδών δομών σε μικρό χρονικό διάστημα (Thomas 2012). Όλες αυτές οι δυναμικές αλληλομετατροπές επιτυγχάνονται με τη βοήθεια μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών που συνδέονται με την ακτίνη (Thomas και συν. 2009).

Ενώ στα περισσότερα μετázωα, ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν την ακτίνη είναι μικρότερος από δέκα, στα φυτά ο αριθμός αυτός ποικίλλει σημαντικά. Για παράδειγμα, στο φυτό *Petunia* η οικογένεια των γονιδίων της ακτίνης αριθμεί περισσότερα από εκατό μέλη, ενώ στο φυτό *Zea mays* εικοσιένα (Šljajcherová και συν. 2012). Στο *A. thaliana* υπάρχουν δέκα γονίδια που κωδικοποιούν την ακτίνη, οκτώ από τα οποία είναι λειτουργικά, ενώ τα υπόλοιπα δύο είναι ψευδογονίδια (Meagher και Fechheimer 2003). Η έκφραση των γονιδίων αυτών ακολουθεί ένα χαρακτηριστικό πρότυπο. Διακρίνονται δύο ομάδες, τα γονίδια που εκφράζονται κατά τη βλαστητική φάση του φυτού και εκείνα που εκφράζονται στην αναπαραγωγική φάση (McDowell και συν. 1996). Τα γονίδια *ACT2*, *ACT7* και *ACT8* εκφράζονται στη ρίζα, το βλαστό και τα φύλλα ενώ τα *ACT1*, *ACT3*, *ACT4*, *ACT11* και *ACT12* εκφράζονται στους γυρεοκόκκους, την ωοθήκη και τα σπέρματα (Šljajcherová και συν. 2012).

Η ακτίνη είναι σφαιρική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 42 kDa περίπου, η οποία ανιχνεύεται σε ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις έως και μερικές εκατοντάδες mM (Staiger και

Blanchoin 2006). Τα μόρια της αποτελούνται από 4 υποπεριοχές που οργανώνονται γύρω από ένα χώρο, ο οποίος περιέχει θέσεις δέσμευσης νουκλεοτιδίων και δισθενών κατιόντων (Li και συν. 2015). Σε κάθε σφαιρική υπομονάδα ακτίνης είναι προσδεδεμένο ένα μόριο ATP (adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη), το οποίο κατά τον πολυμερισμό των MA υδρολύεται. *In vitro*, ο πολυμερισμός τους εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα ATP και δισθενών κατιόντων, όπως Mg^{2+} (Pollard 2000). Το κρίσιμο βήμα για τη συγκρότηση είναι ο σχηματισμός ενός μικρού πυρήνα από τρεις υπομονάδες. Μετά τη δημιουργία αυτής της μονάδας πυρήνωσης, το MA συγκροτείται ταχύτατα με προσθήκη μονομερών και στα δύο άκρα του (Li και συν. 2015). Η προσθήκη γίνεται με ταχύτερο ρυθμό στο ένα άκρο του MA, το οποίο χαρακτηρίζεται ως θετικό (+) άκρο. Στο άκρο αυτό οι υπομονάδες της ακτίνης είναι συνδεδεμένες με ATP, ενώ στο άλλο, το αρνητικό (-) άκρο πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο ο αποπολυμερισμός των MA και η ακτίνη είναι συνδεδεμένη με ADP (adenosine diphosphate, Dominguez και Holmes 2011). Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά μήκος των MA, τα οποία έχουν διάμετρο 7-9 nm, οι υπομονάδες τους εμφανίζουν ελικοειδή διάταξη (Li και συν. 2015).

Η ρύθμιση των δυναμικών μεταβολών των συστημάτων MA επιτελείται με τη συμμετοχή πρωτεϊνών, οι οποίες δεσμεύονται στην ακτίνη (Drøbak και συν. 2004). Στα φυτά έχουν προσδιοριστεί αρκετά πρωτεϊνικά μόρια που διαθέτουν αυτή την ικανότητα (Thomas και συν. 2009). Διακρίνονται με βάση τη βιοχημική τους δραστηριότητα σε 5 ομάδες, οι οποίες περιλαμβάνουν παράγοντες πυρήνωσης των MA, πρωτεΐνες που δεσμεύουν τα μονομερή της ακτίνης, πρωτεΐνες που συνδέονται σε κάποιο από τα άκρα των MA, άλλες που τεμαχίζουν τα MA και άλλες που ευθύνονται για τη δεσμίδωση των MA ή το σχηματισμό συνδέσεων μεταξύ των MA και άλλων πρωτεϊνικών δομών (Li και συν. 2015, Σχήμα 14).



Σχήμα 14. Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των διαφόρων πρωτεϊνικών ομάδων που εμφανίζουν ικανότητα δέσμευσης της ακτίνης. Τροποποιημένο από: McCurdy και συν. (2001).

Τα ΜΑ συμμετέχουν σε σειρά κυτταρικών λειτουργιών, όπως η καθιέρωση κυτταρικής πολικότητας, ο καθορισμός του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης, η μεταφορά υλικών για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, οι μετακινήσεις των διαφόρων κυτταρικών στοιχείων και η κυτοπλασματική ροή. Επιπλέον, εμπλέκονται και σε άλλες, όπως, για παράδειγμα στη λειτουργία των πλασμοδεσμών μέσω των οποίων διεξάγεται η κυτταρική επικοινωνία, στη λειτουργία των στομάτων και στις αποκρίσεις των φυτών μετά την προσβολή τους από παθογόνους μικροοργανισμούς (McCurdy και συν. 2001, Mathur και Hülskamp 2002).

Στις διαδικασίες μεταγωγής μηνύματος που ελέγχουν τη δραστηριότητα του κυτταροσκελετού της ακτίνης συμμετέχουν διάφοροι μηχανισμοί, οι οποίοι αφορούν στη λειτουργία των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ακτίνη. Σε αυτά τα πολύπλοκα δίκτυα εμπλέκονται και οι ROP GTPάσες, οι οποίες σχετίζονται και με τον κυτταροσκελετό της σωληνίνης.

1.2.2 Ο κυτταροσκελετός της σωληνίνης

1.2.2.1 Γενικά

Η υπεροικογένεια πρωτεϊνών της σωληνίνης/FtsZ απαντά σε όλους τους οργανισμούς. Η σωληνίνη είναι από τις πιο συντηρημένες ομάδες πρωτεϊνών των ευκαρυωτικών οργανισμών, η οποία συμμετέχει στη δημιουργία των ΜΣ (Breviario και συν. 2013). Οι ΜΣ είναι πολυμερή ετεροδιμερών α - και β -σωληνίνης και είναι από τις πιο σημαντικές δομές του κυττάρου, καθώς συμμετέχουν στη διεκπεραίωση πολύ βασικών διεργασιών, όπως η κυτταρική διαίρεση και η κυτταρική μορφογένεση, η μεταφορά κυστιδίων, η χωροταξική οργάνωση του πρωτοπλάστη και η ανάπτυξη κυττάρων που χαρακτηρίζονται από κορυφαία αύξηση (Breviario και συν. 2013). Η δυναμική συμπεριφορά του κυτταροσκελετού των ΜΣ επηρεάζεται από μεγάλο αριθμό ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών σημάτων (Cai 2010).

Οι α -, β - και τη γ -σωληνίνη, εντοπίζονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και σε πολλές περιπτώσεις είναι οι μόνοι αντιπρόσωποι της οικογένειας της σωληνίνης (Breviario και συν. 2013). Άλλα μέλη αυτής της οικογένειας, όπως η δ -, ϵ -, ζ -, και η -σωληνίνη, απουσιάζουν από τα χερσαία φυτά και τους μύκητες, ενώ συναντώνται σε άλλες ομάδες οργανισμών, κυρίως πρώτιστα, και δεν συγκροτούν πολυμερή (Breviario και συν. 2013). Κάποιες από αυτές υπάρχουν και στα ζωικά κύτταρα, ενώ στα πρώτιστα έχουν ανιχνευθεί περισσότερα μέλη της οικογένειας της σωληνίνης (Ludueña 2013). Η οργάνωση και λειτουργία του κυτταροσκελετού της σωληνίνης ελέγχονται από διάφορους μηχανισμούς, στους οποίους εμπλέκεται σειρά πρωτεϊνών που σχετίζεται με τους ΜΣ και πορείες μεταγωγής μηνύματος (Komis και συν. 2011, Hamada 2014). Στα επόμενα κεφάλαια θα παρατεθούν περισσότερες λεπτομέρειες για τη σωληνίνη, τους ΜΣ και τα άλλα πολυμερή σωληνίνης, όπως επίσης και για τους μηχανισμούς οργάνωσης του κυτταροσκελετού της

σωληνίνης. Τα δεδομένα της παρούσας διατριβής αφορούν, κατά κύριο λόγο, στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης, συνεπώς η περιγραφή θα είναι πιο εκτεταμένη σε σχέση με την αντίστοιχη για τον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

1.2.2.2 Γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση της σωληνίνης στα φυτικά κύτταρα

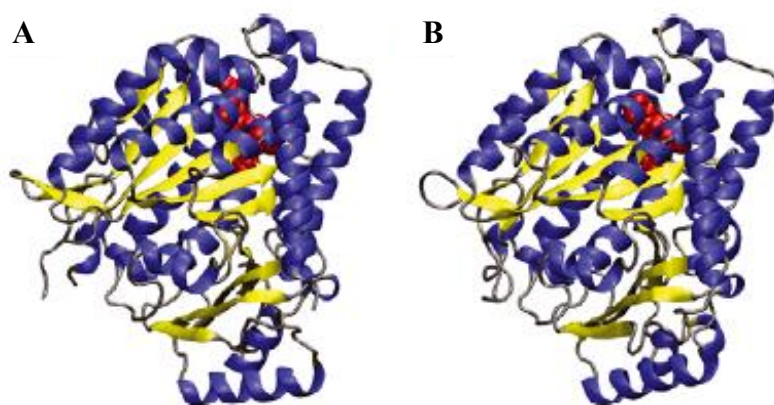
Στο πυρηνικό γονιδίωμα των φυτών βρίσκονται τόσο τα γονίδια της σωληνίνης όσο και εκείνα που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες FtsZ, η δράση των οποίων εκδηλώνεται κατά τη διαίρεση των πλαστιδίων (Breviario και συν. 2013). Στο γονιδίωμα του φυτού *A. thaliana* υπάρχουν τουλάχιστον δεκαεπτά γονίδια που κωδικοποιούν τη σωληνίνη, έξι για την α -σωληνίνη, εννέα για τη β -σωληνίνη και δύο για τη γ -σωληνίνη (Meagher και Fechheimer 2003). Το πρώτο επίπεδο ελέγχου της σύνθεσης της σωληνίνης είναι αυτό της μεταγραφής των γονιδίων. Τα γονίδια της σωληνίνης περιλαμβάνουν εσώνια, ο αριθμός και η θέση των οποίων είναι αρκετά σταθερός στα διαφορετικά φυτικά είδη (Breviario και συν. 2013). Μέχρι σήμερα, δεν έχει αναφερθεί εναλλακτικό «μάτισμα» των mRNA της σωληνίνης (Breviario και συν. 2013). Όπως και στην περίπτωση της ακτίνης, οι αντιπρόσωποι των οικογενειών της α - και β -σωληνίνης μπορούν να διακριθούν σε αυτούς που συμμετέχουν στη βλαστητική φάση και σε αυτές που απαντούν στην αναπαραγωγική φάση των φυτών (Meagher και Fechheimer 2003). Στα φυτικά κύτταρα, φαίνεται ότι λειτουργεί μηχανισμός επιλογής του ισοτύπου α - ή β -σωληνίνης που θα παραχθεί, κατά περίπτωση. Αυτός μπορεί να εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο, το στάδιο της ανάπτυξης, τον τύπο του ιστού ή του φυτικού οργάνου, όπως επίσης από ενδοκυτταρικά ή εξωτερικά ερεθίσματα (Breviario 2008). Επιπλέον, έχει ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι, τουλάχιστον στα ζωικά κύτταρα, η έκφραση των ισοτύπων της σωληνίνης ρυθμίζεται σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο και από μικρομοριακά RNAs (miRNAs, Lobert και Graichen 2013), ενώ λειτουργούν μηχανισμοί που εξασφαλίζουν ισότιμη σύνθεση α - και β -σωληνίνης (Nogales 2004).

1.2.2.3 Τα μονομερή της σωληνίνης στα φυτικά κύτταρα

Οι α -, β -, και γ -σωληνίνες αποτελούν την ελάχιστη απαραίτητη ομάδα πρωτεϊνών για την οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης. Τα μονομερή της α - και β -σωληνίνης, συγκροτούν ένα ετεροδιμερές, εμφανίζουν περίπου 50% ταυτόσημη αμινοξική αλληλουχία και το κάθε ένα από αυτά έχει MW 50 kDa περίπου (Desai και Mitchison 1997). Η γ -σωληνίνη εντοπίζεται στα κέντρα οργάνωσης ΜΣ (Brown και Lemmon 2007, βλέπε παρακάτω).

Τα πολυπεπίδια της α -, β -, και γ -σωληνίνης έχουν όξινο χαρακτήρα και αποτελούνται από 445-450 αμινοξέα (Fosket και Morejohn 1992). Διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το ηλεκτρικό φορτίο, τη διπολική ροπή και άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες (Tuszynski και συν. 2006). Μετά τη σύνθεσή τους, οι α - και β -σωληνίνες υφίστανται τη διαδικασία

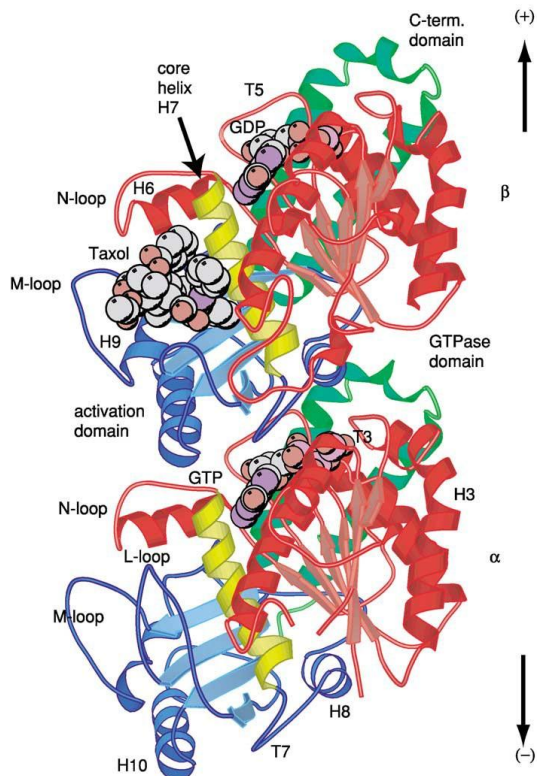
αναδίπλωσης με τη βοήθεια πρωτεϊνών, όπως είναι οι prefoldins και οι chaperones και άλλοι συμπαραγόντες. Η αναδίπλωση της σωληνίνης διεξάγεται τόσο σε επίπεδο μονομερών, όσο και ετεροδιμερών (Breviario και συν. 2013). Η α - και η β -σωληνίνη έχουν όμοια δευτεροταγή και τριτοταγή δομή. Περιέχουν μία κεντρική περιοχή β -πτυχωμένης επιφάνειας που περιβάλλεται από 2 α -έλικες (Σχήμα 15, Downing και Nogales 1998). Κάθε μονομερές φέρει μία επικράτεια που δεσμεύει GTP (guanine triphosphate, τριφωσφορική γουανοσίνη), μία ενδιάμεση στην οποία δεσμεύεται η ταξόλη και μία αμινοτελική περιοχή που αποτελεί τη θέση πρόσδεσης κινητηρίων και άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τους ΜΣ. Όπως αναφέρθηκε, κάθε μονομερές δεσμεύει ένα μόριο GTP. Στην περίπτωση της α -σωληνίνης, το μόριο αυτό δεν ανταλλάσσεται και η θέση πρόσδεσης του χαρακτηρίζεται ως μη ανταλλάξιμη N-θέση (non-exchangable). Η αντίστοιχη θέση στη β -σωληνίνη ονομάζεται ανταλλάξιμη E-θέση (exchangable). Για τον πολυμερισμό της σωληνίνης στην E-θέση πρέπει να υπάρχει GTP, το οποίο υδρολύεται προς GDP (guanine diphosphate, διφωσφορική γουανοσίνη) και δεν ανταλλάσσεται κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού (Nogales και Downing 2008).



Σχήμα 15. Σχηματική αναπαράσταση της δομής της α - και β -σωληνίνης (A και B, αντίστοιχα). Με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι α -έλικες, με κίτρινο οι β -πτυχωτές επιφάνειες και με κόκκινο το GTP (A) και GDP (B). Τροποποιημένο από: Breviario και συν. (2013).

1.2.2.4 Τα ετεροδιμερή της σωληνίνης και η δημιουργία ΜΣ

Σε αντίθεση με τα ετεροδιμερή της σωληνίνης, τα μονομερή είναι αρκετά ασταθή (Downing και Nogales 1998). Στην αυξημένη σταθερότητα των διμερών συνεισφέρει επιπλέον η πρόσδεση του κατιόντος Mg^{2+} στη θέση N της α -σωληνίνης (Menéndez και συν. 1998). Στο σχηματισμό των ετεροδιμερών λαμβάνουν μέρος διάφορες πλευρικές ομάδες των αμινοξέων της α - και β -σωληνίνης. Οι δεσμοί, οι οποίοι δημιουργούνται μεταξύ των μονομερών του ετεροδιμερούς αλλά και μεταξύ γειτονικών ετεροδιμερών είναι παρόμοιοι, ενώ η φύση των αμινοξέων που συμμετέχουν είναι ενδεικτική της σταθερότητας και του αντιστρεπτού χαρακτήρα των επαφών (Nogales και Downing 2008).

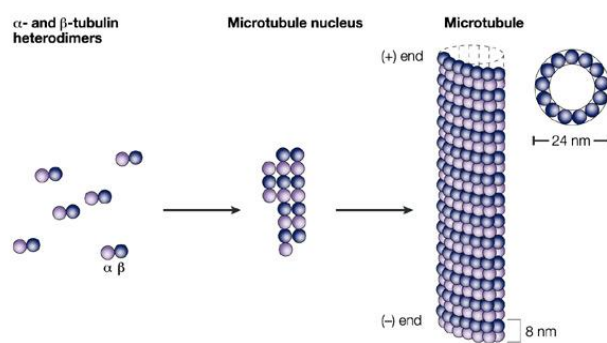


Σχήμα 16. Σχηματική απεικόνιση της δομής του ετεροδιμερούς $\alpha\beta$ σωληνίνης. Τα βέλη σημειώνουν την πολικότητα του πρωτονηματίου. Τροποποιημένο από: Amos και Schlieper (2005).

Ενώ στα μονομερή η θέση σύνδεσης του GTP είναι σταθερή (Σχήμα 15), στο διμερές η θέση τους είναι διαφορετική (Σχήμα 16). Το GTP που συνδέεται με την α -σωληνίνη, δηλαδή βρίσκεται στη θέση N, είναι κάπως «κρυμμένο» κοντά στις θέσεις σύνδεσης της α - και β -σωληνίνης. Αυτό εξηγεί και το γεγονός ότι δεν είναι ανταλλάξιμο. Αντίθετα, η θέση E στη β -σωληνίνη είναι μερικώς εκτεθειμένη στην επιφάνεια του διμερούς (Σχήμα 16). Κατά μήκος ενός πρωτονηματίου, το οποίο είναι ένα γραμμικό πολυμερές ετεροδιμερών σωληνίνης, οι επαφές μεταξύ μονομερών, αλλά και μεταξύ γειτονικών ετεροδιμερών είναι όμοιες και σε αυτές συμμετέχει το νουκλεοτίδιο. Λόγω αυτού, μία από τις συνέπειες της διαδικασίας του πολυμερισμού των ΜΣ είναι η απόκρυψη και της E θέσης, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα στο ΜΣ το GDP της β -σωληνίνης να μην είναι ανταλλάξιμο (Nogales και Downing 2008).

Κάθε ετεροδιμερές σωληνίνης έχει μήκος 8 nm και αλληλεπιδρά με τα γειτονικά ετεροδιμερή κατά μήκος του πρωτονηματίου (Downing και Nogales 1998). Στο πρωτονημάτιο, τα ετεροδιμερή συνδέονται με συγκεκριμένο τρόπο. Αυτό εξηγεί τη διαμορφώση πολικότητας, στο πλαίσιο της οποίας το πρωτονημάτιο έχει θετικό (+) άκρο και αρνητικό (-) άκρο (Amos και Schlieper 2005). Στο (+) άκρο του πρωτονηματίου εντοπίζεται β -σωληνίνη, ενώ αντίθετα στο (-) άκρο α -σωληνίνη (Σχήμα 16, Desai και Mitchinson 1997). Ο πολυμερισμός των ΜΣ είναι αποτέλεσμα συνδυασμού πυρήνωσης και επιμήκυνσης των πρωτονηματίων. Η πυρήνωση αναφέρεται στη δημιουργία ενός πυρήνα πάνω στον οποίο «κτίζονται» τα πρωτονημάτια, ενώ η επιμήκυνση συντελείται με ταχύτατη προσθήκη

ετεροδιμερών (Σχήμα 17, Jordan και Wilson 2004α). Όχι μόνο τα πρωτονημάτια, αλλά και οι ΜΣ διαθέτουν (+) και (-) άκρα, γεγονός που αντανακλά τους διαφορετικούς ρυθμούς πολυμερισμού που χαρακτηρίζουν στα άκρα τους. Η προσθήκη ετεροδιμερών πραγματοποιείται με ταχύτερο ρυθμό στο (+) άκρο και αρκετά βραδύτερο στο (-) άκρο (Desai και Mitchinson 1997). Στους δεσμούς που δημιουργούνται μεταξύ γειτονικών πρωτονηματίων συμμετέχουν συγκεκριμένες περιοχές της σωληνίνης (Nogales 2000). Συνήθως, 13 πρωτονημάτια συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν έναν κοίλο κύλινδρο, ο οποίος έχει εξωτερική διάμετρο 25 nm (Struk και Dhonukshe 2014). Ο αριθμός των πρωτονηματίων σε κάθε ΜΣ είναι συνήθως 13, αν και σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να ποικίλλει από 8 έως 16 (Topalidou και συν. 2012, Breviaro και συν. 2013).



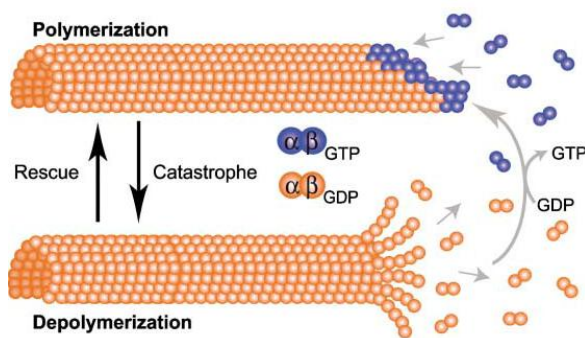
Σχήμα 17. Σχηματική απεικόνιση της πορείας δημιουργίας ενός ΜΣ. Η συγκρότησή του περιλαμβάνει δύο στάδια, την πυρήνωση και την επιμήκυνση. Τόσο το πρωτονημάτιο όσο και ο ΜΣ έχουν (+) και (-) άκρο. Τροποποιημένο από: Jordan και Wilson (2004α).

1.2.2.5 Δυναμική συμπεριφορά ΜΣ

Ο πολυμερισμός των ΜΣ είναι πολύπλοκη δυναμική διαδικασία που απαιτεί ενέργεια, η οποία παρέχεται από την υδρόλυση του GTP, όταν η σωληνίνη προστίθεται στο άκρο του ΜΣ (Jordan και Wilson 2004α). Ο ρυθμός υδρόλυσης του GTP είναι πολύ βραδύς στα ελεύθερα διμερή, επιταχύνεται όμως μετά τον πολυμερισμό τους (Amos και Schlieper 2005). Ωστόσο, στο (+) άκρο των ταχέως επιμηκυνόμενων ΜΣ, οι υπομονάδες αποτελούνται από διμερή που είναι συνδεδεμένα με GTP, τα οποία διαμορφώνουν ένα GTP-κάλυμμα (cap) (Σχήμα 18). Το κάλυμμα αυτό συμβάλλει στη σταθεροποίηση του ΜΣ (Desai και Mitchinson 1997) και επιτρέπει την επιμήκυνσή του (Jordan και Wilson 2004α). Όταν δεν υπάρχει κάλυμμα GTP, υπομονάδες αφαιρούνται ταχύτατα από τον ΜΣ με αποτέλεσμα τη βράχυνσή του (Jordan και Wilson 2004α). Στη φάση του αποπολυμερισμού, οι υπομονάδες GDP-σωληνίνης απελευθερώνονται από το ΜΣ με γρήγορο ρυθμό (Desai και Mitchinson 1997).

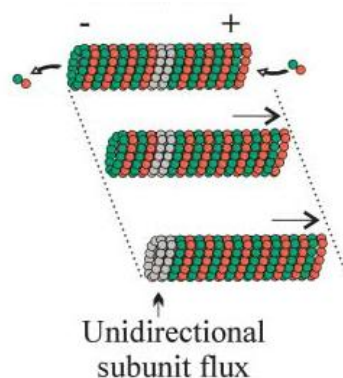
Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, οι ΜΣ εμφανίζουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά δυναμικής συμπεριφοράς (Jordan και Wilson 2004β). Ένα από αυτά είναι η δυναμική αστάθειά (dynamic instability) τους που περιγράφει το φαινόμενο, κατά το οποίο και τα δύο άκρα των ΜΣ βραχύνονται και επιμηκύνονται εναλλάξ (Mitchison και Kirschner 1984). Αυτό είναι πολύ πιο έντονο στο (+) άκρο από ότι στο (-) άκρο, ενώ οι ΜΣ διέρχονται φάσεις, κατά τις οποίες το μήκος τους μεταβάλλεται και άλλες όπου αυτό φαίνεται να παραμένει σταθερό

(Jordan και Wilson 2004β). Η δυναμική αστάθεια των ΜΣ χαρακτηρίζεται από τέσσερις μεταβλητές: τους ρυθμούς πολυμερισμού και αποπολυμερισμού, τη συχνότητα μετάβασης από τη φάση καταστροφής στη φάση δημιουργίας, και το αντίστροφο (Desai και Mitchinson 1997). Καταστροφή (catastrophe) ονομάζεται η φάση κατά την οποία ο ΜΣ αποδιοργανώνεται. Η μείωση του μήκους του ΜΣ μπορεί να παροδικά να σταματήσει. Ο ΜΣ αυτός μπορεί να ξεκινήσει να επιμηκυνεται και πάλι. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται διάσωση (rescue, Σχήμα 18, Amos και Schlieper 2005). Συχνά χρησιμοποιείται ο όρος δυναμικότητα για να περιγραφεί γενικότερα ο ρυθμός ανταλλαγής των ετεροδιμερών στα άκρα του ΜΣ (Jordan και Wilson 2004α). Όταν και τα δύο άκρα είναι ελεύθερα, ο πολυμερισμός και αποπολυμερισμός συμβαίνουν και στα δύο άκρα. Οι ΜΣ επιμηκύνονται, όταν η συγκέντρωση της ελεύθερης σωληνίνης υπερβαίνει μία ορισμένη τιμή. Αυτή η κρίσιμη τιμή είναι υψηλότερη στο (-) άκρο, γεγονός που δικαιολογεί το γεγονός ότι ο πολυμερισμός στο - άκρο σταματά νωρίτερα (Amos 2004).



Σχήμα 18. Σχηματική απεικόνιση της δυναμικής αστάθειας των ΜΣ. Η εναλλαγή φάσεων πολυμερισμού-αποπολυμερισμού είναι χαρακτηριστικό της δυναμικής αστάθειας των ΜΣ. Σημειώνεται ότι, αν και αστάθεια χαρακτηρίζει και τα δύο άκρα τους, στο σχήμα απεικονίζεται μόνο το ένα. Τροποποιημένο από: Kline-Smith και Walczak (2004).

Μία άλλη δυναμική διαδικασία των ΜΣ είναι ο ατέρμων ή αέναος ανασχηματισμός (treadmilling). Ο όρος περιγράφει την κατάσταση κατά την οποία προστίθενται διμερή μόνο στο ένα άκρο και αφαιρούνται από το άλλο άκρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη ροή υπομονάδων σωληνίνης προς μια κατεύθυνση και συνολικά τη «μετατόπιση» του ΜΣ προς το (+) άκρο (Dixit και Cyr 2004, Σχήμα 19).



Σχήμα 19. Σχηματική απεικόνιση του ατέρμονος ανασχηματισμού. Αυτή είναι μία δυναμική κατάσταση κατά την οποία πραγματοποιείται πολυμερισμός μόνο στο (+) άκρο και αποπολυμερισμός στο (-) άκρο. Το γεγονός έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση των υπομονάδων του πολυμερούς (γκρι χρώμα) και την αντίστοιχη «μετατόπιση» του πολυμερούς κατά τη διάρκεια του χρόνου. Τροποποιημένο από: Dixit και Cyr (2004).

Αυτό οφείλεται στις διαφορές της κρίσιμης τιμής της συγκέντρωσης των υπομονάδων στα δύο άκρα του ΜΣ (Jordan και Wilson 2004β). Ο ατέρμων ανασχηματισμός και η δυναμική αστάθεια είναι διαδικασίες που μπορεί να εναλλάσσονται μεταξύ τους, ενώ συχνά κάποια από τις δύο επικρατεί (Jordan και Wilson 2004β). Οι μηχανισμοί που καθορίζουν ποια από τις δύο καταστάσεις θα επικρατήσει σε ένα πληθυσμό ΜΣ πιθανόν σχετίζονται με τους ισοτύπους της σωληνίνης, το ποσοστό μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της σωληνίνης και τη δράση διαφόρων ρυθμιστικών πρωτεϊνών (Jordan και Wilson 2004β).

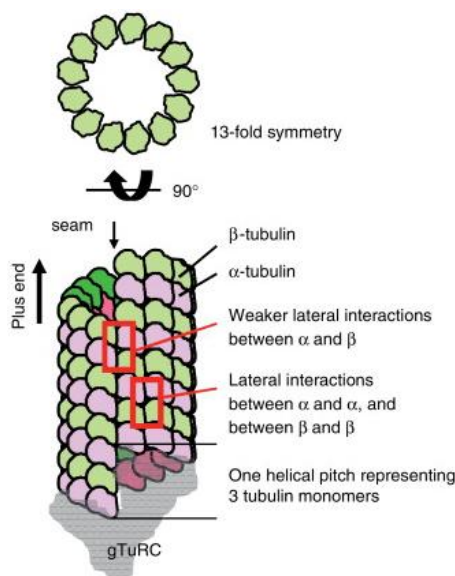
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η διαδικασία πολυμερισμού και αποπολυμερισμού των ΜΣ είναι δυναμική. Οι ΜΣ είναι δομές, οι οποίες δεν είναι σταθερές, αλλά έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής, διότι, παρά τον υψηλό ρυθμό πολυμερισμού, *in vivo* καταστρέφονται με πολύ υψηλή συχνότητα (Desai και Mitchinson 1997). Πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν τη λειτουργία της δυναμικής ανακύκλωσης των ΜΣ *in vivo* περιλαμβάνουν μετρήσεις του χρόνου ημιζωής των διαφόρων συστημάτων ΜΣ. Έγχυση με μικροσύριγγα σωληνίνης σημασμένης με carboxyfluorescein σε κύτταρα του φυτού *Tradescantia virginiana*, επέτρεψε τον υπολογισμό του χρόνου ημιζωής των ΜΣ με την τεχνική της επαναφοράς του φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP, fluorescence recovery after photobleaching). Η ανακύκλωση των ΜΣ της μιτωτικής συσκευής είχε χρόνο ημιζωής 31 s, ενώ ο χρόνος ημιζωής των περιφερειακών ΜΣ, και εκείνων της προ-προφασικής ζώνης και του φραγμοπλάστη κυμαινόταν από 60-67 s (Hush και συν. 1994). Αντίστοιχοι χρόνοι χαρακτηρίζουν τους μιτωτικούς και κυτοπλασματικούς ΜΣ ζωικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, ο χρόνος ημιζωής των ΜΣ καλλιεργούμενων ινοβλαστών κυμαίνεται μεταξύ 200 έως 270 s, εκείνος των διαιρούμενων κυττάρων είναι της τάξεως των 11-87 s, ενώ στους νευράξονες ανέρχεται σε μερικά λεπτά (Hepler και Hush 1996). Ο πολυμερισμός και ο αποπολυμερισμός των ΜΣ εξαρτώνται από διάφορους άλλους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου, η παρουσία αλάτων, η διαθεσιμότητα GTP και η θερμοκρασία (Timasheff και Grisham 1980). Τέλος, η πυρήνωση που προηγείται της επιμήκυνσης των ΜΣ αντιπροσωπεύει ένα καθοριστικό στάδιο για το ρυθμό δημιουργίας τους (Fosket και Morejohn 1992).

1.2.2.6 Κέντρα οργάνωσης ΜΣ

Τα μονομερή της σωληνίνης στα γειτονικά πρωτονημάτια δεν βρίσκονται το ένα απέναντι από το άλλο, αλλά είναι ελαφρά μετατοπισμένα μεταξύ τους με αποτέλεσμα να σχηματίζονται στο φλοιό του ΜΣ δύο αριστερόστροφες έλικες αποτελούμενες από α- και από β-σωληνίνη, αντίστοιχα (Σχήμα 20). Ως συνέπεια, στα άκρα του ΜΣ οι έλικες αφήνουν εκτεθειμένα τρία μονομερή σωληνίνης που ανήκουν σε ένα πρωτονημάτιο (Amos και Schlieper 2005). *In vivo*, η ιδιομορφία αυτή επηρεάζει την πυρήνωση των ΜΣ (Hashimoto

2013). Ενώ σε *in vitro* συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης σωληνίνης δεν απαιτούνται σύμπλοκα για να υποβοηθήσουν την πυρήνωση των ΜΣ, *in vivo* το στάδιο της πυρήνωσης ελέγχεται από τη δραστηριότητα συγκεκριμένων πρωτεϊνικών συμπλόκων. Η παρουσία τους καθιστά εφικτή την έναρξη του σχηματισμού των ΜΣ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σωληνίνης (Seltzer και συν. 2008). Επιπλέον, τα σύμπλοκα πυρήνωσης καθορίζουν τον αριθμό των πρωτονημάτων των ΜΣ, ο οποίος είναι συνήθως 13. Ο αριθμός αυτός έχει ιδιαίτερη σημασία, διότι η συγκρότηση ΜΣ από 13 πρωτονημάτια είναι η μόνη η οποία επιτρέπει σε αυτά να διατάσσονται ακριβώς παράλληλα προς τον άξονα του ΜΣ (Hashimoto 2013).

Ο σχηματισμός των ΜΣ *in vivo* εξαρτάται από τη λειτουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων πυρήνωσης, τα οποία περιέχουν γ -σωληνίνη και 5 πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτή (GCP2-GCP6, γ -tubulin complex protein 2-6). Διαμορφώνουν τελικά δακτυλιοειδή σύμπλοκα που περιέχουν γ -σωληνίνη (γ -TuRC, γ -tubulin containing ring complexes), τα οποία ορίζουν τις θέσεις έναρξης σχηματισμού των πρωτονημάτων (Kollman και συν. 2011). Στο φυτό *A. thaliana* έχουν βρεθεί σύμπλοκα που είναι παρόμοια με τα γ -TuRC των ζωικών κυττάρων (Hashimoto 2013). Η πυρήνωση των ΜΣ με τη βοήθεια αυτών των συμπλόκων είναι πολύ έντονη σε θέσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται ως «κέντρα οργάνωσης ΜΣ» (KOM, MTOCs, microtubule organizing centers, Kollman και συν. 2011).



Σχήμα 20. Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός ΜΣ που αποτελείται από 13 πρωτονημάτια. Ο τρόπος διεύθετησης των μονομερών σωληνίνης στα πρωτονημάτια διαμορφώνει στο φλοιό των ΜΣ μία έλικα από α - και μία από β -σωληνίνη, οι οποίες στο τέλος τους αφήνουν εκτεθειμένα τρία μονομερή σωληνίνης. Σημειώνεται επίσης η θέση των συμπλόκων πυρήνωσης. Τροποποιημένο από: Hashimoto (2013).

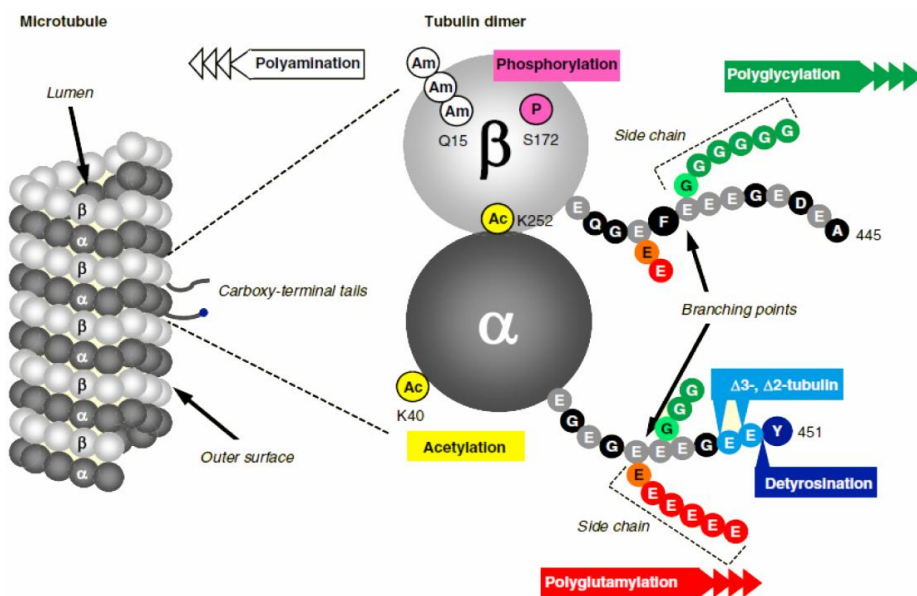
Τα κυριότερα KOM των ζωικών κυττάρων, πολλών φυκών και ορισμένων μυκήτων είναι τα κεντροσωμάτια. Η γ -σωληνίνη εντοπίζεται στο άμορφο υλικό που περιβάλλει τα κεντρώλια στα κύτταρα των παραπάνω οργανισμών, όπως επίσης και τις θέσεις των πολικών σωμάτων, τα οποία εντοπίζονται στους πόλους της ατράκτου ορισμένων μυκήτων. Ωστόσο,

ορισμένοι τύποι ζωικών κυττάρων περιέχουν διατάξεις ΜΣ, η πυρήνωση των οποίων δεν πραγματοποιείται σε κεντροσωμάτια (Seltzer και συν. 2008).

Τα κύτταρα των ανωτέρων φυτών στερούνται κεντροσωματίων και δομικά αναγνωρίσιμων ΚΟΜ σε όλα τα στάδια της ανάπτυξής τους (Schmit 2002). Τα ΚΟΜ σε αυτά αντιστοιχούν σε διάχυτες θέσεις πυρήνωσης που δεν είναι σταθερές, αλλά αλλάζουν θέση και οργάνωση στο κυτόπλασμα ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων ή τη φάση του κυτταρικού κύκλου, περιέχουν όμως γ-σωληνίνη (Brown και Lemmon 2007). Στα κύτταρα των ανωτέρων φυτών, ΚΟΜ εντοπίζονται στο περιφερειακό κυτόπλασμα, στην επιφάνεια του προ-προφασικού/προφασικού πυρήνα, στην περιοχή των πόλων της ατράκτου, στην κεντρική περιοχή του φραγμοπλάστη, όπως επίσης και στην επιφάνεια των πλαστιδίων σε μονοπλαστιδιακά κύτταρα (Brown και Lemmon 2007).

1.2.2.7 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της σωληνίνης

Οι ισότυποι της σωληνίνης που λαμβάνουν μέρος στη συγκρότηση των ΜΣ μπορεί, όπως αναφέρθηκε, να διαφέρουν. Οι ισότυποι είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης διαφορετικών γονιδίων που κωδικοποιούν την ίδια σωληνίνη. Διαφέρουν ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων και, επομένως, είναι λογικό να συμπεραίνεται ότι οι ΜΣ, οι οποίοι συγκροτούνται από διαφορετικά ετεροδιμερή σωληνίνης μπορεί, να έχουν διαφορετική δυναμική (Ludueña 2013).



Σχήμα 21. Σχηματική απεικόνιση των πιο γνωστών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της σωληνίνης που λαμβάνουν χώρα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τροποποιημένο από: Magiera και Janke (2014).

Μία άλλη ιδιότητα της σωληνίνης, η οποία είναι ιδιαίτερως σημαντική για τις ιδιότητες των ΜΣ και τις λειτουργίες τους, είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που

υφίσταται (Janke και Bulinski 2011). Περιλαμβάνουν την προσθήκη χαρακτηριστικών χημικών ομάδων σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα της α - και της β -σωληνίνης (Σχήμα 21). Το αποτέλεσμα της διαδικασίας, η οποία θεωρείται ανεξάρτητη από εκείνη της σύνθεσης διαφορετικών ισοτύπων σωληνίνης, είναι η δημιουργία διαφορετικών ισομορφών σωληνίνης (Parrotta και συν. 2014).

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αλλάζουν τις χημικές ιδιότητες της σωληνίνης επηρεάζοντας τη δυναμική συμπεριφορά των ΜΣ. Το εύρος των τροποποιήσεων είναι αρκετά μεγάλο (Ludueña 2013), με κυριότερες την τυροσινίωση, την ακετυλίωση, πολυγλυκυλίωση, φωσφορυλίωση, πολυαμίνωση, πολυγλουταμυλίωση και τις αντίστροφες αντιδράσεις (Σχήμα 21, Parrotta και συν. 2014) ενώ έχουν αναφερθεί και άλλες που δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς μέχρι σήμερα (Magiera και Janke 2014). Κάποιες αφορούν μόνο στην ελεύθερη σωληνίνη, ενώ έχει διαπιστωθεί και συνδυασμός μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Janke και Bulinski 2011). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι πολλές από τις γνωστές τροποποιήσεις της σωληνίνης δεν έχουν βρεθεί στα φυτικά κύτταρα (Ludueña 2013).

1.2.2.7.1 Τυροσινίωση/αποτυροσινίωση

Η αποτυροσινίωση της σωληνίνης είναι μια από τις πιο κοινές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Parrotta και συν. 2014). Στα περισσότερα ζωικά και φυτικά κύτταρα, το τελευταίο αμινοξύ στο καρβοξυτελικό άκρο της α -σωληνίνης είναι η τυροσίνη και το αμέσως προηγούμενο το γλουταμινικό οξύ (Ludueña 2013). Η απομάκρυνση της τυροσίνης δημιουργεί αποτυροσινιωμένη σωληνίνη, η οποία συχνά ονομάζεται Glu-σωληνίνη. Η απομάκρυνση πραγματοποιείται με τη δράση μίας καρβοξυπεπτιδάσης (Kumar και Flavin 1981). Η αντίστροφη διαδικασία καταλύεται από το ένζυμο λιγάση της τυροσίνης της σωληνίνης, με κατανάλωση ATP (Barra και συν. 1974). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η τυροσινίωση διεξάγεται στα ελεύθερα διμερή, ενώ η αποτυροσινίωση στους ΜΣ (Ludueña 2013). Αυξημένα επίπεδα αποτυροσινιωμένης σωληνίνης φαίνεται ότι σχετίζονται με αυξημένη σταθερότητα των ΜΣ, διότι θεωρείται ότι η αποτυροσινίωση προστατεύει τους ΜΣ από τον αποπολυμερισμό (Parrotta και συν. 2014). Στα φυτικά κύτταρα, τα επίπεδα της τυροσινιωμένης σωληνίνης ποικίλλουν σε διαφορετικούς πληθυσμούς ΜΣ, χωρίς ωστόσο να έχει διαπιστωθεί μια ξεκάθαρη συσχέτιση με το βαθμό σταθερότητας των ΜΣ σε κάθε περίπτωση (Parrotta και συν. 2014). Αναφέρεται πάντως ότι η συντριπτική πλειοψηφία των ΜΣ διαθέτει τυροσίνη και μόνο λίγοι από αυτούς περιέχουν αποτυροσινιωμένη σωληνίνη (Smertenko και συν. 1997). Πέρα από τα παραπάνω, η παρουσία της τυροσίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της σωληνίνης θεωρείται ότι έχει ιδιαίτερη σημασία για τη δέσμευση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τους ΜΣ (microtubule associated proteins, MAPs, Parrotta και συν. 2014).

I.2.2.7.2 Ακετυλίωση

Η ακετυλίωση της σωληνίνης είναι πολύ συντηρημένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση, η οποία έχει διαπιστωθεί σε όλους σχεδόν τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, εκτός από τους μύκητες (Ludueña 2013). Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι στη θέση 252 της β -σωληνίνης μπορεί να συμβεί ακετυλίωση μίας λυσίνης. Σε κύτταρα HeLa βρέθηκαν ετεροδιμερή σωληνίνης, τα οποία είχαν υποστεί αυτή την τροποποίηση. Υποστηρίζεται ότι η ακετυλίωση της K252 αλλάζει τη διαμόρφωση των ετεροδιμερών, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ενσωμάτωσής τους στους ΜΣ (Chu και συν. 2011). Ωστόσο, εκτός από την παραπάνω περίπτωση, η οποία είναι πιο σπάνια, η ακετυλίωση περιλαμβάνει τη μεταφορά μίας ακετυλομάδας στη λυσίνη που βρίσκεται στη θέση 40 της α -σωληνίνης και συχνά συσχετίζεται με ΜΣ, οι οποίοι επιδεικνύουν αυξημένη σταθερότητα (Perdiz και συν. 2011). Η διαδικασία καταλύεται από ακετυλάσες της σωληνίνης. Στο φυτό *A. thaliana*, το ένζυμο ELP3 (elongator protein 3) πιστεύεται ότι δρα ως ακετυλάση της σωληνίνης (Gardiner και Marc 2011). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ακετυλίωση είναι αντιστρεπτή διαδικασία. Αν και δεν είναι το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την αντίδραση της αποακετυλίωσης, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι σε αυτή πιθανόν να εμπλέκεται μία αποακετυλάση της ιστόνης, η HDA14 (histone deacetylase 14, αποακετυλάση ιστόνης 14, Tran και συν. 2012). Οι Tran και συν. (2012) έδειξαν ότι η HDA14 καταλύει την αποακετυλίωση της λυσίνης 40 *in vitro*, ενώ στο φυτό *A. thaliana* συνδέεται με τα $\alpha\beta$ ετεροδιμερή της σωληνίνης.

Ο ρόλος της ακετυλίωσης της σωληνίνης στα φυτικά κύτταρα δεν έχει ακόμα πλήρως διαλευκανθεί (Parrotta και συν. 2014). Οι ΜΣ που αποτελούνται από ακετυλιωμένη σωληνίνη είναι πιο ανθεκτικοί σε παράγοντες που προκαλούν τον αποπολυμερισμό τους (Parrotta και συν. 2014). Κατά κανόνα, η ακετυλιωμένη α -σωληνίνη απουσιάζει από τις ρίζες των αγγειοσπέρμων, ενώ εντοπίζεται στα φύλλα τους (Wang και συν. 2004, Giannoutsou και συν. 2012). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η επίδραση με γιβερελλικό οξύ επάγει την ακετυλίωση της α -σωληνίνης σε καλλιέργεια πρωτοπλαστών των κυττάρων του φυτού *Zea mays* και αποτρέπει τον αποπολυμερισμό των ΜΣ στο ψύχος (Huang και Lloyd 1999). Στα ζωικά κύτταρα η ακετυλίωση της σωληνίνης εμπλέκεται σε διαδικασίες μεταφοράς, στις οποίες συμμετέχουν κινησίνες. Μέχρι σήμερα, όμως, δεν έχει αποδειχθεί αντίστοιχη σχέση της με τις κινησίνες των φυτικών κυττάρων (Parrotta και συν. 2014). Η ακετυλιωμένη λυσίνη 40 βρίσκεται εσωτερικά του κοίλου κυλίνδρου που σχηματίζει ο ΜΣ (Σχήμα 21, Sirajuddin και συν. 2014). Για το λόγο αυτό δεν θεωρείται ότι επηρεάζει την αλληλεπίδραση του καρβοξυτελικού άκρου της σωληνίνης, το οποίο βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά των ΜΣ, με MAPs (Magiera και Janke 2014). Τέλος, έχει διατυπωθεί και η άποψη ότι η παρουσία της λυσίνης στη θέση 40 είναι από μόνη της γεγονός ύψιστης σημασίας, ανεξάρτητα από την παρουσία ακετυλομάδας. Συγκεκριμένα, σε φυτά *A. thaliana* η αντικατάσταση της λυσίνης 40 με αλανίνη ή γλουταμίνη στη σωληνίνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο TUA6

προκάλεσε σοβαρές ανωμαλίες στην ανάπτυξή τους. Αντίθετα, τα φυτά στα οποία είχε πραγματοποιηθεί αντικατάσταση της λυσίνης με αργινίνη είχαν ανάπτυξη παρόμοια με εκείνη των φυτών αγρίου τύπου (Xiong και συν. 2013).

1.2.2.7.3 Φωσφορυλίωση

Η φωσφορυλίωση της σωληνίνης είναι μια τροποποίηση που δεν συμβαίνει συχνά, ενώ ο ακριβής ρόλος της είναι άγνωστος (Parrotta και συν. 2014). Είναι όμως γνωστό, ότι στα ζωικά κύτταρα διάφορες κινάσες καταλύουν την αντίδραση αυτή (Blume και συν. 2008). Έμμεση ένδειξη φωσφορυλίωσης της σωληνίνης παρέχουν πειράματα, σύμφωνα με τα οποία η χρήση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών ή φωσφατασών επηρεάζει την οργάνωση των περιφερειακών ΜΣ (Baskin και Wilson 1997). Παράλληλα, βιοχημικές προσεγγίσεις έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση της α - και της β -σωληνίνης πραγματοποιείται κυρίως σε κατάλοιπα τυροσίνης αλλά και σερίνης/θρεονίνης (Ban και συν. 2013, Parrotta και συν. 2014). Επίσης, με ανοσοεντόπιση διαπιστώθηκε φωσφορυλίωση τυροσίνης σε ΜΣ του περιφερειακού κυτοπλάσματος ή της μιτωτικής συσκευής (Blume και συν. 2008, Sheremet και συν. 2010). Στα φυτά, η πρώτη ισχυρή ένδειξη της ύπαρξης σχέσης μεταξύ της φωσφορυλίωσης της σωληνίνης και της δυναμικής των ΜΣ προέκυψε από πρόσφατα πειράματα σε κύτταρα των *A. thaliana* και *Oryza sativa*. Σε αυτά, η υπερωσμωτική καταπόνηση προκάλεσε την ταχεία φωσφορυλίωση της θρεονίνης που βρίσκεται στη θέση 349 της α -σωληνίνης, ενώ η επαναφορά των κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες οδήγησε στην αποφωσφορυλίωσή της (Ban και συν. 2013). Η φωσφορυλίωση σε αυτή τη θέση σχετίζεται με την καταστροφή των ΜΣ που επάγεται από την υπερωσμωτική καταπόνηση. Το γεγονός ότι η θέση φωσφορυλίωσης βρίσκεται στην επιφάνεια επαφής της α - με τη β -σωληνίνη, δείχνει ότι αυτή συμβαίνει μάλλον μόνο σε μόρια ελεύθερης σωληνίνης και επηρεάζει τον πολυμερισμό των ΜΣ (Ban και συν. 2013).

1.2.2.7.4 Πολυγλουταμυλίωση, πολυγλυκυλίωση, και πολυαμίνωση

Η ενζυμική προσθήκη πλευρικών αλυσίδων γλουταμινικού οξέος σε κατάλοιπα γλουταμινικού της σωληνίνης ονομάζεται πολυγλουταμυλίωση (Σχήμα 21). Η προσθήκη αυτή πραγματοποιείται σε διάφορα σημεία του καρβοξυτελικού άκρου της α - ή β -σωληνίνης, ενώ το μήκος των αλυσίδων ποικίλλει (Magiera και Janke 2014). Ωστόσο, σε ένα συγκεκριμένο κατάλοιπο γλουταμινικού οξέος μπορεί να προστεθεί μία αλυσίδα αμινοξέων γλυκίνης και σε αυτή την περίπτωση η τροποποίηση ονομάζεται πολυγλυκυλίωση (Ludueña 2013). Στα φυτικά κύτταρα δεν είναι γνωστά τα ένζυμα τα οποία καταλύουν τις προσθήκες αυτές, ενώ και οι δύο τροποποιήσεις πραγματοποιούνται στους ΜΣ και όχι στην ελεύθερη σωληνίνη (Parrotta και συν. 2014). Τα επίπεδα του επιπλέον γλουταμινικού οξέος σχετίζονται με τη σταθερότητα των ΜΣ, ενώ η πολυγλυκυλίωση παρατηρείται παρομοίως σε πιο

σταθερούς ΜΣ (Ludueña 2013). Η πολυγλουταμυλίωση μεταβάλλει τα φορτία των καρβοξυτελικών άκρων της σωληνίνης, συνεπώς εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση των ΜΣ με πρωτεΐνες (Magiera και Janke 2014). Υποστηρίζεται ότι και οι δύο τροποποιήσεις εμπλέκονται στο μηχανισμό κατακερματισμού των ΜΣ από την πρωτεΐνη κατανίνη (Sharma και συν. 2007). Επιπλέον, τουλάχιστον στα ζωικά κύτταρα, θεωρείται ότι η πολυγλουταμυλίωση είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση των ΜΣ με μια κατηγορία κινητήριων πρωτεϊνών, τις δυνεΐνες (Ikegami και Setou 2010). Στα φυτικά κύτταρα, έχει διαπιστωθεί πολυγλουταμυλίωση σε ΜΣ κυττάρων των φυτών *Nicotiana tabacum* και *Zea mays*, ενώ δεν είναι μέχρι σήμερα σαφές εάν πραγματοποιείται πολυγλυκυλίωση (Smertenko και συν. 1997, Wang και συν. 2004, Ludueña 2013).

Τέλος, η πολυαμίνωση είναι μη αντιστρεπτή τροποποίηση, η οποία περιλαμβάνει την προσθήκη πρωτοταγών ή δευτεροταγών αμινών σε κατάλοιπα γλουταμίνης, τα οποία συνδέονται με τις αμίνες με ομοιοπολικό δεσμό (Magiera και Janke 2014, Parrotta και συν. 2014). Το ένζυμο που εμπλέκεται σε αυτή τη διαδικασία ονομάζεται τρανσγλουταμινάση και μπορεί να καταλύσει την προσθήκη πολυαμινών τόσο στην ελεύθερη σωληνίνη όσο και στους ΜΣ. Θέσεις προσθήκης έχουν βρεθεί στις περιοχές όπου η β-σωληνίνη δεσμεύει το GTP, αλλά μεταξύ α- και β-σωληνίνης (Magiera και Janke 2014). Οι ΜΣ που έχουν υποστεί πολυαμίνωση πιστεύεται ότι παραμένουν σταθεροί σε συνθήκες που προκαλούν την αποδιοργάνωσή τους, όπως οι αυξημένες συγκεντρώσεις ιόντων ασβεστίου ή οι χαμηλές θερμοκρασίες (Magiera και Janke 2014). Σε γυρεοκόκκους του φυτού *Malus domestica*, η προσθήκη αμινών στη σωληνίνη από μία τρανσγλουταμινάση επηρεάζει αρνητικά τις αλληλεπιδράσεις της με την κινησίνη (Del Duca και συν. 2009).

1.2.2.8 Συσχέτιση ισοτύπων και ισομορφών με τα πολυμερή σωληνίνης

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι διαφορετικοί ισότυποι και ισομορφές της σωληνίνης σχετίζονται στενά με τις ιδιότητες των ΜΣ (Janke και Bulinski 2011). Ο πολυμερισμός της σωληνίνης, η διάρκεια ζωής των ΜΣ, όπως και η αντοχή τους σε συνθήκες καταπόνησης εξαρτώνται από τους ισότυπους και τις ισομορφές της σωληνίνης (Ludueña 2013). Επιπλέον, οι διαφορετικοί ισότυποι και ισομορφές συχνά έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυμερών σωληνίνης με δομικά χαρακτηριστικά διαφορετικά από εκείνα των τυπικών ΜΣ. Συνήθως, οι ΜΣ αποτελούνται από 13 πρωτονημάτια και έχουν εξωτερική διάμετρο 25 nm. Ωστόσο, ΜΣ που δημιουργούνται *in vitro* απουσία του συμπλόκου της γ-σωληνίνης μπορεί να συγκροτούνται από διαφορετικό αριθμό πρωτονηματίων (Ludueña 2013). Επιπλέον, έχει βρεθεί, σε *in vitro* μελέτες πολυμερισμού της σωληνίνης κυττάρων εγκεφάλου, ότι ο αριθμός των πρωτονηματίων ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο διάλυμα, στο οποίο βρίσκεται η σωληνίνη (Pierson και συν. 1978).

Εναλλακτικά, ο αριθμός των πρωτονηματίων μπορεί να σχετίζεται με την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων σωληνίνης και την παραγωγή διαφορετικών ισοτύπων της. Για παράδειγμα, στον *Caenorabditis elegans* ορισμένοι νευρώνες διαθέτουν ΜΣ με μεγάλη διάμετρο που συντίθενται από 15 πρωτονημάτια. Αυτοί αποτελούνται από συγκεκριμένους ισοτύπους α - και β -σωληνίνης (Savage και συν. 1989, Fukushige και συν. 1999). Ωστόσο, πρόσφατα βρέθηκε ότι εκτός από τους ισοτύπους, ένα από τα αίτια της ύπαρξης μεγαλύτερου αριθμού πρωτονηματίων στους ΜΣ μπορεί να είναι και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της σωληνίνης. Στους νευρώνες του *C. elegans*, βρέθηκε ότι η ακετυλίωση της λυσίνης 40 της α -σωληνίνης σχετίζεται με τη δημιουργία ΜΣ μεγάλης διαμέτρου (Cueva και συν. 2012). Πιστεύεται ότι με την ακετυλίωση αποτρέπεται η δημιουργία γέφυρας άλατος μεταξύ της λυσίνης 40 και του γλουταμινικού που βρίσκεται στο ίδιο μόριο στη θέση 55. Με τον τρόπο αυτό σταθεροποιούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών πρωτονηματίων και οι γωνίες στις οποίες αυτά τοποθετούνται (Cueva και συν. 2012). Ο μεγαλύτερος αριθμός πρωτονηματίων, συχνά, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της εξωτερικής διαμέτρου των ΜΣ (Gaertig και Wloga 2012).

Ο όρος «μακροσωληνίσκοι» έχει χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα για την περιγραφή πολυμερών της σωληνίνης, τα οποία έχουν ασυνήθιστα μεγάλη διάμετρο. Η διάμετρος των μακροσωληνίσκων μπορεί να φθάσει ακόμα και τα 60 nm και ο αριθμός των πρωτονηματίων τα 18-20 (Tyson και Bulger 1973, Hinkley 1978). Μακροσωληνίσκοι μπορούν να δημιουργηθούν *in vitro* και *in vivo*, έπειτα από επίδραση με χημικές ουσίες (Tyson και Bulger 1973, Hinkley 1978). Στα φυτικά κύτταρα, η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, όπως τα διαφοροποιούμενα ελαιοσωμάτια του βρυοφύτου *Marchantia palacea* (Galatis και Apostolakos 1976, Apostolakos και Galatis 1998) ή τα ελαιοσωμάτια των επιδερμικών κυττάρων της ωοθήκης του φυτού *Ornithogalum umbellatum* (Kwiatkowska και συν. 2006, 2009). Επιπλέον, η δημιουργία μακροσωληνίσκων επάγεται υπό την επίδραση περιβαλλοντικών καταπονήσεων. Για παράδειγμα, έχει περιγραφεί η συγκρότηση μακροσωληνίσκων σε κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *Triticum turgidum*, τα οποία είχαν υποστεί υπερωσμωτική καταπόνηση (Komis και συν. 2002) ή επίδραση με αργίλιο (Frantzios και συν. 2000), όπως επίσης και σε ακρόρριζα του φυτού *Pisum sativum* επηρεασμένα από δισφαινόλη Α (Adamakis και συν. 2013). Επισημαίνεται ότι ορισμένες χημικές ουσίες προκαλούν το σχηματισμό δομών που αποτελούνται από σωληνίνη, αλλά δεν έχουν σωληνοειδή διαμόρφωση. Οι δομές αυτές μπορεί να συνυπάρχουν με τα άλλα πολυμερή σωληνίνης (Hinkley 1978). Για παράδειγμα, σε κύτταρα ακρόρριζου αγγειοσπέρμων φυτών, τα οποία έχουν υποστεί την επίδραση κολχικίνης σχηματίζονται παρακρυσταλλικές διατάξεις που αποτελούνται από σύμπλοκα σωληνίνης-κολχικίνης, τα οποία ονομάζονται «παρακρύσταλλοι σωληνίνης» (Apostolakos και συν. 1990, Karagiannidou και συν. 1995, Lazareva και συν. 2003, Panteris και συν. 2010). Οι δύο

κατηγορίες πολυμερών, δηλαδή μακροσωληνίσκοι και παρακρύσταλλοι σωληνίνης, συχνά περιγράφονται ως «άτυπα πολυμερή» σωληνίνης (Komis και συν. 2002).

Η ικανότητα των φυτικών κυττάρων να συγκροτούν ΜΣ, συστήματα ΜΣ ή συστήματα που αποτελούνται από άτυπα πολυμερή σωληνίνης εξαρτάται από την ύπαρξη διαφορετικών πρωτεϊνών που συνδέονται με τους ΜΣ (MAPs) και άλλες που σχετίζονται με τη δραστηριότητά τους (Hamada και συν. 2007, Panteris και συν. 2010).

1.2.2.9 Πρωτεΐνες που σχετίζονται με ΜΣ (MAPs)

Ο όρος MAP χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να περιγράψει τις πρωτεΐνες εκείνες, οι οποίες απομονώνονταν μαζί με ΜΣ, έπειτα από διαδοχικούς κύκλους δημιουργίας-καταστροφής ΜΣ σε πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από κύτταρα εγκεφάλου (Lloyd και Hussey 2001). Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα, μετά από αρκετούς κύκλους πολυμερισμού-αποπολυμερισμού-φυγοκέντρωσης, την απομόνωση κυτταρικών κλασμάτων πλούσιων σε σωληνίνη. Τα κλάσματα περιέχουν και πλήθος άλλων πρωτεϊνών που δεσμεύονται ισχυρά στη σωληνίνη (Hamada και συν. 2013). Παρ' όλα αυτά, κάποιες πρωτεΐνες, αν και είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην οργάνωση και λειτουργία των ΜΣ, μπορεί να μην απομονώνονται από αυτά, διότι συνδέονται στη σωληνίνη με μικρότερη συνάφεια. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια ο όρος MAPs περιλαμβάνει όλες τις πρωτεΐνες, οι οποίες έστω και παροδικά, συνεντοπίζονται με ΜΣ και η λειτουργία τους σχετίζεται με αυτούς (Hamada 2014). Οι MAPs συμμετέχουν στη συγκρότηση των ετεροδιμερών της σωληνίνης, στον πολυμερισμό και τη σταθεροποίηση των ΜΣ ή καταλύουν τον κατακερματισμό τους και προωθούν τον αποπολυμερισμό τους, ή ευθύνονται για την οργάνωση διαφόρων συστημάτων ΜΣ (Struk και Dhonukshe 2014).

1.2.2.9.1 Μοριακές συνοδοί

Η δημιουργία ετεροδιμερών **αβ** σωληνίνης που αναδιπλώνονται με το σωστό τρόπο προϋποθέτει τη δραστηριότητα βοηθητικών πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται μοριακές συνοδοί ή τσαπερόνες. Η σωληνίνη αναδιπλώνεται αρχικά με τη βοήθεια της τσαπερόνης CCT (cytosolic chaperonin containing TCP-1, Struk και Dhonukshe 2014). Στα ζωικά κύτταρα, η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται στα κεντροσωμάτια. Στα φυτικά κύτταρα, απαντά σε κυτταρικές θέσεις στις οποίες διεξάγεται πυρήνωση νέων ΜΣ, ενώ συνεντοπίζεται με τα διάφορα συστήματα ΜΣ (Nick και συν. 2000). Στη συνέχεια, η ορθή συγκρότηση ετεροδιμερών διευκολύνεται από συμπαραγόντες που συμμετέχουν στην αναδίπλωση της σωληνίνης (TFCs, tubulin folding cofactors). Πρόκειται για πρωτεΐνες, οι οποίες μεταξύ άλλων εμπλέκονται στη διαθεσιμότητα των ετεροδιμερών και τη σταθερότητα των ΜΣ (Struk και Dhonukshe 2014). Στα φυτά, υπάρχει μία ομάδα γονιδίων που κωδικοποιούν ορθόλογες πρωτεΐνες των TFCs και ονομάζονται PILZ. Τα μεταλλάγματα *pilz* του φυτού *A. thaliana*

εμφανίζουν σοβαρά προβλήματα στη δημιουργία ΜΣ (Mayer και συν. 1999). Μία άλλη πολύ συντηρημένη μοριακή συνοδός, η οποία βρίσκεται στα κεντροσωμάτια και έχει, εκτός των άλλων, την ικανότητα να συνδέεται τόσο στα ελεύθερα διμερή όσο και σε ΜΣ είναι η πρωτεΐνη Hsp90 (heat shock protein 90). *In vitro*, αποκτά λειτουργική στερεοδιαμόρφωση μαζί με τους ΜΣ ενώ σε καλλιέργεια κυττάρων του φυτού *Nicotiana tabacum* συνδέεται με τους ΜΣ και εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση των διαφόρων συστημάτων τους (Krtková και συν. 2012).

I.2.2.9.2 Πρωτεΐνες του συμπλόκου της γ-σωληνίνης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η πυρήνωση των ΜΣ *in vitro* μπορεί να πραγματοποιηθεί απουσία MAPs. Ωστόσο, εντός των κυττάρων η πυρήνωση προωθείται από MAPs, ώστε να επιτυγχάνεται η μείωση της τιμής της κρίσιμης συγκέντρωσης της σωληνίνης που απαιτείται για τον πολυμερισμό των ΜΣ (Hamada 2014). Το σύμπλοκο της γ-σωληνίνης είναι από τις πιο μελετημένες δομές που συμμετέχουν στην πυρήνωση ΜΣ (βλέπε ενότητα 1.2.2.5). Η στόχευση της γ-σωληνίνης στις θέσεις πυρήνωσης των ΜΣ απαιτεί τη δράση του συμπλόκου της πρωτεΐνης Augmin. Η πρωτεΐνη αυτή στα ζωικά κύτταρα εντοπίζεται στη μιτωτική συσκευή και σχετίζεται με την πυρήνωση των ΜΣ της ατράκτου, ενώ απουσιάζει από τα κεντροσωμάτια (Goshima και συν. 2007). Στο φυτό *A. thaliana* η Augmin σχετίζεται με την αυτοοργάνωση των ΜΣ της μιτωτικής ατράκτου και του φραγμοπλάστη. Η απενεργοποίηση του γονιδίου της Augmin διαταράσσει το πρότυπο εμφάνισης της γ-σωληνίνης και προκαλεί τη δημιουργία λιγότερων και μεγαλύτερων σε μήκος ΜΣ στην άτρακτο (Hotta και συν. 2012). Δεν σχετίζονται όλα τα μέλη που ανήκουν στις Augmins με το μεσοφασικό περιφερειακό σύστημα ΜΣ. Όμως, η υπομονάδα AUG8 βρίσκεται στο (+) άκρο των περιφερειακών ΜΣ και εμπλέκεται στην οργάνωσή τους (Hotta και συν. 2012). Εκτός από την Augmin, και η πρωτεΐνη NEDD1 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 1), η οποία περιέχει επαναλαμβανόμενα μοτίβα τρυπτοφάνης ασπαρτικού (WD40), σχετίζεται με το σύμπλοκο της γ-σωληνίνης. Στο *A. thaliana*, η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται στους ΜΣ της μιτωτικής συσκευής, κατά κύριο λόγο στο (-) άκρο τους (Zeng και συν. 2009). Υποστηρίζεται ότι, κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η NEDD1 λαμβάνει μέρος στη σύνδεση της Augmin με το σύμπλοκο της γ-TuRC (Hashimoto 2013).

I.2.2.9.3 Σύμπλοκο πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A

Η TONNEAU1 (TON1) είναι πρωτεΐνη, η οποία παρουσιάζει υψηλή ομοιότητα με την FOP (FGR1 oncogene partner) που εντοπίζεται στα κεντροσωμάτια των κυττάρων του ανθρώπου (Struk και Dhonukshe 2014). Στα φυτικά κύτταρα, η TON1 απαντά στο περιφερειακό σύστημα ΜΣ και την προ-προφασική ζώνη ΜΣ. Τα *ton1* μεταλλάγματα στο *Arabidopsis*, εμφανίζουν σημαντικές αλλοιώσεις στο φαινότυπο σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου,

γεγονός το οποίο αποδίδεται στην απουσία προ-προφασικής ζώνης ΜΣ και την επακόλουθη αποτυχία καθορισμού του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης (Azimzadeh και συν. 2008). Η TON1 αλληλεπιδρά με μία πρωτεΐνη του *A. thaliana*, η οποία είναι ομόλογη της κεντρίνης (Azimzadeh και συν. 2008). Η TON1 μαζί με την TONNEAU2 (TON2)/FASS σχηματίζουν ένα σύμπλοκο πρωτεϊνικής φωσφατάσης PP2A (protein phosphatase 2A), στο οποίο η TON2 αποτελεί ρυθμιστική υπομονάδα (Spinner και συν. 2013). Ο φαινότυπος των μεταλλάξεων *fass* είναι παρόμοιος με αυτόν των *ton1*, ενώ και από τα φυτά αυτά απουσιάζει η προ-προφασική ζώνη ΜΣ (Camilleri και συν. 2002). Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι η TON2 εμπλέκεται ειδικά στην πυρήνωση ΜΣ, όταν αυτή βασίζεται σε προϋπάρχοντες ΜΣ στο περιφερειακό κυτόπλασμα (Kirik και συν. 2012). Στο σύμπλοκο της PP2A συμμετέχει και η TRM (TON1 recruiting motif), η οποία αφενός αλληλεπιδρά και με την TON2 και αφετέρου ευθύνεται για τη στόχευση της TON1 στους ΜΣ του περιφερειακού κυτοπλάσματος (Spinner και συν. 2013).

I.2.2.9.4 MOR1

Η πρωτεΐνη MOR1 ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών MAP215. Τα μέλη αυτής της οικογένειας επηρεάζουν τη δυναμική των ΜΣ, διότι προωθούν την αύξηση ή τη συρρίκνωση των ΜΣ και προάγουν τη συγκρότηση ΜΣ *in vivo* και *in vitro* (Hamada 2014). Η MOR1 ανακαλύφθηκε σε μεταλλάγματα του φυτού *A. thaliana*, στα οποία διαπιστώθηκε αποδιοργάνωση των ΜΣ σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 29 °C (Whittington και συν. 2001). Στα φυτά η MOR1 εντοπίζεται σε όλα τα συστήματα ΜΣ (Hamada 2014). Σε μεταλλάγματα, στα οποία η MOR1 απουσιάζει, διαταράσσεται η οργάνωση ΜΣ του περιφερειακού κυτοπλάσματος, της μιτωτικής ατράκτου ή του φραγμοπλάστη (Whittington και συν. 2001, Eleftheriou και συν. 2005, Kawamura και συν. 2006α). Είναι ενδιαφέρον ότι στα μεταλλάγματα αυτά η δυναμική των ΜΣ επηρεάζεται, ακόμα και σε θερμοκρασίες κάτω των 29 °C. Επιπλέον, διαταράσσεται και το πρότυπο κατανομής μίας άλλης MAP, της EB1, γεγονός που υποδηλώνει ότι η MOR1 εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση της EB1 με τους ΜΣ (Kawamura και Wasteneys 2008).

I.2.2.9.5 EB1

Η EB1 (end binding protein 1) είναι πρωτεΐνη που απαντά σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Hamada 2014). Ανήκει στις +TIPs, δηλαδή στις MAPs που συνδέονται στο αναπτυσσόμενο (+) άκρο των ΜΣ (plus end-binding proteins). Οι πρωτεΐνες αυτές προωθούν τον πολυμερισμό των ΜΣ και πιστεύεται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δυναμικής τους κατάστασης, αλλά και στις αλληλεπιδράσεις των ΜΣ με άλλες πρωτεΐνες ή κυτταρικές δομές (Kumar και Whittman 2012). Η EB1 θεωρείται ότι σταθεροποιεί τη σωληνοειδή δομή των ΜΣ και εμποδίζει τη μείωση του μήκους των αναπτυσσόμενων (+)

άκρων τους (Struk και Dhonukshe 2014). Στο φυτό *A. thaliana* υπάρχουν τρεις πρωτεΐνες EB1, οι EB1a, EB1b και EB1c. Οι δύο πρώτες εντοπίζονται στο (+) άκρο των ΜΣ σε όλα τα συστήματα ΜΣ. Είναι ενδιαφέρον ότι στο καρβοξυτελικό άκρο αυτών των πρωτεϊνών υπάρχει μία επικράτεια, μέσω της οποίας οι EB1a και EB1b εμποδίζουν τη συγκρότηση ΜΣ *in vitro*. Αντίθετα, η EB1c δεν διαθέτει αυτή τη χαρακτηριστική επικράτεια, έχει έντονη παρουσία στο μεσοφασικό πυρηνόπλασμα των μεριστωματικών κυττάρων, ενώ κατά την κυτταροδιαίρεση εντοπίζεται στους ΜΣ της μιτωτικής ατράκτου και του φραγμοπλάστη (Komaki και συν. 2010). Η άτρακτος και ο φραγμοπλάστης έχουν άτυπη οργάνωση στα μεταλλάγματα, τα οποία στερούνται και των τριών γονιδίων EB1 (Komaki και συν. 2010). Επιπλέον, θεωρείται ότι οι υπόλοιπες +TIPs προσδένονται στο (+) άκρο των ΜΣ μέσω της EB1 (Kumar και Whittman 2012).

I.2.2.9.6 CLASP

Στην ομάδα των πρωτεϊνών που προσδένονται στο (+) άκρο των ΜΣ ανήκουν και οι πρωτεΐνες CLASP (CLIP-associated proteins, Akhmanova και συν. 2001, Horio και Murata 2014). Οφείλουν την ονομασία τους στο γεγονός ότι δεσμεύονται, εκτός από τους ΜΣ, στις πρωτεΐνες CLIP (cytoplasmic linker protein), οι οποίες αποτελούν σύνδεσμο των ΜΣ με άλλες κυτταρικές δομές (Hamada 2014). Συνδέονται κατά κύριο λόγο πλησίον του (+) άκρου των ΜΣ, αλλά εντοπίζονται και κατά μήκος ολόκληρης της επιφάνειάς τους (Struk και Dhonukshe 2014). Σε ότι αφορά στη δομή τους, παρουσιάζουν ομοιότητες με τις XMAP215 και την ομόλογη πρωτεΐνη των φυτικών κυττάρων MOR1, φέρουν δε την επικράτεια TOG (tumor overexpressing gene), μέσω της οποίας δεσμεύονται στα ετεροδιμερή της σωληνίνης (Al-Bassam και Chang 2011). Στα ζωικά κύτταρα, οι CLASP επιτελούν διάφορες λειτουργίες, σταθεροποιούν τα (+) άκρα των ΜΣ και αποτρέπουν τον αποπολυμερισμό τους, μέσω της σύνδεσής τους στην επιφάνεια των ΜΣ. Οι CLASPs συνδέουν τα (+) άκρα των ΜΣ με τους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων ή το πλασμαλήμμα (Hamada 2014). Είναι απαραίτητες στα φυτά για την οργάνωση της μιτωτικής ατράκτου και του φραγμοπλάστη ενώ εντοπίζονται και σε όλα τα υπόλοιπα συστήματα ΜΣ (Ambrose και συν. 2007). Στο φυτό *A. thaliana*, η CLASP αποτρέπει τον αποπολυμερισμό ΜΣ, που προκαλείται όταν οι τελευταίοι φθάνουν στην περιφέρεια του κυττάρου (Ambrose και συν. 2011).

I.2.2.9.7 TPX2

Η TPX2 (targeting protein for Xkpl2) είναι μία MAP με πολλές λειτουργίες, η οποία σχετίζεται με την οργάνωση της μιτωτικής συσκευής των ζωικών κυττάρων (Hamada 2014). Αρχικά βρέθηκε ότι εμπλέκεται στη στόχευση της κινησίνης 12 στους πόλους της ατράκτου, ενώ στη συνέχεια ταυτοποιήθηκε ως υποψήφιος στόχος της Ran GTPάσης (Petrovská και συν. 2013). Στα ζωικά κύτταρα, στη μεσόφαση εντοπίζεται στον πυρήνα και στη συνέχεια,

κατά το τέλος της πρόφασης, μεταφέρεται στο κυτόπλασμα, όπου και συμμετέχει στην πυρήνωση ΜΣ στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων κατά την προμετάφαση και μετάφαση (Vos και συν. 2008). Η TPX2 ενεργοποιεί την κινάση aurora A, η οποία διαδραματίζει πολλούς ρόλους κατά τη διάρκεια της κυτταροδιαίρεσης (Vos και συν. 2008). Στα φυτικά κύτταρα, υπάρχουν πολλά υποψήφια γονίδια, ένα από τα οποία κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη ορθόλογη της TPX2 (Vos και συν. 2008). Στο φυτό *A. thaliana*, η πρωτεΐνη αυτή εξέρχεται από τον πυρήνα στο τέλος της φάσης G₂ και λαμβάνει μέρος στην πυρήνωση των περιπυρηνικών ΜΣ. Ακολούθως, συμμετέχει στην πυρήνωση και τη σταθεροποίηση των ΜΣ της μιτωτικής ατράκτου ενώ κατά τη διάρκεια της κυτοκίνησης αποδιοργανώνεται (Vos και συν. 2008, Envrard και συν. 2009). Επίσης, σε κύτταρα φύλλου του περιδόφυτου *Asplenium nidus*, έχει βρεθεί μία πρωτεΐνη που αναγνωρίζεται από το αντίσωμα έναντι της AtTPX2. Αυτή συνεντοπίζεται με τους ΜΣ του περιπυρηνικού κυτοπλάσματος, της προφασικής, μεταφασικής και αναφασικής ατράκτου και του διαζωνικού τελοφασικού συστήματος ΜΣ. Επιπλέον, εντοπίζεται στο φραγμοπλάστη των κυτοκινητικών κυττάρων και σε μια περιοχή του πυρηνικού φακέλου που βρίσκεται προς το θυγατρικό κυτταρικό τοίχωμα. Απαντά επίσης και στο περιφερειακό κυτόπλασμα που επενδύει το θυγατρικό τοίχωμα (Panteris και συν. 2013).

I.2.2.9.8 MAP70

Μία άλλη MAP, η οποία έχει βρεθεί μόνο στα φυτικά κύτταρα, είναι η MAP70 (Korolev και συν. 2005, Hamada 2014). Στο φυτό *A. thaliana* έχουν ταυτοποιηθεί πέντε μέλη της πρωτεΐνης αυτής (Korolev και συν. 2005). Η MAP70-1 συνεντοπίζεται με όλα τα συστήματα ΜΣ και διαθέτει την ικανότητα να δεσμεύεται στους ΜΣ και *in vitro* (Korolev και συν. 2005). Η MAP70-5, αντίθετα από τη MAP70-1, η οποία παράγεται σε όλα τα όργανα, εντοπίζεται μόνο στα διαφοροποιούμενα κύτταρα του ξυλώματος (Korolev και συν. 2005). Η λειτουργία των διαφορετικών αντιπροσώπων της MAP70 δεν είναι πλήρως γνωστή (Hamada 2014). Ωστόσο, για την MAP70-5 είναι γνωστό ότι επηρεάζει τον πολυμερισμό και τη δυναμική των ΜΣ. Σε *in vitro* πειράματα, η παρουσία της οδήγησε στη συγκρότηση ΜΣ με μεγαλύτερο μήκος σε σχέση με τους αντίστοιχους που σχηματίζονται απουσία κάποιας MAP (Korolev και συν. 2007). Η αποσιώπηση του γονιδίου της MAP70-5 σε κύτταρα ρίζας προκαλεί τη δημιουργία περιεστραμμένων γύρω από τον άξονα αύξησης φυτικών οργάνων, τα οποία έχουν ελικοειδή εμφάνιση (Korolev και συν. 2007).

I.2.2.9.9 SPIRAL

Περιεστραμμένα όργανα δημιουργούνται, αντίστοιχα, και στα μεταλλάγματα *Arabidopsis* από τα οποία απουσιάζουν οι πρωτεΐνες SPIRAL1 και SPIRAL2 (SPR1, SPR2, Furutani και συν. 2000). Η πρωτεΐνη SPR1 είναι ένα μόριο μικρού μεγέθους με MB μόλις 12 kDa που

ανήκει στις +TIPs. Εντοπίζεται στο ταχύτερα αναπτυσσόμενο (+) άκρο σε όλα τα συστήματα ΜΣ και εξαφανίζεται όταν αυτοί συρρικνώνονται. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η SPR1 είτε προωθεί τον πολυμερισμό στο (+) άκρο των ΜΣ ή αποτρέπει την καταστροφή τους (Sedbrook και συν. 2004). Σε συνθήκες καταπόνησης που προκαλούν την αποδιοργάνωση των ΜΣ, όπως είναι η υψηλή αλατότητα, η SPR1 υφίσταται πρωτεόλυση από το πρωτεάσωμα 26S (Wang και συν. 2011α). Η SPR1 είναι συντηρημένη πρωτεΐνη που απαντά μόνο στα φυτικά κύτταρα. Στο *A. thaliana* υπάρχουν έξι πρωτεΐνες αυτής της ομάδας (Hamada και συν. 2013). Η SPR2 βρίσκεται επίσης μόνο στα φυτικά κύτταρα, διαθέτει την επικράτεια TOG και δεσμεύεται στο (+) άκρο των ΜΣ. Ωστόσο, αυτή παραμένει στο (+) άκρο των ΜΣ ακόμη και όταν αυτοί συρρικνώνονται (Whittman και συν. 2013). *In vivo*, εντοπίζεται σε όλες τις διατάξεις ΜΣ και επηρεάζει τη δυναμική τους. Η δράση της είναι όμοια με την αντίστοιχη των πρωτεϊνών MAP215 (Hamada 2014). Σε φυτά *A. thaliana* διαπιστώθηκε ότι, η παρουσία της SPR2 στα άκρα των ΜΣ σε θέσεις διασταύρωσης ΜΣ με διαφορετικό προσανατολισμό, σταθεροποιεί τις θέσεις αυτές και αποτρέπει τη δράση της κατανίνης, μίας πρωτεΐνης που κατακερματίζει τους ΜΣ (βλέπε παρακάτω, Whittman και συν. 2013).

I.2.2.9.10 AIR9

Η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη AIR9 (auxin-induced in root cultures 9) επάγεται από τη δράση της αυξίνης κατά τη διάρκεια σχηματισμού των πλάγιων ριζών (Bushmann και συν. 2006, Hamada 2014). Η AIR9 είναι MAP μοριακού βάρους 187 kDa, η οποία είναι συντηρημένη στα φυτά, ενώ απαντά και σε κάποια πρωτόζωα. Συνεντοπίζεται με τους περιφερειακούς ΜΣ στη μεσόφαση και με εκείνους της προ-προφασικής ζώνης, ενώ δεν ανιχνεύεται κατά τη μίτωση. Είναι ενδιαφέρον όμως ότι επανεμφανίζεται στο φραγμοπλάστη και, στη συνέχεια, στη θέση, όπου είχε σχηματιστεί η προ-προφασική ζώνη ΜΣ, όταν ο φραγμοπλάστης πλησιάζει στην περιφέρεια του κυττάρου. Τελικά, εντοπίζεται στο περιφερειακό κυτόπλασμα που επενδύει το θυγατρικό τοίχωμα (Bushmann και συν. 2006). Αν και κατατάσσεται στις MAPs, προς το παρόν δεν είναι γνωστός ο ρόλος τον οποίο επιτελεί (Hamada 2014).

I.2.2.9.11 EDE1

Μία πρωτεΐνη που επίσης απαντά μόνο στα φυτά και ανήκει στις MAPs είναι η EDE1 (endosperm defective 1). Τα φυτά, τα οποία στερούνται του γονιδίου *EDE1*, εμφανίζουν προβλήματα ανάπτυξης του σπέρματος και δημιουργίας του ενδοσπερμίου, καθώς δημιουργείται πολύ μικρότερος αριθμός ενδοσπερμικών πυρήνων σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Το γονίδιο *EDE1* εκφράζεται μόνο στο ενδοσπέρμιο και το έμβρυο των αναπτυσσόμενων σπερμάτων. Η EDE1 εντοπίζεται αποκλειστικά στους ΜΣ της μιτωτικής

ατράκτου και του φραγμοπλάστη. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί η ικανότητά της να δεσμεύεται στους ΜΣ *in vitro* (Pignocchi και συν. 2009, Hamada 2014).

1.2.2.9.12 Η οικογένεια πρωτεϊνών MAP65

Οι δεσμίδες ΜΣ συγκροτούνται με τη βοήθεια πρωτεϊνών που συνδέουν τους ΜΣ μεταξύ τους. Οι πιο γνωστές πρωτεΐνες με αυτή τη λειτουργία στα φυτικά κύτταρα είναι τα μέλη της οικογένειας MAP65 ενώ υπάρχουν ομόλογες στα ζωικά κύτταρα (PRC1, protein regulating cytokinesis 1) και τους μύκητες (Ase1, anaphase spindle elongation 1, Walczak και Shaw 2010). Οι MAP65 συνιστούν μια συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών με μέλη που έχουν MB 60-65 kDa (Chang-Jie και Sonobe 1993). Το φυτό *A. thaliana* διαθέτει εννέα μέλη, ενώ στο *Oryza sativa* έχουν βρεθεί έντεκα (Hamada 2014).

	Method	Interphase	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase
NtMAP65-1a	antibody	CMTs	PPB	Midzone	Midzone	Midline
	GFP	CMTs	PPB	No strong staining	Midzone	Midline
AtMAP65-1	antibody	CMTs	PPB	No strong staining	Midzone	Midzone
	GFP	CMTs	—	—	—	Midzone
	GFP	—	PPB	No strong staining	Midzone	Midzone
AtMAP65-2	GFP	CMTs	PPB	No strong staining	Midzone	Midzone
	GFP	CMTs	PPB	Spindle	Midzone	Phragmoplast
AtMAP65-3	antibody	No staining	No staining	No staining	Midline	Midline
	antibody		No strong staining	No strong staining	Midline	Midline
	GFP	—	—	—	Midline	Midline
AtMAP65-4	GFP	No staining	Nucleus periphery	Spindle pole regions	Spindle pole regions	No staining
	GFP	No staining	Nucleus periphery	Kinetochore MTs	Kinetochore MTs	No strong staining
	antibody		Nucleus periphery	No strong staining	midzone	Phragmoplast
AtMAP65-5	GFP	CMTs	PPB and Nucleus periphery	Spindle	Spindle	midline
	GFP	—	PPB and Nucleus periphery	midzone	midzone	midline
	antibody	CMTs	PPB	No strong staining	midzone	midline
AtMAP65-6	antibody	mitochondria	—	—	—	—
	antibody	CMTs as dots	PPB	Spindle	Spindle	Phragmoplast
AtMAP65-7		subgroup with AtMAP65-6				
AtMAP65-8	GFP	CMTs as dots	—	Some of spindle MTs and spindle poles as dots		outer side of phragmoplast and dots around nucleus
	antibody	No staining	No staining	No staining	No staining	No staining

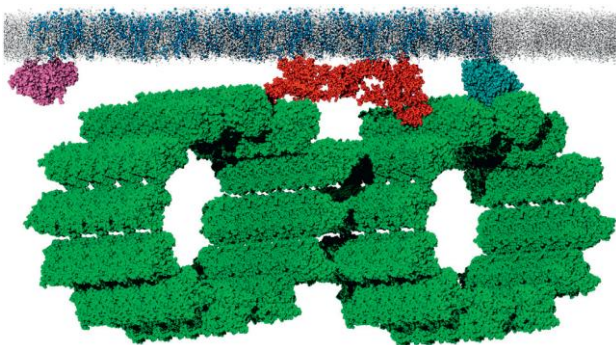
Πίνακας 5. Το πρότυπο εμφάνισης των διαφόρων ισομορφών MAP65 στη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Τροποποιημένο από: Hamada (2014).

Όλες οι MAP65 φέρουν μία περιοχή στο αμινοτελικό άκρο, η οποία αποτελείται από περιεστραμμένες α-έλικες που διαμορφώνουν ένα σπείραμα (coiled-coil region), το οποίο τους προσδίδει την ικανότητα σχηματισμού διμερών (Ho και συν. 2012). Στο καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται η περιοχή, μέσω της οποίας δεσμεύονται στους ΜΣ. Διαφέρει στις διαφορετικές ισομορφές των MAP65 και καθορίζει τις ιδιότητές τους (Smertenko και συν. 2008). Οι MAP65 εντοπίζονται σε δεσμίδες ΜΣ με αντιπαράλληλο ή με τον ίδιο

προσανατολισμό και προωθούν το σχηματισμό αυτών των δεσμίδων ΜΣ (Stoppin-Mellet και συν. 2013). Το πρότυπο εμφάνισης κάθε μίας από τις πρωτεΐνες της οικογένειας MAP65 διαφέρει ανάλογα με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου (Πίνακας 5, Hamada 2014).

Η MAP65-1 είναι η περισσότερο μελετημένη πρωτεΐνη της οικογένειας MAP65 (Ehrhardt 2008). Η κατανομή της κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων της κυτταροδιαίρεσης φαίνεται ότι ελέγχεται αυστηρά (Chang και συν. 2005). Στο φυτό *A. thaliana* συνδέεται με τους μεσοφασικούς ΜΣ του περιφερειακού κυτοπλάσματος. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης εντοπίζεται στους ΜΣ της προ-προφασικής ζώνης, η παρουσία της δεν είναι έντονη στη μεταφασική άτρακτο, ενώ επανεμφανίζεται σε κεντρικές θέσεις της αναφασικής ατράκτου όπου οι ΜΣ αλληλοεπικαλύπτονται. Επιπλέον, κατά την κυτοκίνηση εντοπίζεται στο φραγμοπλάστη και, ιδιαίτερα, στην κεντρική περιοχή του (Smertenko και συν. 2004).

Η MAP65-1 δεσμεύεται στους ΜΣ με τη μορφή διμερών, δημιουργώντας πολλές εγκάρσιες γέφυρες μεταξύ γειτονικών ΜΣ, οι οποίες έχουν μήκος 25 nm (Σχήμα 22, Li και συν. 2007α). Υποστηρίζεται ότι η MAP65-1 δεσμεύεται κατά κανόνα σε ΜΣ με αντιπαράλληλο προσανατολισμό, αλλά και σε ΜΣ με τον ίδιο προσανατολισμό (Hamada 2014). Η δημιουργία συνδέσεων, μέσω της MAP65, μεταξύ πολυμερών σωληνίνης εξαρτάται από τη γωνία που σχηματίζεται μεταξύ τους (Tulin και συν. 2012). Η MAP65-1, όπως θα δούμε σε επόμενη ενότητα, αποτελεί στόχο MAPKs και άλλων κινασών (Smertenko και συν. 2006). Η φωσφορυλίωση της MAP65-1 σε θέσεις που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο του μορίου προκαλεί την αποδέσμευσή της από τους ΜΣ (Smertenko και συν. 2006).



Σχήμα 22. Εγκάρσια γέφυρα μεταξύ δύο γειτονικών ΜΣ (πράσινο) από διμερή MAP65-1 (κόκκινο). Τροποποιημένο από: Pleskot και συν. (2013).

Η MAP65-1, παράλληλα με τη δράση της ως πρωτεΐνης που συνδέει γειτονικούς ΜΣ με αποτέλεσμα τη δημιουργία δεσμίδων ΜΣ, πιστεύεται ότι προωθεί την πυρήνωση και τον πολυμερισμό των ΜΣ, ενώ η παρουσία της μειώνει την κρίσιμη συγκέντρωση της σωληνίνης που απαιτείται για τον πολυμερισμό τους (Mao και συν. 2005). Η άποψη αυτή ενισχύεται από πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι η AtMAP65-1 μπορεί να συνδεθεί με τα ετεροδιμερή της σωληνίνης *in vitro* (Li και συν. 2007β). Επιπλέον, υποστηρίχθηκε πρόσφατα ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας MAP65 σχετίζονται με τη δημιουργία και σταθεροποίηση και

άτυπων πολυμερών σωληνίνης. Σε κύτταρα ρίζας του φυτού *Vigna sinensis*, η συγκρότηση παρακρυστάλλων σωληνίνης, έπειτα από επίδραση με κολχικίνη, φαίνεται ότι επιτυγχάνεται με τη βοήθεια πρωτεϊνών MAP65. Η δέσμευσή τους στα πολυμερή σωληνίνης-κολχικίνης φαίνεται ότι ελέγχεται με φωσφορυλίωση. Με βάση τα παραπάνω, οι MAP65 πρωτεΐνες διαθέτουν και χαρακτηριστικά πρωτεϊνών που σχετίζονται γενικότερα με σωληνίνη (tubulin associated proteins, Panteris και συν. 2010).

I.2.2.9.13 TANGLED1

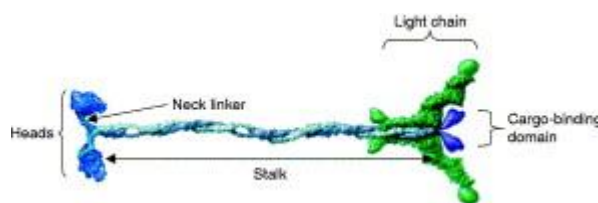
Η πρωτεΐνη TANGLED1 (TAN1) απαντά αποκλειστικά στα φυτικά κύτταρα. Ανακαλύφθηκε πρώτη φορά σε μεταλλάγματα του φυτού *Zea mays*, στα οποία ο καθορισμός του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης έχει διαταραχθεί. Η πρωτεΐνη αυτή εμφανίζει ομοιότητα με την πρωτεΐνη APC (anaphase promoting complex, σύμπλοκο προώθησης της ανάφασης) των ζωικών κυττάρων, όσον αφορά στην περιοχή που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση της APC στους ΜΣ (Smith και συν. 2001). Η TAN1 δεσμεύεται στους ΜΣ *in vitro*, ενώ σε διαιρούμενα κύτταρα καταβολών φύλλου του φυτού *Z. mays* εντοπίζεται μαζί με τα διαδοχικά συστήματα ΜΣ που σχηματίζονται κατά την κυτταροδιαίρεση (Smith και συν. 2001). Στο φυτό *Arabidopsis*, όμως, απαντά στην περιοχή της προ-προφασικής ζώνης και παραμένει στη θέση του μελλοντικού επιπέδου κυτταροδιαίρεσης μέχρι και το τέλος της κυτοκίνησης. Συμμετέχει πιθανόν στην καθοδήγηση του αναπτυσσόμενου φραγμοπλάστη προς προκαθορισμένες θέσεις του μητρικού τοιχώματος (Walker και συν. 2007). Η εμφάνιση της TAN1 στη θέση του επιπέδου διαίρεσης προϋποθέτει την αλληλεπίδρασή της με κινητήριες πρωτεΐνες, τις κινησίνες POK1 και POK2 (phragmoplast orienting kinesins, Rasmussen και συν. 2011).

I.2.2.9.14 Κινητήριες πρωτεΐνες

Οι κινητήριες πρωτεΐνες στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς κατατάσσονται σε τρεις οικογένειες, τις μυοσίνες, τις δυνείνες και τις κινησίνες. Οι δύο τελευταίες αποτελούν τις κινητήριες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τους ΜΣ. Αυτές χρησιμοποιούν την ενέργεια που απελευθερώνεται από την υδρόλυση του ATP για να κινούνται κατά μήκος των ΜΣ (Reddy και Day 2011). Οι κινησίνες είναι συντηρημένες πρωτεΐνες στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Hamada 2014). Κατατάσσονται σε 14 οικογένειες από τις οποίες οι 2, 3, 9 και 11 δεν έχουν βρεθεί στα φυτικά κύτταρα. Σε αυτά έχουν εντοπιστεί αρκετά μέλη των οικογενειών 7 και 14 (Struck και Dhonukshe 2014). Στο γονιδίωμα του φυτού *A. thaliana* έχουν βρεθεί 61 γονίδια που κωδικοποιούν κινησίνες (Reddy και Day 2001).

Οι κινησίνες δρουν συνήθως ως διμερή. Κάθε μόριο διαθέτει μία περιοχή μήκους 350 αμινοξέων περίπου που είναι υπεύθυνη για τη δραστηριότητά τους. Αυτή φέρει μία περιοχή δέσμευσης ATP και μία άλλη, η οποία χρησιμεύει για την πρόσδεσή τους στην επιφάνεια των

ΜΣ. Η καταλυτική επικράτεια (κεφαλή) συνδέεται συνήθως σε μία περιοχή που ονομάζεται λαιμός, η οποία ενισχύει τις αλλαγές της στερεοδιαμόρφωσης των κινησινών, οι οποίες επάγονται από το ATP (Zhu και Dixit 2012). Η κεφαλή καθορίζει επίσης την κατεύθυνση της μετακίνησης των κινησινών κατά μήκος των ΜΣ. Έχει υπολογιστεί ότι, με κατανάλωση 100 μορίων ATP, η κινησίνη μπορεί να μετακινείται ακόμη και με ταχύτητα 800 nm/sec (Yildiz και Selvin 2005). Η περιοχή της κεφαλής συνδέεται, μέσω του στελέχους, με την ουρά της κινησίνης, η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του φορτίου που μετακινείται με τη βοήθεια της κινησίνης (Σχήμα 23, Yildiz και Selvin 2005). Το στέλεχος αποτελείται από α-έλικες που περιστρέφονται περαιτέρω σχηματίζοντας ένα σπείραμα, μέσω του οποίου είναι εφικτή η δημιουργία διμερών. Η περιοχή με την οποία η κινησίνη δεσμεύεται στο φορτίο που μεταφέρει δεν είναι ίδια για όλες τις κινησίνες (Zhu και Dixit 2012). Η ρύθμιση της δραστηριότητας των κινησινών γίνεται με διάφορους τρόπους και είναι πρωταρχικής σημασίας, διότι είναι αναγκαίο να αποφεύγεται η άσκοπη υδρόλυση ATP (Reddy και Day 2011).



Σχήμα 23. Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός μορίου κινησίνης. Τροποποιημένο από: Yildiz και Selvin (2005).

Οι κινησίνες είναι απαραίτητες για μια σειρά κυτταρικών διεργασιών. Η δράση τους κατηγοριοποιείται σε δύο επίπεδα, αυτό της οργάνωσης συστημάτων ΜΣ και αυτό της μεταφοράς κυτταρικών στοιχείων μέσω των συστημάτων ΜΣ. Η συμμετοχή τους στην οργάνωση του κυτταροσκελετού επιτελείται με τη ρύθμιση της δυναμικής των πολυμερών της σωληνίνης, σχηματίζοντας δεσμίδες μεταξύ των γειτονικών ΜΣ ή βοηθώντας στην αμοιβαία μετακίνησή τους (Zhu και Dixit 2012). Διάφορες κινησίνες ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της κυτταροδιαίρεσης (Reddy και Day 2011). Μία από αυτές είναι η KCBP (kinesin-like calmodulin binding protein, πρωτεΐνη όμοια με κινησίνη που δεσμεύει καλμοδουλίνη), η οποία εκτός από την καταλυτική επικράτεια διαθέτει και μία άλλη που δεσμεύει καλμοδουλίνη. Η δραστηριότητά της εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις των ιόντων ασβεστίου (Narasimhulu και Reddy 1998). Η KCBP συμβάλλει στη δημιουργία δεσμίδων ΜΣ και εντοπίζεται στην προ-προφασική ζώνη ΜΣ, στη μιτωτική άτρακτο και το φραγμοπλάστη ΜΣ (Reddy και Day 2011). Δύο άλλες κινησίνες οι ARK1 και ARK2 (armadillo repeat domain-containing kinesins, κινησίνη που περιέχει επαναλήψεις της επικράτειας armadillo) προωθούν την οργάνωση των ΜΣ στο περιφερειακό κυτόπλασμα (Sakai και συν. 2008). Οι ATK1 και ATK5 (*A. thaliana* kinesin, κινησίνες του φυτού *A. thaliana*) ανήκουν στις κινησίνες της οικογένειας 14 και συμμετέχουν στην οργάνωση και λειτουργία της μιτωτικής συσκευής (Ambrose και συν. 2005, 2007). Στην ίδια οικογένεια

ανήκουν και οι KCA1 και KCA2, οι οποίες εμπλέκονται στη μετακίνηση οργανιδίων και άλλων μορίων κατά μήκος των ΜΣ σε μικρές αποστάσεις (Suetsugu και συν. 2010). Η κινησίνη 13A συμμετέχει σε μετακινήσεις που αφορούν στα δικτυοσωμάτια (Lu και συν. 2005). Είναι ενδιαφέρον ότι η κινησίνη αυτή εντοπίζεται στο περιφερειακό κυτόπλασμα και είναι απαραίτητη για τον αποπολυμερισμό των ΜΣ στη θέση δημιουργίας των βοθρίων (Oda και Fukuda 2013). Τέλος, οι κινησίνες POK1 και POK2 αλληλεπιδρούν με την MAP TAN1 και είναι απαραίτητες για τη στόχευση της τελευταίας στο μελλοντικό επίπεδο κυτταροδιαίρεσης (Rasmussen και συν. 2011). Αξίζει να σημειωθεί ότι τουλάχιστον 23 διαφορετικές κινησίνες φαίνεται ότι ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της κυτταροδιαίρεσης (Reddy και Day 2011).

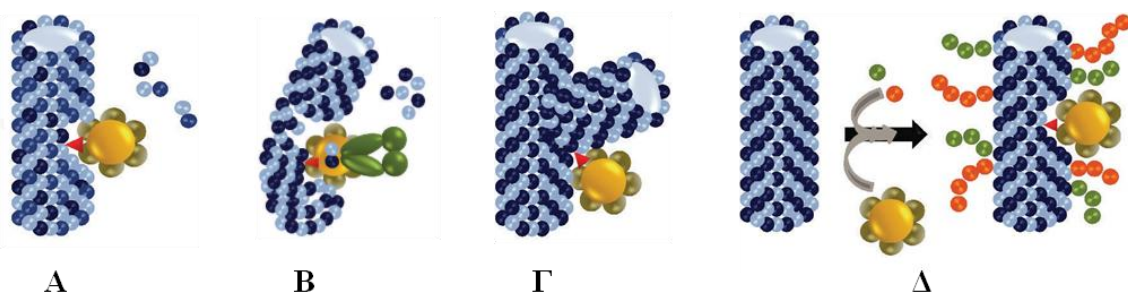
Μέχρι σήμερα, η ύπαρξη των δυνεϊνών στα φυτά αμφισβητείται. Στο γονιδίωμα του φυτού *A. thaliana*, η αναζήτηση αλληλουχιών που ομοιάζουν με τις αντίστοιχες των γονιδίων των δυνεϊνών δεν έχει δώσει κάποιο αποτέλεσμα (Wickstead και Gull 2007). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια επικρατεί η άποψη ότι στα φυτικά κύτταρα οι κινησίνες που ανήκουν στην οικογένεια 14 υποκαθιστούν τις δυνεΐνες (Vale 2003). Αν αυτή η υπόθεση είναι σωστή, τότε θα πρέπει να υπάρχουν μέλη της οικογένειας 14 που προσδένονται στο (-) άκρο των ΜΣ και συμμετέχουν στη συγκρότηση της μιτωτικής ατράκτου. Στις πρωτεΐνες, οι οποίες προσδένονται στο (-) άκρο των ΜΣ, η επικράτεια που λογίζεται ως η κινητήρια βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο και αυτό συμβαίνει σε πέντε από τα εικοσιένα μέλη της οικογένειας 14 (Reddy και Day 2001). Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί ότι κάποια από αυτά τα πρωτεϊνικά μόρια είναι απαραίτητα για την οργάνωση της μιτωτικής ατράκτου. Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα μέλη αυτής της οικογένειας είναι πιθανόν να υποκαθιστούν τη λειτουργία των δυνεϊνών (Zhu και Dixit 2012).

1.2.9.15. Πρωτεΐνες που κατακερματίζουν ή αποσταθεροποιούν τους ΜΣ

Η κατανίνη είναι η μόνη από τις πρωτεΐνες που κατακερματίζουν ΜΣ, η οποία έχει βρεθεί στα φυτά (Struk και Dhonukshe 2014). Στα ζωικά κύτταρα, εκτός της κατανίνης, την ίδια ικανότητα έχουν οι πρωτεΐνες spastin και fidgetin (Roll-Mecak και McNally 2010). Η κατανίνη εντοπίζεται πλησίον των κεντροσωματίων των ζωικών κυττάρων και τέμνει τους ΜΣ σε πολλά σημεία κοντά στις θέσεις δημιουργίας τους, οδηγώντας τελικά στον αποπολυμερισμό τους (Struk και Dhonukshe 2014). Στα φυτά, έχουν βρεθεί πρωτεΐνες ομόλογες με την κατανίνη, οι οποίες φαίνεται ότι διαδραματίζουν αντίστοιχα σημαντικό ρόλο (Kumar Ghosh και συν. 2012).

Η κατανίνη συγκροτεί ετεροδιμερή, διαθέτει δραστικότητα ΑΤΡάσης και κατακερματίζει τους ΜΣ μετά την πρόσδεσή της πλευρικά των ΜΣ (Σχήμα 24 Α, Struk και Dhonukshe 2014). Αποτελείται από δύο πολυπεπίδια, τις πρωτεΐνες p60 και p80. Η πρώτη έχει δραστικότητα ΑΤΡάσης και μπορεί να κόβει τους ΜΣ, ακόμα και απουσία της p80. Η

p80 διαθέτει μια WD40 επικράτεια, η οποία είναι απαραίτητη για τη στόχευση της κατανίνης στα κεντροσωμάτια, ενώ η περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου της είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την p60 (Burk και συν. 2007). Τη δράση της κατανίνης μπορεί να υποβοηθήσει η παρουσία κινητηρίων πρωτεϊνών. Πιστεύεται ότι με την πρόσδεση και την κίνησή τους κατά μήκος των ΜΣ οι κινητήριες πρωτεΐνες προκαλούν κάμψη στους ΜΣ, διευκολύνοντας την απελευθέρωση των ετεροδιμερών της σωληνίνης από τις θέσεις αυτές, μέσω της κατανίνης (Σχήμα 24B, Kumar Ghosh και συν. 2012). Οι θέσεις που συχνά προτιμώνται από την κατανίνη είναι αυτές που περιέχουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σωληνίνης, καθώς και οι θέσεις διασταύρωσης μεταξύ ΜΣ με διαφορετικούς προσανατολισμούς (Σχήμα 24Γ, Δ, Kumar Ghosh και συν. 2012).



Σχήμα 24. Μηχανισμοί τομής ΜΣ με τη δράση της κατανίνης. Οι δύο υπομονάδες, p60 και p80 της κατανίνης απεικονίζονται με χρυσαφί και κίτρινο χρώμα αντίστοιχα. Στο Δ, με πορτοκαλί και πράσινο απεικονίζονται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της σωληνίνης. Τροποποιημένο από: Kumar Ghosh και συν. (2012).

Το γονίδιο του φυτού *A. thaliana* περιέχει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την p60 και τέσσερα την p80 υπομονάδα της κατανίνης. Η μικρή υπομονάδα έχει την ικανότητα να τέμνει τους ΜΣ *in vitro* (Stoppin-Mellet και συν. 2006). Η κατανίνη εντοπίζεται στο περιφερειακό κυτόπλασμα, την προ-προφασική ζώνη ΜΣ, το περιπυρηνικό κυτόπλασμα, τους πόλους της ατράκτου και το φραγμοπλάστη (McClinton και συν. 2001, Burk και συν. 2007, Panteris και συν. 2011, Hamada 2014). Έχουν δημιουργηθεί διάφορα μεταλλάγματα *Arabidopsis* από τα οποία απουσιάζει η p60, όπως τα *fra2*, *lue1*, *bot1*, *erh3* (Struk και Dhonukshe 2014). Σε αυτά, διαπιστώθηκε αρχικά η αδυναμία φυσιολογικής οργάνωσης των περιφερειακών ΜΣ σε κύτταρα τα οποία επιμηκύνονται (Burk και συν. 2007). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η απουσία κατανίνης από τα *lue1* και *fra2* επηρεάζει την οργάνωση των ΜΣ της προ-προφασικής ζώνης, διαταράσσει την οργάνωση της προφασικής ατράκτου και του φραγμοπλάστη ΜΣ, αλλά και τον καθορισμό του επιπέδου διαίρεσης (Panteris και συν. 2011). Γενικά, φαίνεται ότι η κατανίνη σχετίζεται με τη δημιουργία παράλληλων διατάξεων ΜΣ, τη δεσμίδωση και την αναδιοργάνωση των περιφερειακών ΜΣ, καθώς διασπά τα τμήματα ΜΣ που αποκλίνουν στις θέσεις διασταύρωσης ΜΣ. Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι η δράση της κατανίνης είναι απαραίτητη όχι μόνο για τους περιφερειακούς ΜΣ, αλλά και για

την οργάνωση των διπολικών συστημάτων ΜΣ, κατά τη διάρκεια της κυτταροδιαίρεσης (Panteris και συν. 2011).

Εκτός από την κατανίνη, η οποία προωθεί τον αποπολυμερισμό των ΜΣ μετά τον κατακερματισμό τους, υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που αποσταθεροποιούν ή αποπολυμερίζουν τους ΜΣ. Όπως αναφέρθηκε, αποσταθεροποίηση ΜΣ μπορούν να προκαλέσουν και κινησίνες που ανήκουν σε συγκεκριμένες οικογένειες. Στα ζωικά κύτταρα, η Op18/stathmin (oncoprotein18) αποσταθεροποιεί τους ΜΣ, όμως δεν έχουν βρεθεί ομόλογες πρωτεΐνες στα φυτά (Hamada 2007). Στα φυτά, η οικογένεια της MAP18 έχει δείχθει ότι μπορεί να δεσμεύεται στους ΜΣ και να εμποδίζει τον πολυμερισμό της σωληνίτης *in vitro* (Hamada 2014). Στο φυτό *A. thaliana*, η MAP18 συνεντοπίζεται με τους περιφερειακούς ΜΣ. Λόγω της ικανότητάς της να προκαλεί τον αποπολυμερισμό των ΜΣ, πιστεύεται ότι προωθεί την αναδιοργάνωση των περιφερειακών ΜΣ (Wang και συν. 2007). Στην οικογένεια της MAP18 ανήκει και η πρωτεΐνη MDP25 (microtubule destabilizing protein 25, πρωτεΐνη που αποσταθεροποιεί τους ΜΣ 25), η οποία εμφανίζει παρόμοια λειτουργικά χαρακτηριστικά. Σε αναπτυσσόμενα κύτταρα υποκοτυλίου του φυτού *A. thaliana*, η MDP25 είναι απαραίτητη για την αλλαγή προσανατολισμού των περιφερειακών ΜΣ κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του υποκοτυλίου, προκαλώντας τον αποπολυμερισμό των ΜΣ (Li και συν. 2011). Ομοίως, η MDP40 εντοπίζεται στους περιφερειακούς ΜΣ και συμμετέχει στον έλεγχο της οργάνωσης των ΜΣ κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης των κυττάρων του υποκοτυλίου του *A. thaliana*, η οποία επάγεται από την επίδραση μπρασισινοστεροειδών (Wang και συν. 2012α). Είναι ενδιαφέρον ότι η MAP18 δεσμεύεται και σε ΜΑ και διαθέτει την ικανότητα να τα κατακερματίζει (Hamada 2014). Παράλληλα, υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες μπορούν να συνδέονται τόσο σε ΜΣ όσο και σε ΜΑ.

1.2.2.9.16 Πρωτεΐνες που συνδέονται με ΜΣ και ΜΑ

Έχει βρεθεί *in vitro* ότι η MAP190 συνδέεται τόσο σε ΜΣ όσο και σε ΜΑ. Η πρωτεΐνη εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων κατά τη μεσόφαση και στην άτρακτο και το φραγμοπλάστη ΜΣ, κατά τη διάρκεια της κυτταροδιαίρεσης (Hamada 2014). Άλλα πρωτεϊνικά μόρια που διαθέτουν την ικανότητα αυτή είναι οι φορμίνες (Formins). Αυτές προωθούν τη συγκρότηση ΜΑ και φαίνεται ότι τόσο στα ζωικά όσο και στα φυτικά κύτταρα συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ΜΣ και ΜΑ (Hamada 2014). Η AtFormin16 διαθέτει την ικανότητα να δεσμεύεται σε ΜΣ και να προωθεί τη δεσμίδωσή τους (Wang και συν. 2013). Η AtFormin14 εντοπίζεται σε όλες τις διατάξεις ΜΣ, ενώ στα μεταλλάγματα, από τα οποία απουσιάζει, επηρεάζεται η οργάνωση των διαφόρων συστημάτων ΜΣ κατά τη διάρκεια της μείωσης (Li και συν. 2010).

1.2.3 Μηχανισμοί μεταγωγής μηνύματος και κυτταροσκελετός των ΜΣ

Η οργάνωση και η δυναμική των ΜΣ ρυθμίζονται από πληθώρα μηχανισμών. Αυτοί αφορούν στην παραγωγή της σωληνίνης ή στη λειτουργία των MAPs. Στους μηχανισμούς αυτούς συμμετέχουν διάφορα μονοπάτια μεταγωγής μηνύματος, τα οποία περιλαμβάνουν πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες, μονοπάτια MAPKs, φωσφολιπάσες και GTPάσες. Οι ισότυποι και οι ισομορφές της σωληνίνης επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις των ΜΣ με τις MAPs, με αποτέλεσμα αυτές να συμμετέχουν στη ρύθμιση της συμπεριφοράς του κυτταροσκελετού των ΜΣ (Cai 2010). Η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων της σωληνίνης είναι πολύ συχνή (Matsumoto και συν. 2007). Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να επιλέγουν τον ισότυπο της σωληνίνης, ανάλογα με τις συνθήκες οι οποίες επικρατούν. Επίσης, μπορεί να ευνοείται μία συγκεκριμένη ισομορφή σωληνίνης, έπειτα από κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση (Parrotta και συν. 2014). Μια από τις τροποποιήσεις είναι η φωσφορυλίωση της σωληνίνης, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάφορες θέσεις του μορίου. Προηγουμένως, αναφέρθηκε, ότι η α -σωληνίνη μπορεί να φωσφορυλιωθεί στη θέση 349, όπου εντοπίζεται θρεονίνη (Ban και συν. 2013). Το ένζυμο, το οποίο υποστηρίζεται ότι καταλύει τη φωσφορυλίωση στη θέση αυτή, είναι μία άτυπη κινάση σωληνίνης, η PHS1 (PROPYZAMIDE HYPERSENSITIVE 1, Fujita και συν. 2013). Επιπλέον, οι κινάσες που σχετίζονται με τις NIMA (NEKs, NIMA-related kinases) συνιστούν συντηρημένη ομάδα κινασών, οι οποίες ελέγχουν διάφορα γεγονότα της μίτωσης των ευκαρυωτικών οργανισμών. Η NEK6 δεσμεύεται στους ΜΣ *in vitro*, φωσφορυλιώνει τη β -σωληνίνη, αλληλεπιδρά με άλλες NEKs και ρυθμίζει την οργάνωση των περιφερειακών ΜΣ στα κύτταρα υποκοτυλίου του φυτού *A. thaliana* (Motosé και συν. 2011). Παρόλο που είναι γνωστό ότι η σωληνίνη υπόκειται σε φωσφορυλίωση, μέχρι στιγμής δεν έχειδειχθεί ότι οι σωληνίνες αποτελούν στόχο των MAPKs. Ωστόσο, έχουν ταυτοποιηθεί ως υποστρώματα των MAPKs άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με ΜΣ, όπως οι MAPs (Komis και συν. 2011).

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι MAPKs επηρεάζουν την αναδιευθέτηση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, αλλά και το αντίθετο, δηλαδή ότι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού μπορεί να είναι προαπαιτούμενο για τη δρομολόγηση κάποιας απόκρισης μέσω MAPKs (Komis και συν. 2011, βλέπε παρακάτω). Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη MPK18 εμπλέκεται στην οργάνωση των περιφερειακών ΜΣ και στη δυναμική συμπεριφορά των ΜΣ. Σε μεταλλάγματα *mpk18-1* του φυτού *A. thaliana*, οι περιφερειακοί ΜΣ εμφανίζονται ιδιαιτέρως σταθεροί έπειτα από επίδραση με ουσίες που προκαλούν αποπολυμερισμό των ΜΣ (Walia και συν. 2009). Υποστηρίζεται ότι η ενεργοποίηση της MPK18 προκαλεί την υπερφωσφορυλίωση MAP πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την αποδέσμευση των τελευταίων από τους ΜΣ και την αποσταθεροποίηση των ΜΣ στη συνέχεια (Walia και συν. 2009). Η εξέταση της αλληλουχίας διαφόρων πρωτεϊνών υποδηλώνει ότι είναι πιθανόν να αποτελούν οι MAPs

στόχο MAPKs. Μία από αυτές, η MOR1, περιέχει πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης σερίνης/θρεονίνης (Walia και συν. 2009, Komis και συν. 2011).

Το πιο γνωστό μονοπάτι MAPK που συμμετέχει στην κυτταρική διαίρεση είναι το NPK1-NQK1-NRK1. Έχει βρεθεί στο φυτό *Nicotiana tabacum* και ελέγχει, εκτός των άλλων, την επέκταση του φραγμοπλάστη. Η NPK1 (nucleus and phragmoplast localizing kinase1) είναι μία MAPKKK, η οποία ενεργοποιείται στο τέλος της μίτωσης (Xu και Zhang 2015). Στο φυτό *A. thaliana* έχουν βρεθεί ομόλογες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο συγκεκριμένο μονοπάτι. Οι ANPs (*Arabidopsis* homologues of NPK1, κινάσες του φυτού *Arabidopsis* ομόλογες της NPK1) είναι MAPKKKs και αποτελούνται από τις ANP1, ANP2 και ANP3. Η MAPKK ANQ/MKK6 είναι ομόλογη της NQK και η MPK13 είναι ομόλογη της NRK1 (Komis και συν. 2011). Οι ANP2 και ANP3 εμπλέκονται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού των ΜΣ κατά τη διάρκεια της κυτταροδιαίρεσης (Beck και συν. 2010). Επιπλέον, η MPK4 είναι απαραίτητη για την οργάνωση της μιτωτικής και κυτοκινητικής συσκευής (Beck και συν. 2011), ενώ η MPK6 εντοπίζεται στην προ-προφασική ζώνη ΜΣ και το φραγμοπλάστη (Müller και συν. 2010). Οι MPK3 και MPK6 ανήκουν στο μονοπάτι YODA (MPKKK4)/MKK4/5/MPK3/6 (Xu και Zhang 2015). Είναι ενδιαφέρον ότι, σε όλα τα μονοπάτια που αναφέρθηκαν παραπάνω, ένα από τα υποστρώματα των MPKs είναι οι πρωτεΐνες της οικογένειας MAP65. Για παράδειγμα, η NRK1 στο φυτό *N. tabacum*, φωσφορυλιώνει την MAP65-1 σε ένα κατάλοιπο θρεονίνης στη θέση 579. Η φωσφορυλίωσή της μειώνει τη συνάφεια της MAP65-1 με τους ΜΣ, με αποτέλεσμα να αποσταθεροποιούνται οι ΜΣ και να υποβοηθάται η ανακύκλωση των ΜΣ και η επέκταση του φραγμοπλάστη (Sasabe και συν. 2006). Στο φυτό *A. thaliana*, η MAP65-1 φωσφορυλιώνεται από την MPK4, MPK3 και MPK6 (Smertenko και συν. 2006, Sasabe και συν. 2011α, Hoehenwarter και συν. 2013, Smékalová και συν. 2014α). Η MPK4 φωσφορυλιώνει επίσης τις MAP65-2 και MAP65-3 (Sasabe και συν. 2011α).

Ένα από τα πολύ σημαντικά μόρια μεταγωγής μηνύματος, το οποίο προσδένεται στη MAP65-1 είναι το PA, το οποίο παράγεται από τη δράση των PLDs (Pleskot και συν. 2013). Η δέσμευση μορίων PA από την MAP65-1 προωθεί τον πολυμερισμό της σωληνίνης και τη δημιουργία δεσμίδων ΜΣ *in vitro* (Zhang και συν. 2012α). Επιπλέον, η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για την αναδιοργάνωση του περιφερειακού κυτταροσκελετού σε κύτταρα υποκοτυλίου του φυτού *A. thaliana*, τα οποία έχουν υποστεί επίδραση NaCl (Zhang και συν. 2012α). Παράλληλα, η παραγωγή PA από τις PLDs είναι απαραίτητη για την απόκριση των κυττάρων στην ωσμωτική καταπόνηση. Στο φυτό *Triticum turgidum*, η απόκριση στην επίδραση υπερωσμωτικού μέσου περιλαμβάνει τη δημιουργία ανθεκτικών μακροσωληνίσκων (Komis και συν. 2002). Στη δημιουργία τους συμμετέχει μία MAPK, όμοια με την p38 των θηλαστικών (Komis και συν. 2004), η ενεργοποίηση της οποίας εξαρτάται από την παραγωγή PA (Komis και συν. 2006). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι το PA συμμετέχει στις αλλαγές της

οργάνωσης του κυτταροσκελετού των ΜΣ που επάγονται από ABA στα καταφρακτικά κύτταρα. Η παραγωγή του PA πυροδοτείται από αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων κυτοπλασματικού ασβεστίου, ενώ συμμετέχει σε μια πορεία ανάδρασης, στην οποία η παραγωγή PA προκαλεί περαιτέρω αύξηση του κυτοπλασματικού ασβεστίου. Η τελευταία συνδέεται με τον αποπολυμερισμό των ΜΣ που πραγματοποιείται κατά το κλείσιμο των στομάτων (Jiang και συν. 2014). Ένα άλλο ένζυμο, η PLC σχετίζεται με την ανακύκλωση των φωσφολιπιδίων και συμμετέχει στους μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος των φυτικών κυττάρων. Η αναστολή της δραστηριότητάς της προκαλεί τον αποπολυμερισμό των ΜΣ και εμποδίζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης (Komis και συν. 2008, Andreeva και συν. 2010). Οι επιπτώσεις από την ανάρχεση της καταλυτικής δραστηριότητας της PLC είναι πιθανόν ότι σχετίζονται και με τη διατάραξη της ομοιόστασης του κυτοπλασματικού ασβεστίου (Komis και συν. 2008).

Οι χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων ασβεστίου είναι απαραίτητες για τη συγκρότηση ΜΣ, η αύξηση όμως της συγκέντρωσής τους μπορεί να προκαλέσει τον αποπολυμερισμό τους *in vitro* (O'Brien και συν. 1997). Ωστόσο, τα ιόντα ασβεστίου σχετίζονται και με τη λειτουργία MAPs. Για παράδειγμα, η KCBP, η οποία έχει βρεθεί και στο φυτό *A. thaliana* διαθέτει μία επικράτεια δέσμευσης καλμοδουλίνης (Narasimhulu και Reddy 1998). Η καλμοδουλίνη είναι μικρή πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται με ιόντα ασβεστίου, γεγονός που προκαλεί αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωσή της. Επηρεάζει τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά. Εν προκειμένω, η KCBP προσδένεται στους ΜΣ απουσία καλμοδουλίνης, ενώ παρουσία της καλμοδουλίνης η πρόσδεση αυτή αναστέλλεται (Reddy και Day 2011).

Εκτός από τα παραπάνω, τη λειτουργία κινησινών μπορεί να επηρεάσει και η δράση των ROP GTPασών, των οποίων τελεστές, μεταξύ άλλων, είναι οι RIPs (ROP-interacting proteins, πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με ROPs, Mucha και συν. 2011). Η RIP3 μπορεί να δεσμεύεται στις ROPs, ενώ αλληλεπιδρά και με την κινησίνη 13A. Με τον τρόπο αυτό εμπλέκεται στη δυναμική των ΜΣ κατά τη διάρκεια μορφογένεσης των τριχών στα φύλλα του φυτού *A. thaliana* (Mucha και συν. 2010). Επιπλέον, στη διαδικασία της μορφογένεσης των λοβωτών επιδερμικών κυττάρων του φυτού *A. thaliana*, οι ROPs συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού μέσω των πρωτεϊνών RICs (ROP-interactive CRIB-containing proteins, πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με ROPs και φέρουν την επικράτεια CRIB, Fu και συν. 2005 Fu και συν. 2009). Οι RICs είναι πρωτεΐνες, η δραστηριότητα των οποίων επίσης επηρεάζεται από τις ROPs. Είναι ενδιαφέρον ότι, στην περιοχή όπου δημιουργείται η λόβωση των επιδερμικών κυττάρων, η RIC1 απενεργοποιείται από την ROP2 και αποδεσμεύεται από τους ΜΣ, ενώ η ROP6 ενεργοποιεί επίσης την RIC1 στις θέσεις μεταξύ δύο λοβών. Η τελευταία με τη σειρά της προκαλεί την ομαδοποίηση των περιφερειακών ΜΣ (Fu και συν. 2005, Fu και συν. 2009). Στο ίδιο σύστημα, το μονοπάτι

μεταγωγής μηνύματος ROP6-RIC1 εμπλέκεται και στην ενεργοποίηση της κατανίνης, γεγονός το οποίο ευνοεί την αναδιοργάνωση των ΜΣ (Lin και συν. 2013).

Η ενεργοποίηση των κινησινών μπορεί να πραγματοποιείται και με φωσφορυλίωσή τους από τις CDKs και τις Aurora κινάσες, τουλάχιστον στα ζωικά κύτταρα. Επομένως, φαίνεται ότι η φωσφορυλίωση των MAPs μπορεί να πραγματοποιηθεί και με άλλους τρόπους, εκτός των MAPKs. Τα πειραματικά δεδομένα που αφορούν σε φυτικά κύτταρα είναι ελάχιστα (Reddy και Day 2011). Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες της οικογένειας MAP65 περιλαμβάνουν θέσεις φωσφορυλίωσης από τις CDKs και την κινάση Aurora B (Struk και Dhonukshe 2014). Στο φυτό *A. thaliana*, η κινάση AtAurora1 εντοπίζεται μαζί με την AtTPX2 και τη γ-σωληνίνη στα συστήματα των ΜΣ από την προ-πρόφαση έως την τελόφαση (Petrovská και συν. 2012). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι TPX2 και οι Aurora κινάσες αλληλεπιδρούν (Vos και συν. 2008, Petrovská και συν. 2012).

Στους μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος που εμπλέκονται στην οργάνωση του φυτικού κυτταροσκελετού συμμετέχουν εξίσου τόσο οι κινάσες, όσο και οι φωσφατάσες. Συχνά, οι επιπτώσεις στη μορφογένεση των φυτικών κυττάρων, έπειτα από επίδραση αναστολέων πρωτεϊνικών κινάσων και αναστολέων φωσφατασών είναι παρόμοιες (Baskin και Wilson 1997). Για παράδειγμα, στο *A. thaliana*, η χρήση αναστολέων φωσφατασών προκάλεσε αποπολυμερισμό ή αλλαγή στον προσανατολισμό των περιφερειακών ΜΣ σε κύτταρα ρίζας (Baskin και Wilson 1997, Yemets και συν. 2008). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι σε γυρεοκόκκους του φυτού *Lilium*, οι οποίοι βλαστάνουν παρουσία αναστολέων φωσφατασών ή έπειτα από επίδραση με τους ίδιους αναστολείς σε βλαστημένους γυρεοκόκκους, οι αναστολείς προκαλούν την αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των ΜΣ (Foissner και συν. 2002). Το σύμπλοκο πρωτεϊνικής φωσφατάσης PP2A έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την αναδιοργάνωση των ΜΣ κατά τη μετάβαση στη μίτωση, ενώ στη διαμόρφωση και τη λειτουργία του συμπλόκου συμμετέχουν οι MAPs TONNEAU1, FASS και TRM1 (Spinner και συν. 2013).

I.2.4 Λειτουργίες του κυτταροσκελετού των ΜΣ

I.2.4.1 Η συμμετοχή του κυτταροσκελετού στις αναπτυξιακές διεργασίες των φυτών

I.2.4.1.1 Η συμμετοχή των ΜΣ στην κυτταρική διαίρεση

Ο κυτταροσκελετός των ΜΣ αποτελεί βασικό στοιχείο των μηχανισμών, με τους οποίους πραγματοποιείται η μίτωση και η κυτοκίνηση των φυτικών κυττάρων. Στα βλαστητικά μεριστωματικά κύτταρα των ανωτέρων φυτών οι ΜΣ συγκροτούν διαδοχικά τα παρακάτω διακριτά συστήματα: το περιφερειακό σύστημα ΜΣ, την προ-προφασική ζώνη ΜΣ, την προφασική, μεταφασική και αναφασική άτρακτο και το φραγμοπλάστη (Sano και συν. 2007). Στη μεσόφαση, ΜΣ εντοπίζονται στο περιφερειακό κυτόπλασμα, επενδύοντας το πλασμαλήμμα, με το οποίο συνδέονται με εγκάρσιες πρωτεϊνικές γέφυρες (Hashimoto και

Kato 2006). Συνήθως, προσανατολίζονται παράλληλα μεταξύ τους και κάθετα προς τον κατά μήκος άξονα του κυττάρου (Hashimoto και Kato 2006). Κατά τη φάση G₂, των βλαστητικών κυττάρων των ανωτέρων φυτών, το περιφερειακό σύστημα ΜΣ αποδιοργανώνεται και αντικαθίσταται από ένα δακτύλιο που δημιουργείται από αλληλοεπικαλυπτόμενους ΜΣ, την προ-προφασική ζώνη ΜΣ, η οποία προσημειώνει το επίπεδο της κυτταροδιαίρεσης (Mineyuki 1999, Murata και Sasabe 2011). Ειδικότερα, ο σχηματισμός αυτός δημιουργείται πριν την έναρξη της μίτωσης, στις θέσεις εκείνες όπου η σχηματιζόμενη κυτταρική πλάκα θα συντηχθεί στο τέλος της κυτοκίνησης με τα μητρικά τοιχώματα, και αποδιοργανώνεται κατά το τέλος της πρόφασης (Mineyuki 1999, Rogers 2005). Στα κύτταρα, τα οποία θα υποστούν σύμμετρη διαίρεση η προ-προφασική ζώνη εντοπίζεται σε κεντρικό επίπεδο του κυττάρου, ενώ σε εκείνα που διαιρούνται ασύμμετρα αυτή οργανώνεται έκκεντρα στο πολωμένο άκρο του κυττάρου και μπορεί να είναι ιδιόμορφη (Mineyuki 1999, Panteris και συν. 2006). Αντίθετα, όταν η προ-προφασική ζώνη ΜΣ απουσιάζει, όπως στην περίπτωση της δημιουργίας γαμετών, το επίπεδο διαίρεσης του κυττάρου καθορίζεται με διαφορετικό μηχανισμό (Nick 2008).

Κατά τη διάρκεια της προ-πρόφασης/πρόφασης ο αριθμός των περιπυρηνικών ΜΣ αυξάνεται και καθώς η πρόφαση προχωρά, συγκροτείται διπολική προφασική άτρακτος, η οποία αποτελείται από ΜΣ που συγκλίνουν με τα αρνητικά άκρα τους στους δύο πόλους της ακτράκτου (Duroc και συν. 2011). Ακολούθως, οργανώνεται η μιτωτική άτρακτος, η οποία είναι απαραίτητη για την τοποθέτηση των χρωμοσωμάτων στο ισημερινό επίπεδο, στη συνέχεια για τη μετακίνηση των θυγατρικών χρωμοσωμάτων στους πόλους και τελικά την ισότιμη μεταβίβασή τους στους θυγατρικούς πυρήνες. Η μεταφασική άτρακτος ΜΣ έχει βαρελοειδές σχήμα και αποτελείται από δεσμίδες ΜΣ, που συνδέονται με τους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων και από τους ΜΣ του σκελετού της ατράκτου. Ο ρόλος της είναι η διάταξη και ο προσανατολισμός των χρωμοσωμάτων στο ισημερινό επίπεδο. Η αναφασική άτρακτος ΜΣ μετακινεί τις θυγατρικές ομάδες χρωμοσωμάτων προς τους πόλους. Ο μηχανισμός μετακίνησης συνίσταται στην αμοιβαία ολίσθηση των ΜΣ του σκελετού της ατράκτου, οι οποίοι αλληλοεπικαλύπτονται στο ισημερινό επίπεδο, με τη βοήθεια κινησινών, με ταυτόχρονη μείωση του μήκους των δεσμίδων ΜΣ κινητοχώρων. Κατά την ανάπτυξη της μεταφασικής ατράκτου, το άκρο των ΜΣ που συνδέεται με τους κινητοχώρους λειτουργεί ως (+) άκρο, από όπου κατά την ανάφαση πραγματοποιείται ταχεία απομάκρυνση διμερών σωληνίνης με αποτέλεσμα να συμπεριφέρεται ως (-) άκρο (Ambrose και Cyr 2007).

Κατά την κυτοκίνηση οργανώνεται ο φραγμοπλάστης, ένας βαρελοειδής σχηματισμός ΜΣ, ο οποίος αποτελείται από δύο διατάξεις παράλληλων ΜΣ που έχουν αντίθετο προσανατολισμό. Τα θετικά άκρα των ΜΣ αλληλοεπικαλύπτονται στο ισημερινό επίπεδο του φραγμοπλάστη, όπου εντοπίζεται ηλεκτρονικά πυκνό υλικό, ενώ τα αρνητικά βρίσκονται κοντά στους δύο θυγατρικούς πυρήνες. Κατά την πρόοδο της κυτοκίνησης, ο

φραγμοπλάστης επεκτείνεται προς την περιφέρεια του κυττάρου με πολυμερισμό νέων ΜΣ στα περιθώριά του και τον ταυτόχρονο αποπολυμερισμό τους στις κεντρικές σταθεροποιημένες περιοχές της κυτταρικής πλάκας (McMichael και Bednarek 2013). Η κύρια λειτουργία του είναι η μεταφορά των κυστιδίων, τα οποία απελευθερώνονται από τα δικτυοσωμάτια, στο ισημερινό επίπεδο του φραγμοπλάστη, όπου συντηκόμενα θα σχηματίσουν την κυτταρική πλάκα, η οποία, στη συνέχεια, θα μετασχηματιστεί σε θυγατρικό τοίχωμα (Otegui και συν. 2005). Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι, εκτός του φραγμοπλάστη των ΜΣ, στην ίδια θέση δημιουργείται και φραγμοπλάστης ΜΑ, ο οποίος έχει τα ίδια δομικά χαρακτηριστικά. Ο χρόνος εμφάνισης και αποδιοργάνωσής του συμπίπτει με εκείνους του φραγμοπλάστη των ΜΣ, ενώ ο ρόλος του δεν έχει διευκρινιστεί (Wright και Smith 2007).

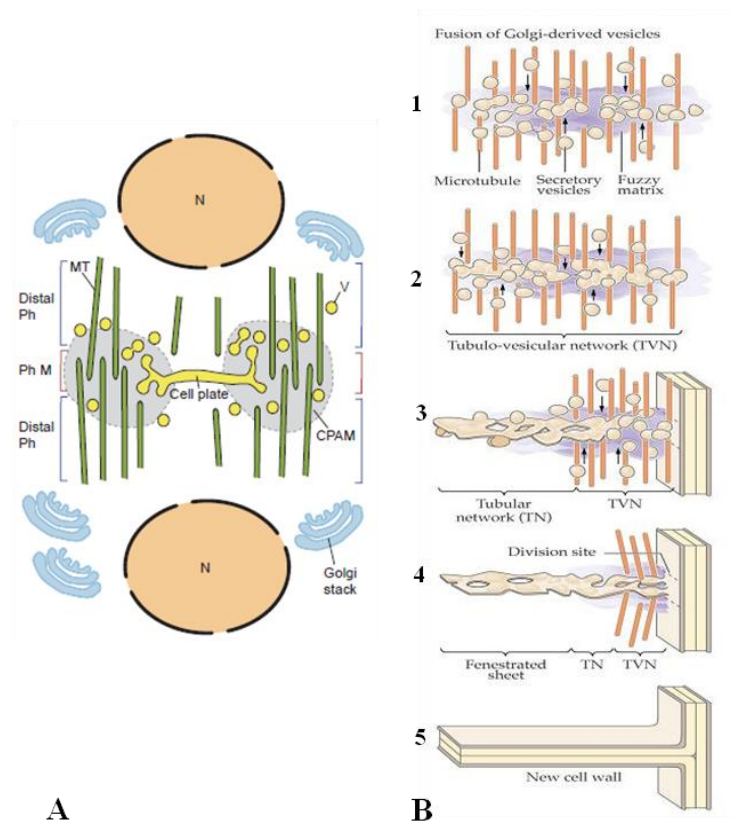
1.2.4.1.1.1 Η διαδικασία οργάνωσης της κυτταρικής πλάκας στα ανώτερα φυτά

Η κύρια λειτουργία του φραγμοπλάστη είναι η μεταφορά των κυστιδίων Golgi στο ισημερινό επίπεδο του διαιρούμενου κυτοκινητικού κυττάρου, τα οποία, στη συνέχεια, συντήκονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν την κυτταρική πλάκα (Σχήμα 25Α, Otegui και συν. 2005). Η δομή αυτή αρχίζει να δημιουργείται σε κεντρικό επίπεδο μεταξύ των δύο θυγατρικών πυρήνων, αναπτύσσεται δε φυγόκεντρα μέχρις ότου συναντήσει τα μητρικά τοιχώματα, με τα οποία τελικά συντήκεται. Ακολουθεί ο μετασχηματισμός της κυτταρικής πλάκας σε θυγατρικό κυτταρικό τοίχωμα (Staehelein και Hepler 1996). Η ανάπτυξη της κυτταρικής πλάκας πραγματοποιείται με τη συνεχή σύντηξη κυστιδίων. Συμμετέχουν κυρίως κυστίδια δικτυοσωματίων, τα οποία μεταφέρουν στην κυτταρική πλάκα πολυσακχαρίτες του στρώματος του τοιχώματος (Σχήμα 25Α). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Dhonukshe και συν. (2006) ενδοκυτωτικά κυστίδια που παράγονται από το πλασμαλήμμα, μεταφέρουν στην κυτταρική πλάκα επιπλέον υλικά του μητρικού κυτταρικού τοιχώματος.

Η λεπτομερής μελέτη της δημιουργίας της κυτταρικής πλάκας απέδειξε ότι αυτή είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία μπορεί να διακριθεί σε επιμέρους στάδια (Σχήμα 25Β). Αρχικά, στην κεντρική περιοχή του επιπέδου της κυτταροδιαίρεσης συγκεντρώνονται κυστίδια, τα οποία συντήκονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μεμβρανικές δομές που φέρουν ασαφές περίβλημα (fuzzy coat, Σχήμα 25Β₁). Η συνεχής σύντηξη κυστιδίων δημιουργεί ένα σωληνοειδές-κυστιδιακό δίκτυο (tubule-vesicular network, Σχήμα 25Β₂), στο οποίο συντήκονται νέα κυστίδια. Το μεμβρανικό αυτό σύστημα σταδιακά μετασχηματίζεται σε σωληνοειδές δίκτυο (tubular network, Σχήμα 25Β₃) και τελικά σε ένα διάτρητο διάφραγμα (fenestrated sheet, Σχήμα 25Β₄, Jürgens 2005). Με τον τρόπο αυτό η κυτταρική πλάκα σταθεροποιείται και γίνεται επίπεδη.

Επειδή η πορεία αυτή ξεκινά από κεντρικές θέσεις και βαθμιαία, με τη συνεχή σύντηξη κυστιδίων στα περιθώριά της, επεκτείνεται προς την περιφέρεια του κυττάρου

(Σχήμα 25B), οι διαφορετικές περιοχές της βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Η περίσσεια του μεμβρανικού υλικού απομακρύνεται από την κυτταρική πλάκα με την παραγωγή ενός ειδικού τύπου τραχέων κυστιδίων από τις περιοχές της που έχουν δομή σωληνοειδούς-κυστιδιακού δικτύου και σωληνοειδούς δικτύου. Τα κυστίδια αυτά, τα οποία συχνά είναι καλυμμένα με κλαθρίνη, κατευθύνονται προς τα ενδοσώματα με τα οποία συντήκονται (Jürgens 2005). Στο εσωτερικό της κυτταρικής πλάκας εντοπίζονται υλικά του στρώματος του κυτταρικού τοιχώματος, όπως πηκτίνες, ημικυτταρίνες και μεγάλες ποσότητες καλλόξης. Μετά τη σύντηξη της κυτταρικής πλάκας με τα μητρικά τοιχώματα, η καλλόξη αντικαθίσταται από κυτταρίνη και η κυτταρική πλάκα μετασχηματίζεται σε νεαρό θυγατρικό τοίχωμα (Σχήμα 25B₅, Jürgens 2005).



Σχήμα 25. Α. Διαγραμματική αναπαράσταση της δημιουργίας της κυτταρικής πλάκας στα κυτοκίνητικα κύτταρα των ανωτέρων φυτών. Η συγκρότηση της κυτταρικής πλάκας (σημειώνεται με κίτρινο χρώμα) ξεκινά σε κεντρικό επίπεδο μεταξύ των δύο θυγατρικών πυρήνων (N) και επιτυγχάνεται με τη συνεχή σύντηξη κυστιδίων (V) που προέρχονται από τα δικτυοσωμάτια (σημειώνονται με μπλε χρώμα) και καθοδηγούνται από τους ΜΣ του φραγμοπλάστη (δείχνονται με πράσινο). Τροποποιημένο, από: Otegui και συν. (2005). **Β.** Σχηματική αναπαράσταση των διαδοχικών σταδίων συγκρότησης της κυτταρικής πλάκας που οδηγεί στο σχηματισμό του θυγατρικού κυτταρικού τοιχώματος (secretory vesicles: εκκριτικά κυστίδια, fuzzy matrix: ασαφές υλικό, TVN: σωληνοειδές-κυστιδιακό δίκτυο, TN: σωληνοειδές δίκτυο, fenestrated sheet: διάτρητο διάφραγμα, new cell wall: νέο θυγατρικό τοίχωμα). Τροποποιημένο από: Staehelin και Hepler (1996).

1.2.4.1.2 Η συμμετοχή των ΜΣ στην κυτταρική μορφογένεση

Οι περιφερειακοί ΜΣ είναι «οργανίδιο-κλειδί», στο οποίο βασίζεται ο μηχανισμός της μορφογένεσης των φυτικών κυττάρων (Cyr 1994). Η επίδραση με ουσίες που αποδιοργανώνουν τους ΜΣ διαταράσσει δραματικά το μηχανισμό μορφογένεσης, δημιουργώντας κύτταρα με ανώμαλο σχήμα (Baskin και συν. 1994, Panteris και Galatis 2005). Αποδείξεις του μορφογενετικού ρόλου των ΜΣ προκύπτουν από τη μελέτη μεταλλαγμάτων φυτών, στα οποία η οργάνωση των ΜΣ διαταράσσεται. Τα μεταλλαγμένα κύτταρα εμφανίζουν ανώμαλα σχήματα και άτυπα πρότυπα αύξησης (Ivakon και Persson 2013). Οι περιφερειακοί ΜΣ καθορίζουν τον άξονα της αύξησης των κυττάρων, ελέγχοντας την κατανομή και την κατεύθυνση της δραστηριότητας των συμπλόκων των συνθετασών της κυτταρίνης (Paredes και συν. 2006). Με το μηχανισμό αυτό, ο προσανατολισμός των περιφερειακών ΜΣ καθορίζει τον προσανατολισμό των νέο-εναποτιθέμενων μικροϊνιδίων της κυτταρίνης (Deinum και Mulder 2013). Έχειδειχθεί ότι, τόσο οι σύμμετρες όσο και οι ασύμμετρες κυτταρικές μορφές αποτελούν έκφραση του προσανατολισμού και της οργάνωσης των περιφερειακών ΜΣ (Hashimoto 2011). Σε κύτταρα τα οποία επιμηκύνονται με ταχείς ρυθμούς, οι ΜΣ διαμορφώνουν παράλληλες διατάξεις διευθετημένες κάθετα προς τον άξονα επιμήκυνσης. Σε κύτταρα τα οποία επιμηκύνονται με βραδείς ρυθμούς και έχουν κυλινδρικό σχήμα οι περιφερειακοί ΜΣ είναι συνήθως διατεταγμένοι είτε κατά μήκος του μεγάλου άξονα των κυττάρων ή υπό γωνία (Hashimoto 2011). Επιπλέον, σε αρκετές περιπτώσεις, διατάξεις περιφερειακών ΜΣ υψηλής οργάνωσης συμμετέχουν στη δημιουργία τοπικών τοιχωματικών παχύνσεων (Oda και συν. 2005). Αξίζει να σημειωθεί ότι διάφορα περιβαλλοντικά και ορμονικά ερεθίσματα ενεργοποιούν μηχανισμούς αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού των ΜΣ. Με τον τρόπο αυτό οι ΜΣ συμμετέχουν στην αντίληψη εξωτερικών παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζουν ή ελέγχουν την κυτταρική μορφογένεση (Fu και Yang 2011).

1.2.4.1.3 Η συμμετοχή των ΜΣ στην οργανογένεση

Πλήθος δεδομένων υποστηρίζει ότι οι ΜΣ συμμετέχουν στην ανάπτυξη των ιστών των διαφόρων φυτικών οργάνων (Kost και συν. 1999). Τυπικό παράδειγμα αποτελεί το ξύλωμα, το οποίο συγκροτείται από διάφορους κυτταρικούς τύπους: τραχειακά στοιχεία, σκληρεγχυματικές ίνες και παρεγχυματικά κύτταρα. Κοινό χαρακτηριστικό των δύο πρώτων τύπων κυττάρων του ξυλώματος είναι η εναπόθεση δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος. Στα τραχειακά στοιχεία οι τοπικές δευτερογενείς παχύνσεις του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος εναποτίθενται σε θέσεις όπου εντοπίζονται καλά οργανωμένες δεσμίδες περιφερειακών ΜΣ, οι οποίες καθορίζουν τη μορφή και την έκταση των παχύνσεων (Pesquet και Lloyd 2011). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε *in vivo* και *in vitro* σε διαφοροποιούμενα τραχειακά στοιχεία του φυτού *A. thaliana*. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν διάφορες

MAPs (Pesquet και Lloyd 2011). Η εξέταση του προτύπου κατανομής των συμπλόκων συνθετάσης της κυτταρίνης έδειξε ότι αυτό συμπίπτει με εκείνο των περιφερειακών ΜΣ. Η επίδραση ορυζαλίνης διαταράσσει το πρότυπο αυτό (Wightman και Turner 2008).

Παράλληλα, ο κυτταροσκελετός των ΜΣ και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οργάνωσή του είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των φυτικών οργάνων. Για παράδειγμα, σε μεταλλάγματα MAPs από το φυτό *Arabidopsis*, όπως είναι τα *ton/fass*, η καθιέρωση του άξονα αύξησης αποτυγχάνει, ενώ στα αρτίβλαστα δεν αναπτύσσονται οι κοτυληδόνες ούτε, σε επόμενο στάδιο, τα άνθη (Kost και συν. 1999). Επιπλέον, στο ακραίο μερίστωμα του βλαστού του *A. thaliana* οι μηχανικές καταπονήσεις που ασκούνται στα κύτταρά του επηρεάζουν την κατανομή των μεταφορέων της αυξίνης και αυτή καθορίζει τη συμπεριφορά του περιφερειακού κυτταροσκελετού των ΜΣ. Τα γεγονότα αυτά είναι απαραίτητα για την καθιέρωση νέων αξόνων αύξησης και τη δημιουργία φυτικών οργάνων (Sassi και συν. 2014).

1.2.4.1.4 Η συμμετοχή των ΜΣ στην κορυφαία αύξηση

Οι ΜΣ και τα ορμονικά ερεθίσματα συμμετέχουν επίσης σε πορείες κορυφαίας αύξησης, όπως η δημιουργία ριζικών τριχιδίων, η ανάπτυξη των γυρεοσωλήνων κ.ά. (Blume και συν. 2012, Tominaga-Wada και συν. 2011). Αν και ο κυτταροσκελετός των ΜΑ παίζει τον κύριο ρόλο στην κορυφαία αύξηση των ριζικών τριχιδίων, φαίνεται ότι και οι ΜΣ έχουν σημαντική συμμετοχή (Sieberer και συν. 2005α). Στο φυτό *A. thaliana*, σε αδιαφοροποίητα κύτταρα της ριζοδερμίδας, οι περιφερειακοί ΜΣ εμφανίζονται κατά κύριο λόγο προσανατολισμένοι κάθετα προς τον άξονα επιμήκυνσης των κυττάρων. Στους τριχοβλάστες, οι ΜΣ αναδιοργανώνονται κατά την εκκίνηση της δημιουργίας των ριζικών τριχιδίων και αποπολυμερίζονται στη θέση δημιουργίας της κυτταρικής προεκβολής που θα δημιουργήσει το σωλήνα του ριζικού τριχιδίου. Στη συνέχεια, οι περιφερειακοί ΜΣ και οι ΜΣ του ενδοπλάσματος προσανατολίζονται παράλληλα προς τον άξονα επιμήκυνσης του σωλήνα ριζικού τριχιδίου. Στα πλήρως διαφοροποιημένα ριζικά τριχίδια ο αριθμός των περιφερειακών ΜΣ μειώνεται, ενώ απουσιάζουν οι ενδοπλασμικοί ΜΣ, οι οποίοι στα αναπτυσσόμενα ριζικά τριχίδια διατρέχουν το κυτόπλασμα μεταξύ του πυρήνα και της αναπτυσσόμενης κορυφής (Van Bruaene και συν. 2004). Η συμμετοχή του κυτταροσκελετού των ΜΣ στην παραπάνω διαδικασία έχει τεκμηριωθεί από επιδράσεις με χημικές ουσίες που διαταράσσουν τον κυτταροσκελετό της σωληνίνης ή με πειράματα, στα οποία έχει τροποποιηθεί η λειτουργία των γονιδίων της σωληνίνης. Και στις δύο περιπτώσεις επηρεάζεται δραματικά η ανάπτυξη των ριζικών τριχιδίων. Επιπλέον, η μελέτη μεταλλάγμάτων κατανίνης (*erh3*, *ectopic root hair3*) του φυτού *A. thaliana* έδειξε ότι οι ΜΣ εμπλέκονται και στον καθορισμό των κυττάρων της ριζοδερμίδας που θα διαφοροποιηθούν

σε τριχοβλάστες. Η απουσία της κατανίνης προκαλεί αλλαγές στο πρότυπο διαφοροποίησης των κυττάρων της ριζοδερμίδας (Tominaga-Wada και συν. 2011).

Ενα ακόμη πρότυπο σύστημα μελέτης της κορυφαίας αύξησης είναι αυτό των αναπτυσσόμενων γυρεοσωλήνων. Η διάμετρος των γυρεοσωλήνων είναι 10-20 μm , ενώ το μήκος τους, που αυξάνει ταχύτατα, μπορεί να φθάσει αρκετά cm (Kost και συν. 1999). Οι ΜΣ φαίνεται να απουσιάζουν από την κορυφή του αναπτυσσόμενου γυρεοσωλήνα, σχηματίζουν όμως δεσμίδες που διατρέχουν το περιφερειακό κυτόπλασμα του υπόλοιπου τμήματος του γυρεοσωλήνα παράλληλα προς τον άξονά του. Επιδράσεις με ουσίες που διαταράσσουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού των ΜΣ έχουν δείξει ότι αυτοί έχουν μικρή συμμετοχή στην μετακίνηση των οργανιδίων κατά μήκος του γυρεοσωλήνα, αλλά ουσιαστικό ρόλο στη μετακίνηση των σπερματικών κυττάρων (Cai και Cresti 2010). Είναι αξιοσημείωτο ότι, ενώ στα αγγειόσπερμα η ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα δεν αναστέλλεται μετά την επίδραση με ορυζαλίνη η οποία καταστρέφει τους ΜΣ, σε ορισμένα γυμνόσπερμα η πορεία αυτή αναστέλλεται. Σε αναπτυσσόμενους γυρεοκόκκους του φυτού *Picea abies*, οι ΜΣ εμφανίζονται στην κορυφή του γυρεοσωλήνα, γεγονός που υποδηλώνει ότι, τουλάχιστον στην περίπτωση αυτή, οι ΜΣ είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα (Anderhag και συν. 2000).

1.2.4.1.5 Η συμμετοχή των ΜΣ στη διακυτταρική επικοινωνία

Η επικοινωνία μεταξύ των πρωτοπλαστών γειτονικών φυτικών κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω των πλασμοδεσμών. Στη ρίζα του φυτού *A. thaliana*, η έναρξη της δημιουργίας των κυττάρων της ενδοδερμίδας και του φλοιού προϋποθέτει τη μετακίνηση ενός μεταγραφικού παράγοντα, του SHR (short root) από το αγωγό σύστημα στα κύτταρα της ενδοδερμίδας μέσω των πλασμοδεσμών (Vatén και συν. 2011). Η μετακίνηση αυτή επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μίας άλλης πρωτεΐνης, της SIEL (SHR-interacting embryonic lethal). Υποστηρίζεται ότι οι ΜΣ είναι απαραίτητοι για την μετακίνηση της SIEL μέσω των ενδοσωμάτων στην περιφέρεια του κυττάρου, πορεία που διακόπτεται από την ορυζαλίνη (Wu και Gallagher 2013). Τα ενδοσώματα αποτελούν μικρά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα που περιβάλλονται από στοιχειώδη μεμβράνη, στα οποία συγκεντρώνεται υλικό μέσω της σύντηξης ενδοκυττωτικών κυστιδίων. Αυτά αποτελούν θέσεις αποθήκευσης και διαλογής υλικών τα οποία στη συνέχεια, μπορούν να μεταφερθούν σε άλλα οργανίδια στόχους (Contento και Bassham 2012). Η SIEL αλληλεπιδρά και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που μεταφέρονται με τον ίδιο μηχανισμό, χωρίς ωστόσο να έχει βρεθεί αν στη μετακίνησή τους συμμετέχουν οι ΜΣ (Han και συν. 2014). Επιπλέον, σε περιπτώσεις μόλυνσης των φυτικών κυττάρων από ιούς, στις οποίες η μετακίνηση του γονιδιώματός τους από κύτταρο σε κύτταρο πραγματοποιείται μέσω πλασμοδεσμών, οι ΜΣ συμμετέχουν στη μεταφορά των νουκλεοπρωτεϊνών στην περιοχή των πλασμοδεσμών (Niehl και συν. 2013).

1.2.4.2 Οι συμμετοχή του κυτταροσκελετού της σωληνίνης στις αποκρίσεις σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις

Ο κυτταροσκελετός της σωληνίνης, εκτός από την ουσιαστική συμμετοχή του στην κυτταρική διαίρεση, την κυτταρική μορφογένεση και γενικότερα τη διαφοροποίηση των φυτών, εμπλέκεται και στις αποκρίσεις των φυτικών κυττάρων σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Wang και συν. 2011β). Είναι γνωστό ότι η οργάνωση των περιφερειακών ΜΣ μεταβάλλεται από την παρουσία σημάτων εξωκυτταρικής ή ενδοκυτταρικής προέλευσης (Nick 2014). Συγκεκριμένα, ο κυτταροσκελετός των ΜΣ επηρεάζεται από ορμονικά ερεθίσματα, τη μηχανική καταπόνηση ή τη βαρύτητα (Nick 2013). Υποστηρίζεται ότι η απόκριση στην εφαρμογή μηχανικής καταπόνησης γίνεται αντιληπτή από τον κυτταροσκελετό των ΜΣ, με αποτέλεσμα την συγκρότηση δεσμίδων ΜΣ παράλληλα προς την κατεύθυνση εφαρμογής της μέγιστης τάσης (Landrein και Hamant 2013). Όχι μόνο οι μηχανικές καταπονήσεις, αλλά και άλλες μορφές αβιοτικής καταπόνησης επάγουν την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι μεταβολές, τις οποίες επιφέρουν οι αβιοτικές καταπονήσεις στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης, δεν αντιπροσωπεύουν απλά ένα παράπλευρο αποτέλεσμα. Αντίθετα, πιστεύεται ότι ο κυτταροσκελετός συμμετέχει ενεργά στην αντίληψη των ερεθισμάτων, με την ενεργοποίηση μηχανισμών μεταγωγής μηνύματος και τη δρομολόγηση κυτταρικών αποκρίσεων (Nick 2011).

Πειραματικά δεδομένα, τα οποία προέκυψαν από τη μελέτη των κυττάρων που υφίστανται την επίδραση υψηλής αλατότητας, έδειξαν ότι οι περιφερειακοί ΜΣ αποπολυμερίζονται και στη συνέχεια πολυμερίζονται ξανά. Η πορεία αυτή θεωρείται ότι είναι απαραίτητη για την επιβίωση των φυτικών κυττάρων και την αντοχή τους στη συγκεκριμένη καταπόνηση (Wang και συν. 2007). Η συμπεριφορά αυτή του περιφερειακού κυτταροσκελετού είναι κοινή σε αρκετές περιπτώσεις αβιοτικών καταπονήσεων. Για παράδειγμα, σε κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *Triticum turgidum* η επίδραση υπερωσμωτικών μέσων προκαλεί την αποδιοργάνωση των περιφερειακών ΜΣ και τη συγκρότηση μακροσωληνίσκων. Οι τελευταίοι φαίνεται ότι αποτελούν προϋπόθεση για τη σταθεροποίηση του όγκου του πλασμουμένου πρωτοπλάστη (Komis και συν. 2002). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οι ΜΣ αποδιοργανώνονται στο ψύχος και για το λόγο αυτό θεωρείται ότι εμπλέκονται στην αντίληψη της πτώσης της θερμοκρασίας από τα φυτικά κύτταρα. Ωστόσο, η ευαισθησία στο ψύχος και η κρίσιμη θερμοκρασία κάτω από την οποία οι ΜΣ αποπολυμερίζονται διαφέρουν μεταξύ των φυτικών ειδών (Nick 2013). Ακόμη και σε φυτά, τα οποία είναι προσαρμοσμένα να επιβιώνουν σε χαμηλές θερμοκρασίες, η ραγδαία πτώση της θερμοκρασίας προκαλεί αποπολυμερισμό των ΜΣ. Συχνά, το επόμενο βήμα σε αυτή τη διαδικασία είναι η σταθεροποίηση των πολυμερών της σωληνίνης, πορεία στην οποία συμμετέχουν και φυτοορμόνες (Seung και συν. 2013). Υποστηρίζεται ότι η απόκριση

αυτή, η οποία συμβάλλει στην προσαρμογή των φυτών στο ψύχος, είναι αντίστοιχη εκείνης των κυττάρων που υφίστανται ωσμωτική καταπόνηση και οδηγεί στη συγκρότηση των μακροσωληνίσκων (Nick 2013).

Η δημιουργία μακροσωληνίσκων δεν περιορίζεται μόνο στις περιπτώσεις που αναφέρθηκαν. Η επίδραση χημικών ουσιών ή διαφόρων μετάλλων προκαλεί την οργάνωση άτυπων πολυμερών σωληνίνης. Για παράδειγμα, η επίδραση δισφαινόλης Α έχει ως αποτέλεσμα την οργάνωση άτυπων πολυμερών σωληνίνης στο περιφερειακό κυτόπλασμα και τη διαταραχή της οργάνωσης της μιτωτικής και κυτοκινητικής συσκευής (Adamakis και συν. 2013). Ο περιφερειακός κυτταροσκελετός αποτελεί στόχο μετάλλων, όπως το βολφράμιο (Adamakis και συν. 2010). Αντίστοιχα, η παρουσία βαρέων μετάλλων, όπως το αργίλιο, έχει πολλαπλές επιπτώσεις στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης. Η επίδραση με αργίλιο σε κύτταρα ρίζας διαφόρων φυτικών ειδών προκαλεί αποπολυμερισμό ΜΣ, αναδιοργάνωση του περιφερειακού κυτταροσκελετού ή αντικατάσταση των ΜΣ με μακροσωληνίσκους (Frantzios και συν. 2005). Είναι γνωστό ότι το χρώμιο είναι από τα περισσότερο τοξικά βαρέα μέταλλα. Η επίδραση με εξασθενές χρώμιο σε κύτταρα ρίζας του φυτού *Allium cepa* προκαλεί κατακερματισμό και αποπολυμερισμό ΜΣ. Αντίθετα, στο φυτό *Lens culinaris* η παρουσία του χρωμίου προκαλεί σταθεροποίηση των ΜΣ και τη δημιουργία δεσμίδων ΜΣ (Eleftheriou και συν. 2013).

Ωστόσο, η σταθεροποίηση των ΜΣ στην τελευταία περίπτωση ευνοείται και από την επαγωγή ακετυλίωση της σωληνίνης (Eleftheriou και συν. 2013). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων οδηγεί σε αλλαγές στο πρότυπο των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της σωληνίνης. Πιστεύεται ότι η παρουσία γιββερελίνης προσφέρει προστασία στους ΜΣ έναντι των χαμηλών θερμοκρασιών, με την αύξηση των επιπέδων της ακετυλιωμένης σωληνίνης (Huang και Lloyd 1999). Αντίστοιχη είναι και η περίπτωση της φωσφορυλίωσης της α -σωληνίνης που διαπιστώθηκε σε κύτταρα των φυτών *A. thaliana* και *Oryza sativa*, έπειτα από υπερωσμωτική καταπόνηση (Ban και συν. 2013).

Επιπλέον των όσων αναφέρθηκαν παραπάνω, οι ΜΣ είναι απαραίτητοι και για την αλληλεπίδραση των φυτών με μικροοργανισμούς, είτε πρόκειται για την εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων ή απόκριση των φυτών στην προσβολή από παθογόνους μικροοργανισμούς (Hardham 2013). Για παράδειγμα, κατά τη δημιουργία των φυματίων, αρχικά τα συμβιωτικά βακτήρια προσβάλλουν την κορυφή των ριζικών τριχιδίων. Μετά την προσέγγιση των βακτηρίων στο ριζικό τριχίδιο, οι ΜΣ στο περιφερειακό κυτόπλασμα και οι ενδοπλασματικοί ΜΣ που βρίσκονται πλησίον της κορυφής του ριζικού τριχιδίου αποδιοργανώνονται. Καθώς η προσβολή εξελίσσεται, στο περιφερειακό κυτόπλασμα οργανώνεται ένα σύστημα ΜΣ που περιβάλλει τα διεισδύοντα βακτήρια (Sieberer και συν. 2005β), ενώ παράλληλα ο κυτταροσκελετός των ΜΣ των κυττάρων του φλοιού της ρίζας

υφίσταται αναδιοργάνωση. Θεωρείται ότι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης συμμετέχει στο μηχανισμό που κατευθύνει τα βακτήρια από την επιδερμίδα της ρίζας στα κύτταρα του φλοιού για τη δημιουργία του φυματίου (Hardham 2013). Επίσης, σε περιπτώσεις ιώσεων, οι ΜΣ διευκολύνουν τη μεταφορά νουκλεοπρωτεϊνών ή ολόκληρων ιών από τα μολυσμένα στα γειτονικά υγιή κύτταρα, μέσω των πλασμοδεσμών (Niehl και συν. 2013).

Ο κυτταροσκελετός των ΜΣ επηρεάζεται και από την παρουσία παθογόνων βακτηρίων. Ένας από τους τρόπους εκδήλωσης της μολυσματικότητας είναι η απελευθέρωση βακτηριακών τοξινών στο κυτόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή (Hardham 2013). Η επίδραση με την τοξίνη harpin σε κύτταρα διαφορετικών ποικιλιών των φυτών *Vitis vinifera* και *Vitis rupestris*, οι οποίες εμφανίζουν διαφορές ως προς την ανθεκτικότητά τους στην προσβολή από βακτήρια, προκαλεί διαφορετικές επιπτώσεις στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης. Στην πιο ανθεκτική ποικιλία, η οργάνωση των ΜΣ διαταράσσεται και οι περιφερειακοί ΜΣ αντικαθίστανται από άλλους μικρότερου μήκους, ενώ στην ευαίσθητη ποικιλία η απόκριση δεν είναι τόσο έντονη (Qiao και συν. 2010). Μία άλλη βακτηριακή τοξίνη, η flg22, προκαλεί αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των ΜΣ της ανθεκτικής ποικιλίας, όχι όμως της ευαίσθητης (Chang και Nick 2012). Και στις δύο περιπτώσεις οι αλλαγές του κυτταροσκελετού των ΜΣ θεωρούνται προϋπόθεση της έκφρασης αμυντικών γονιδίων, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι οι ΜΣ συμμετέχουν στην αντίληψη των βιοτικών καταπονήσεων και δρομολογούν τις αμυντικές αποκρίσεις (Qiao και συν. 2010, Chang και Nick 2012). Αξίζει να σημειωθεί ότι η επίδραση με την τοξίνη harpin φυτών της ευαίσθητης ποικιλίας προκάλεσε μεγάλη αύξηση στα επίπεδα της τυροσινωμένης σωληνίνης (Qiao και συν. 2010). Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι ο ίδιος ο παθογόνος παράγοντας μπορεί να τροποποιήσει το πρότυπο των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της σωληνίνης. Η πρωτεΐνη HopZ1a, για παράδειγμα, παράγεται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* και η παρουσία της διαταράσσει την οργάνωση των ΜΣ στο φυτό *A. thaliana*. Η HopZ1a είναι μια ακετυλοτρανσφεράση που καταλύει την ακετυλίωση της σωληνίνης των κυττάρων του ξενιστή. Η ακετυλίωση της β -σωληνίνης εμποδίζει την ενσωμάτωση των ετεροδιμερών στους ΜΣ και κατά συνέπεια τον πολυμερισμό των ΜΣ (Lee και συν. 2012, Hardham 2013).

Γενικά, η είσοδος ενός παθογόνου προκαλεί αποπολυμερισμό των ΜΣ στο σημείο της εισβολής. Αυτή η διαδικασία μπορεί να συνοδεύεται και από τη δημιουργία νέων δεσμίδων ΜΣ. Σε αντιδράσεις υπερευαισθησίας, οι οποίες περιλαμβάνουν την εκδήλωση προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου με σκοπό την αποτροπή της εξάπλωσης της μόλυνσης, ο κυτταροσκελετός των ΜΣ φαίνεται ότι έχει σημαντική συμμετοχή (Smertenko και Franklin-Tong 2011). Επιπλέον, οι ΜΣ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην εκδήλωση προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου κατά τη διαφοροποίηση ορισμένων κυτταρικών τύπων ή κατά την ανάπτυξη γυρεοκόκκων, οι οποίοι δεν είναι συμβατοί με τον

ύπερο, στον οποίο έχουν μεταφερθεί (Smertenko και συν. 2003, Poulter και συν. 2008, Smertenko και Franklin-Tong 2011). Η απόκριση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, η οποία φαίνεται να εμπλέκεται στην εκδήλωση προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, περιλαμβάνει τον αποπολυμερισμό των ΜΣ και τη δημιουργία δεσμίδων νέων ΜΣ, φαινόμενα τα οποία επιτυγχάνονται χάρη στη στρατολόγηση MAPs (Smertenko και Franklin-Tong 2011). Παράλληλα, σε κύτταρα, τα οποία βρίσκονται στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου λόγω γήρανσης, έχει διαπιστωθεί μείωση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν σωληνίνες και επίσης πτώση των επιπέδων αυτών των πρωτεϊνών (Swidzinski και συν. 2002). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η συμμετοχή του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε αυτή τη διαδικασία έχει θεμελιωθεί καλύτερα σε σύγκριση με εκείνη των ΜΣ. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος συχνά επάγεται ως απόκριση στις αλλαγές των επιπέδων των ROS (Smertenko και Franklin-Tong 2011).

I.2.5 ROS και κυτταροσκελετός

I.2.5.1 ROS και κυτταροσκελετός της ακτίνης

Η οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης φαίνεται ότι επηρεάζεται από την αυξημένη παραγωγή ROS. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η επαγωγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των γυρεοκόκκων, οι οποίοι δεν είναι συμβατοί με το στίγμα που έχουν επικαθίσει. Σε αυτούς παρατηρούνται αλλαγές στον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Αρχικά, τα MA διατάσσονται κατά μήκους του αναπτυσσόμενου γυρεοσωλήνα. Λίγα λεπτά μετά την αντίληψη της ασυμβατότητας, τα MA αποπολυμερίζονται, διαδικασία η οποία ακολουθείται από τη συγκρότηση «στικτών μαζών F-ακτίνης» (Smertenko και Franklin-Tong 2011). Σε ασύμβατους γυρεοκόκκους του φυτού *Pyrus pyrifolia* διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της παραγωγής ROS σχετίζεται με τον αποπολυμερισμό των MA. Το ποσοστό των γυρεοσωλήνων, στους οποίους τα MA είχαν καταστραφεί, ήταν πολύ μικρότερο στην περίπτωση που αυτοί είχαν υποστεί επίδραση με DPI, ουσία η οποία αναστέλλει την παραγωγή ROS από τη δράση των Rbohs (Wang και συν. 2010). Επιπλέον, στην περίπτωση επαγωγής προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, λόγω ασυμβατότητας, σε γυρεοκόκκους του φυτού *Populus rhoeas*, τόσο ο αποπολυμερισμός των MA, όσο και ο μετέπειτα πολυμερισμός της ακτίνης που οδηγεί στη δημιουργία στικτών μαζών ακτίνης, εξαρτάται από την αυξημένη παραγωγή ROS και NO στον γυρεοσωλήνα (Wilkins και συν. 2011).

Επιπλέον, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι, σε συνθήκες υψηλής αλατότητας που προκαλούν τον αποπολυμερισμό των MA και την αύξηση των επιπέδων των ROS, ο κυτταροσκελετός της ακτίνης ελέγχει την παραγωγή των τελευταίων. Σε κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *A. thaliana*, τα οποία υπέστησαν την επίδραση NaCl, η αποδιοργάνωση των MA φαίνεται ότι προκαλεί την αύξηση της παραγωγής ROS μέσω της AtRbohC (Liu και συν.

2012β). Ωστόσο, διάφορα πειραματικά δεδομένα συνηγορούν και για το αντίθετο. Για παράδειγμα, στο μύκητα *Magnaporthe oryzae* που μολύνει το φυτό *Oryza sativa*, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης του μύκητα, η οποία ελέγχεται από GTPάσες και συμβαίνει κατά τη διάρκεια της προσβολής, ρυθμίζεται από NADPH-οξειδάσες του μύκητα (Ryder και συν. 2013). Στα ριζικά τριχίδια του φυτού *A. thaliana*, η ενεργοποίηση της AtRbohC και η παραγωγή ROS προκαλεί την είσοδο ιόντων ασβεστίου μέσω καναλιών του πλασμαλήματος, γεγονός το οποίο, μεταξύ άλλων, επηρεάζει τη δυναμική των MA κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ριζικών τριχιδίων (Foreman και συν. 2003). Παράλληλα, στα φύλλα του φυτού *A. thaliana* η παραγωγή H_2O_2 , που επάγεται από το ABA και σχετίζεται με το κλείσιμο των στομάτων, επηρεάζει τη συμπεριφορά του κυτταροσκελετού της ακτίνης, μέσω του ελέγχου της δραστηριότητας των πρωτεϊνών του συμπλόκου Arp2/3 (actin related protein 2/3, πρωτεΐνη σχετιζόμενη με ακτίνη 2/3). Στη συνέχεια, οι αλλαγές της οργάνωσης των MA ενισχύουν αναδραστικά την περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του H_2O_2 από τις Rbohs (Li και συν. 2014).

Η σχέση των ROS με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης είναι περισσότερο τεκμηριωμένη στα ζωικά σε σχέση με τα φυτικά κύτταρα και μάλιστα είναι γνωστό ότι η επίδραση με οξειδωτικά μέσα διαταράσσει την οργάνωσή του. Η διατάραξη συχνά οφείλεται στις αλλαγές που επάγονται στην οξειδοαναγωγική κατάσταση της ακτίνης ή των πρωτεϊνών που σχετίζονται με αυτή. Ένας από τους κύριους στόχους των οξειδωτικών ενώσεων είναι οι θειολικές ομάδες της κυστεΐνης και μεθειονίνης (Dalle-Donne και συν. 2001). Αναφέρεται, επίσης, ότι στα αμινοξέα της ακτίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί προσθήκη γλουταθειόνης στις σουλφιδρυλικές ομάδες της ή καρβονυλίωση, ως αποτέλεσμα της παρουσίας H_2O_2 ή άλλων ROS (Dalle-Donne και συν. 2001, Lassing και συν. 2007). Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι η ήπια οξείδωση των μορίων της G-ακτίνης προωθεί, λόγω του σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ γειτονικών πρωτεϊνικών μορίων, τη δημιουργία διμερών ή ολιγομερών ακτίνης και το σχηματισμό δεσμών μεταξύ γειτονικών MA. Τα παραπάνω αυξάνουν την ευελιξία του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα ζωικά κύτταρα (Tang και συν. 1999). Σε κύτταρα παγκρέατος ποντικού, η επίδραση με ROS προκαλεί την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Rosado και συν. 2002). Αξίζει να σημειωθεί ότι το μονοπάτι MAPK p38/MAPKAPK2 (MAPK Activated Protein Kinase 2, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από MAPK 2) εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης (Dalle-Donne και συν. 2001).

1.2.5.2 ROS και κυτταροσκελετός της σωληνίνης

Μέχρι σήμερα οι περισσότερες πληροφορίες για τις επιπτώσεις των ROS στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης αφορούν σε μελέτες ζωικών κυττάρων. Γενικά, φαίνεται ότι η οξειδοαναγωγική κατάσταση της σωληνίνης επηρεάζει ευθέως τον πολυμερισμό της

(Landino και συν. 2004α). Είναι γνωστό ότι η σωληνίνη είναι ευαίσθητη στην οξειδωτική καταπόνηση και ότι τα κατάλοιπα κυστεΐνης μπορούν πολύ εύκολα να οξειδωθούν (Ludueña 2013). Η οξείδωσή τους σχετίζεται με τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ α - και β -σωληνίνης, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται ο πολυμερισμός της και κατ' επέκταση η συγκρότηση ΜΣ (Clark και συν. 2014). Σε *in vitro* μελέτη, στην οποία είχε απομονωθεί σωληνίνη από νευρώνες εγκεφάλων, η οξείδωση των θειολικών ομάδων των αμινοξέων της σωληνίνης, έπειτα από την επίδραση με οξειδωτικά μέσα, προκάλεσε αναστολή του πολυμερισμού ΜΣ. Η αναστολή αυτή ήταν αντιστρεπτή, καθώς με την προσθήκη γλουταθειόνης, γλουταρεδοξίνης ή αναγωγάσης της γλουταθειόνης, οι δισουλφιδικοί δεσμοί, οι οποίοι είχαν δημιουργηθεί, υπέστησαν αναγωγή, γεγονός που επέτρεψε τον εκ νέου πολυμερισμό των ΜΣ (Landino και συν. 2004α). Είναι ενδιαφέρον ότι σε νευρώνες ασθενών από τη νόσο Alzheimer, στους οποίους τα επίπεδα των ROS είναι αυξημένα, ένα ποσοστό μορίων β -σωληνίνης σχηματίζουν δεσμούς μεταξύ τους (Santa-Maria και συν. 2005). Επιπλέον, σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινων νευρώνων η επίδραση με *t*-Butyl-hydroperoxide (*t*-βουτυλοϋπεροξειδίου του υδρογόνου, *t*-BuOOH) προκαλεί αλλοιώσεις της οργάνωσης του κυτταροσκελετού των ΜΣ και μείωση των επιπέδων της α -σωληνίνης (Allani και συν. 2004). Ομοίως, η επίδραση με κινόνες, οι οποίες επίσης προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση, προωθεί την καταστροφή των ΜΣ ανθρώπινων νευρώνων και τη μείωση του ποσοστού του πολυμερισμού νέων ΜΣ (Santa Maria και συν. 2005).

Η σωληνίνη των φυτικών κυττάρων φαίνεται ότι επίσης είναι ευαίσθητη στην οξείδωση, ενώ υπάρχουν και ενδείξεις λειτουργίας προστατευτικών μηχανισμών. Σε κύτταρα του φυτού *A. thaliana*, στα οποία πραγματοποιήθηκε πρωτεομική ανάλυση, η ταυτοποίηση πρωτεϊνών, των οποίων η οξειδοαναγωγική κατάσταση μεταβάλλεται από την επίδραση H_2O_2 , αποκάλυψε ότι οι α - και β -σωληνίνη είναι ευαίσθητες στην παρουσία οξειδωτικών μέσων (Wang και συν. 2012β). Με την ίδια πειραματική προσέγγιση είχε προηγουμένως δειχθεί ότι η επίδραση *t*-BuOOH προκαλεί τη γλουταθειονυλίωση της α - και β -σωληνίνης (Dixon και συν. 2005). Όπως ήδη αναφέρθηκε, η προσθήκη γλουταθειόνης στις θειολικές ομάδες τις προστατεύει, διότι αποτρέπει την οξείδωσή τους (Rouhier και συν. 2008).

Οι συνέπειες της αύξησης των επιπέδων των ROS του κυτταροσκελετού της σωληνίνης στα φυτικά κύτταρα αφορούν, κατά κύριο λόγο, σε περιπτώσεις καταπονήσεων. Για παράδειγμα, η αυξημένη παραγωγή τους που παρατηρείται σε κύτταρα καλλιέργειας του φυτού *Nicotiana tabacum*, μετά από παρατεταμένη έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, μπορεί να προκαλέσει ανασχεση της μίτωσης (Dixit και Cyt 2003). Επιπλέον, η έκθεση επιδερμικών κυττάρων φύλλων *A. thaliana* σε νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2) που ευθύνονται για τη δημιουργία συνθηκών οξειδωτικής καταπόνησης, διαταράσσει την οργάνωση των ΜΣ και ευνοεί τη δημιουργία συναθροίσεων σωληνίνης (Wang και συν. 2011γ). Συχνά, οι επιπτώσεις στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης, όπως εκείνες που

διαπιστώθηκαν σε κύτταρα που υφίστανται την επίδραση δισφαινόλης A, χρωμίου ή υψηλής αλατότητας, αποδίδονται στην αυξημένη παραγωγή ROS (Wang και συν. 2007, Adamakis και συν. 2013, Eleftheriou και συν. 2013, βλέπε ενότητα I.2.4.2). Πολύ πρόσφατα, υποστηρίχθηκε ότι η αναδιοργάνωση των ΜΣ στην περίπτωση της ωσμωτικής καταπόνησης πιθανόν πραγματοποιείται με μηχανισμούς στους οποίους συμμετέχει η NADPH-οξειδάση και τα ιόντα ασβεστίου (Nick 2014).

Εκτός από τις αβιοτικές καταπονήσεις, η αλληλεπίδραση των φυτικών κυττάρων με παθογόνα ή προϊόντα τους έχει ως συνέπεια την αύξηση της παραγωγής ROS, την αποδιοργάνωση των ΜΣ και συχνά την αναδιοργάνωσή τους. Η τελευταία είναι απαραίτητη για τις αμυντικές αποκρίσεις. Η επίδραση σε κύτταρα φύλλου του φυτού *A. thaliana* με τοξίνες που παράγονται από το μύκητα *Verticillium dahliae* προκαλεί τον αποπολυμερισμό των περιφερειακών ΜΣ. Η απόκριση αυτή φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της αύξησης των συγκεντρώσεων H_2O_2 , ενώ είναι ενδιαφέρον ότι σε μεταλλάγματα, τα οποία στερούνται τις NADPH-οξειδάσες RbohD και RbohF, παρατηρήθηκε πολύ πιο αργή απόκριση και επίσης ότι οι ΜΣ των επιδερμικών κυττάρων τους δεν αποδιοργανώθηκαν πλήρως (Yao και συν. 2011). Αλλαγές στον κυτταροσκελετό και στο πρότυπο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της σωληνίνης διαπιστώθηκαν και στην περίπτωση της παρουσίας βακτηριακών τοξινών, όπως η harpin και η flg22 σε κυτταρικές σειρές BY-2. Και σε αυτή την περίπτωση, στις αποκρίσεις εμπλέκεται η ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης και κατ' επέκταση η παραγωγή ROS (Chang και Nick 2012). Στις παραπάνω περιπτώσεις, ο αποπολυμερισμός των ΜΣ παρουσία των τοξινών παθογόνων μικροοργανισμών θεωρείται προαπαιτούμενο για την ενεργοποίηση της έκφρασης αμυντικών γονιδίων (Yao και συν. 2011, Chang και Nick 2012). Σε προηγούμενη ενότητα (I.1.7.9), αναφέρθηκε ότι κάτι αντίστοιχο ισχύει και για την παραγωγή των ROS, έπειτα από αλληλεπίδραση με παθογόνους μικροοργανισμούς (O'Brien και συν. 2012).

1.3 ANTIKEIMENO ΜΕΛΕΤΗΣ

Από όσα αναφέρθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια, καθίσταται σαφές ότι οι ROS, εκτός του ότι αντιπροσωπεύουν μόρια που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στους οργανισμούς, διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αντίληψη των βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων και των ορμονικών ερεθισμάτων αλλά και στις αποκρίσεις των φυτικών κυττάρων σε αυτά. Παράλληλα, οι ROS είναι απαραίτητες για μια σειρά από αναπτυξιακές διεργασίες των φυτών. Για τους λόγους αυτούς οι ROS αποτελούν πολύ σημαντικά μόρια για την επιβίωση και τη λειτουργία των φυτών. Τελικά, τα φυτικά κύτταρα έχουν προσαρμοστεί στην παρουσία τους, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς με τους οποίους αποφεύγουν την οξειδωτική καταπόνηση και τις οξειδωτικές βλάβες και ταυτόχρονα χρησιμοποιούν προς όφελος τους τις ROS καθιστώντας αυτές πολύ σημαντικές για τη μεταγωγή μηνυμάτων.

Είναι επίσης γνωστό ότι ο φυτικός κυτταροσκελετός αφενός μεν ανταποκρίνεται άμεσα σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα και καταπονήσεις, αφετέρου δε ότι ελέγχει την κυτταρική μορφογένεση, την κυτταρική διαφοροποίηση και την οργανογένεση, και επομένως εμπλέκεται στους ίδιους μηχανισμούς με τις ROS. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι, όπως και οι ΜΣ, οι ROS συμμετέχουν στην αντίληψη των βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων και τη δρομολόγηση των κυτταρικών αποκρίσεων σε αυτές. Επιπλέον, ο κυτταροσκελετός αναδιοργανώνεται παρουσία ορμονικών ερεθισμάτων, ενώ είναι επίσης γνωστό ότι σχεδόν όλες οι φυτοορμόνες επάγουν την παραγωγή ROS, η οποία μάλιστα θεωρείται προαπαιτούμενο για την απόκριση στο εκάστοτε ορμονικό ερέθισμα. Ταυτόχρονα, οι ROS είναι απαραίτητες για διάφορες αναπτυξιακές διεργασίες, βασικό στοιχείο του μηχανισμού διεκπεραίωσης των οποίων είναι ο κυτταροσκελετός. Για παράδειγμα, οι ROS ελέγχουν την πορεία του κυτταρικού κύκλου, στην διάρκεια του οποίου πραγματοποιείται συνεχής αναδιοργάνωση των συστημάτων ΜΣ ενώ, όπως και ο κυτταροσκελετός, εμπλέκονται και σε πορείες καθιέρωσης κυτταρικής πολικότητας. Επομένως, καθίσταται αντιληπτό ότι, εφόσον οι ROS συμμετέχουν σε διεργασίες, στις οποίες εμπλέκεται και ο κυτταροσκελετός, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα αυτά τα πολύ σημαντικά «εργαλεία» για το κύτταρο να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Στα φυτικά κύτταρα, μέχρι σήμερα, κυριαρχεί η αντίληψη ότι η αυξημένη παραγωγή ROS προκαλεί την καταστροφή των διαφόρων συστημάτων ΜΣ. Ωστόσο, παρότι αυτό είναι πράγματι σε ένα βαθμό αληθές, έρχεται σε αντίφαση με το γεγονός ότι οι ROS και ο κυτταροσκελετός της σωληνίνης συμμετέχουν στις ίδιες αναπτυξιακές πορείες και ανταποκρίνονται σε κοινά ερεθίσματα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η παρούσα διατριβή αποσκοπεί στη διερεύνηση της λειτουργικής σχέσης των ROS με τον φυτικό κυτταροσκελετό, εστιάζοντας στη μελέτη των μηχανισμών αλληλεπίδρασης των ROS με τον κυτταροσκελετό, κατά κύριο λόγο εκείνων της σωληνίνης. Ως πειραματικό φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη αγγειοσπέρμων,

τα μονοκοτυλήδωνα *Triticum turgidum* και *Zea mays* και το δικοτυλήδονο *Arabidopsis thaliana*.

Συνοπτικά, τα κύρια ερωτήματα που διερευνήθηκαν ήταν:

1. Η σχέση των ROS με την οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης στα φυτικά κύτταρα:

Αρτίβλαστα των παραπάνω φυτών υπέστησαν επιδράσεις με ουσίες που αυξάνουν τα επίπεδα των ROS, καθώς και με αντιοξειδωτικές ενώσεις ή με αναστολείς ενζύμων που προκαλούν μειωμένη παραγωγή ROS. Για τη μελέτη των επιπτώσεων της μεταβολής των επιπέδων των ROS στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης χρησιμοποιήθηκαν κυρίως κύτταρα ακρόρριζου, τα οποία εμφανίζουν έντονη μεριστωματική δραστηριότητα. Στα κύτταρα αυτά πραγματοποιείται έντονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (McCurdy και Gunning 1990). Χρησιμοποιήθηκαν, επιπλέον, μεταλλάγματα του φυτού *Arabidopsis*, τα οποία στερούνται της δράσης μίας NADPH-οξειδάσης, της AtRbohC, όπως επίσης και μετασχηματισμένα φυτά, τα οποία εξέφραζαν τα γονίδια TUA6 ή TUB6 μαζί με το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP, green fluorescent protein).

2. Ο ρόλος των ROS στην πορεία του κυτταρικού κύκλου:

Διερευνήθηκε ο ρόλος των ROS συνολικά στην πορεία του κυτταρικού κύκλου και σε ορισμένα από τα φαινόμενα που τη συνοδεύουν. Χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον, φυτά, στα οποία ο υποκινητής του γονιδίου της κυκλίνης B1 είχε συντηχθεί με το γονίδιο της β-γλυκουρονιδάσης (GUS, β-glucuronidase).

3. Οι πιθανοί μηχανισμοί μεταγωγής μηνύματος που συνδέουν τις ROS με τον κυτταροσκελετό της σωληνίνης:

Διερευνήθηκε η συμμετοχή πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αύξηση των επιπέδων των ROS, όπως η PI3K, στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης. Επιπλέον, διερευνήθηκε εάν στους παραπάνω μηχανισμούς συμμετέχει και μία MAPK, όμοια με την p38 των ζωικών κυττάρων, δεδομένου ότι: α) η p38-MAPK στα ζωικά κύτταρα ενεργοποιείται σε περιπτώσεις οξειδωτικής καταπόνησης (Gaitanaki και συν. 2006), και β) αυτή η MAPK στα φυτικά κύτταρα συμμετέχει στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης (Komis και συν. 2004).

4. Ο ρόλος των ROS, ως μορίων μεταγωγής μηνύματος που ελέγχουν μορφογενετικές πορείες, στη διεξαγωγή των οποίων ο κυτταροσκελετός αποτελεί βασικό στοιχείο:

Διερευνήθηκε ο ρόλος των ROS στην οντογένεση των στοματικών συμπλόκων του φυτού *Z. mays*, κατά τη διάρκεια της οποίας, κατευθυνόμενα τοπικά επαγωγικά ερεθίσματα που εκπέμπονται από συγκεκριμένα κύτταρα, καθιερώνουν κυτταρική πολικότητα στα γειτονικά τους κύτταρα, με αποτέλεσμα την εκδήλωση ασυμμέτρων κυτταροδιαίρέσεων. Στις διαδικασίες αυτές, ο κυτταροσκελετός της σωληνίνης και εκείνος της ακτίνης διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο (Galatis και Apostolakos 2004, Facette και Smith 2012).

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

II.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα διατριβή, ως πειραματικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν αρτίβλαστα των φυτών *Triticum turgidum* var. Athos, *Arabidopsis thaliana* οικότυπος Columbia και *Zea mays* var. Ptolemaios. Οι καρυόψεις των φυτών *T. turgidum* και *Z. mays* παραχωρήθηκαν από το Ινστιτούτο Σιτηρών (Θεσσαλονίκη), ενώ τα σπέρματα του φυτού *A. thaliana* από τον Δρα. Κ. Χαραλαμπίδη (Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών).

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν σπέρματα ορισμένων γενετικά τροποποιημένων φυτών *Arabidopsis*. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλάγματα *rhd2-5* και *rhd2-6* (προσφορά του Δρα L. Dolan, John Innes Centre, Norwich, UK) και *ton1* (προσφορά του Δρα D. Bouchez, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles, France) και φυτά των διαγονιδιακών σειρών FA4C, τα οποία περιέχουν το γονίδιο αναφοράς β-γλυκουρονιδάσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή της κυκλίνης B1 (προσφορά του Δρα Κ. Χαραλαμπίδη), GFP-TUA6 και GFP-TUB6 (προσφορά του Δρα Ι.Δ. Αδαμάκη, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης).

II.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Οι καρυόψεις του φυτού *T. turgidum* τοποθετήθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν διηθητικό χαρτί διαβρεγμένο με απεσταγμένο νερό, ενώ εκείνες του *Z. mays* τοποθετήθηκαν αρχικά σε διαβρεγμένο διηθητικό χαρτί και, στη συνέχεια, σε γυάλινα δοχεία. Οι καρυόψεις *T. turgidum* και *Z. mays* αφέθηκαν να φυτρώσουν στο σκοτάδι σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (Heraeus, Belingen, Germany) 25 ± 1 °C για 48 h και 72 h, αντίστοιχα.

Για την ανάπτυξη αρτιβλάστων του φυτού *Arabidopsis* τα σπέρματα ενυδατώνονται στους 4 °C για 48 h και ακολούθως απολυμαίνονται σε άσηπτες συνθήκες με υδατικό διάλυμα χλωρίνης 25% (v/v) και αιθανόλης 70% (v/v). Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε τρυβλία ή σε κωνικές φιάλες που περιέχουν, αντίστοιχα, αποστειρωμένο στερεό ή υγρό (1/2) θρεπτικό διάλυμα μάκρο- και μικροθρεπτικών ουσιών Murashige και Skoog (MS, Murashige και Skoog 1962). Αυτό προκύπτει από τη διάλυση των μειγμάτων αλάτων και βιταμινών MS (Duchefa, Haarlem, The Netherlands) και Gamborg B5 (Duchefa) σε MES (methanesulfonic acid, Serva, Heidelberg, Germany). Το pH του διαλύματος αυτού ρυθμίζεται στο 5,7 με τη χρήση KOH. Για τη στερεοποίηση του θρεπτικού μέσου προστέθηκε 0,8% Phytigel (Duchefa).

Τα τρυβλία ή οι κωνικές φιάλες μεταφέρονται σε θάλαμο επώασης σταθερής θερμοκρασίας 22 °C και αναπτύσσονται με φωτοπερίοδο 16 h. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα σπέρματα του φυτού *Arabidopsis* τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο με διαβρεγμένο διηθητικό χαρτί και αφέθηκαν να φυτρώσουν στους 22 °C με φωτοπερίοδο 16 h.

II.3 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Αρτίβλαστα *Triticum turgidum*, *Arabidopsis thaliana* και *Zea mays* υπέστησαν επιδράσεις με ουσίες που διαταράσσουν την ομοιόσταση των ROS, όπως και με ορισμένους αναστολείς. Ολόκληρα αρτίβλαστα *T. turgidum* και *A. thaliana* τοποθετήθηκαν στα διαλύματα των επιδράσεων. Οι επιδράσεις στα αρτίβλαστα του φυτού *Z. mays* έλαβαν χώρα σε ποτήρια ζέσεως, τα οποία περιείχαν βαμβάκι εμποτισμένο με το αντίστοιχο υδατικό διάλυμα. Τα αρτίβλαστα τοποθετήθηκαν στο διάλυμα της επίδρασης, μετά την αφαίρεση της κύριας ρίζας. Λεπτές τομές ή μικρά τεμάχια των επηρεασμένων φύλλων υπέστησαν πειραματικούς χειρισμούς όπως περιγράφονται παρακάτω.

Σε ορισμένες από τις βιοχημικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, οι ρίζες αρτίβλαστων του φυτού *T. turgidum* αφαιρέθηκαν και τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland για 3 h, ώστε να ανακάμψουν από τον τραυματισμό. Ακολούθησαν επιδράσεις με ουσίες διαλυμένες σε διάλυμα Hoagland. Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις, ρίζες από ακέραια αρτίβλαστα *T. turgidum* και *Arabidopsis* βυθίστηκαν σε υδατικά διαλύματα των ουσιών.

Το θρεπτικό διάλυμα Hoagland είναι υδατικό διάλυμα αλάτων και αποτελείται από 20 mM MES, τιτλοδοτημένο με KOH, ώστε το pH του διαλύματος να είναι 5,6, 5 mM CaCl₂, 5 mM KNO₃, 2 mM MgSO₄, 2 mM KH₂PO₄, 1 μM NaFeEDTA, 0,1 μM NaMoO₄, 0,1 μM CuSO₄, 0,1 μM ZnSO₄ και 0,1 μM MnCl₂ και επιπλέον 20 mM γλυκόζη.

II.4 ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΙΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Ολόκληρα αρτίβλαστα ή ρίζες των υπό μελέτη φυτών υπέστησαν επιδράσεις με τις παρακάτω ουσίες ή αναστολείς:

1. DPI (Diphenylene iodonium, Dibenziodolium chloride, Sigma, Saint Louis, MO, USA)

Το DPI αναστέλλει τη δραστηριότητα της NADPH-οξειδάσης, γεγονός το οποίο προκαλεί μείωση των επιπέδων των ROS (Bolwell και Wojtaszek 1997, Foreman και συν. 2003). Χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 10-50 μM, οι οποίες προέκυψαν από πυκνό διάλυμα 10 mM DPI σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO).

2. NAC (N-acetyl cysteine, N-ακετυλοκυστεΐνη Sigma)

Η NAC αλληλεπιδρά με διάφορες ROS, συμπεριλαμβανομένων των H₂O₂, O₂⁻ και HO[•] (Aruoma και συν. 1989, Benrahmoune και συν. 2000). Η NAC αρχικά παρασκευάστηκε σε πυκνό υδατικό διάλυμα 100 mM και χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 100-500 μM.

3. MEN (Menadione, 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, Sigma)

Η MEN είναι παράγωγο της βιταμίνης K1. Η είσοδός της στα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή της, την παραγωγή υδροκινόνης (hydroquinone) και την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ROS παρουσία οξυγόνου (Kawamura συν. 2006β).

Χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 10-50 μM , οι οποίες προέκυψαν από πυκνό διάλυμα 100 mM σε DMSO.

4. H₂O₂ (Hydrogen peroxide, Merck, Darmstadt, Germany)

Το H₂O₂ είναι ένα ήπιο οξειδωτικό μέσο, το οποίο διαπερνά με ευκολία το πλασμαλήμμα (Neill και συν. 2002). Χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 100 μM -10 mM, οι οποίες προέκυψαν από πυκνό διάλυμα περιεκτικότητας 30% (w/v) σε νερό.

5. LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one, Sigma)

Ο LY294002 είναι εξειδικευμένος αναστολέας της καταλυτικής δραστηριότητας της PI3K (Vlachos και συν. 1994). Για την επίδραση χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα LY294002 50 μM , τα οποία παρασκευάστηκαν από πυκνό διάλυμα 10 mM της ουσίας αυτής σε DMSO.

6. SB203580 (4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-imidazole, Calbiochem-Millipore, Billerica, MA, USA) Ο SB203580 είναι εξειδικευμένος αναστολέας της p38-MAPK (Young και συν. 1997) και έχει χρησιμοποιηθεί κατ' επανάληψη στα φυτικά κύτταρα (Komis και συν. 2004, Izumi και συν. 2012). Ο αναστολέας χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 10-100 μM , οι οποίες προέκυψαν από πυκνό διάλυμα συγκέντρωσης 10 mM σε DMSO.

Κατά τη διάρκεια των επιδράσεων, τα αρτίβλαστα *T. turgidum* και *Z. mays* τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 25 ± 1 °C, ενώ εκείνα του *Arabidopsis* σε θάλαμο 22 °C στο σκοτάδι ή με φωτοπερίοδο 16 h.

Οι συγκεντρώσεις των ουσιών, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκαν μετά από προκαταρκτικά πειράματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις και ήταν ίδιες ή μικρότερες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν σε άλλες περιπτώσεις. Τα κριτήρια για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης ήταν η λήψη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων και η ικανότητα των επηρεασμένων αρτιβλάστων να ανακάμπτουν σε απεσταγμένο νερό μετά το τέλος της επίδρασης.

Ως δείγματα μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν αρτίβλαστα ή ρίζες που υπέστησαν επίδραση με απεσταγμένο νερό ή υδατικά διαλύματα DMSO. Σε αυτά τα πειράματα, οι συγκεντρώσεις του DMSO ήταν ίδιες με εκείνες των διαλυμάτων των επιδράσεων. Η μέγιστη τελική συγκέντρωση DMSO στα διαλύματα της επίδρασης ήταν 0,5% (v/v).

II.5 ΧΡΩΣΕΙΣ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΟ ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Σε ζώντα αρτίβλαστα ή ρίζες του φυτού *T. turgidum*, αρτίβλαστα *Arabidopsis* και τομές ή τμήματα φύλλου αρτιβλάστων *Z. mays* εφαρμόστηκαν *in vivo* χρώσεις με τις παρακάτω ουσίες:

1. Fluorescein diacetate (διοξική φλουορεσκεΐνη, FDA, Sigma)/Propidium iodide (ιωδιούχο προπίδιο, PI, Serva)

Η ταυτόχρονη χρώση FDA/PI επιτρέπει τη διάκριση ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Το FDA εισέρχεται στα ζωντανά κύτταρα. Μετά την είσοδό του στο κυτόπλασμα, διάφορες εστεράσες καταλύουν την αποακετυλίωσή του, με αποτέλεσμα την παραγωγή του φθορίζοντος μορίου fluorescein (φλουορεσκεΐνη). Αντίθετα, το PI εισέρχεται μόνο στα νεκρά κύτταρα ή σε κύτταρα, στα οποία το πλασμαλήμμα έχει καταστραφεί και χρωματίζει τον πυρήνα (Darzynkiewicz και συν. 1994). FDA και PI σε τελική συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/ml}$ προστίθενται στο διάλυμα της επίδρασης 10 min πριν από το τέλος των επιδράσεων, με σκοπό να διαπιστωθεί εάν οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν προκαλούν νεκρωτικά φαινόμενα στα επηρεασμένα κύτταρα.

2. 2,7-Dichlorofluorescein diacetate (διχλωρο-διοξική φλουορεσκεΐνη, DCF, Sigma) και 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (2,7-διυδροδιχλωρο-διοξική φλουορεσκεΐνη, H₂DCF, Sigma)

Το DCF και το H₂DCF χρησιμοποιούνται ευρέως ως δείκτες της παρουσίας ROS τόσο σε ζωικά όσο και σε φυτικά κύτταρα. Η είσοδός τους στα κύτταρα ακολουθείται από την υδρόλυσή τους από εστεράσες. Απελευθερώνονται οι ουσίες dichlorofluorescein και dichlorodihydrofluorescein, οι οποίες αντιδρούν με H₂O₂ και άλλες ROS. Η αντίδραση με τις ROS έχει και στις δύο περιπτώσεις ως αποτέλεσμα το σχηματισμό φθορίζοντος μορίου (Gomes και συν. 2005, Sandalio και συν. 2008). DCF και H₂DCF σε τελική συγκέντρωση 25 μM και 20 μM , αντίστοιχα, προστέθηκαν στο διάλυμα λίγο πριν από το τέλος της κάθε επίδρασης. Ωστόσο, στην περίπτωση του φυτού *Z. mays* παραδερμικές τομές φύλλων ή λωρίδες φύλλων εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ίδιο με εκείνο της επίδρασης που περιείχε DCF ή H₂DCF για 15 min. Οι διαφορές στην ένταση του φθορισμού μετρήθηκαν με τη βοήθεια ενός λογισμικού Java (Image Color Gauge version 0.1, N. Apostolakis, Laboratoire d' Astrophysique de Marseille, France) ή του λογισμικού Image J v.1.46 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Η μέτρηση της έντασης του φθορισμού με τα παραπάνω προγράμματα λογισμικού πραγματοποιήθηκε σε ψηφιακές εικόνες, οι οποίες είχαν ληφθεί με τον ίδιο χρόνο έκθεσης.

3. Aniline blue (Serva)

Το κυανούν της ανιλίνης είναι φθορίζουσα χρωστική που χρωματίζει έντονα τα νεαρά θυγατρικά κυτταρικά τοιχώματα που περιέχουν καλλόζη. Ολόκληρα αρτίβλαστα ή τομές φύλλων τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 0,05% (w/v) χρωστικής σε 0,07 M K₂HPO₄, pH 8,5 (O'Brien και McCully 1981).

II.6 ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ *Arabidopsis*

II.6.1 Φυτά που παράγουν GFP-σωληνίνη

Οι επιπτώσεις της διατάραξης της ομοιόστασης των ROS στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης μελετήθηκαν και με τη βοήθεια των διαγονιδιακών φυτών GFP-TUA6 και GFP-TUB6. Τα φυτά αυτά παράγουν το μόριο της GFP, το οποίο έχει συντηχθεί στο αμινοτελικό άκρο της α - ή της β -σωληνίνης αντίστοιχα, υπό τον έλεγχο του υποκινητή CaMV 35S (Ueda και συν. 1999). Επηρεασμένα αρτίβλαστα των φυτών αυτών μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω σε σταγόνα ύδατος και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο επιφθορισμού (βλέπε παρακάτω).

II.6.2 Φυτά που εκφράζουν *GUS:Cyclin B1*

Χρησιμοποιήθηκε η διαγονιδιακή σειρά *Arabidopsis* FA4C. Τα φυτά αυτά περιέχουν το σύστημα αναφοράς cyclin B1:1 β -glucuronidase (β -γλυκουρονιδάση, GUS). Σε αυτά, ο υποκινητής του γονιδίου της κυκλίνης B1 είναι συνδεδεμένος με το γονίδιο της β -γλυκουρονιδάσης (Colón-Carmona και συν. 1999). Με τη χρήση κατάλληλου υποστρώματος, η β -γλυκουρονιδάση καταλύει τη μετατροπή του υποστρώματος σε έγχρωμο προϊόν, αποκαλύπτοντας μία ενδεικτική εικόνα του προτύπου έκφρασης του γονιδίου της κυκλίνης. Αρτίβλαστα των φυτών αυτών υπέστησαν επίδραση με ουσίες που διαταράσσουν την ομοιόσταση των ROS. Μετά το τέλος της επίδρασης, ακολούθησε η παρακάτω πειραματική διαδικασία που επιτρέπει την ανίχνευση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου της κυκλίνης B1.

1. Τα αρτίβλαστα βυθίστηκαν σε υδατικό διάλυμα 90% (v/v) παγωμένης ακετόνης και έπειτα αφέθηκαν σε αυτό για 25 min, στους 25 °C.
2. Η ακετόνη αφαιρέθηκε και ακολούθησαν πλύσεις με παγωμένο διάλυμα χρώσης GUS (βλέπε παρακάτω).
3. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση των αρτιβλάστων με διάλυμα ίδιας σύστασης με το παραπάνω διάλυμα, το οποίο περιείχε επιπλέον 2 mg/ml του υποστρώματος της β -γλυκουρονιδάσης, X-glca (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid cyclohexylammonium salt, Duchefa), στους 37 °C για 12 h.
4. Ακολούθησαν διαδοχικές αφυδατώσεις διάρκειας 30 min με 20%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% και τέλος 90% αιθανόλη, στους 25 °C.
5. Στη συνέχεια, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε υδατικό διάλυμα 70% αιθανόλης στους 4 °C, όπου και φυλάσσονται.
6. Τα δείγματα μελετήθηκαν με φωτονικό μικροσκόπιο. Τα αρτίβλαστα εμφανίζουν μπλε χρώμα, λόγω της παραγωγής γλυκουρονικού οξέος, μετά τη δράση της β -γλυκουρονιδάσης.

Το διάλυμα της χρώσης GUS περιέχει 0,2% (v/v) Triton X-100 (Sigma), 1 mM σιδηροκυανιούχου καλίου (potassium ferrocyanide, Sigma), 1 mM σιδηρικού ανιούχου καλίου potassium ferricyanide (Sigma) σε διάλυμα 0,1 M φωσφορικού νατρίου (sodium phosphate) pH 7,2. Φυλάσσεται στους 4 °C, ενώ, όταν περιέχει το υπόστρωμα X-glca, φυλάσσεται στους -20 °C.

II.7 ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΗ

II.7.1 Προετοιμασία των δειγμάτων

Η διαδικασία ανοσοσήμανσης διάφορων βιολογικών μακρομορίων με τη βοήθεια κατάλληλων αντισωμάτων περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια επεξεργασίας των δειγμάτων:

1. Στερέωση του φυτικού υλικού

Ακρόρριζα αρτιβλάστων *T. turgidum* βυθίστηκαν σε διάλυμα 8% (w/v) παραφορμαλδεΐδης (PFA, παραφορμαλδεΐδη, Merck) σε ρυθμιστικό διάλυμα PEM (PIPES, EGTA, MgSO₄, βλέπε παρακάτω) pH 6,8 για 45 min ή 1 h στους 25 °C. Ακρόρριζα ή ολόκληρα αρτίβλαστα των φυτών *Arabidopsis*, όπως επίσης και οι τομές φύλλων αρτιβλάστων *Z. mays* στερεώθηκαν με διάλυμα που περιείχε 4% (w/v) PFA. Ενίστε, το στερεωτικό διάλυμα περιείχε 0,05% (v/v) Triton X-100 και 0,1-5% (v/v) DMSO.

Για την παρασκευή του στερεωτικού διαλύματος διαλύθηκε κατάλληλη ποσότητα PFA με θέρμανση σε PEM. Το στερεωτικό διάλυμα διαμοιράζεται σε μικρότερες ποσότητες και φυλάσσεται στους -20 °C.

2. Πλύσεις

Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PEM διάρκειας 15 min η κάθε μία.

3. Ενζυμική πέψη του κυτταρικού τοιχώματος

Η πέψη των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος πραγματοποιήθηκε με την επώαση των δειγμάτων με κατάλληλο ενζυμικό μείγμα, στους 25 °C. Σε όλες της περιπτώσεις, το ενζυμικό μείγμα διαλύθηκε σε PEM pH 5,6. Τα ακρόρριζα *T. turgidum* επώαστηκαν με 2% (w/v) cellulase (Onozuka R10, Yacult-Honshua, Tokyo, Japan), 1% (w/v) macerozyme (Onozuka R10), 1% (w/v) driselase (Sigma) και 1% (v/v) β-glucuronidase (Sigma) για 30-60 min. Στην περίπτωση των ακρόρριζων και των αρτιβλάστων *A. thaliana*, το ενζυμικό μείγμα περιείχε 0,5% cellulase και 1% (w/v) macerozyme, ενώ η διάρκεια της επώασης ήταν 15-30 min. Οι τομές φύλλων του φυτού *Z. mays* επώαστηκαν για 15 min με 1% (w/v) cellulase, 1% (w/v) macerozyme και 1% (w/v) driselase.

4. Πλύσεις

Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PEM διάρκειας 15 min η κάθε μία.

5. Αποχωρισμός των κυττάρων και επίστρωση σε καλυπτρίδες

Οι καλυπτρίδες διατηρούνται σε διάλυμα πυκνού νιτρικού οξέος. Πριν από τη χρήση, πλένονται επιμελώς με νερό και ακετόνη και επιστρώνονται με υδατικό διάλυμα πολυ-L-λυσίνης (poly-L-Lysine, Sigma) 0,1% (w/v). Στη συνέχεια, τα ακρόρριζα *T. turgidum* και *A. thaliana* μεταφέρονται σε καθαρές καλυπτρίδες καλυμμένες με πολυ-L-λυσίνη. Με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου, τα δείγματα πιέζονται προσεκτικά, ώστε να διαχωριστούν τα κύτταρα, στη συνέχεια δε αφέθηκαν να στεγνώσουν. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις, το βήμα αυτό παραλείπεται.

6. Εκχύλιση

Η αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια διαλύματος PBS (Phosphate Buffered Saline, βλέπε παρακάτω) που περιείχε Triton X-100 και DMSO. Οι καλυπτρίδες που έφεραν κύτταρα ακρόρριζων του φυτού *T. turgidum* επώαστηκαν με διάλυμα που περιείχε 2% (v/v) Triton X-100 και 5% (v/v) DMSO, ενώ εκείνες με τα κύτταρα *A. thaliana* με διάλυμα 0,5% (v/v) Triton X-100 και 1% (v/v) DMSO. Στην περίπτωση των αρτιβλάστων *A. thaliana* και των φύλλων *Z. mays* το διάλυμα περιείχε 0,05% (v/v) Triton X-100, 0,1% (v/v) DMSO και 1% (v/v) Triton X-100 και 5% (v/v) DMSO, αντίστοιχα. Η διάρκεια εκχύλισης ήταν 15-60 min. Στην περίπτωση των ολόκληρων αρτιβλάστων *A. thaliana*, προηγήθηκε της επίδρασης επώαση με παγωμένη απόλυτη μεθανόλη για 10 min στους -20 °C.

7. Πλύσεις

Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS, διάρκειας 10 min η κάθε μία.

8. Δέσμευση μη ειδικών θέσεων

Η δέσμευση μη ειδικών θέσεων (blocking) πραγματοποιήθηκε με την επώαση των δειγμάτων με διάλυμα PBS που περιέχει 2% (w/v) BSA (bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοδινού, Fluka, Buchs, Switzerland). Ορισμένες φορές το BSA προστέθηκε στο διάλυμα εκχύλισης.

9. Επώαση με το πρώτο αντίσωμα

Ακολουθεί επώαση με κατάλληλα αντισώματα (βλέπε παρακάτω), τα οποία διαλύονται σε συγκεκριμένες αραιώσεις σε PBS που περιέχει 2% (w/v) BSA. Τα δείγματα επωάζονται για 12 h με το διάλυμα του αντισώματος, σε θερμοκρασία 4 ή 25 °C.

10. Πλύσεις

Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS, διάρκειας 10 min η κάθε μία.

11. Επώαση με αντισώματα συζευγμένα με κατάλληλα φθοριοχρώματα

Τα δείγματα επώαστηκαν για 1-4 h στους 37 °C με μείγματα ανοσοσφαιρινών συζευγμένων με φθοριοχρώματα (Sigma), κυρίως με fluorescein isothiocyanate. Χρησιμοποιήθηκαν ανοσοσφαιρίνες που αναγνωρίζουν τις ανοσοσφαιρίνες επίμυων, ποντικών και κουνελιών,

ανάλογα με το είδος στο οποίο είχε παρασκευαστεί το πρώτο αντίσωμα (βλέπε παρακάτω). Η αραίωση των αντισωμάτων ήταν 1:100 ή 1:40 σε διάλυμα PBS που περιείχε 2% BSA.

12. Πλύσεις

Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS, διάρκειας 10 min η κάθε μία.

13. Χρώση του DNA

Η χρώση του DNA (deoxy-ribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ) πραγματοποιήθηκε με 10 µg/ml Hoechst 33258 (bis-Benzimide, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) ή 2,5 µg/ml PI.

14. Πλύσεις

Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS, διάρκειας 10 min η κάθε μία.

15. Κάλυψη των δειγμάτων

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα που περιείχε μία σταγόνα υλικού κάλυψης, το οποίο βοηθά στη διατήρηση του φθορισμού. Χρησιμοποιήθηκε υλικό κάλυψης Dabco (Sigma) ή διάλυμα PBS με γλυκερόλη σε αναλογία 1:2 (v/v) το οποίο περιείχε 0,36% (w/v) p-phenylenediamine (Sigma), το οποίο παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.

16. Μελέτη με μικροσκόπιο επιφθορισμού ή συνεστιακό μικροσκόπιο laser (βλέπε παρακάτω).

II.7.2 Αντισώματα

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε ανοσοσήμανση διαφόρων βιολογικών μακρομορίων με τη χρήση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν εκλεκτικά τα μακρομόρια αυτά.

1. Για τη σήμανση της α -σωληνίνης χρησιμοποιήθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα YOL clone 1/34 (Serotec, Oxford, UK) και DM1A (Sigma), τα οποία αναπτύχθηκαν από υβριδώματα επίμυος και ποντικού αντίστοιχα, σε αραιώσεις 1: 100 ή 1:40.

2. Για τη σήμανση της τυροσινωμένης α -σωληνίνης χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο μονοκλωνικό αντίσωμα (clone TUB-1A2, Sigma). Το αντίσωμα παρασκευάζεται από υβριδώματα ποντικού και αναγνωρίζει το καρβοξυτελικό άκρο της α -σωληνίνης, το οποίο περιέχει τυροσίνη. Η αραίωση του αντισώματος ήταν 1:40.

3. Για τη σήμανση της ακετυλιωμένης α -σωληνίνης χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα (clone 6-11B-1, Sigma). Το αντίσωμα αυτό παρασκευάζεται από υβριδώματα ποντικού και αναγνωρίζει την α -σωληνίνη, στην οποία η λυσίνη-40 έχει υποστεί ακετυλίωση. Η αραίωση του αντισώματος ήταν 1:40.

4. Για τη σήμανση των HDEL πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:40 το μονοκλωνικό αντίσωμα 2E7 (clone 2E7, Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA, USA), το οποίο αναπτύχθηκε από υβριδώματα ποντικού.

5. Η πρωτεΐνη MAP65-1 εντοπίστηκε με τη βοήθεια ενός πολυκλωνικού αντισώματος που περιέχεται σε ορό κουνελιού ανοσοποιημένου με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη MAP65-1

του φυτού *A. thaliana* (προσφορά του Δρα A. Smertenko, University of Durham, Durham, UK, Smertenko και συν. 2004). Η αραίωση του αντισώματος ήταν 1:200.

6. Για τη σήμανση της συνταξίνης KNOLLE χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που προέρχεται από ορό κουνελιών ανοσοποιημένων με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη KNOLLE, η οποία παράγεται σε βακτήρια *Escherichia coli* (προσφορά του Δρα G. Jürgens, University of Tübingen, Tübingen, Germany, Lauber και συν. 1997). Η αραίωση του αντισώματος ήταν 1:250.

7. Για την ανοσοεντόπιση των PLDs χρησιμοποιήθηκε, σε αραίωση 1:100, πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει αυτές τις πρωτεΐνες (Biotrend Chemicals, Köln, Germany, προσφορά του Δρα H. Quader, Biocenter Klein Flottbek, University of Hamburg, Hamburg, Germany).

8. Η καλλόζη εντοπίστηκε με αντίσωμα ποντικού που αναγνωρίζει την (1→3)-β-γλυκάνη (Biosupplies, Victoria, Australia). Στην περίπτωση αυτή η πέψη των κυτταρικών τοιχωμάτων έγινε με 1% cellulase και η διάρκεια της επώασης ήταν 15 min.

9. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα επίμυος (JIM5, Plant Probes, Leeds, UK), το οποίο αναγνωρίζει μερικώς εστεροποιημένους επιτόπους των ομογαλακτουρονανών (Willats και συν. 2000). Η αραίωση του αντισώματος ήταν 1:40. Στην περίπτωση αυτή η πέψη των κυτταρικών τοιχωμάτων έγινε με 1% cellulase για 15 in.

II.7.3 Διαλύματα

1. Διάλυμα PEM

Το διάλυμα αυτό περιέχει 50 mM PIPES (piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid), 5 mM EGTA (ethyleneglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, Αιθυλένογλυκόλη-δισ(2-αμινοαιθυλο) N,N,N',N'-τετραοξικό οξύ), 5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και 0,005% (w/v) NaN_3 . Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται υπό ανάδευση σε απεσταγμένο νερό. Η ρύθμιση του pH στην τιμή 6,8 επιτυγχάνεται με τη βοήθεια δισκίων KOH. Συνήθως, παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα 2X, το οποίο διατηρείται στους 4 °C. Το pH του διαλύματος PEM που χρησιμοποιείται για την ενζυμική πέψη των κυτταρικών τοιχωμάτων ρυθμίζεται στην τιμή 5,6, με HCl.

2. Διάλυμα PBS

Το διάλυμα αυτό προκύπτει από την ανάμιξη συγκεκριμένης ποσότητας των διαλυμάτων Na_2HPO_4 1 M και NaH_2PO_4 1 M. Η ποσότητα εξαρτάται από το επιθυμητό pH του διαλύματος. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε PBS pH 7.0. Για την παρασκευή 1 L διαλύματος αναμειγνύονται 39 ml NaH_2PO_4 και 61 ml Na_2HPO_4 . Στη συνέχεια, συμπληρώνεται ο τελικός όγκος με απεσταγμένο νερό, αφού έχει πρώτα προστεθεί NaCl σε τελική συγκέντρωση 150 mM και 0,005% (w/v) NaN_3 .

II.8 ΧΡΩΣΗ ΜΙΚΡΟΝΗΜΑΤΙΩΝ ΑΚΤΙΝΗΣ

Για τη χρώση MA σε τομές φύλλων του φυτού *Z. mays* χρησιμοποιήθηκε φαλλοϊδίνη στην οποία έχει συζευχθεί το φθοριόχρωμα Alexa 568, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Panteris και συν. (2006):

1. Σταθεροποίηση MA

Τομές ή μικρές λωρίδες φύλλων βυθίστηκαν σε διάλυμα PEM, pH 6,8, που περιείχε 300 μ M m-maleimidobezoyl-N-hydroxysuccinimide ester (Sigma), 2% (v/v) DMSO και 0.1% (v/v) Triton X-100 και παρέμειναν για 30 min στο σκοτάδι, στους 25 °C.

2. Στερέωση του φυτικού υλικού

Το φυτικό υλικό προ-στερεώθηκε σε διάλυμα 1% (w/v) PFA σε PEM για 20 min. Ακολούθησε μετα-στερέωση σε 4% (w/v) PFA για 1 h.

3. Πλύσεις

Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PEM, διάρκειας 15 min η κάθε μία.

4. Εκχύλιση

Τα φύλλα εκχυλίστηκαν με 5% (v/v) DMSO και 1% (v/v) Triton X-100 σε PEM για 20 min.

5. Πλύσεις

Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PEM, διάρκειας 10 min η κάθε μία.

6. Επώαση με φαλλοϊδίνη

Τα δείγματα επώαστηκαν για 1 h στους 37 °C σε διάλυμα 10% φαλλοϊδίνης συζευγμένης με το φθοριόχρωμα Alexa 568 (Molecular Probes) σε PEM. Η αραίωση έγινε από πυκνό διάλυμα 200 units/ml φαλλοϊδίνης διαλυμένης σε μεθανόλη.

7. Χρώση του DNA

Η χρώση του DNA πραγματοποιήθηκε με 10 μ g/ml Hoechst 33258.

8. Κάλυψη των δειγμάτων

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα που περιείχε μία σταγόνα υλικού κάλυψης, το οποίο περιείχε p-phenylenediamine.

9. Παρατήρηση με μικροσκόπιο επιφθορισμού

(βλέπε παρακάτω)

II.9 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΚΑΙ ΣΤΕΡΕΟΣΚΟΠΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

Τα δείγματα μελετήθηκαν με φωτονικό μικροσκόπιο Zeiss Axioplan (Zeiss, Oberkochen, Germany), εφοδιασμένο με πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας, ψηφιακή κάμερα Zeiss AxioCam MRc5 και κατάλληλο σύστημα μονοχρωματικών φίλτρων Zeiss (1. φίλτρο εκπομπής: 365 nm, φίλτρο φραγμού: 420 nm, 2. φίλτρο εκπομπής: 450-490 nm, φίλτρο φραγμού: 515-565 nm, 3. φίλτρο εκπομπής: 546 nm, φίλτρο φραγμού: 590 nm). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν τα συνεστιακά μικροσκόπια σάρωσης ακτίνων laser (CLSM, confocal laser scanning

microscope) Leica (Leica Microsystems, Bensheim, Germany) TCS 4D (Biocenter Klein Flottbek, Hamburg, Germany) και TCS SP5II (Ιδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Αθήνα). Τέλος, για τη φωτογράφιση φυτών *Arabidopsis* αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένων χρησιμοποιήθηκε στερεοσκόπιο Zeiss Stemi 2000-C εφοδιασμένο με ψηφιακή κάμερα Jenoptik ProgRes3 (Jenoptik, Jena, Germany).

Η μέτρηση των διαστάσεων των κυττάρων πραγματοποιήθηκε είτε σε οπτικό μικροσκόπιο Zeiss εφοδιασμένο με μικρομετρική κλίμακα ή στο μικροσκόπιο Zeiss Axioplan σε ψηφιακές εικόνες, με τη βοήθεια του λογισμικού Axiocam Rel 4.4.

II.10 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΜΕ ΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ

II.10.1 Προετοιμασία των δειγμάτων και παρατήρηση

Η προετοιμασία του πειραματικού υλικού για τη μελέτη με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια που λαμβάνουν χώρα σε γυάλινα φιαλίδια ή σωλήνες erpendorf:

1. Στερέωση του φυτικού υλικού

Ακρόρριζα *T. turgidum* και ολόκληρα αρτίβλαστα *A. thaliana* στερεώθηκαν με 3% (v/v) γλουταραλδεΐδη (Sigma) σε διάλυμα 50 mM κακωδυλικού νατρίου pH 7,0, το οποίο περιέχει και 1% (w/v) ταννικό οξύ, για 1,5 h στους 25 °C.

2. Πλύσεις

Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με το διάλυμα κακωδυλικού νατρίου, διάρκειας 15 min η κάθε μία.

3. Μετα-στερέωση

Τα δείγματα, στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε διάλυμα 1% (w/v) τετροξειδίου του οσμίου (OsO_4) σε ρυθμιστικό διάλυμα κακωδυλικού νατρίου, για 4-12 h, στο σκοτάδι, στους 4 °C.

4. Πλύσεις

Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα κακωδυλικού νατρίου, διάρκειας 15 min η κάθε μία.

5. Αφυδάτωση του υλικού

Το βιολογικό υλικό αφυδατώθηκε σταδιακά με διαλύματα ακετόνης αυξανόμενης συγκέντρωσης 50% (v/v), 70% (v/v), 90% (v/v) σε απεσταγμένο νερό, για 20-60 min κάθε φορά, στους 25 °C. Ακολούθησαν τρεις αλλαγές με 100% ακετόνη, για 20-60 min.

6. Προπυλενοξειδίο

Τα δείγματα, στη συνέχεια, εμβαπτίζονται σε καθαρό προπυλενοξειδίο (propyleneoxide, Serva) δύο φορές, διάρκειας 15 min η κάθε μία. Το στάδιο αυτό έχει ως στόχο να προετοιμάσει την εμποτίση του ιστού με ρητίνη.

7. Εμποτίση με ρητίνη Spurr

Το φυτικό υλικό εμποτίστηκε σταδιακά με μείγματα ρητίνης Spurr's (βλέπε παρακάτω) και προπυλενοξειδίου, σε στάδια διάρκειας 12 h, κατά τα οποία η συγκέντρωση της ρητίνης αυξανόταν προοδευτικά. Συγκεκριμένα, τα δείγματα επώαστηκαν με 30% (v/v), 50% (v/v) και 70% (v/v) ρητίνης. Έπειτα, τα φιαλίδια παρέμειναν ανοικτά, ώστε να εξατμιστεί το προπυλενοξείδιο, με αποτέλεσμα τη σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης της ρητίνης. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε στο φιαλίδιο καθαρή ρητίνη, η οποία αφέθηκε για 4-12 h υπό ανάδευση.

8. Εγκλειση

Τα ακρόρριζα *T. turgidum* και ολόκληρα αρτίβλαστα *A. thaliana* εγκλείσθηκαν σε μικρά πλαστικά σκαφίδια που περιείχαν καθαρή ρητίνη.

9. Πολυμερισμός

Τα σκαφίδια μεταφέρθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 60 °C για 48 h, με σκοπό τον πολυμερισμό της ρητίνης.

10. Τομές του φυτικού υλικού

Οι τομές λήφθηκαν με υπερμικροτόμο Ultratome III (LKB Produkter AB, Stockholm-Bromma 1, Sweden), με τη γυάλινα μαχαιρίδια. Αυτά παρασκευάζονται από παραλληλεπίπεδες υάλινες ράβδους σε ειδική συσκευή (Knifemaker 7801B, LKB).

11. Συλλογή λεπτών τομών

Οι σειρές των λεπτών τομών επιπλέουν σε λεκανίδια γεμάτα με απεσταγμένο νερό, τα οποία κατασκευάζονται στα μαχαιρίδια και συλλέγονται σε πλέγματα χαλκού καλυμμένα με λεπτό υμένιο. Το υμένιο παρασκευάζεται από διάλυμα 0,5% (w/v) Pioloform (polyvinyl butyral, Agar Scientific, Stansted, UK) σε χλωροφόρμιο.

12. Χρώση των τομών με οξικό ουρανύλιο και κιτρικό μόλυβδο

Η ικανότητα των βιολογικών υλικών να σκεδάζουν τα ηλεκτρόνια στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης ενισχύθηκε με τη «χρώση» των λεπτών τομών αρχικά με 4% (w/v) οξικό ουρανύλιο σε διάλυμα 70% (v/v) αιθανόλης για 30 min. Στη συνέχεια, μετά από προσεκτική πλύση με διάλυμα 50% (v/v) αιθανόλης, οι τομές, «χρωματίζονται» με διάλυμα κιτρικού μολύβδου (Reynolds 1963) για 20 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί πλύσιμο των τομών με απεσταγμένο νερό.

13. Παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Η εξέταση των τομών πραγματοποιήθηκε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης Philips EM 300. Η φωτογράφιση των δειγμάτων έγινε με φιλμ Copex Pan 35 mm (Agfa-Gevaert, Leverkusen, Germany).

14. Ψηφιοποίηση των εικόνων

Μετά την επεξεργασία του φιλμ (εμφανιστής D19, Kodak, Rochester, NY, USA), τα αρνητικά ψηφιοποιήθηκαν σε αρχεία jpeg με τη βοήθεια σαρωτή Epson Perfection 4490 (Epson, Tokyo, Japan) ή Reflecta RPS 7200 (Reflecta, Rottenburg, Germany).

II.10.2 Διαλύματα

1. Διάλυμα κακωδυλικού νατρίου

Ποσότητα κακωδυλικού νατρίου τελικής συγκέντρωσης 100 mM διαλύεται υπό ανάδευση σε απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C. Από αυτό παράγεται το διάλυμα χρήσης (50 mM κακωδυλικό) με αραιώση με απεσταγμένο νερό.

2. Μείγμα ρητίνης Spurr's

Το μείγμα της ρητίνης Spurr της Εταιρίας Serva παρασκευάζεται με την ανάμιξη συγκεκριμένων ποσοτήτων από τέσσερα διαφορετικά αντιδραστήρια. Οι ποσότητες αυτές είναι 2,5 g vinyl cyclohexene dioxide (ERL, μονομερές), 1,5 g diglycidyl ether of polypropylene glycol (D.E.R. 736, διασυσζευκτή), 6,5 g nonenylsuccinic anhydride (NSA, πλαστικοποιητής), 0,1g dimethylaminoethanol (S₁, επιταχυντής). Το μείγμα διατηρείται στους -20 °C.

3. Οξικό ουρανύλιο

Ποσότητα οξικού ουρανυλίου διαλύεται σε υδατικό διάλυμα 70% (v/v) αιθανόλης, ώστε η τελική συγκέντρωσή του να γίνει 4% (w/v). Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

4. Κιτρικός μολύβδος

Για την παρασκευή 50 ml διαλύματος κιτρικού μολύβδου 1,33 g νιτρικού μολύβδου και 1,76 g κιτρικού νατρίου τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως με 30 ml απεσταγμένο νερό (Reynolds 1963). Το μείγμα αναδεύεται με θέρμανση, με αποτέλεσμα το σχηματισμό γαλακτώδους υγρού. Στο διάλυμα προστίθενται 800 μl NaOH 10 N, οπότε καθίσταται διαυγές και στη συνέχεια, ο όγκος του συμπληρώνεται μέχρι τα 50 ml με απεσταγμένο νερό (Reynolds 1963). Το διάλυμα του κιτρικού μολύβδου φυλάσσεται στους 4 °C σε σκοτάδι.

II.10.3 Χρώση H₂O₂ με CeCl₃

Το H₂O₂ εντοπίζεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με επώαση των δειγμάτων σε διάλυμα CeCl₃. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση του H₂O₂ με το CeCl₃, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό Ce(OH)₂OOH και Ce(OH)₃OOH. Η παραγωγή των παραπάνω έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ηλεκτρονιόπυκνων σωματιδίων, ορατών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Bestwick και συν. 1997). Συγκεκριμένα, μικρά τμήματα νωπού ιστού επώαστηκαν με διάλυμα 50 mM MOPS pH 7,0 (1-morpholinepropanesulfonic acid, Alfa aesar), που περιείχε 5 mM CeCl₃ (Cerium chloride, Alfa aesar), για 1 h. Ακολούθως, τα

δείγματα πλύθηκαν με το ίδιο διάλυμα και στερεώθηκαν με 2,5% (v/v) γλουταραλδεΐδη και 1,25% (w/v) PFA σε διάλυμα 50 mM κακωδυλικού νατρίου, για 1,5 h. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις και επώαση σε 1% OsO₄ σε διάλυμα κακωδυλικού νατρίου και, στη συνέχεια, τα δείγματα ακολούθησαν τη διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα II.10.1 (στάδια 4-11). Η χρώση των τομών πραγματοποιήθηκε με οξικό ουρανύλιο για 5 min. Οι τομές παρατηρήθηκαν με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

II.10.4 Ανοσοσήμευση της σωληνίνης με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού

Για την ανοσοεντόπιση βιολογικών μακρομορίων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης ακολουθήθηκε παραλλαγή της διαδικασίας που περιγράφεται στην ενότητα II.10.2.1. Η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος είναι ηπιότερη, καθώς επιδιώκεται η καλύτερη κατά το δυνατόν διατήρηση των αντιγονικών επιτόπων, ενώ η εμπότιση του βιολογικού υλικού γίνεται σε διαφορετική ρητίνη. Μετά την έγκλειση των δειγμάτων στη ρητίνη και τη συλλογή λεπτών τομών, οι επιτόποι σημαίνονται με ανοσοσφαιρίνες συζευγμένες με κολλοειδή σωματίδια χρυσού. Η ανοσοεντόπιση της σωληνίνης πραγματοποιήθηκε σε λεπτές τομές κυττάρων ακρόρριζου *T. turgidum* και *A. thaliana*, σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία.

1. Στερέωση του φυτικού υλικού

Τα δείγματα στερεώθηκαν με διάλυμα PEM pH 6,8, το οποίο περιείχε 2% (w/v) PFA και 0,1% γλουταραλδεΐδη. Παρέμειναν στο στερεωτικό διάλυμα, για 1,5 h, στους 4 °C.

2. Πλύσεις

Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με παγωμένο PEM (4 °C), διάρκειας 15 min η κάθε μία.

3. Αφυδάτωση του υλικού

Το υλικό αφυδατώθηκε σε μείγματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης σε νερό στους 0 °C. Συγκεκριμένα, ο ιστός αφυδατώθηκε με 10% (v/v), 30% (v/v), 50% (v/v), 70% (v/v), 90% (v/v) αιθανόλης και, στη συνέχεια, τρεις φορές με απόλυτη αιθανόλη. Η διάρκεια του κάθε σταδίου ήταν 30 min. Ορισμένες φορές το υλικό παρέμενε σε διάλυμα 30% αιθανόλης για 12 h.

Συνήθως, αποφεύγεται η μετα-στερέωση με OsO₄ ή όταν χρησιμοποιείται έχει περιορισμένη διάρκεια. Κάποιες φορές, κατά το στάδιο της επώασης με 30% αιθανόλη, στο διάλυμα προστέθηκε OsO₄ σε τελική συγκέντρωση 0,25% (w/v).

4. Εμπότιση με ρητίνη

Η εμπότιση των δειγμάτων με ρητίνη έγινε σταδιακά με τη χρήση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ρητίνης σε αιθανόλη στους 4 °C. Χρησιμοποιήθηκε η ακρυλική ρητίνη London Resin White (Sigma). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε διαλύματα 10% (v/v), 20% (v/v), 30% (v/v), 50% (v/v), 60% (v/v), 70% (v/v), 80% (v/v), 90% (v/v), για 1 h κάθε φορά ή σε διαλύματα 30% (v/v), 50% (v/v), 70% (v/v) για 12 h. Στη συνέχεια, ο ιστός εμποτίζεται με καθαρή ρητίνη για 6 h.

5. Έγκλειση

Τα δείγματα τοποθετούνται σε καψίδια ζελατίνης, τα οποία περιέχουν καθαρή ρητίνη.

6. Πολυμερισμός

Η ρητίνη πολυμερίζεται στους 50 °C, για 48 h, παρουσία καταλύτη (benzoyl peroxide, Sigma), η συγκέντρωση του οποίου στο διάλυμα της ρητίνης ανέρχεται σε 2% (w/v).

7. Συλλογή λεπτών τομών

Λεπτές τομές του υλικού παρασκευάστηκαν με υπερμικροτόμο και συλλέχθηκαν σε πλέγματα χρυσού.

8. Κάλυψη μη ειδικών θέσεων

Τα πλέγματα μεταφέρονται στην επιφάνεια σταγόνας διαλύματος PBS, όπου και παραμένουν για 30 min. Ακολουθεί επώαση σε 5% (w/v) BSA σε PBS για 5 h.

9. Επώαση με πρώτο αντίσωμα

Το υλικό επώαστηκε με το αντίσωμα YOL 1/34, το οποίο αναγνωρίζει την α -σωληνίνη, αραιωμένο 1:40 σε PBS που περιείχε 2% (w/v) BSA. Η διάρκεια της επώασης ήταν 4 h στους 37 °C.

10. Πλύσεις

Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS που περιείχε 2% (w/v) BSA, διάρκειας 15 min η κάθε μία.

11. Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα

Ακολούθησε επώαση για 12 h, στους 25 °C, με πολυκλωνικό μείγμα ανοσοσφαιρινών, οι οποίες αναγνωρίζουν τις ανοσοσφαιρίνες επίμυος και είναι συζευγμένες με σωματίδια κολλοειδούς χρυσού διαμέτρου 10 nm (Sigma).

12. Πλύσεις

Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS, διάρκειας 15 min η κάθε μία.

13. Χρώση των τομών με οξικό ουρανύλιο

Οι τομές «χρωματίστηκαν» για 5 min με υδατικό διάλυμα 2% (w/v) οξικού ουρανυλίου.

14. Παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Οι λεπτές τομές μελετήθηκαν και φωτογραφήθηκαν με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ακολούθησε ψηφιοποίηση των εικόνων με τη βοήθεια του σαρωτή Epson.

II.10.5 Μέτρηση της διαμέτρου των πολυμερών της σωληνίνης

Η διάμετρος των πολυμερών της σωληνίνης των φυσιολογικών και επηρεασμένων κυττάρων μετρήθηκε σε ψηφιακές εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, με τη βοήθεια του λογισμικού CorelDraw Graphics Suite X4 (Corel Suite, Pantone Ottawa, Canada). Η μέτρηση των διαστάσεων έγινε με τη βοήθεια ψηφιοποιημένων εικόνων βαθμονομημένων πλεγμάτων.

II.11 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

Με σκοπό τη μελέτη των επιπέδων ορισμένων πρωτεϊνικών μορίων, απομονώθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από ρίζες αρτιβλάστων *T. turgidum* και ακέραια αρτίβλαστα *A. thaliana*, φυσιολογικά ή επηρεασμένα. Τα εκχυλίσματα αυτά ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE, SDS polyacrylamide gel electrophoresis) και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μελέτη των επιπέδων διαφόρων πρωτεϊνικών μορίων μελετήθηκε με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων.

II.11.1 Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

1. Συλλογή φυτικού υλικού

Οι ρίζες επηρεασμένων αρτιβλάστων *T. turgidum* τοποθετούνται σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως και ζυγίζονται για να υπολογισθεί η νωπή μάζα τους. Στην περίπτωση που η επίδραση γίνεται σε κομμένες ρίζες *T. turgidum*, αυτή πραγματοποιείται σε προζυγισμένα ποτήρια ζέσεως. Μετά το τέλος της επίδρασης, αφαιρείται το διάλυμα και υπολογίζεται το νωπό βάρος των ριζών. Τα αρτίβλαστα *A. thaliana* μεταφέρονται σε προζυγισμένους σωλήνες erppendorf, ζυγίζονται και, στη συνέχεια, εμβαπτίζονται σε δοχείο, το οποίο περιέχει υγρό άζωτο.

2. Ομογενοποίηση

Οι ρίζες *T. turgidum* και τα αρτίβλαστα *A. thaliana* ομογενοποιούνται με ίσο όγκο G-buffer (βλέπε παρακάτω). Στην πρώτη περίπτωση, η ομογενοποίηση πραγματοποιείται σε παγωμένο γουδί που περιέχει μικρή ποσότητα χαλαζιακής άμμου. Στη δεύτερη, τα αρτίβλαστα ομογενοποιούνται σε σωλήνες erppendorf με τη βοήθεια ειδικού μικροεμβόλου. Το ομογενοποίημα διηθείται με αποστειρωμένη γάζα και μεταφέρεται σε σωλήνες erppendorf που βρίσκονται σε πάγο, όπου παραμένουν για 15 min.

3. Συλλογή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται σε 6000 g για 30 min σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (Costar, Cambridge, MA, USA) στους 4 °C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης συλλέγεται το υπερκείμενο.

4. Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών στα δείγματα

Η ολική ποσότητα των πρωτεϊνών κάθε δείγματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (Bradford 1976). Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης έγινε με τη βοήθεια φιαλιδίων γνωστής συγκέντρωσης BSA (Sigma). Συγκεκριμένη ποσότητα των δειγμάτων, γνωστής και άγνωστης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, αναμίχθηκε με το αντιδραστήριο Bradford (Sigma). Ακολούθησε φωτομέτρηση στα 595 nm σε φωτόμετρο ορατού-υπεριώδους Novaspec II (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden).

Π.11.2 Ηλεκτροφόρηση και μεταφορά σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης

1. Ανάμιξη με διάλυμα κατεργασίας

Κατάλληλη ποσότητα δειγμάτων αναμειγνύεται με διάλυμα κατεργασίας (sample buffer) 4X (βλέπε παρακάτω). Τα μείγματα θερμαίνονται σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 3 min. Με αυτό τον τρόπο οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρωση.

2. Ηλεκτροφόρηση

Τα μείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, το οποίο αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking) και το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving, βλέπε παρακάτω). Η περιεκτικότητα σε πολυακρυλαμίδη των πηκτωμάτων διαχωρισμού ήταν 10% (w/v) ή 12% (w/v). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή Mini-PROTEAN tetra cell (Bio-Rad). Μετά την προσαρμογή των πηκτωμάτων στη συσκευή, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer, βλέπε παρακάτω). Στη συνέχεια, στις οπές που έχουν σχηματιστεί στο πήκτωμα επιστοίβαξης, εισάγονται ποσότητες μειγμάτων από τα διαφορετικά δείγματα, οι οποίες περιέχουν ίσες συγκεντρώσεις ολικής πρωτεΐνης. Σε μία από αυτές εισάγεται μείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με τροφοδοτικό ρεύματος PowerPac Universal (Bio-Rad) και ακολουθεί ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε σταθερή τάση 180 V, για περίπου 1 h.

3. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται ηλεκτροφορητικά από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, με πόρους 0,45 μm (Protran, Schleicher and Schuell, Dassel, Germany). Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ημίξηρης μεταφοράς Trans Blot SD (Bio-Rad). Σε αυτή τοποθετούνται με την εξής σειρά: ένα φύλλο εμποτισμένο με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (βλέπε παρακάτω) ειδικού χαρτιού Extra Thick Blot Paper PROTEAN (Bio-Rad), ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης κομμένο στις διαστάσεις του πηκτώματος, το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ένα ακόμη φύλλο Thick paper. Τα ειδικά χαρτιά, το φύλλο νιτροκυτταρίνης και το πήκτωμα, πριν από την τοποθέτησή τους στη συσκευή μεταφοράς, εμβαπτίζονται σε δοχεία που περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer, βλέπε παρακάτω). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας που περιγράφηκε παραπάνω, προσαρμόζεται η άνοδος στη συσκευή, η οποία συνδέεται με το τροφοδοτικό. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 12V για 45-90 min, γεγονός που επιβεβαιώνεται, μετά από χρώση της με διάλυμα χρωστικής Ponceau-S (Sigma). Η χρωστική απομακρύνεται με διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης με ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T.

Π.11.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης

1. Κάλυψη μη ειδικών θέσεων

Η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα TBS-T που περιέχει 5% (w/v) BSA, για 1 h στους 25 °C, υπό συνεχή ανακίνηση.

2. Επώαση με πρώτο αντίσωμα

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με κατάλληλα αντισώματα (βλέπε παρακάτω). Τα αντισώματα διαλύονται σε συγκεκριμένες αραιώσεις, σε TBS-T που περιέχει 5% (w/v) BSA. Τα δείγματα επωάζονται για 12 h με το διάλυμα του αντισώματος στους 4 °C.

3. Πλύσεις

Ακολουθούν τρεις πλύσεις με TBS-T, διάρκειας 10 min η κάθε μία.

4. Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα

Οι μεμβράνες επωάζονται με μείγματα ανοσοσφαιρινών, συζευγμένων με το ένζυμο υπεροξειδάση του φυτού *Raparus sativus* (HRP, horseradish peroxidase, Santa Cruz), οι οποίες αναγνωρίζουν ανοσοσφαιρίνες ποντικών ή κουνελιών. Η αραιώση ήταν 1:5000 σε διάλυμα TBS-T που περιείχε 5% (w/v) BSA.

5. Πλύσεις

Ακολουθούν τρεις πλύσεις με TBS-T, διάρκειας 10 min η κάθε μία.

6. Έκθεση και εμφάνιση σε φιλμ

Τα ακινητοποιημένα ανοσοσυμπλέγματα-HRP αποτυπώνονται σε φιλμ Super RX (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan). Αρχικά, ποσότητα μείγματος αντιδραστηρίων ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) τοποθετείται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη τοποθετείται μαζί με το φιλμ σε ειδική θήκη (Amersham, Oakville, Ontario, Canada). Οι ζώνες εμφανίζονται στο φιλμ μετά τη διαδοχική εμβάπτιση του σε δοχεία, τα οποία περιέχουν διάλυμα εμφάνισης Kodak GBX (Sigma), νερό, και στερεωτικό διάλυμα Kodak (Sigma).

Π.11.4 Αντισώματα

Τα επίπεδα των παρακάτω πρωτεϊνών μελετήθηκαν με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων:

1. Αντίσωμα DM1A που αναγνωρίζει την α -σωληνίνη σε αραιώση 1:500
2. Αντίσωμα που αναγνωρίζει την τυροσινωμένη α -σωληνίνη (clone TUB-1A2) σε αραιώση 1:1000.
3. Αντίσωμα που αναγνωρίζει την ακετυλιωμένη α -σωληνίνη (clone 6-11B-1) σε αραιώση 1:1000.
4. Αντίσωμα που εντοπίζει την ενεργοποιημένη p38-MAPK (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) σε αραιώση 1:1000. Το αντίσωμα αυτό είναι πολυκλωνικό και παράγεται από κουνέλια

ανοσοποιημένα με συνθετικό φωσφοπεπτίδιο, το οποίο αντιστοιχεί στις αλληλουχίες που βρίσκονται πλησίον του ενεργού κέντρου της p38-MAPK των θηλαστικών. Αναγνωρίζει την p38-MAPK, η οποία έχει φωσφορυλιωθεί στη θρεονίνη 180 ή/και την τυροσίνη 182. Το αντίσωμα έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φυτικών κυττάρων (Komis και συν. 2004).

5. Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιών που αναγνωρίζει την MAPKAPK2, η οποία έχει φωσφορυλιωθεί στη θέση 334 (Cell Signaling), σε αραιώση 1:1000. Η MAPKAPK2 είναι ένα από τα υποστρώματα της p38-MAPK (Yuan και συν. 2010).

6. Τα επίπεδα της GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης) στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προσδιορίστηκαν είτε με πολυκλωνικό αντίσωμα που προέρχεται από ορό κουνελιών και αναγνωρίζει τη φυτική GAPDH (προσφορά του Δρα Ι.Δ. Αδαμάκη) ή με μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο παράγεται από υβριδώματα ποντικού (Ambion, Austin, TX, USA). Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη ελέγχου, ενώ η αραιώση των αντισωμάτων και στις δύο περιπτώσεις ήταν 1:5000.

II.11.5 Πυκνομέτρηση

Η πυκνομέτρηση των ζωνών που εμφανίζονται στο φίλμ πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Image J σε εικόνες του φιλμ, οι οποίες ψηφιοποιήθηκαν με τη βοήθεια του σαρωτή Epson. Για τη σύγκριση των επιπέδων της πρωτεΐνης μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο λόγος της πυκνότητας της ζώνης που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη αυτή προς την πυκνότητα της ζώνης της πρωτεΐνης ελέγχου GAPDH.

II.11.6 Διαλύματα

1. G-buffer

Διάλυμα 20 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid, Sigma) pH 7,5, το οποίο περιέχει 20 mM β-glycerophosphate (Sigma), 50 mM NaF (Sigma), 2 mM EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, Alfa aesar, Ward Hill, MA, USA), 10 mM dithiothreitol (Merck), 0,2 mM Na₃VO₄. Σε αυτό προστίθεται ένα δισκίο μείγματος αναστολέων πρωτεασών Mini Complete (Roche Diagnostics Ltd, Mannheim, Germany).

2. Πήκτωμα διαχωρισμού

Το πήκτωμα διαχωρισμού παρασκευάζεται με την ανάμιξη κατάλληλων ποσοτήτων (βλέπε πίνακα): α) διαλύματος 29,2% (w/v) ακρυλαμίδης και 0,8% (w/v) bis-ακρυλαμιδίου, β) απεσταγμένου νερού, γ) διαλύματος 1,5 M Tris pH 8,8, δ) διαλύματος 10% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate, δωδεκυλοθειικό νάτριο, Sigma), ε) 10% (w/v) APS (ammonium

persulfate, υπερθειικό αμμώνιο, Sigma), και στ) TEMED (tetramethylethylenediamine, τετραμεθυλενοδιαμίνη, Sigma). Μετά την ανάμιξη των συστατικών, το μείγμα τοποθετείται στο χώρο μεταξύ δύο κατάλληλων γυάλινων πλακών (Bio-Rad) και αφήνεται να πολυμεριστεί.

Πήκτωμα διαχωρισμού	10%	12%
H₂O	4,0 ml	3,3 ml
Μείγμα 30% ακρυλαμίδης	3,3 ml	4,0 ml
1,5 M Tris pH 8.8	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 μl	100 μl
10% APS	100 μl	100 μl
TEMED	4 μl	4 μl
Συνολικός όγκος	10 ml	10 ml

3. Πήκτωμα επιστοιβαξης

Το πήκτωμα επιστοιβαξης παρασκευάζεται με την ανάμιξη κατάλληλων ποσοτήτων (βλέπε πίνακα): α) διαλύματος 29,2% (w/v) ακρυλαμίδης και 0,8% (w/v) bis-ακρυλαμιδίου, β) απεσταγμένου νερού, γ) διαλύματος 1,0 M Tris pH 6.8, διαλύματος, δ) 10% (w/v) SDS, ε) 10% (w/v) APS, και στ) TEMED. Μετά την ανάμιξη των συστατικών, το μείγμα τοποθετείται μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών (Bio-Rad), πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού και αφήνεται να πολυμεριστεί.

Πήκτωμα επιστοιβαξης	5%
H₂O	4,1 ml
Μείγμα 30% ακρυλαμίδης	1,0 ml
1,0 M Tris pH 6.8	750 μl
10% SDS	60 μl
10% APS	60 μl
TEMED	6 μl
Συνολικός όγκος	6 ml

4. Διάλυμα κατεργασίας

Το διάλυμα κατεργασίας παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 5X, το οποίο περιέχει 330 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% (w/v) SDS, 50% (v/v) γλυκερόλη, 20% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη και 0,2% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης (Laemmli 1970). Το διάλυμα αραιώνεται κατάλληλα με το πρωτεϊνικό μείγμα.

5. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιέχει 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη και 0,1% (w/v) SDS. Παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 5X και αραιώνεται κατάλληλα με απεσταγμένο νερό. Το pH του διαλύματος είναι περίπου 8,3.

6. Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς

Το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς χρησιμοποιείται για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πηκτώμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Περιέχει 15,6 mM Tris, 120 μM γλυκίνη, 0,03% (w/v) SDS και 20% (v/v) μεθανόλη. Το pH του διαλύματος είναι περίπου 8,3.

7. TBS-T

Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,05% (v/v) Tween 20 (Serva) σε διάλυμα TBS (Tris Buffered Saline). Το TBS περιέχει 10 mM Tris και 150 mM NaCl. Παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 10X και αραιώνεται κατάλληλα με απεσταγμένο νερό πριν από τη χρήση. Κατά την παρασκευή του πυκνού διαλύματος, πριν από τη συμπλήρωση του τελικού όγκου, το pH ρυθμίζεται, με την προσθήκη HCl, ώστε η τιμή του να είναι 7,5.

II.12 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TON1a*

Τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *Ton1a* προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ημιποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης-πολυμεράσης (semi-quantitative RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction), ώστε να διαπιστωθεί εάν αυτά επηρεάζονται από τις μεταβολές των επιπέδων των ROS. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε RNA (ribonucleic acid, ριβονουκλεϊκό οξύ) από φυσιολογικά και επηρεασμένα αρτίβλαστα *A. thaliana*. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση πραγματοποιήθηκε σύνθεση μορίων DNA συμπληρωματικών με τα ώριμα mRNA (cDNA, complementary DNA). Τα μόρια cDNA που αντιστοιχούν στο mRNA των γονιδίων που μελετήθηκαν ενισχύθηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction), με τη βοήθεια ειδικών εκκινητών. Τα προϊόντα της PRC αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώμα αгарόζης.

II.12.1 Απομόνωση ολικού RNA αρτίβλαστων *A. thaliana*

Η απομόνωση ολικού RNA από τα αρτίβλαστα του φυτού *A. thaliana* πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία που έχει περιγραφεί από τους Logemann και συν. (1987), με ορισμένες τροποποιήσεις.

1. Μετά το τέλος της επίδρασης, ολόκληρα αρτίβλαστα τοποθετήθηκαν σε σωλήνες eppendorf και εμβαπτίστηκαν σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο. Έπειτα ομογενοποιήθηκαν σε σωλήνες eppendorf, με τη βοήθεια μικροεμβόλου, με την προσθήκη 400 μl

αποστειρωμένου διαλύματος ομογενοποίησης και ίσης ποσότητας φαινόλης (Sigma). Τα παραπάνω αναμιγνύονται και, στη συνέχεια, φυγοκεντρώνονται σε 12000 g, για 10 min, στους 25 °C. Στο τέλος της φυγοκέντρωσης, εντός του φιαλιδίου, διαμορφώνονται δύο φάσεις, μία υδατική και μία οργανική. Η υδατική φάση, στην οποία περιέχονται τα νουκλεϊκά οξέα συλλέγεται και τοποθετείται σε νέο φιαλίδιο. Το διάλυμα ομογενοποίησης περιέχει 100 mM Tris και 0,5% (w/v) SDS. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με HCl στην τιμή 9,5.

2. Το δείγμα καθαρίζεται με προσθήκη φαινόλης και φυγοκέντρωση σε διαδοχικούς κύκλους, και τέλος, με την κατεργασία σε διάλυμα, το οποίο περιέχει φαινόλη, χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογίες 25:24:1 (v/v). Τα δείγματα ανακινούνται έντονα και φυγοκεντρώνονται για 5 min, στους 25 °C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης ακολουθεί η συλλογή της υδατικής φάσης.

3. Με στόχο την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων στα δείγματα προστίθεται διπλάσιος όγκος αιθανόλης και 1/10 του όγκου διαλύματος 3M οξικού νατρίου (pH 5,2) και αυτά επωάζονται στους -20 °C για 12 h. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται σε 12000 g, σε θερμοκρασία 4 °C, για 20 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 75% (v/v) αιθανόλη. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται και εν συνεχεία το ίζημα αφήνεται να ξηρανθεί. Ο έλεγχος της απομόνωσης των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιείται με την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αгарόζης 0,8% (w/v).

4. Σε ποσότητα του δείγματος πραγματοποιήθηκε πέψη του DNA με DNAάση και απομόνωση καθαρού RNA. Στο δείγμα προστέθηκαν 2 U/μl DNAάσης (Biolabs) και 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 2,5 mM MgCl₂ και 10 mM CaCl₂ (Biolabs). Το δείγμα επώαστηκε για 10 min στους 37 °C. Η αντίδραση πέψης τερματίστηκε με την προσθήκη ποσότητας υδατικού διαλύματος 0,5 M EDTA σε τελική συγκέντρωση 5 mM.

5. Το δείγμα καθαρίζεται εκ νέου με προσθήκη διαλύματος φαινόλης και φυγοκέντρωση. Το RNA κατακρημνίζεται με τη βοήθεια καθαρής αιθανόλης και διαλύματος 3 M οξικού αμμωνίου για 12 h στους -20 °C και φυγοκέντρωση σε 12000 g, σε θερμοκρασία 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο απορρίπτεται, ενώ στο ίζημα προστίθεται 75% (v/v) αιθανόλης και αφήνεται να ξηρανθεί για λίγα λεπτά.

6. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε δισαπεσταγμένο νερό και το δείγμα υφίσταται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.

II.12.2 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης

Η παραπάνω διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την απομόνωση ολικού RNA από τα φυσιολογικά ή επηρεασμένα φυτά. Όμως, επειδή ο στόχος είναι ο καθορισμός των επιπέδων των μεταγράφων των γονιδίων, πραγματοποιείται η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης, με τη χρήση εκκινητών με αλληλουχία βάσεων θυμίνης, ώστε να επιλεγούν

μόνο τα μόρια που φέρουν ουρά poly-A (ώριμα mRNA). Με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης, από το σύνολο των mRNAs των δειγμάτων, προκύπτει ένα σύνολο μονόκλωνων μορίων DNA (cDNA). Η αντίδραση περιλαμβάνει την αποδιάταξη των μορίων RNA, τον υβριδισμό των μορίων με τους εκκινητές και, στη συνέχεια, την επέκταση των τμημάτων με την προσθήκη νουκλεοτιδίων, η οποία καταλύεται από τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια της Εταιρίας Roche και θερμικός κυκλοποιητής Bio-Rad PTC-200. Ακολουθήθηκε η διαδικασία σύμφωνα με το πρωτόκολλο που συνοδεύει τα αντιδραστήρια.

1. Σε ένα φιαλίδιο PCR προστίθενται το RNA των δειγμάτων (έως 5 µg), 50 pM εκκινητών [(ολιγονουκλεοτίδια που αποτελούνται από 17 βάσεις θυμίνης, OligoDT (VBC, Vienna, Austria)], και 1mM μείγμα νουκλεοτιδίων (dNTPs, deoxynucleotides, Qiagen, Hilden, Germany) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl που περιέχει 75 mM KCl και 3 mM MgCl₂ pH 8,3 (Roche) και κατάλληλη ποσότητα δισαπαρασταγμένου νερού. Μετά την ανάμειξη των συστατικών αυτών, ακολουθεί επώαση για 5 min στους 65 °C. Τα δείγματα τοποθετούνται αμέσως σε πάγο.
2. Ακολουθεί η προσθήκη νουκλεοτιδίων από την αντίστροφη μεταγραφάση. Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται στους 42 °C για 1 h, αφού προστεθεί στο προηγούμενο μείγμα αναστολέας RNAασης (Biolabs), σε τελική συγκέντρωση 20 pM, αντίστροφη μεταγραφάση Expand (Roche) σε τελική συγκέντρωση 100U, ποσότητα από το προηγούμενο διάλυμα και κατάλληλη ποσότητα δισαπαρασταγμένου νερού (Merck).
3. Η αντίδραση τερματίζεται έπειτα από επώαση των δειγμάτων στους 75 °C για 15 min. Τα δείγματα φυλάσσονται στους 4 °C.

II.12.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Τα μόρια cDNA που προκύπτουν από την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθούν τα επίπεδα των μεταγράφων των γονιδίων *TON1a* και *18S RNA*. Το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, με σκοπό να ενισχυθούν από την DNA-πολυμεράση οι αλληλουχίες cDNA που αντιστοιχούν στα γονίδια αυτά, με τη βοήθεια ειδικών εκκινητών (Bartlett και Stirling, 2003). Σε καθεμία περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών. Ο ένας εκκινητής είναι συμπληρωματικός του 5'-άκρου και ο άλλος του 3'-άκρου, του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται παρακάτω:

At18S-F: 5' TTG ATT CTA TGG GTG GTG GT 3'

At18S-R: 5' CCT TGT TAC GAC TTC TCC TT 3'

AtTON1a-F: 5' GTG GAC CAC TCC TTC TCG 3'

AtTON1a-R: 5' CAC AAA CCA TTA CTC TAC TAA TCC 3'

Η αντίδραση πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή και η πορεία αυτής χωρίζεται σε επιμέρους στάδια, μερικά από τα οποία επαναλαμβάνονται κυκλικά. Τα δείγματα θερμαίνονται αρχικά για 2 min σε θερμοκρασία 94 °C και, στη συνέχεια, για 30 s στην ίδια θερμοκρασία. Υπό αυτές τις συνθήκες το DNA αποδιατάσσεται, με συνέπεια να είναι δυνατή η σύνδεση των εκκινητών στα μονόκλιωνα μόρια DNA που προκύπτουν. Στο δεύτερο στάδιο, την αναδιάταξη, μειώνεται η θερμοκρασία με σκοπό να γίνει υβριδοποίηση των εκκινητών με τα μόρια DNA. Η τιμή της θερμοκρασίας εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών. Στο τρίτο στάδιο γίνεται η επέκταση, κατά την οποία η DNA-πολυμεράση προσθέτει dNTPs στους 72 °C, σύμφωνα με την αλληλουχία του τμήματος που λειτουργεί ως μήτρα, και το οποίο ορίζεται από τους εκκινητές. Ακολουθεί η επανάληψη των σταδίων αυτών. Η συγκέντρωση των προϊόντων εξαρτάται από τον αριθμό επαναλήψεων των παραπάνω σταδίων (Ένας κύκλος: 94 °C, 30 sec, αναδιάταξη, επέκταση). Στο τέλος, τα δείγματα αφήνονται στους 72 °C για 5-10 min. Τα προϊόντα της αντίδρασης φυλάσσονται στους 4 °C. Οι χρόνοι που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε στάδιο, ανά περίπτωση παρουσιάζονται παρακάτω:

Στάδιο	<i>TON1a</i>	<i>18S</i>
1. Αποδιάταξη	94 °C, 2 min	94 °C, 2 min
2. Αποδιάταξη	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s
3. Αναδιάταξη	53 °C, 30 s	52 °C, 30 s
4. Επέκταση	72 °C, 15 s	72 °C, 30 s
5. Κύκλοι 2-3-4	33	22
6. Επέκταση	72 °C, 5 min	72 °C, 5 min

Στο θερμικό κυκλοποιητή τοποθετούνται φιαλίδια PCR, τα οποία περιέχουν κατάλληλη ποσότητα cDNA, δισαπεσταγμένου νερού, 0,3 μM έκαστου εκκινητή, 200 μM μείγματος δεόξυριβονουκλεοτιδίων, 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1.0 U/50 μl DNA-πολυμεράσης (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) και ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης Taq (Invitrogen). Το διάλυμα αυτό έχει τελική συγκέντρωση 20 mM Tris-HCl και 500mM KCl, ενώ η τιμή του pH είναι 8,4.

II.12.4 Ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης PCR πραγματοποιείται με την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα 0,8% (w/v) αγαρόζης. Τα νουκλεϊκά οξέα καθίστανται ορατά μετά από χρώση του πηκτώματος με βρωμιούχο αιθίδιο και παρατήρηση κάτω από υπεριώδες φως. Στη συνέχεια, περιγράφονται με λεπτομέρεια τα στάδια της ακολουθούμενης διαδικασίας.

1. Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης

Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης διαλύεται εν βρασμό σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Το διάλυμα περιέχει 0,04% (w/v) NaOH και 2,25% (w/v) βορικό οξύ. Μετά τη διάλυση της αγαρόζης, το μείγμα τοποθετείται σε ειδικό δοχείο και αφήνεται να πολυμεριστεί.

2. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Το πήκτωμα, το οποίο περιέχει οπές για την τοποθέτηση των δειγμάτων, μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Cleaver Scientific, Warwickshire, UK). Το δοχείο της συσκευής πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα τοποθετούνται στις οπές του πηκτώματος. Σε αυτά έχει προστεθεί ποσότητα της χρωστικής κυανού της βρωμοφαινόλης που επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Σε μία οπή τοποθετείται δείγμα μάρτυρα που περιέχει μόρια DNA γνωστών μεγεθών (1Kb, Invitrogen). Η συσκευή συνδέεται σε τροφοδοτικό παροχής ρεύματος E-C (E-C Corporation, St. Petersburg, FL, USA) και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε σταθερή τάση 70 V για 30 min.

3. Χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογράφιση

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρεται σε διάλυμα που περιέχει 1 mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου σε ρυθμιστικό διάλυμα και αφήνεται για 15-20 min. Ακολούθως, το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή φωτογράφισης με πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (UVP Inc., San Gabriel, CA, USA).

II.12.5 Πυκνομέτρηση

Η πυκνομέτρηση των ζωνών πραγματοποιήθηκε στις ψηφιακές εικόνες, με το πρόγραμμα Image J. Για τη σύγκριση των επιπέδων των μεταγράφων του γονιδίου *TON1a* μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο λόγος της πυκνότητας της ζώνης που αντιστοιχεί στο γονίδιο αυτό προς την πυκνότητα της ζώνης του γονιδίου αναφοράς.

II.13 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων επεξεργάστηκαν στατιστικά με τη βοήθεια του προγράμματος Excel του Microsoft Office (Microsoft Corp., Redmond, Washington). Η

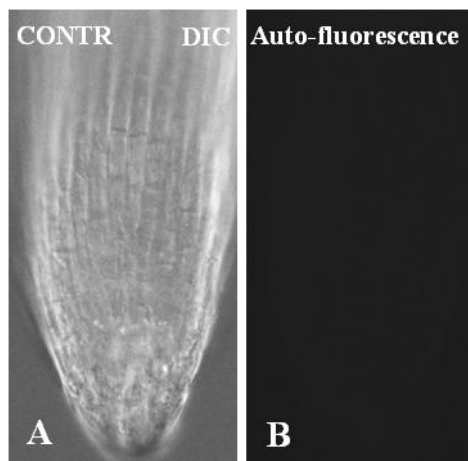
ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών πιστοποιήθηκε με τη δοκιμασία Student's *t*-test. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές, όταν η τιμή *P* ήταν μικρότερη από 0,05.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ROS ΣΤΑ ΑΚΡΟΡΡΙΖΑ

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής ακρόρριζα των αρτιβλάστων *Arabidopsis thaliana* και *Triticum turgidum* υπέστησαν την επίδραση ουσιών που αυξάνουν τα επίπεδα των ROS, όπως η MEN και το H_2O_2 , και ουσιών που προκαλούν τη μείωσή τους, αλληλεπιδρώντας με τις ROS (NAC) ή αναστέλλοντας τη δραστηριότητα της NADPH-οξειδάσης (DPI), ενός εκ των κυριότερων ενζύμων παραγωγής ROS. Ως φυτά μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αρτίβλαστα, τα οποία είχαν υποστεί την ίδια ακριβώς μεταχείριση, με τη διαφορά ότι το διάλυμα της επίδρασης ήταν απεσταγμένο νερό ή υδατικά διαλύματα που περιείχαν DMSO σε συγκέντρωση ίδια με αυτή που υπήρχε στα διαλύματα της επίδρασης.

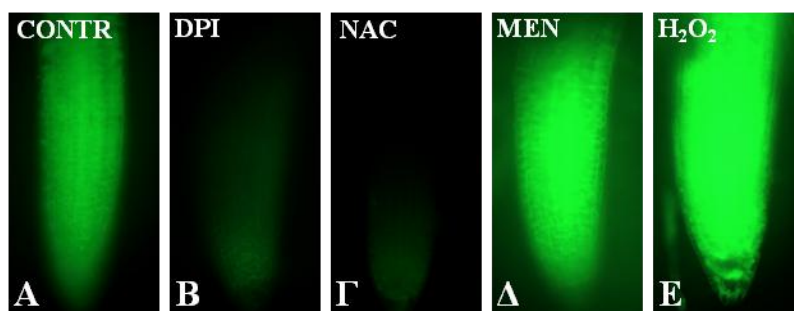
Η ικανότητα των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν να διαταράσσουν την ομοιόσταση των ROS στα ακρόρριζα διερευνήθηκε σε ζωντανά αρτίβλαστα των φυτών *A. thaliana* και *T. turgidum* με τη βοήθεια των χρωστικών DCF και H_2DCF , οι οποίες εντοπίζουν τις ROS. Αυτές αντιδρούν με τις ROS, με αποτέλεσμα την παραγωγή φθοριζόντων μορίων (βλέπε κεφάλαιο II). Η προσθήκη των χρωστικών στα διαλύματα που περιείχαν τις ουσίες, οι οποίες διαταράσσουν τα επίπεδα των ROS, έγινε πριν από το τέλος της κάθε επίδρασης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι διερευνήθηκε και η πιθανότητα αυτοφθορισμού των ακρόρριζων. Διαπιστώθηκε ότι αυτά δεν αυτοφθορίζουν στα μήκη κύματος, στα οποία γίνεται η παρατήρηση των παραπάνω χρωστικών (Εικ. 1).



Εικόνα 1. Ακρόρριζο *A. thaliana* αγρίου τύπου, όπως φαίνεται με το οπτικό σύστημα Nomarski (A) και το μικροσκόπιο φθορισμού (B). Το σύστημα φίλτρων που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη της (B) είναι το ίδιο με εκείνο, με το οποίο παρατηρήθηκαν τα ακρόρριζα της Εικ. 2. Μεγέθυνση: X900.

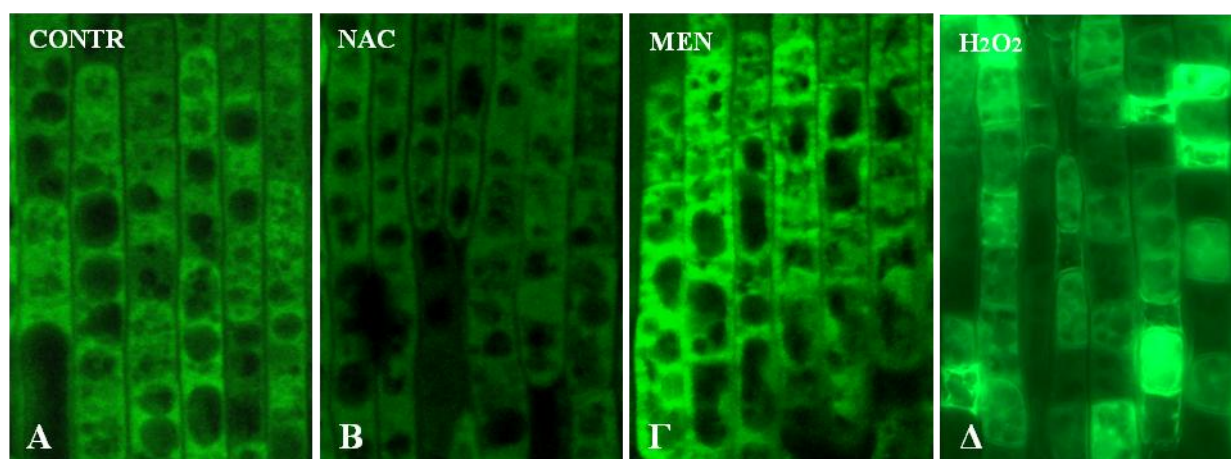
Η εξέταση αρτιβλάστων-μαρτύρων του φυτού *A. thaliana* έδειξε ότι οι ROS συσσωρεύονται κατά κύριο λόγο στο ακρόρριζο. Οι περιοχές που εξέπεμπαν τον πλέον έντονο φθορισμό ήταν το μερίστωμα και τα κύτταρα της καλύπτρας (Εικ. 2Α). Στα ακρόρριζα, τα οποία είχαν υποστεί επίδραση DPI και NAC, η ένταση του φθορισμού ήταν αισθητά μειωμένη σε σχέση με την αντίστοιχη του μάρτυρα (Εικ. 2Β,Γ σύγκρινε με Εικ. 2Α). Αντίθετα, η επίδραση με τις ουσίες MEN και το H_2O_2 προκάλεσε μεγάλη αύξηση της

έντασης του φθορισμού (Εικ. 2Δ,Ε σύγκρινε με Εικ. 2Α), γεγονός που δείχνει ότι στα ακρόρριζα συσσωρεύονται μεγάλες ποσότητες ROS.



Εικόνα 2. Ακρόρριζα μάρτυρα *A. thaliana* (Α) και επηρεασμένων φυτών (Β-Ε), έπειτα από χρώση με DCF, όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο επιφθορισμού. Οι εικόνες είναι εστιασμένες στα κύτταρα της ριζοδερμίδας. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί με τον ίδιο χρόνο έκθεσης. Πριν από το τέλος κάθε επίδρασης (30 min), προστέθηκαν στο διάλυμα 25 μM DCF. Επίδρασεις: CONTR: H_2O 2 h, DPI: 25 μM 2 h, NAC: 250 μM 2 h, MEN 25 μM 2 h, H_2O_2 4 mM 2 h. Μεγέθυνση: X500.

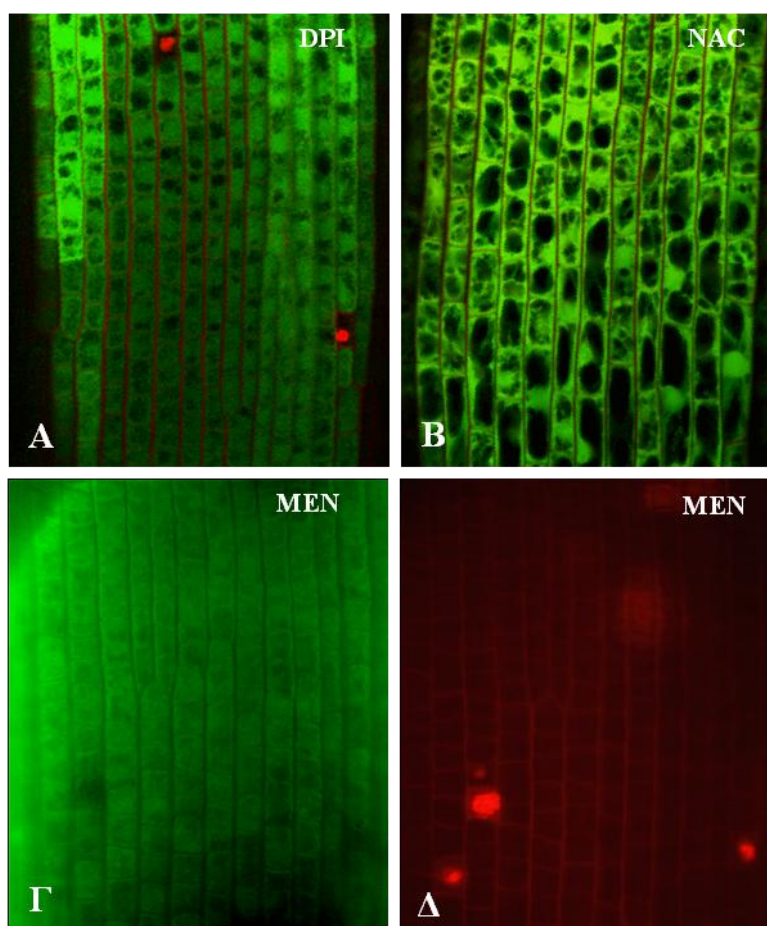
Η αποτελεσματικότητα των επιδράσεων επιβεβαιώθηκε και στα αρτίβλαστα του φυτού *T. turgidum*. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν όμοια με εκείνα των ακρόρριζων του *A. thaliana* (Εικ. 3). Η μελέτη ακρόρριζων φυτών-μαρτύρων (Εικ. 3Α) και ακρόρριζων φυτών επηρεασμένων με τις ουσίες NAC, MEN και H_2O_2 (Εικ. 3Β-Δ) έδειξε ότι οι περισσότερες ROS βρίσκονται εντός των κυττάρων, χωρίς όμως να αποκλείεται η παρουσία τους και στον αποπλάστη (Εικ. 3), όπως και ότι τα επηρεασμένα ακρόρριζα διαθέτουν μικρότερες (Εικ. 3Β) και μεγαλύτερες ποσότητες ROS (Εικ. 3Γ,Δ) σε σχέση με το μάρτυρα, αντίστοιχα (Εικ. 3Α).



Εικόνα 3. Ακρόρριζα μάρτυρα *T. turgidum* (Α) και επηρεασμένων φυτών (Β-Δ), έπειτα από χρώση με DCF. Οι εικόνες Α-Γ δείχνουν οπτικές τομές της ριζοδερμίδας που ελήφθησαν με CLSM. Η εικόνα Δ έχει ληφθεί με μικροσκόπιο επιφθορισμού. Πριν από το τέλος κάθε επίδρασης (30 min), προστέθηκαν στο διάλυμα 25 μM DCF. Επίδρασεις: CONTR: H_2O 1 h, NAC: 500 μM 1 h, MEN 50 μM 1 h, H_2O_2 4 mM 2 h. Μεγέθυνση: X1000.

III.2 Ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΡΤΙΒΛΑΣΤΩΝ ΔΕΝ ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ

Ο έλεγχος της πιθανότητας πρόκλησης νεκρωτικών φαινομένων στα επηρεασμένα κύτταρα, τα οποία πιθανόν προκαλούνται από τις συγκεντρώσεις και τους χρόνους επίδρασης των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν, έγινε με τη βοήθεια των φθορίζουσών χρωστικών FDA και PI. Αυτές προστέθηκαν στα αντίστοιχα διαλύματα πριν το τέλος της κάθε επίδρασης. Η ταυτόχρονη χρώση FDA/PI επιτρέπει τη διάκριση των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων. Η μελέτη των εικόνων έδειξε ότι στα επηρεασμένα ακρόρριζα, η πλειοψηφία των κυττάρων ήταν ζωντανά. Σε αυτά το PI περιορίζεται στα κυτταρικά τοιχώματα, τα οποία χρωματίζονται κόκκινα. Στα ελάχιστα νεκρά κύτταρα, το PI είχε εισχωρήσει, με αποτέλεσμα ο πυρήνας να εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα (Εικ. 4).



Εικόνα 4. Επηρεασμένα ακρόρριζα *T. turgidum*, έπειτα από χρώση με FDA/PI. Προβολή μεμονωμένων οπτικών τομών ρίζας αρτιβλάστων που έχουν ληφθεί με CLSM (Α,Β) και εικόνες της ίδιας περιοχής ρίζας, όπως φαίνονται μετά τη χρήση διαφορετικών φίλτρων του μικροσκοπίου επιφθορισμού (Γ,Δ). Τα κύτταρα, τα οποία είναι νεκρά στο τέλος της επίδρασης είναι ελάχιστα. Επιδράσεις: DPI: 50 μ M 1 h, NAC: 500 μ M 1 h, MEN 50 μ M 1 h. Μεγέθυνση: X800.

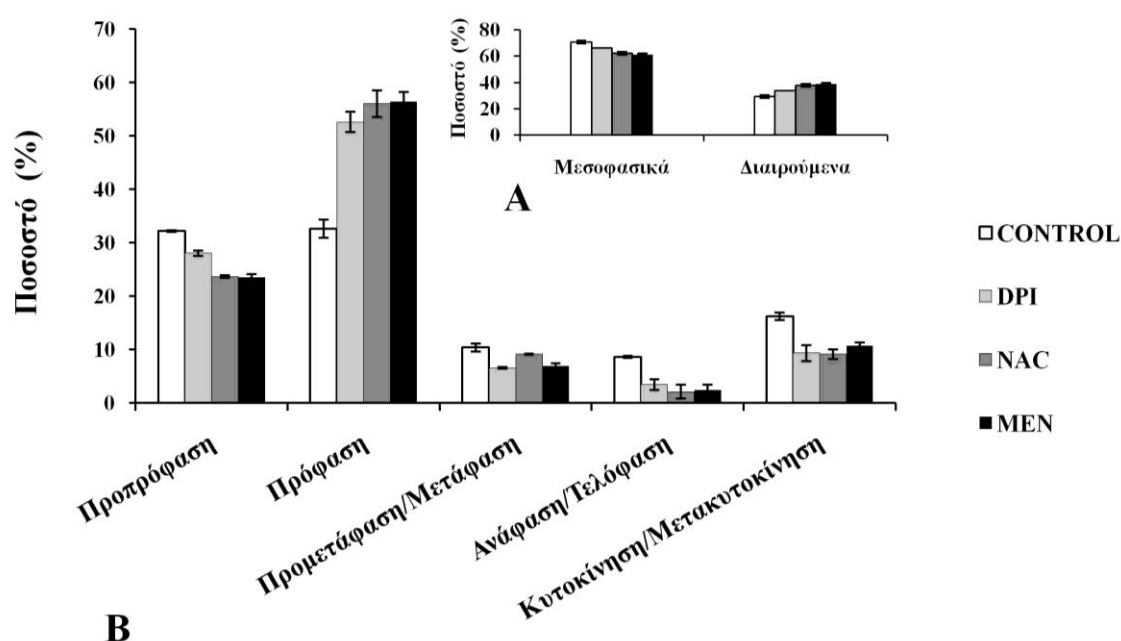
III.3 Η ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΗΣ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ROS ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΗΝ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

III.3.1 Η πορεία του κυτταρικού κύκλου σε φυσιολογικά και επηρεασμένα ακρόρριζα

Η διερεύνηση της πιθανής συμμετοχής των ROS στον έλεγχο της πορείας του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιήθηκε με τη διατάραξη της ομοιόστασής τους με τη βοήθεια DPI, NAC και MEN. Εν συνεχεία, προσδιορίστηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τους τα ποσοστά των κυττάρων που βρίσκονται στις διάφορες φάσεις της κυτταροδιαίρεσης σε φυσιολογικά και επηρεασμένα ακρόρριζα (Εικ. 5). Η κατάταξη των κυττάρων στις επιμέρους φάσεις του κυτταρικού κύκλου έγινε βάσει της οργάνωσης της χρωματίνης, όπως αυτή φαίνεται έπειτα από χρώση με Hoechst 33258 και της αντίστοιχης οργάνωσης των πολυμερών της σωληνίνης μετά από ανοσοσήμανση της σωληνίνης.

Στα ακρόρριζα που είχαν υποστεί επίδραση DPI, NAC και MEN διαπιστώθηκε μείωση του ποσοστού των μεσοφασικών κυττάρων σε σχέση με εκείνο των φυσιολογικών ακρόρριζων, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS προκαλεί την αύξηση των διαιρούμενων κυττάρων, πιθανόν λόγω της αδυναμίας εξόδου τους από τον κυτταρικό κύκλο (Εικ. 5Α). Τα ποσοστά που παρατίθενται στην Εικ. 5Α προέκυψαν από την καταμέτρηση 3306 κυττάρων φυσιολογικών ακρόρριζων *T. turgidum*, 1812 κυττάρων επηρεασμένων με DPI, 1421 επηρεασμένων με NAC και 1636 επηρεασμένων με MEN. Αυτά ήταν αποτέλεσμα δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, ενώ οι διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και επηρεασμένων είναι στατιστικά σημαντικές. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα διαιρούμενα κύτταρα ταξινομήθηκαν στις εξής φάσεις: προ-πρόφαση, πρόφαση, προμετάφαση/μετάφαση, ανάφαση/τελόφαση και κυτοκίνηση/μετακυτοκίνηση. Ο αριθμός των διαιρούμενων κυττάρων στα φυσιολογικά φυτά ήταν 963, ενώ των επηρεασμένων με DPI, NAC και MEN ήταν αντίστοιχα 610, 537 και 634 κύτταρα. Στη συνέχεια, τα ποσοστά των κυττάρων κάθε φάσης της κυτταροδιαίρεσης υπολογίστηκαν στο σύνολο των διαιρούμενων κυττάρων που καταμετρήθηκαν σε κάθε περίπτωση (Εικ. 5Β). Όπως φαίνεται από την Εικ. 5Β, το ποσοστό των επηρεασμένων προ-προφασικών κυττάρων ήταν μειωμένο σε σχέση μ' εκείνο των φυσιολογικών ακρόρριζων. Στα τελευταία, τα προ-προφασικά κύτταρα αντιστοιχούσαν στο 32,19%, των διαιρούμενων κυττάρων, ενώ στα ακρόρριζα που ήταν επηρεασμένα με DPI, NAC και MEN στο 28,03%, 23,65% και 23,50% αντίστοιχα (Εικ. 5Β). Το ποσοστό των επηρεασμένων κυττάρων που ήταν σε πρόφαση ήταν πολύ μεγαλύτερο από εκείνο των φυσιολογικών ακρόρριζων. Στα επηρεασμένα ακρόρριζα τα προφασικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν το 52,62% των διαιρούμενων κυττάρων, μετά την επίδραση με DPI, το 56,05%, στην επίδραση με NAC και το 56,47% στην επίδραση με MEN. Τα ποσοστά αυτά είναι σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τα ακρόρριζα του μάρτυρα, στα οποία το ποσοστό αυτό ήταν 32,61% (Εικ. 5Β). Αντίθετα, στα επηρεασμένα αρτίβλαστα το ποσοστό

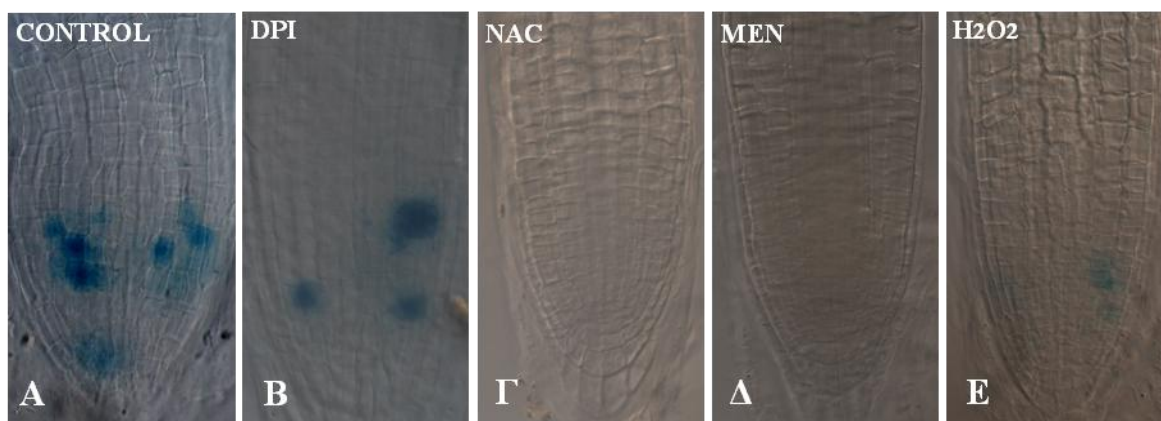
των κυττάρων που βρίσκονται στη προμετάφαση/μετάφαση και ανάφαση τελόφαση ήταν μειωμένο (Εικ. 5B). Οι διαφορές που σημειώνονται στην Εικ. 5B είναι στατιστικά σημαντικές και δείχνουν ότι στα επηρεασμένα ακρόρριζα πραγματοποιείται: α) συσσώρευση των διαιρούμενων κυττάρων στην πρόφαση, β) καθυστέρηση της μετάβασης των κυττάρων από τη μετάφαση στην ανάφαση και γ) καθυστέρηση της εξόδου από την κυτταροδιαίρεση. Τα ποσοστά που παρουσιάζονται αφορούν μόνο στα αρτίβλαστα *T. turgidum*, διότι οι διαφορές που προέκυψαν από την καταμέτρηση φυσιολογικών και επηρεασμένων κυττάρων στα ακρόρριζα *A. thaliana* δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, λόγω του μικρού αριθμού διαιρουμένων κυττάρων.



Εικόνα 5. Ποσοστά μεσοφασικών και διαιρούμενων κυττάρων φυσιολογικών και επηρεασμένων ακρόρριζων του φυτού *Triticum turgidum*, έπειτα από καταμέτρηση και κατάταξη των κυττάρων στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Στο διάγραμμα Α απεικονίζονται τα ποσοστά των μεσοφασικών και διαιρούμενων κυττάρων εκφρασμένα στο σύνολο των κυττάρων που καταμετρήθηκαν σε κάθε περίπτωση, ενώ στο διάγραμμα Β εκείνα των κυττάρων που βρίσκονται στις επιμέρους φάσεις της κυτταροδιαίρεσης εκφρασμένα στο σύνολο των διαιρούμενων κυττάρων που καταμετρήθηκαν. Επιδράσεις: CONTROL: H₂O 1 h, DPI: 50 μ M 1 h, NAC: 500 μ M 1 h, MEN 50 μ M 1 h.

III.3.2 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου της κυκλίνης B1

Η διαπίστωση ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS συνοδεύεται από διατάραξη της πορείας του κυτταρικού κύκλου (Εικ. 5), οδήγησε στην αναζήτηση πιθανών αιτιών αυτού του φαινομένου. Αρχικά, διερευνήθηκε το ενδεχόμενο η αύξηση ή η μείωση των επιπέδων των ROS να επηρεάζει το πρότυπο της έκφρασης του γονιδίου της κυκλίνης B1. Οι κυκλίνες τύπου B αποτελούν κομβικά μόρια πολλών σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, όπως, για παράδειγμα, για τη μετάβαση από τη φάση G₂ στη μίτωση και την αντίστοιχη από τη μετάφαση στην ανάφαση (Dewitte και Murray 2003).



Εικόνα 6. Ακρόρριζα από αρτίβλαστα *A. thaliana* της διαγονιδιακής σειράς FA4C. Τα φυτά περιέχουν το σύστημα αναφοράς cyclin B1:1 β-glucuronidase (GUS). Η μείωση των κυττάρων, στα οποία εκφράζεται η κυκλίνη B1, στα επηρεασμένα ακρόρριζα σε σχέση με το μάρτυρα είναι εμφανής (B-E σύγκρινε με A). CONTROL: Θρεπτικό μέσο 6 h, DPI: 25 μM 6 h NAC: 250 μM 6 h, MEN 25 μM 6 h, H₂O₂ 5 mM 6 h. Μεγέθυνση: X800.

Η μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου της κυκλίνης B1 πραγματοποιήθηκε με το σύστημα αναφοράς GUS. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν φυτά *A. thaliana* της σειράς FA4C. Τα φυτά αυτά είναι κατάλληλα μετασχηματισμένα, ώστε ο υποκινητής του γονιδίου της κυκλίνης B1 να βρίσκεται συνδεδεμένος με το γονίδιο της β-γλυκουρονιδάσης. Η χρήση κατάλληλων ενώσεων, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν υποστρώματα της β-γλυκουρονιδάσης, προκαλεί την παραγωγή έγχρωμων προϊόντων, έπειτα από τη δραστηριότητα του ενζύμου. Η συσσώρευση των προϊόντων αυτών στα κύτταρα υποδεικνύει ότι επάγεται η έκφραση του γονιδίου της κυκλίνης B1. Αρτίβλαστα cyclin B1:1 β-glucuronidase ηλικίας 6 ημερών υπέστησαν την επίδραση DPI, NAC, MEN και H₂O₂ (Εικ. 6). Η σύγκριση των ακρόρριζων, στα οποία η ομοιόσταση των ROS είχε διαταραχθεί, με εκείνα των αρτίβλαστων του μάρτυρα δείχνει ότι στα πρώτα ο αριθμός των κυττάρων που δίνουν θετική αντίδραση GUS είναι μειωμένος (Εικ. 6B-E σύγκρινε με Εικ. 6A). Η μείωση ήταν εμφανέστερη στα ακρόρριζα που είχαν υποστεί επίδραση με τις ουσίες NAC, MEN και H₂O₂, συγκριτικά με αυτά που επηρεάστηκαν με DPI (Εικ. 6B-Γ). Τα παραπάνω δεδομένα

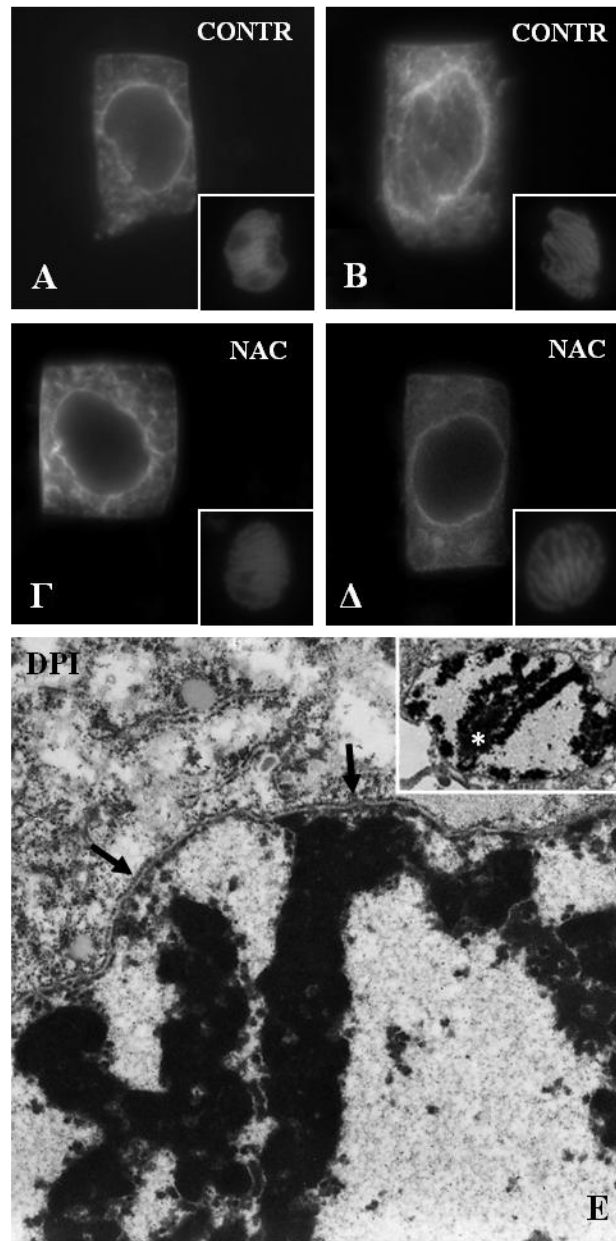
υποστηρίζουν ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS, επηρεάζει το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου της κυκλίνης B1.

III.3.3 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει τη συμπεριφορά του πυρηνικού φακέλου κατά τη διάρκεια της μίτωσης

Από τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην Εικ. 5, συνάγεται ότι στα επηρεασμένα ακρόρριζα τα διαιρούμενα κύτταρα συσσωρεύονται στην πρόφαση. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS πιθανόν καθυστερεί ή αναστέλλει τη μετάβαση των κυττάρων από την πρόφαση στην προμετάφαση. Διερευνήθηκε το ενδεχόμενο η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS να επηρεάζει την αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου, που αποτελεί σημαντικό φαινόμενο αυτής της φάσης (Evans και συν. 2011). Για το σκοπό αυτό αρτίβλαστα *T. turgidum* υπέστησαν επίδραση με DPI, NAC, MEN και ακολούθησε ανοσοσήμανση των πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου που φέρουν το πεπτίδιο HDEL χρησιμοποιώντας το αντίσωμα 2E7. Το αντίσωμα αυτό είναι αξιόπιστο και έχει χρησιμοποιηθεί κατ' επανάληψη για την εντόπιση του ενδοπλασματικού δικτύου και του πυρηνικού φακέλου των φυτικών κυττάρων (Napier και συν. 1992).

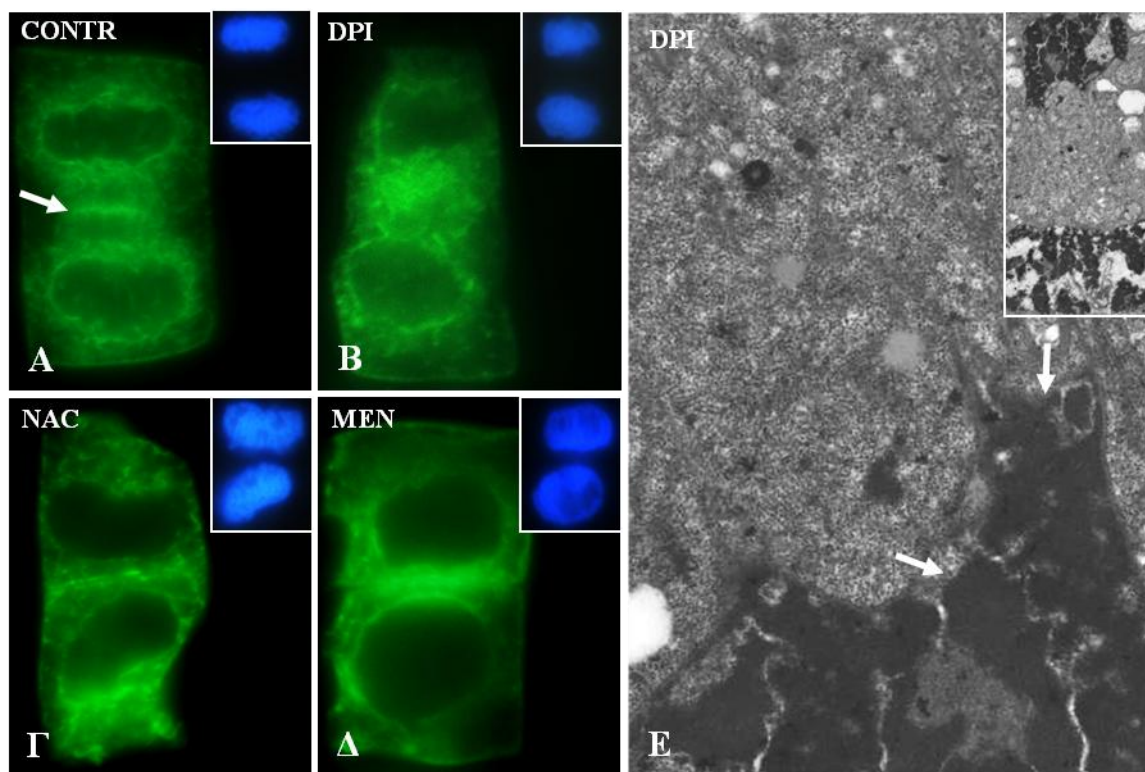
Τα φυσιολογικά προφασικά κύτταρα της ρίζας διαθέτουν πυρήνες οι οποίοι περιβάλλονται από ακέραιο πυρηνικό φάκελο (Εικ. 7Α). Αυτός αποδιοργανώνεται, κατά τη μετάβαση του κυττάρου από την πρόφαση στην προμετάφαση, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των προμεταφασικών χρωμοσωμάτων στο κυτόπλασμα. Το κύτταρο της Εικ. 7Β, βρίσκεται στη φάση της μετάβασης από την πρόφαση στην προμετάφαση. Αυτό συμπεραίνεται από το γεγονός ότι τα χρωμοσώματα είναι ορατά, ενώ το περίγραμμα του πυρήνα δεν είναι ομαλό (ένθετη Εικ. 7Β). Οι ασυνέχειες στο σήμα φθορισμού του πυρηνικού φακέλου που φαίνονται στην Εικ. 7Β αντιστοιχούν στις θέσεις από όπου έχει αρχίσει η αποδιοργάνωσή του. Αντίθετα, στα επηρεασμένα κύτταρα, τα οποία διαθέτουν προφασική ή προμεταφασική οργάνωση της χρωματίνης (ένθετες Εικ. 7Γ,Δ) το σήμα φθορισμού που αντιστοιχεί στον πυρηνικό φάκελο είναι συνεχές (Εικ. 7Γ,Δ). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι αυτός παραμένει ακέραιος, αν και το κύτταρο βρίσκεται στο στάδιο της προμετάφασης (Εικ. 7Γ,Δ σύγκρινε με Εικ. 7Β).

Το φαινόμενο αυτό επιβεβαιώθηκε και μετά από τη μελέτη των επηρεασμένων κυττάρων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Το κύτταρο της Εικ. 7Ε βρίσκεται στην προμετάφαση, γεγονός που συνάγεται από την παρουσία καλά οργανωμένων χρωμοσωμάτων και από την αποδιοργάνωση του πυρηνίσκου (ένθετη Εικ. 7Ε). Ωστόσο, ο πυρηνικός φάκελος εμφανίζεται ακέραιος και με αυτόν συνδέονται τα προμεταφασικά χρωμοσώματα (Εικ. 7Ε). Η ανάσχεση της αποδιοργάνωσης του πυρηνικού φακέλου κατά το τέλος της πρόφασης διαπιστώθηκε τόσο έπειτα από επίδραση με DPI και NAC (Εικ. 7), όσο και μετά από οξειδωτική καταπόνηση που προκλήθηκε από την επίδραση με MEN.



Εικόνα 7. (Α-Δ): Κύτταρα ακρόρριζου *T. turgidum* από φυσιολογικά (Α,Β) και επηρεασμένα με NAC αρτίβλαστα (Γ-Δ), έπειτα από ανοσοεντόπιση του ενδοπλασματικού δικτύου και του πυρηνικού φακέλου με το αντίσωμα 2E7. Στις ένθετες εικόνες παρουσιάζονται οι πυρήνες των παραπάνω κυττάρων, μετά τη χρώση του DNA με Hoechst 33258. Με βάση τη συμπύκνωση της χρωματίνης των κυττάρων στις (Α,Γ) συνάγεται ότι αυτά βρίσκονται στην αρχή της πρόφασης, ενώ τα κύτταρα στις (Β,Δ) στο τέλος της πρόφασης/αρχή της προμετάφασης. (Ε): Ο πυρήνας ενός επηρεασμένου με DPI κυττάρου, όπως εμφανίζεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Είναι σαφές ότι διαθέτει άθικτο πυρηνικό φάκελο (βέλη), παρά την παρουσία προμεταφασικών χρωμοσωμάτων στο πυρηνόπλασμα. Ο αστερίσκος στην ένθετη εικόνα δείχνει τα υπολείμματα του πυρηνίσκου. Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 50 μM 2 h, NAC: 500 μM 1,5 h. Μεγέθυνση: (Α-Δ) X900, (Ε) X22000.

Η καθυστέρηση της αποδιοργάνωσης του πυρηνικού φακέλου των επηρεασμένων προμεταφασικών κυττάρων οδήγησε στο ερώτημα κατά πόσο η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει και την επανασυγκρότησή του κατά την τελόφαση. Η ανοσοσήμανση του πυρηνικού φακέλου με το αντίσωμα 2E7 έδειξε ότι στα φυσιολογικά κύτταρα ο πυρηνικός φάκελος των θυγατρικών πυρήνων ολοκληρώνεται στο τέλος της τελόφασης (Εικ. 8Α).



Εικόνα 8. Τελοφασικά/κυτοκινητικά κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum* από φυσιολογικά (Α) και επηρεασμένα (Β-Δ) αρτίβλαστα, μετά την ανοσοεντόπιση των πρωτεϊνών που φέρουν το πεπτίδιο HDEL και τη χρώση των πυρήνων με Hoechst 33258 (ένθετες εικόνες). Στο κύτταρο από το φυσιολογικό ακρόρριζο (Α), έντονο σήμα φθορισμού εντοπίζεται γύρω από κάθε θυγατρικό πυρήνα, καθώς και στην περιοχή της κυτταρικής πλάκας (βέλος). Στα κύτταρα των επηρεασμένων ακρόρριζων (Β-Δ) το σήμα φθορισμού γύρω από τους θυγατρικούς πυρήνες είναι ασυνεχές. (Ε): Πυρήνας κυτοκινητικού κυττάρου επηρεασμένου με DPI. Τα βέλη σημειώνουν τις περιοχές, στις οποίες δεν έχει ακόμη σχηματιστεί ο πυρηνικός φάκελος. Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 50 μM 2 h, NAC: 500 μM 1,5 h. Μεγέθυνση: (Α-Δ) X1200, (Ε) X22000.

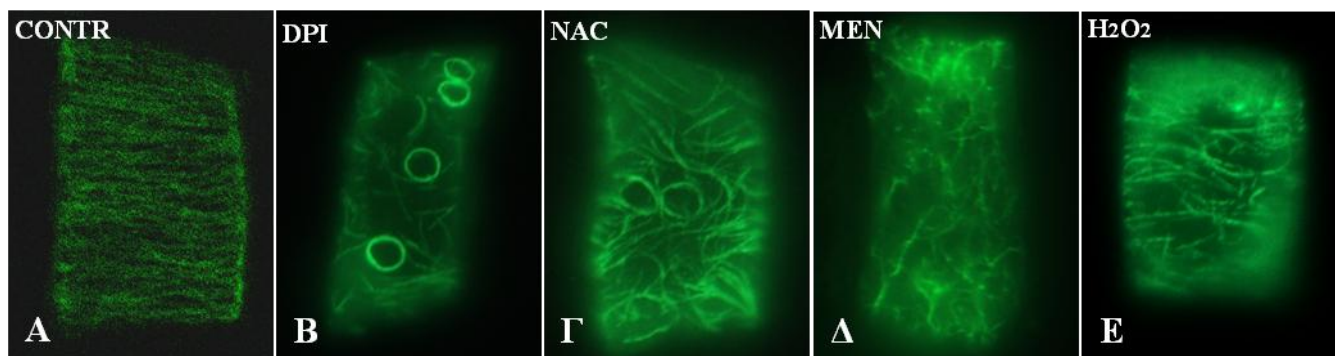
Αντίθετα, στα κύτταρα, τα οποία ήταν επηρεασμένα με DPI, NAC και MEN, το σήμα φθορισμού που εκπέμπεται από την περιφέρεια των θυγατρικών πυρήνων ήταν ασυνεχές (Εικ. 8Β-Δ). Το γεγονός αυτό αποκαλύπτει την καθυστέρηση της ανασυγκρότησης του πυρηνικού φακέλου των θυγατρικών πυρήνων, παρότι η αποσυσπείρωση των χρωμοσωμάτων τους εμφανίζεται προχωρημένη (ένθετες Εικ. 8Β-Δ). Το φαινόμενο αυτό επιβεβαιώθηκε από τη μελέτη με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Στην Εικ. 8Ε δείχνεται τμήμα ενός

θυγατρικού πυρήνα κυτοκινητικού κυττάρου επηρεασμένου με DPI, στην οποία σημειώνονται με βέλη οι περιοχές, όπου δεν έχει ακόμη συγκροτηθεί πυρηνικός φάκελος. Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι, τόσο η μείωση της συγκέντρωσης των ROS στο ακρόρριζο όσο και η αύξησή τους, διαταράσσουν όχι μόνο την αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου στην προμετάφαση αλλά και την επανασυγκρότησή του κατά την τελόφαση.

III.4 Η ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΗΣ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ROS ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΗΝ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΣ ΣΕ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

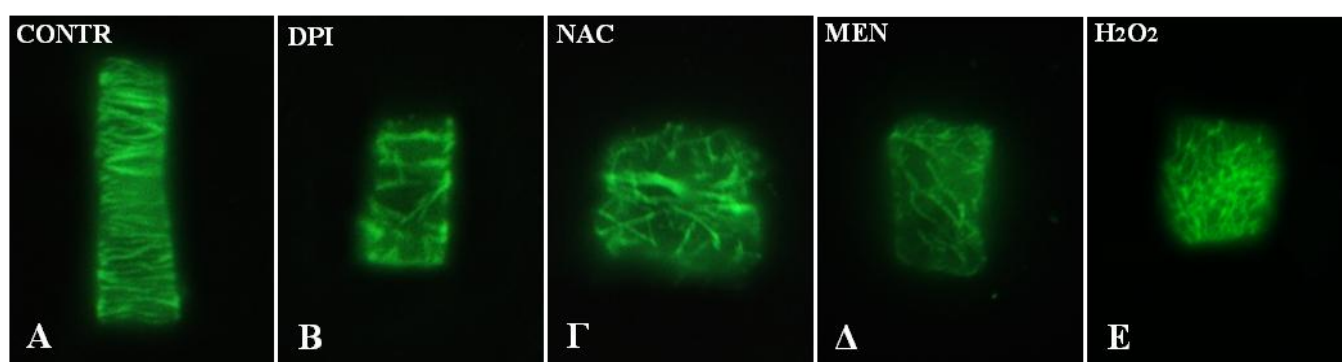
III.4.1 Μεσόφαση

Το περιφερειακό κυτόπλασμα των φυσιολογικών μεσοφασικών κυττάρων του ακρόρριζου των φυτών *T. turgidum* και *A. thaliana* διατρέχεται από καλά οργανωμένες διατάξεις ΜΣ. Αυτές αποτελούνται από ΜΣ, οι οποίοι είναι παράλληλοι μεταξύ τους και συνήθως προσανατολισμένοι κάθετα προς το μεγάλο άξονα των κυττάρων (Εικ. 9Α, Εικ. 10Α). Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά φέρουν και ενδοπλασμικούς ΜΣ, κυρίως στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα. Τα κύτταρα ακρόρριζων, τα οποία είχαν υποστεί επίδραση με DPI και NAC, στερούνται τυπικών διατάξεων ΜΣ (Εικ. 9Β,Γ, Εικ. 10Β,Γ σύγκρινε με Εικ. 9Α, Εικ. 10Α). Στο περιφερειακό κυτόπλασμα αυτών των κυττάρων δημιουργούνται γραμμικά, καμπύλα ή ακόμη και κυκλικά πολυμερή σωληνίνης (Εικ. 9Β,Γ, Εικ. 10Β,Γ). Η διευθέτησή τους είναι συνήθως τυχαία, ενώ οι διαστάσεις τους ποικίλλουν (Εικ. 9Β,Γ, Εικ. 10Β,Γ σύγκρινε με Εικ. 9Α, Εικ. 10Α). Η παρουσία των άτυπων πολυμερών σωληνίνης δεν περιορίζεται μόνο στο περιφερειακό κυτόπλασμα, αλλά αυτά εντοπίζονται και σε διάφορες θέσεις του ενδοπλάσματος.



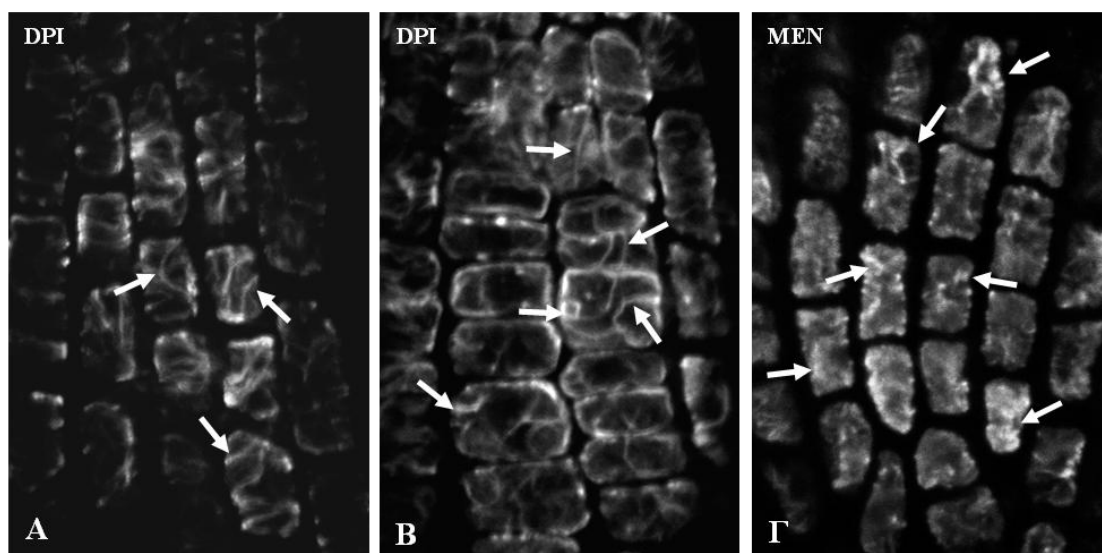
Εικόνα 9. Μεσοφασικά κύτταρα ακρόρριζων *T. turgidum* φυσιολογικών (Α) και επηρεασμένων με DPI, NAC, MEN και H_2O_2 (Β-Ε), έπειτα από ανοσοσήμανση της σωληνίνης. Η εικόνα Α αντιπροσωπεύει οπτική τομή CLSM, ενώ οι υπόλοιπες έχουν ληφθεί με μικροσκόπιο επιφθορισμού. Τα επηρεασμένα κύτταρα διαθέτουν άτυπα πολυμερή σωληνίνης στο περιφερειακό κυτόπλασμα (Β-Ε σύγκρινε με Α). Επίδρασεις: CONTR: dH_2O 1 h, DPI: 25 μM 1 h NAC: 250 μM 1 h, MEN: 25 μM 1 h, H_2O_2 : 4 mM 1 h. Μεγέθυνση: X1200.

Τα μεσοφασικά κύτταρα, τα οποία υφίστανται οξειδωτική καταπόνηση, ως συνέπεια της επίδρασης με MEN, στερούνται επίσης τυπικών διατάξεων ΜΣ (Εικ. 9Δ, Εικ. 10Δ σύγκρινε με Εικ. 9Α, Εικ. 10Α). Σε αυτά εντοπίζονται άμορφες, γραμμικές ή κυματοειδείς δομές σωληνίνης, οι οποίες μπορεί να σχηματίζουν δίκτυο (Εικ. 9Δ, Εικ. 10Δ). Στην περίπτωση κατά την οποία τα ακρόρριζα υφίστανται επίδραση με H_2O_2 , η οργάνωση των πολυμερών μοιάζει με εκείνη των κυττάρων που είχαν επηρεαστεί με DPI, στα οποία τα επίπεδα των ROS είναι μειωμένα (Εικ. 9Ε, Εικ. 10Ε σύγκρινε με Εικ. 9Β, Εικ. 10Β). Συγκεκριμένα, το περιφερειακό κυτόπλασμα των επηρεασμένων κυττάρων περιέχει άτυπα πολυμερή σωληνίνης διαφόρων σχημάτων, τα οποία είναι παράλληλα μεταξύ τους ή έχουν τυχαίο προσανατολισμό (Εικ. 9Ε, Εικ. 10Ε).



Εικόνα 10. Μεσοφασικά κύτταρα ακρόρριζου *A. thaliana* φυσιολογικού (Α) και επηρεασμένου με DPI, NAC, MEN και H_2O_2 (Β-Ε), έπειτα από ανοσοσήμανση της σωληνίνης και παρατήρηση με μικροσκόπιο επιφθορισμού. Το περιφερειακό κυτόπλασμα των επηρεασμένων κυττάρων διατρέχεται από άτυπα πολυμερή σωληνίνης με τυχαίο προσανατολισμό. Επιδράσεις: CONTR: dH_2O 1 h, DPI: 25 μM 1 h NAC: 250 μM 1 h, MEN: 25 μM 1 h, H_2O_2 : 4 mM 1 h. Μεγέθυνση: X1200.

Οι παραπάνω ατυπίες της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της σωληνίνης επιβεβαιώθηκαν και με ανοσοσήμανση της σωληνίνης σε ολόκληρα ακρόρριζα *A. thaliana*. Στην Εικ. 11 παρουσιάζονται κύτταρα της ριζοδερμίδας και του φλοιού ακρόρριζων, έπειτα από επίδραση με DPI (Εικ. 11Α,Β) και MEN (Εικ. 11Γ). Τα επηρεασμένα με DPI κύτταρα διαθέτουν γραμμικούς ή κυκλικούς σχηματισμούς σωληνίνης. Αυτά τα άτυπα πολυμερή εντοπίζονται στο περιφερειακό κυτόπλασμα και παρουσιάζουν τυχαία διάταξη. Παρόμοιες δομές δημιουργούνται και στο ενδόπλασμα, το οποίο συχνά διατρέχουν από τη μία άκρη του κυττάρου έως την άλλη (Εικ. 11Α,Β). Στα κύτταρα, τα οποία υφίστανται την επίδραση MEN εμφανίζονται μάζες σωληνίνης τυχαία κατανεμημένες, τόσο στην περιφέρεια του κυττάρου όσο και στο ενδόπλασμα (Εικ. 11Γ).

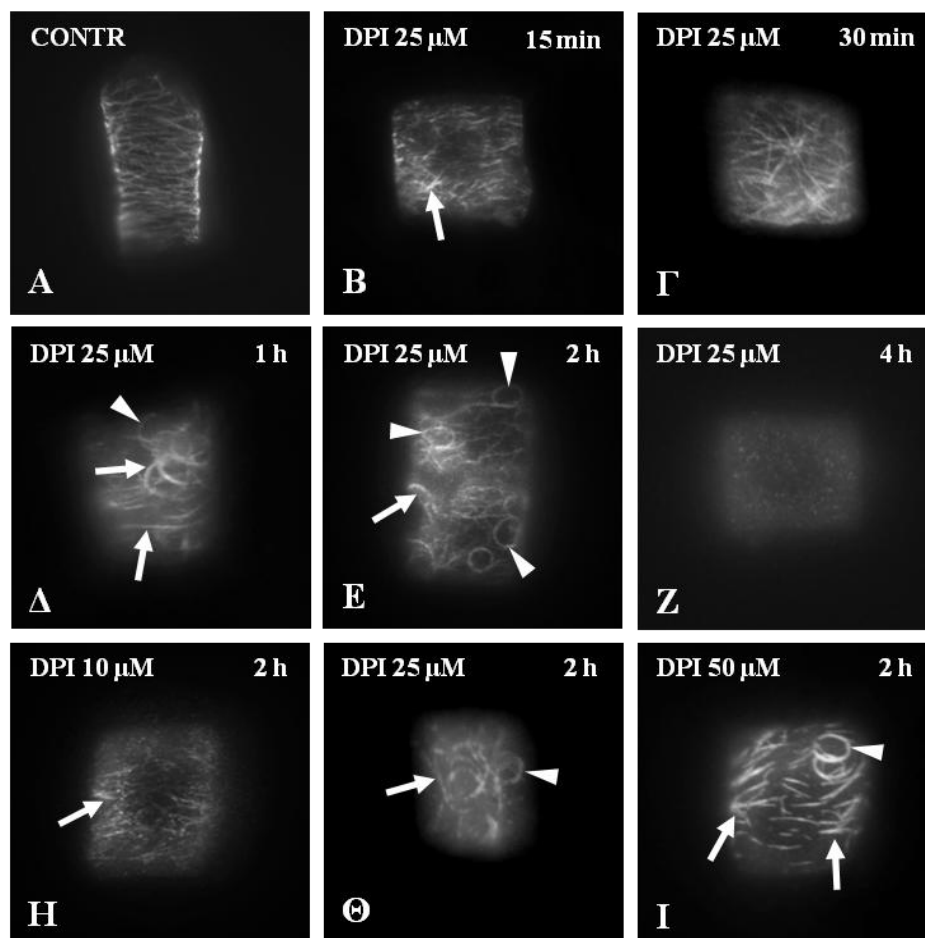


Εικόνα 11. Κύτταρα ριζοδερμίδας (Α,Γ) και φλοιού (Β) από ακρόρριζα επηρεασμένα με DPI (Α,Β) και MEN (Γ), έπειτα από ανοσοσήμανση της σωληνίνης σε ολόκληρα αρτίβλαστα *A. thaliana*. Οι εικόνες προέκυψαν από την προβολή οπτικών τομών, έπειτα από παρατήρηση με CLSM. Τα βέλη δείχνουν άτυπα πολυμερή της σωληνίνης. Επιδράσεις: DPI: 25 μ M 2 h, MEN 25 μ M 2 h. Μεγέθυνση: X800.

Η πραγματοποίηση επιδράσεων σε διαφορετικούς χρόνους αποκάλυψε ότι, στα κύτταρα, των οποίων η ομοιοστάση των ROS έχει διαταραχθεί, η αντικατάσταση των ΜΣ από άτυπα πολυμερή σωληνίνης ακολουθεί σε όλες τις περιπτώσεις ένα χαρακτηριστικό πρότυπο. Συγκεκριμένα, σε αρτίβλαστα *T. turgidum* πραγματοποιήθηκαν επιδράσεις με όλες τις ουσίες που μεταβάλλουν τα επίπεδα των ROS για χρόνους 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, και 4 h. Στην Εικ. 12Α-Ζ παρουσιάζονται κύτταρα που έχουν υποστεί επίδραση με DPI. Διαπιστώνεται ότι το περιφερειακό σύστημα ΜΣ αρχίζει να αποδιοργανώνεται μετά από 15 min επίδρασης (Εικ. 12Β σύγκρινε με Εικ. 12Α). Ακολουθεί ο σχηματισμός άτυπων πολυμερών σωληνίνης, τα οποία μετά από 30 min είναι εμφανώς περισσότερα (Εικ. 12Γ), ενώ μετά από 1 h επίδρασης δεν διακρίνονται ΜΣ (Εικ. 12Γ,Δ). Μετά από 2 h επίδρασης το περιφερειακό κυτόπλασμα χαρακτηρίζεται από έντονη παρουσία άτυπων πολυμερών σωληνίνης διαφόρων μορφών (Εικ. 12Ε). Στην Εικ. 12Ζ το σήμα φθορισμού της σωληνίνης είναι εξαιρετικά ασθενές, πιθανόν λόγω της έναρξης νεκρωτικών φαινομένων, μετά από 4 h παραμονής του κυττάρου στο DPI.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, τόσο οι χρόνοι επίδρασης όσο και οι συγκεντρώσεις των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκαν βάσει συγκεκριμένων κριτηρίων. Ως βέλτιστοι θεωρήθηκαν οι χρόνοι επιδράσεων και οι συγκεντρώσεις ουσιών που επηρεάζουν τον κυτταροσκελετό της σωληνίνης, χωρίς ωστόσο να προκαλούν νέκρωση των κυττάρων του ακρόρριζου. Όπως φαίνεται από τις Εικ. 12Η-Ι, οι επιπτώσεις εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα της επίδρασης. Για παράδειγμα, στις επιδράσεις με DPI η παρουσία των άτυπων πολυμερών σωληνίνης ήταν πολύ πιο έντονη όταν η

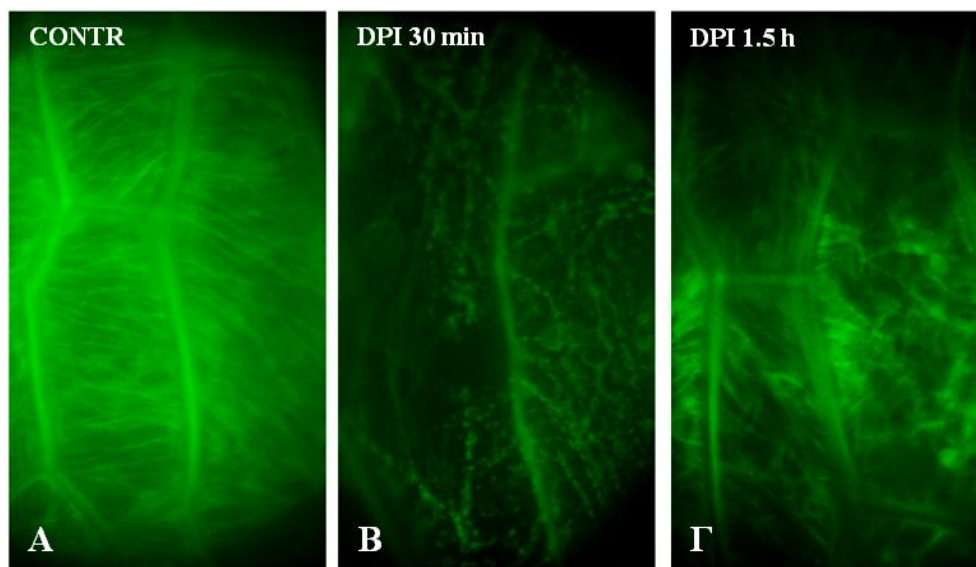
συγκέντρωση του DPI ήταν 25 μM και 50 μM σε σύγκριση με τη χαμηλότερη συγκέντρωση των 10 μM (Εικ. 12Θ, Ι σύγκρινε με Εικ. 12Η).



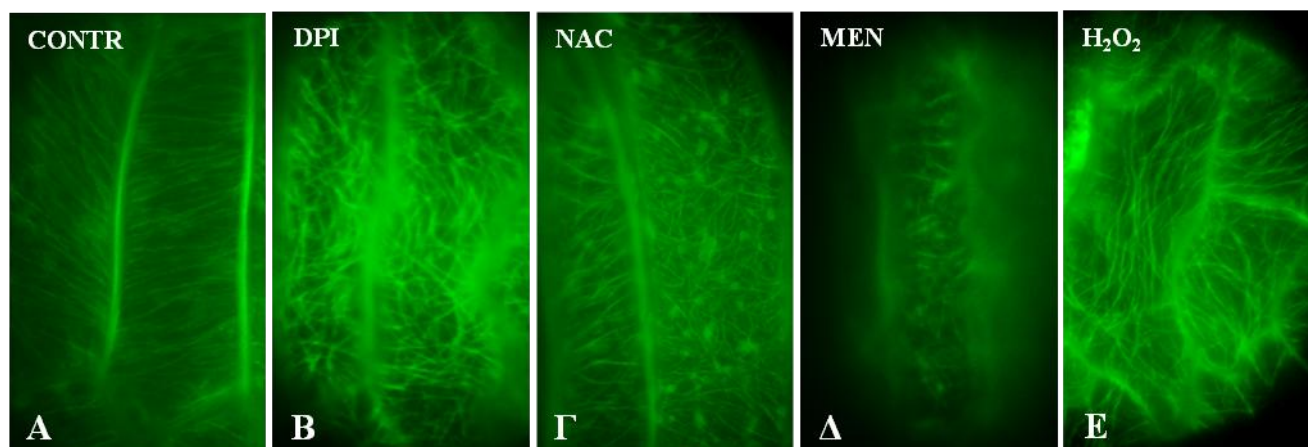
Εικόνα 12. Μεσοφασικά κύτταρα ακρόρριζον του φυτού *T. turgidum* φυσιολογικά (Α) και επηρεασμένα από DPI (Β-Ι), έπειτα από ανοσοσθήμανση της σωληνίνης. Ο χρόνος της επίδρασης (Β-Ζ) και η συγκέντρωση του DPI (Η-Ι) ποικίλλουν. Τα βέλη δείχνουν τα γραμμικά άτυπα πολυμερή σωληνίνης και οι κεφαλές βελών τα κυκλικά. Ο αριθμός των άτυπων πολυμερών εξαρτάται τόσο από το χρόνο της επίδρασης, όσο και τη συγκέντρωση του διαλύματος του DPI. Επιδράσεις: (Β): 25 μM DPI 15 min, (Γ): 25 μM DPI 30 min, (Δ): 25 μM DPI 1 h, (Ε): 25 μM DPI 2 h, (Ζ): 25 μM DPI 4 h, (Η): 10 μM DPI 2 h, (Θ): 25 μM DPI 2 h, (Ι): 50 μM DPI 2 h. Μεγέθυνση X1000.

Οι αλλαγές που επάγονται στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης από τις μεταβολές των επιπέδων των ROS επιβεβαιώθηκαν και σε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ζωντανά αρτίβλαστα *Arabidopsis*, κατάλληλα μετασχηματισμένα ώστε να εκφράζουν το γονίδιο TUA6 ή το γονίδιο TUB6, τα οποία κωδικοποιούν ισότυπους σωληνίνης μαζί με εκείνο της πρωτεΐνης GFP. Αρτίβλαστα των φυτών αυτών ηλικίας τεσσάρων ημερών, υπέστησαν πειραματική διατάραξη της ομοιόστασης των ROS και μελετήθηκαν οι επιπτώσεις στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης. Ο χειρισμός αυτός έχει το πλεονέκτημα ότι πραγματοποιείται σε ζωντανά φυτά, γεγονός που επιτρέπει τη μελέτη της συμπεριφοράς του

κυτταροσκελετού της σωληνίνης στο ίδιο φυτό, κατά τη διάρκεια του χρόνου. Διαπιστώθηκε ότι, όταν τα επίπεδα των ROS αυξάνουν, αλλά και όταν αυτά μειώνονται, ο κυτταροσκελετός της σωληνίνης των επιδερμικών κυττάρων των κοτυληδόνων και του υποκοτυλίου εμφανίζει συμπεριφορά παρόμοια με εκείνη των μεσοφασικών κυττάρων του ακρόρριζου.



Εικόνα 13. Επιδερμικά κύτταρα υποκοτυλίου ζωντανών αρτιβλάστων *Arabidopsis* που εκφράζουν *GFP-TUA6*, έπειτα από παρατήρηση με μικροσκόπιο επιφθορισμού. Τα κύτταρα των (B,Γ) είναι επηρεασμένα με DPI για διαφορετικό χρονικό διάστημα. Διαπιστώνεται η βαθμιαία αποδιοργάνωση των ΜΣ (B,Γ σύγκρινε με A). Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 50 μM 30 min (B), 1,5 h (Γ). Μεγέθυνση: X1000.



Εικόνα 14. Επιδερμικά κύτταρα υποκοτυλίου ζωντανών αρτιβλάστων *Arabidopsis* που εκφράζουν *GFP-TUA6*, έπειτα από παρατήρηση με μικροσκόπιο επιφθορισμού. Τα κύτταρα των (B-E) προέρχονται από αρτίβλαστα, στα οποία έχει πραγματοποιηθεί επίδραση με ουσίες που διαταράσσουν την ομοιόσταση των ROS. Είναι εμφανής η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης. Στα επηρεασμένα κύτταρα (B-E σύγκρινε με A). Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 50 μM 2 h, NAC: 500 μM 2 h, MEN: 50 μM 2 h, H₂O₂: 5 mM 2 h. Μεγέθυνση: X1100.

Επομένως, και άλλοι τύποι κυττάρων είναι ευαίσθητοι στις μεταβολές των επιπέδων των ROS. Στα κύτταρα των φυτών αυτών, ο κυτταροσκελετός των ΜΣ αποδιοργανώνεται

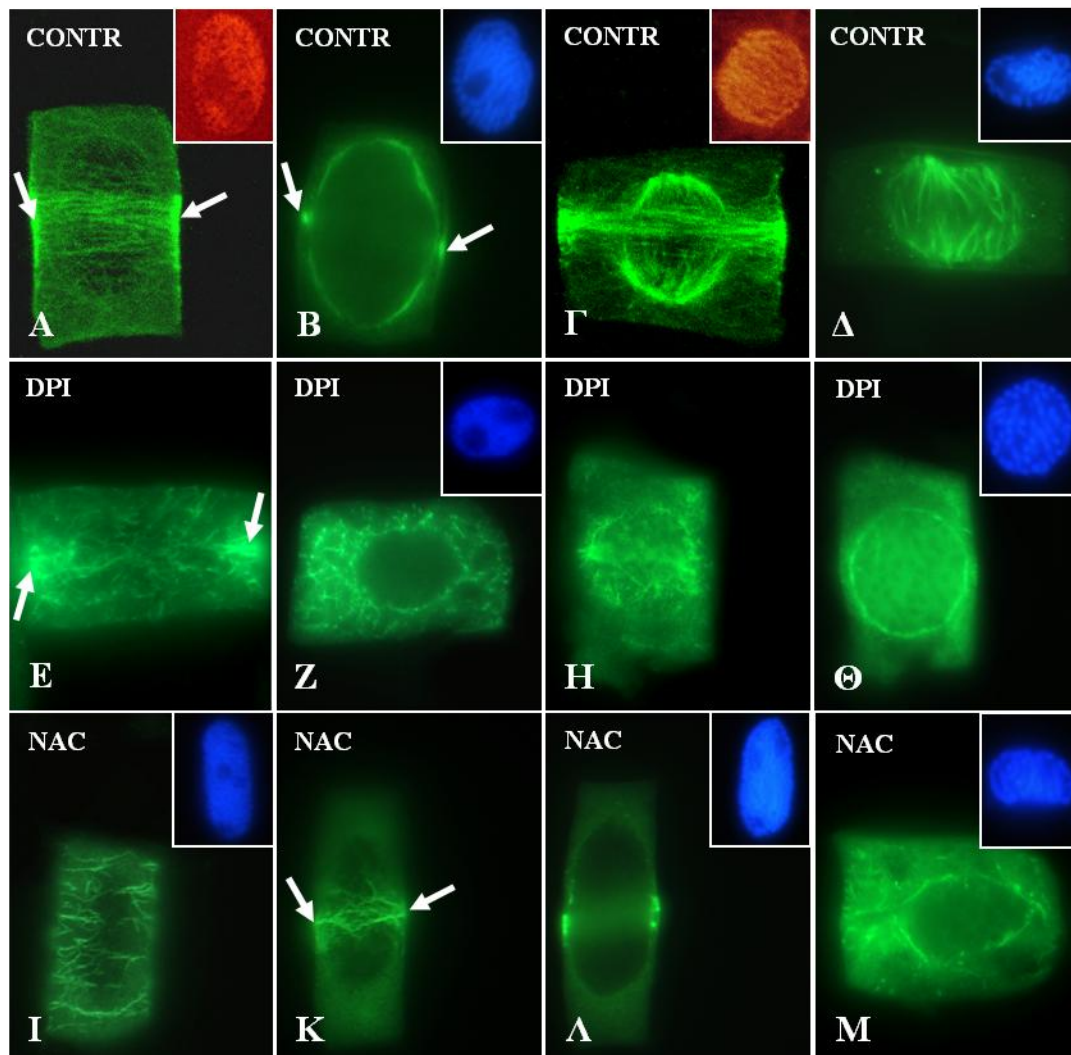
περίπου 30 min μετά την έναρξη της επίδρασης (Εικ. 13Α-Γ). Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα, στο κυτόπλασμα των κυττάρων διακρίνονται πολυάριθμα κοκκία που αποτελούνται από GFP-σωληνίνη (Εικ. 13Β). Ακολούθως, εμφανίζονται πολυμερή, τα οποία διαφέρουν από τους ΜΣ (Εικ. 13Γ, Εικ. 14Β-Ε σύγκρινε με Εικ. 13Α, Εικ. 14Α). Ο προσανατολισμός των άτυπων πολυμερών σωληνίνης ποικίλλει, ενώ αυτά σε μερικές περιπτώσεις σχηματίζουν δίκτυο (Εικ. 14Β).

III.4.2 Προ-πρόφαση/Πρόφαση

Κατά την προ-πρόφαση των ακρόρριζων των φυτών *T. turgidum* και *A. thaliana* αποδιοργανώνεται το περιφερειακό σύστημα των ΜΣ και εμφανίζεται ένα νέο περιφερειακό σύστημα ΜΣ, η προ-προφασική ζώνη των ΜΣ, στο επίπεδο όπου η μελλοντική κυτταρική πλάκα θα συντηχθεί με τα πατρικά τοιχώματα. Έχει τη μορφή κλειστού δακτυλίου, ο οποίος κατά την προ-πρόφαση έχει μεγάλο εύρος. Το εύρος αυτό κατά τη διάρκεια της πρόφασης μειώνεται σημαντικά. Κατά τη φάση της πλήρους ωριμότητάς της καθίσταται δύσκολη η διάκριση μεμονωμένων ΜΣ στο μικροσκόπιο φθορισμού (Εικ. 15Β,Γ, Εικ. 17Β). Ο σχηματισμός αυτός αποδιοργανώνεται πριν από την είσοδο των κυττάρων στη μετάφαση (Εικ. 15Δ, Εικ. 17Γ). Παράλληλα με την πορεία ωρίμανσης της προ-προφασικής ζώνης ΜΣ, εμφανίζονται στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα πολυάριθμοι ΜΣ (Εικ. 15Β, Εικ. 17Β), οι οποίοι, στη συνέχεια, διαμορφώνουν ένα διπολικό σύστημα, την προφασική άτρακτο (Εικ. 15Γ,Δ, Εικ. 17Γ). Κατά κανόνα, τα προφασικά κύτταρα δεν φέρουν ΜΣ σε άλλες θέσεις του ενδοπλάσματος (Εικ. 15Γ, Εικ. 17Γ). Η μετάβαση από την προ-πρόφαση στην προμετάφαση χαρακτηρίζεται από σταδιακή συμπίκνωση της χρωματίνης, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ευκρινών χρωμοσωμάτων κατά το τέλος της πρόφασης (Εικ. 15Α-Δ, Εικ. 17Α-Γ).

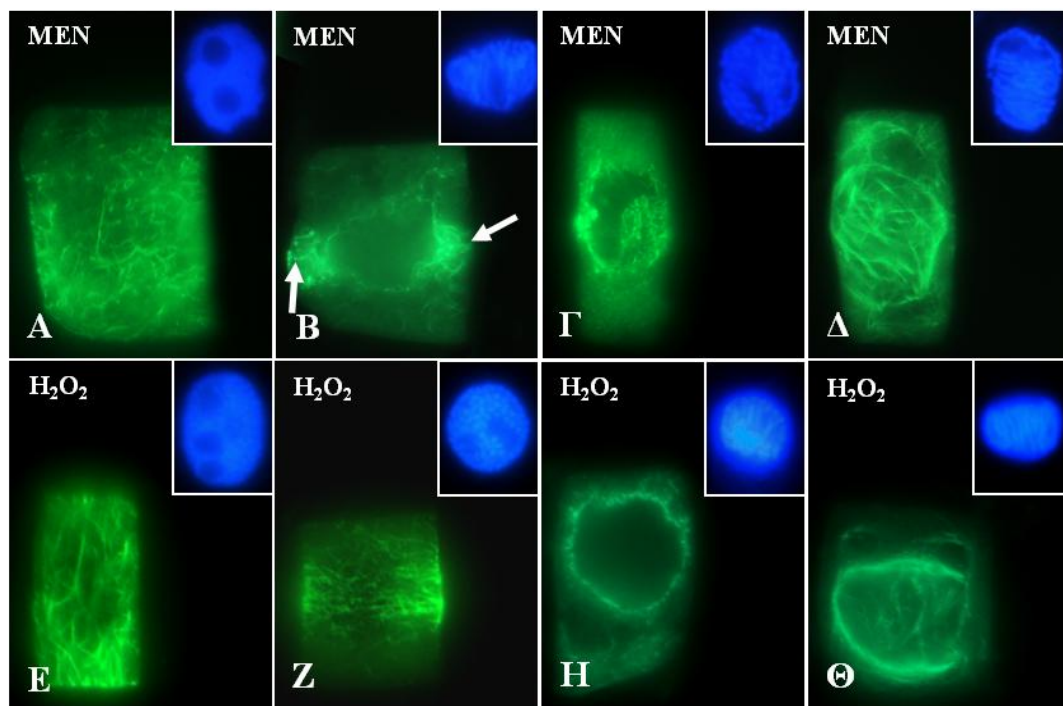
Τα προ-προφασικά/προφασικά κύτταρα του ακρόρριζου, τα οποία υφίστανται την επίδραση DPI και NAC, δηλαδή με ουσίες που προκαλούν μείωση στα επίπεδα των ROS, εμφανίζουν πολλές ατυπίες οργάνωσης των συστημάτων των πολυμερών σωληνίνης. Σε πολλά από αυτά απουσιάζει η προ-προφασική ζώνη ΜΣ (Εικ. 15Ε-Η,Ι, Εικ. 17Δ). Συχνά, η περιοχή της ή και ολόκληρο το περιφερειακό κυτόπλασμα των κυττάρων καταλαμβάνεται από γραμμικά πολυμερή σωληνίνης, τα οποία έχουν τυχαίο προσανατολισμό (Εικ. 15Ε-Ζ,Ι,Κ, Εικ. 17Δ,Θ). Γενικά, διαπιστώνεται ασυμφωνία στο βαθμό ωρίμανσης της προ-προφασικής ζώνης σε σχέση με το βαθμό συμπίκνωσης της χρωματίνης (Εικ. 15Η,Κ,Λ, Εικ. 17Ε,Ζ,Ι). Στα κύτταρα που έχουν επηρεαστεί με DPI και NAC είναι εμφανής η απουσία περιπυρηνικών πολυμερών σωληνίνης, αν και σε ορισμένα από αυτά εντοπίζονται στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα άμορφες μάζες σωληνίνης (Εικ. 15Ζ-Θ,Λ, Εικ. 17Ε-Η,Ι). Το γεγονός αυτό πιθανόν εξηγεί την απουσία προφασικής άτρακτου σε μεγάλο αριθμό κυττάρων. Ως αποτέλεσμα, πυρήνες με ορατά χρωμοσώματα περιβάλλονται από άτυπα πολυμερή σωληνίνης, τα οποία δεν διαμορφώνουν διπολικά συστήματα (Εικ. 15Θ,Μ, Εικ. 17Ζ).

Μεταξύ του πυρήνα και της προ-προφασικής ζώνης, αλλά και σε άλλες κυτοπλασματικές θέσεις, εντοπίζονται πολυμερή σωληνίνης διαφόρων μορφών (Εικ. 15Z,M, Εικ. 17H).

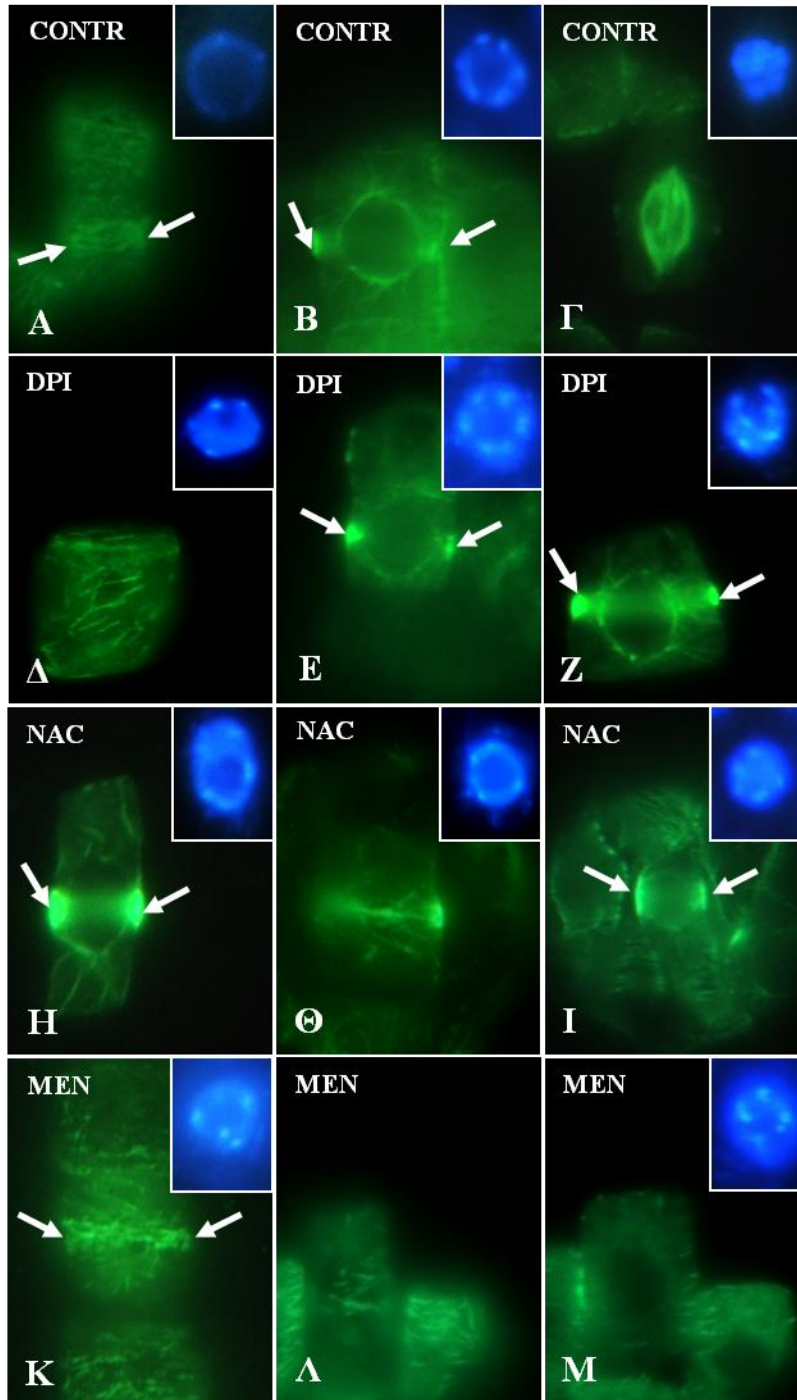


Εικόνα 15. Προ-προφασικά/προφασικά κύτταρα ακρόρριζου που έχουν ληφθεί από φυσιολογικά (Α-Δ) και επηρεασμένα με DPI (Ε-Θ) και NAC (Ι-Μ) αρτίβλαστα του φυτού *T. turgidum*, όπως φαίνονται μετά από ανοσοσήμανση σωληνίνης. Οι (Α,Γ) προέκυψαν από την προβολή οπτικών τομών CLSM, ενώ οι υπόλοιπες εικόνες έχουν ληφθεί με μικροσκόπιο επιφθορισμού. Στις ένθετες εικόνες παρουσιάζονται οι πυρήνες, μετά τη χρώση του DNA με Hoechst 33258 (μπλε χρώμα) ή PI (κόκκινο χρώμα, Α,Γ). Τα βέλη στις (Α,Β,Ε,Κ) δείχνουν την περιοχή της προ-προφασικής ζώνης. Στις (Α-Δ) παρουσιάζεται η πορεία ωρίμανσης της προ-προφασικής ζώνης ΜΣ και αυτή της δημιουργίας διπολικής προφασικής ατράκτου. Στα επηρεασμένα κύτταρα απουσιάζει η προ-προφασική ζώνη ΜΣ (Ζ,Ι) ή αποτελείται από άτυπα πολυμερή σωληνίνης (Ε,Κ). Τα προφασικά κύτταρα δεν διαθέτουν καλά οργανωμένο περιπυρηνικό σύστημα ΜΣ (Ζ,Λ), ενώ όταν υπάρχει δεν οργανώνεται σε διπολική προφασική άτρακτο (Η,Θ,Μ). Παράλληλα, άτυπα πολυμερή σωληνίνης παρατηρούνται και σε άλλες θέσεις του κυτοπλάσματος (Ζ,Μ). Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 25 μΜ 1 h, NAC: 500 μΜ 2 h. Μεγέθυνση: X1100.

Τα προ-προφασικά/προφασικά κύτταρα *T. turgidum* και *A. thaliana*, τα οποία υφίστανται οξειδωτική καταπόνηση λόγω της επίδρασης με MEN ή H_2O_2 , εμφανίζουν αντίστοιχες ατυπίες στην οργάνωση της σωληνίνης. Για παράδειγμα, πολλά προ-προφασικά και προφασικά κύτταρα αποτυγχάνουν να συγκροτήσουν προ-προφασική ζώνη ΜΣ (Εικ. 16Α,Γ,Ε, Εικ. 17Λ,Μ), αλλά και όταν αυτή εμφανίζεται, καθυστερεί η πορεία ωρίμανσής της (Εικ. 16Ζ). Η παρουσία άτυπων πολυμερών σωληνίνης, είναι ιδιαίτερα έντονη στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα, σε θέσεις μεταξύ της περιοχής της προ-προφασικής ζώνης και του πυρήνα, αλλά και στο περιφερειακό κυτόπλασμα (Εικ. 16Β,Γ,Ε,Η, Εικ. 17Κ,Λ). Στα περισσότερα κύτταρα απουσιάζει η διπολική προφασική άτρακτος, ενώ σε κύτταρα, τα οποία βρίσκονται στο τέλος της πρόφασης ο πυρήνας περιβάλλεται από μάζες πολυμερών σωληνίνης με άτυπη εμφάνιση (Εικ. 16Δ,Θ, Εικ. 17Μ).



Εικόνα 16. Προ-προφασικά/προφασικά κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum* επηρεασμένα με MEN (Α-Δ) και H_2O_2 (Ε-Θ), όπως φαίνονται μετά από ανοσοσθήμανση της σωληνίνης και παρατήρηση σε μικροσκόπιο επιφθορισμού. Στις ένθετες εικόνες παρουσιάζονται οι πυρήνες των κυττάρων μετά τη χρώση του DNA με Hoechst 33258. Τα βέλη (Β) δείχνουν άτυπα πολυμερή σωληνίνης στην περιοχή μεταξύ της προ-προφασικής ζώνης και του πυρήνα. Στα επηρεασμένα κύτταρα η προ-προφασική ζώνη ΜΣ μπορεί να απουσιάζει (Α,Ε,Η). Τα προφασικά κύτταρα δεν διαθέτουν καλά οργανωμένο περιπυρηνικό σύστημα ΜΣ (Β), ενώ απουσιάζει η προφασική άτρακτος (Δ,Η,Θ). Άτυπα πολυμερή σωληνίνης παρατηρούνται και σε άλλες θέσεις του κυτοπλάσματος (Β,Δ,Θ). Επιδράσεις: MEN: 50 μ M 1 h, H_2O_2 : 4 μ M 1 h. Μεγέθυνση: X1100.

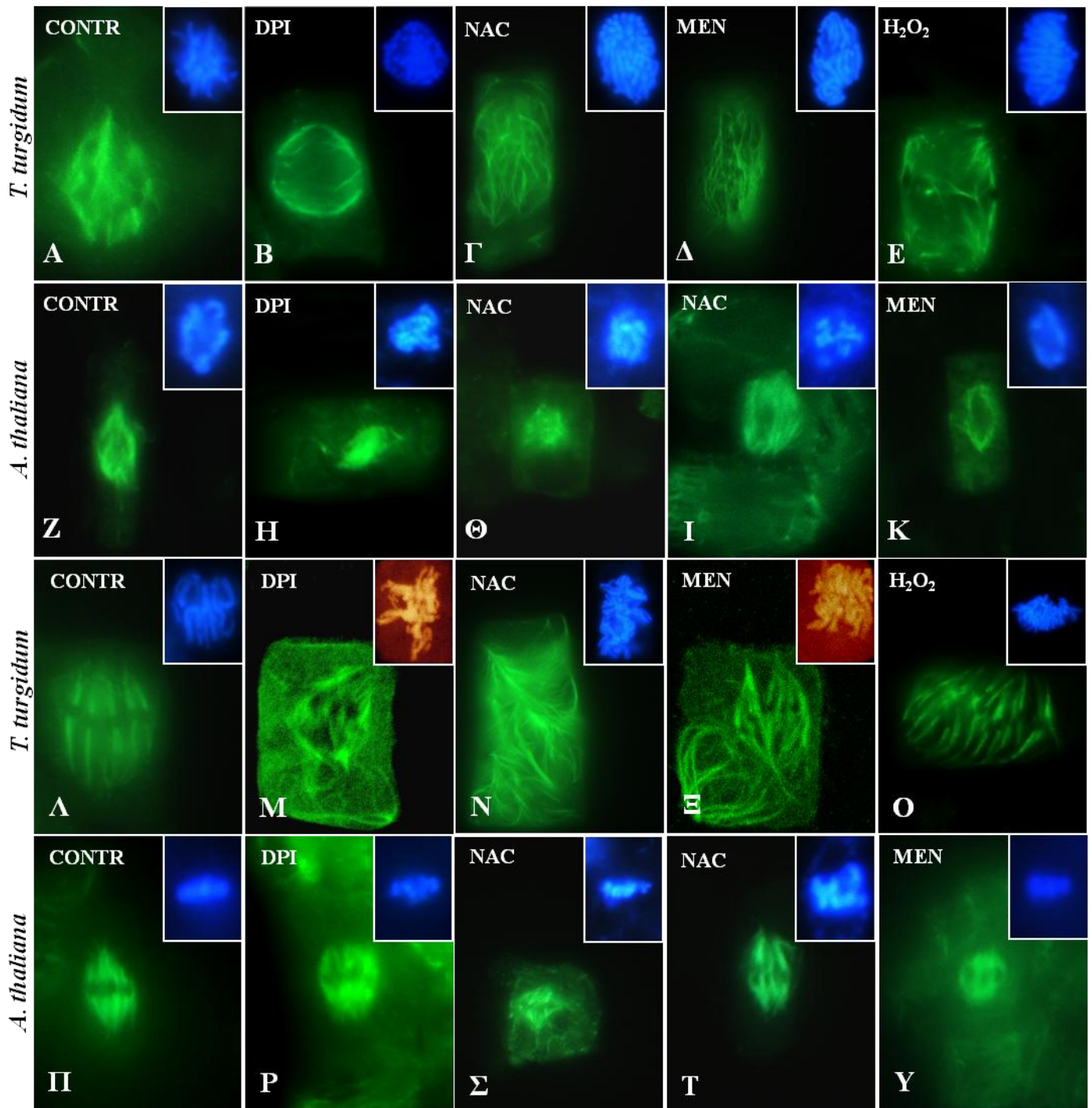


Εικόνα 17. Φυσιολογικά (Α-Γ) και επηρεασμένα με DPI (Δ-Ζ), NAC (Η-Ι) και MEN (Κ-Μ) προ-προφασικά/προφασικά κύτταρα ακρόρριζου αρτιβλάστων του φυτού *A. thaliana*, όπως φαίνονται μετά την ανοσοσθήμανση σωληνίνης σε μικροσκόπιο επιφθορισμού. Στις ένθετες εικόνες παρουσιάζονται οι πυρήνες των κυττάρων, έπειτα από χρώση του DNA με Hoechst 33258. Τα βέλη δείχνουν την προ-προφασική ζώνη. Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 25 μM 1 h, NAC: 500 μM 2 h, MEN: 50 μM 1 h. Μεγέθυνση: X1100.

III.4.3 Προμετάφαση/Μετάφαση

Στα φυσιολογικά προμεταφασικά κύτταρα των φυτών *T. turgidum* και *A. thaliana*, μετά την αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου, ανάμεσα στα προμεταφασικά χρωμοσώματα εντοπίζονται δεσμίδες ΜΣ (Εικ. 18Α,Ζ), οι οποίες συνδέονται με τους κινητοχώρους. Αυτές μαζί με τους ΜΣ του σκελετού της ατράκτου διαμορφώνουν τη διπολική μεταφασική άτρακτο (Εικ. 18Λ,Π). Στο φυτό *T. turgidum* η μεταφασική άτρακτος έχει βαρελοειδή διαμόρφωση, ενώ στο φυτό *A. thaliana* στα περισσότερα κύτταρα οι δεσμίδες ΜΣ κινητοχώρων συγκλίνουν έντονα στους πόλους (Εικ. 18Λ σύγκρινε με Εικ. 18Π). Η αναδιευθέτηση των χρωμοσωμάτων, λόγω της δημιουργίας της μεταφασικής ατράκτου, έχει ως αποτέλεσμα τη διάταξη των κινητοχώρων των χρωμοσωμάτων στο ισημερινό επίπεδο και τον προσανατολισμό των βραχιόνων τους προς τους πόλους (ένθετες Εικ. 18Λ,Π). Σε κύτταρα που βρίσκονται σε προμετάφαση, επηρεασμένα από DPI, NAC, MEN και H₂O₂ είναι εμφανής η καθυστέρηση της αποδιοργάνωσης του πυρηνικού φακέλου, με αποτέλεσμα τον εγκλωβισμό των χρωμοσωμάτων στην πυρηνική περιοχή (ένθετες Εικ. 18Β-Ε,Η-Κ). Γύρω από αυτά εντοπίζονται δεσμίδες πολυμερών σωληνίνης, οι οποίες όμως δεν συνδέονται με τους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων (Εικ. 18Β-Ε,Η-Κ).

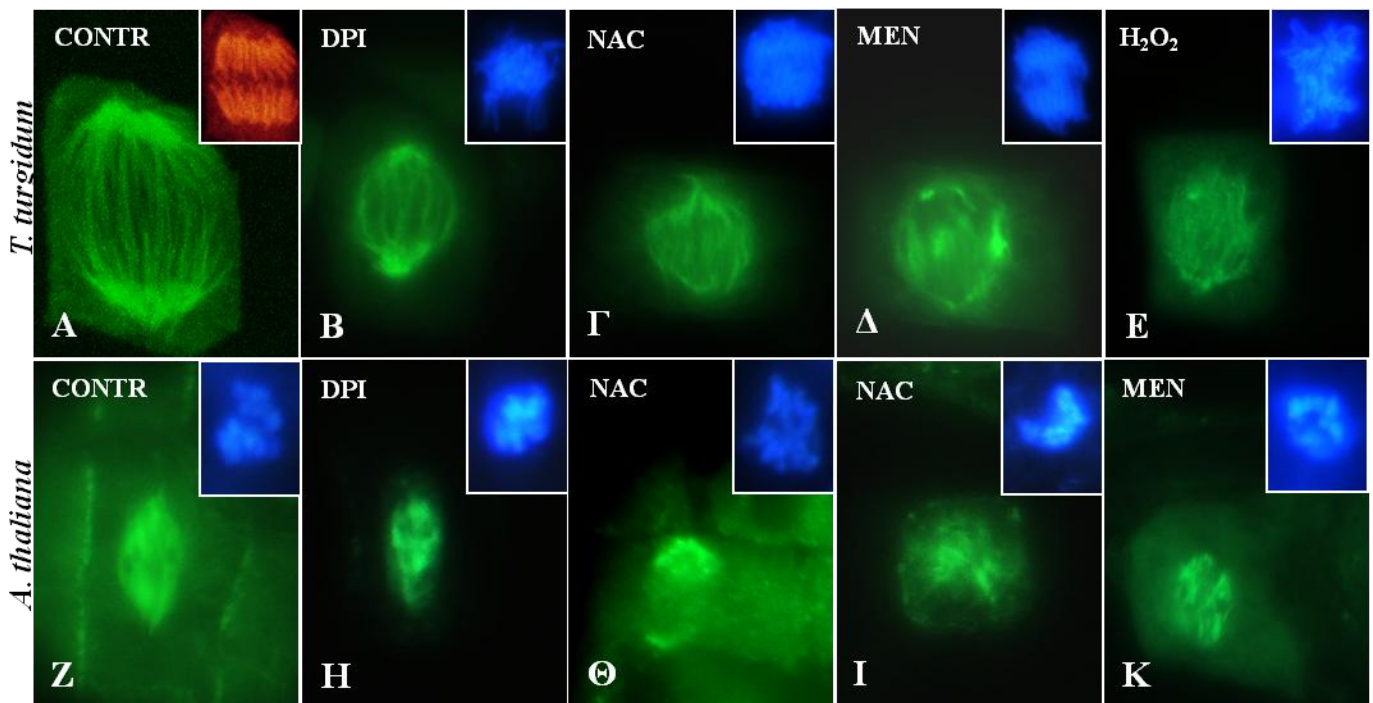
Στα επηρεασμένα κύτταρα διαταράσσεται, επίσης, η οργάνωση της μεταφασικής ατράκτου (Εικ. 18Μ-Ο,Ρ-Υ σύγκρινε με Εικ. 18Λ,Π). Στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων καταλήγουν δεσμίδες άτυπων πολυμερών σωληνίνης, οι οποίες σχηματίζουν δίκτυα ή διασχίζουν το κυτόπλασμα σε διάφορες κατευθύνσεις, ενώ συχνά συγκλίνουν έντονα σε πολλά σημεία (Εικ. 18Μ,Ν,Ξ,Ο,Ρ). Λόγω των ατυπιών αυτών επηρεάζεται η διάταξη των κινητοχώρων των χρωμοσωμάτων στο ισημερινό επίπεδο της ατράκτου (ένθετες Εικ. 18Μ-Ο,Ρ-Υ), ενώ συχνά αυτά διασπείρονται σε όλο τον κυτταρικό χώρο (ένθετες Εικ. 18Ν,Ξ,Τ). Αν και στα φυσιολογικά μεταφασικά κύτταρα δεν εντοπίζονται ΜΣ εκτός από εκείνους της ατράκτου, στα επηρεασμένα παρατηρούνται πολυμερή σωληνίνης σε διάφορες τυχαίες θέσεις. Τα πολυμερή αυτά έχουν άτυπη εμφάνιση, ποικίλο σχήμα και εντοπίζονται σε θέσεις που βρίσκονται σε απόσταση από τα χρωμοσώματα, ακόμη και πλησίον του πλασμαλήμματος, χωρίς όμως να συνδέονται με τους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων (Εικ. 18Μ,Ν,Ξ,Σ).



Εικόνα 18. Προμεταφασικά (Α-Κ) και μεταφασικά (Λ-Υ) κύτταρα ακρόρριζων *T. turgidum* (Α-Ε, Λ-Ο) και *A. thaliana* (Ζ-Κ, Π-Υ) φυσιολογικών (Α, Ζ, Λ, Π) και επηρεασμένων με DPI (Β, Η, Μ, Ρ), NAC (Γ, Θ, Ι, Ν, Σ, Τ), MEN (Δ, Κ, Ξ, Υ) και H₂O₂ (Ε, Ο) αρτιβλάστων, όπως φαίνονται μετά από ανοσοσήμανση της σωληνίνης. Οι (Μ, Ξ) αντιπροσωπεύουν προβολή οπτικών τομών CLSM, ενώ οι υπόλοιπες εικόνες έχουν ληφθεί με μικροσκόπιο επιφθορισμού. Στις ένθετες εικόνες παρουσιάζονται οι πυρήνες ή τα χρωμοσώματα των κυττάρων, μετά τη χρώση του DNA με Hoechst 33258 (μπλε χρώμα) ή PI (κόκκινο χρώμα, Μ, Ξ). Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 25 μM 1,5 h, NAC: 500 μM 1 h, MEN: 50 μM 1 h, H₂O₂: 4 μM 1 h. Μεγέθυνση: X1100.

III.4.4 Ανάφαση/Τελόφαση

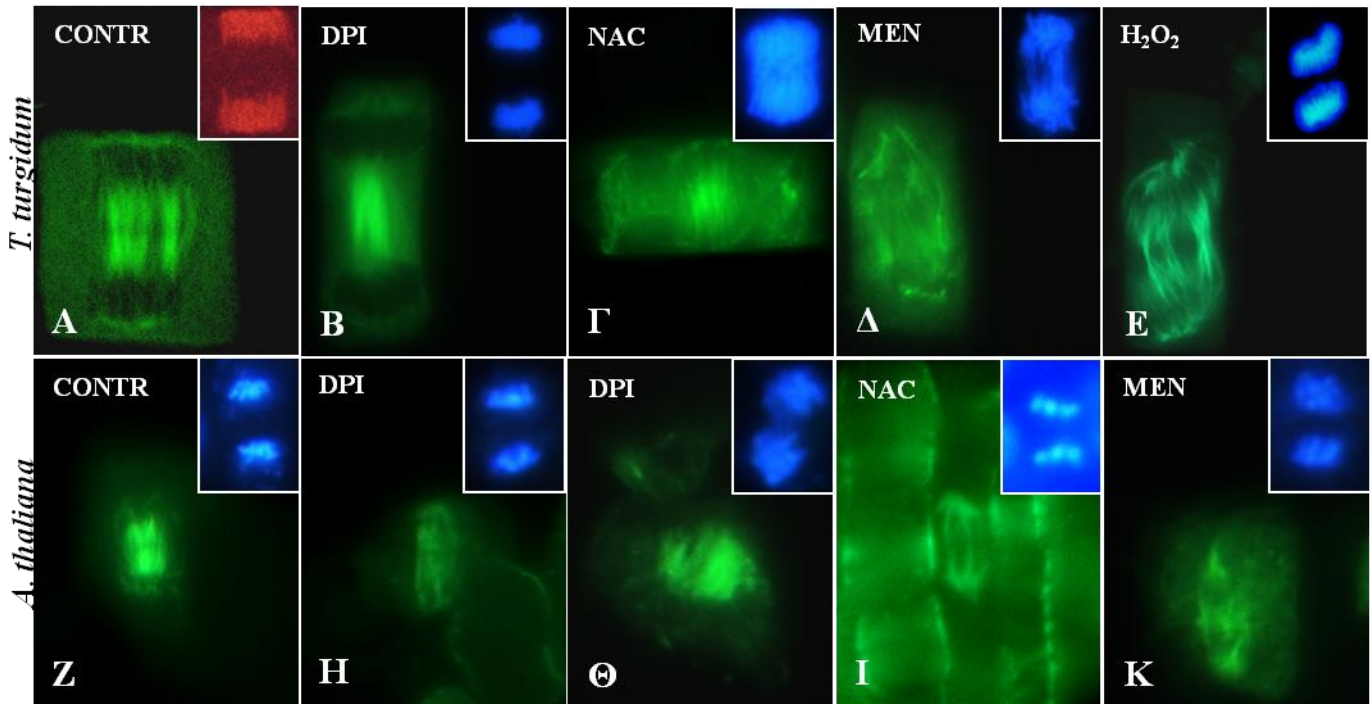
Η αναφασική άτρακτος ΜΣ μετακινεί τις θυγατρικές ομάδες χρωμοσωμάτων προς τους πόλους, λόγω της αμοιβαίας ολίσθησης των ΜΣ του σκελετού της ατράκτου και της ταυτόχρονης μείωσης του μήκους των δεσμίδων ΜΣ κινητοχώρων (Εικ. 19Α,Ζ). Στα κύτταρα που είναι επηρεασμένα με DPI, NAC, MEN και H_2O_2 η αναφασική άτρακτος έχει συνήθως άτυπη οργάνωση, δηλαδή αποτελείται από άτυπα πολυμερή σωληνίνης, τα οποία δεν συγκροτούν διπολικό σύστημα (Εικ. 19Β-Ε,Η-Κ σύγκρινε με Εικ. 19Α,Ζ). Παράλληλα, άτυπα πολυμερή σωληνίνης μπορούν να παρατηρηθούν και σε τυχαίες κυτοπλασματικές θέσεις (Εικ. Η-Ι). Λόγω της άτυπης οργάνωσης της αναφασικής ατράκτου, διαταράσσεται ή αναστέλλεται η αναφασική κίνηση και ο διαχωρισμός των θυγατρικών ομάδων χρωμοσωμάτων (ένθετες Εικ. 19Β-Ε,Η-Κ σύγκρινε με ένθετες Εικ.19Α,Ζ).



Εικόνα 19. Αναφασικά κύτταρα ακρόρριζων *T. turgidum* (Α-Ε) και *A. thaliana* (Ζ-Κ), τα οποία έχουν ληφθεί από φυσιολογικά (Α,Ζ) και επηρεασμένα με DPI (Β,Η), NAC (Γ,Θ,Ι), MEN (Δ,Κ) και H_2O_2 (Ε) αρτίβλαστα, όπως φαίνονται μετά από ανοσοσθήμανση της σωληνίνης. Η (Α) αντιπροσωπεύει προβολή οπτικών τομών CLSM, ενώ οι υπόλοιπες εικόνες έχουν ληφθεί με μικροσκόπιο επιφθορισμού. Στις ένθετες εικόνες παρουσιάζονται τα χρωμοσώματα των κυττάρων, μετά τη χρώση του DNA με Hoechst 33258 (μπλε χρώμα) ή PI (κόκκινο χρώμα, Α). Επιδράσεις: CONTR: H_2O 2 h, DPI: 25 μM 1,5 h, NAC: 500 μM 1 h, MEN: 50 μM 1 h, H_2O_2 : 4 μM 1 h. Μεγέθυνση: X1100.

Στα φυσιολογικά τελοφασικά κύτταρα ακρόρριζου και των δύο φυτών αναπτύσσεται ένα καλά οργανωμένο διαζωνικό σύστημα ΜΣ μεταξύ των δύο θυγατρικών πυρήνων (Εικ. 20Α,Ζ). Αυτό συγκροτείται από παράλληλες δεσμίδες ΜΣ που αλληλοεπικαλύπτονται στο

ισημερινό επίπεδο. Σε αυτή τη φάση οι δεσμίδες ΜΣ των κινητοχώρων αποδιοργανώνονται (Εικ. 20Α,Ζ). Η παρουσία άτυπων πολυμερών σωληνίνης μεταξύ των δύο θυγατρικών πυρήνων είναι εμφανής στα επηρεασμένα τελοφασικά κύτταρα (Εικ. 20Β-Ε,Η-Κ). Αντίθετα με ότι συμβαίνει στα φυσιολογικά τελοφασικά κύτταρα, στα επηρεασμένα καθυστερεί η αποδιοργάνωση των δεσμίδων πολυμερών σωληνίνης που συνδέονται με τους κινητοχώρους (Εικ. 20Γ,Δ,Ε,Η,Ι,Κ).



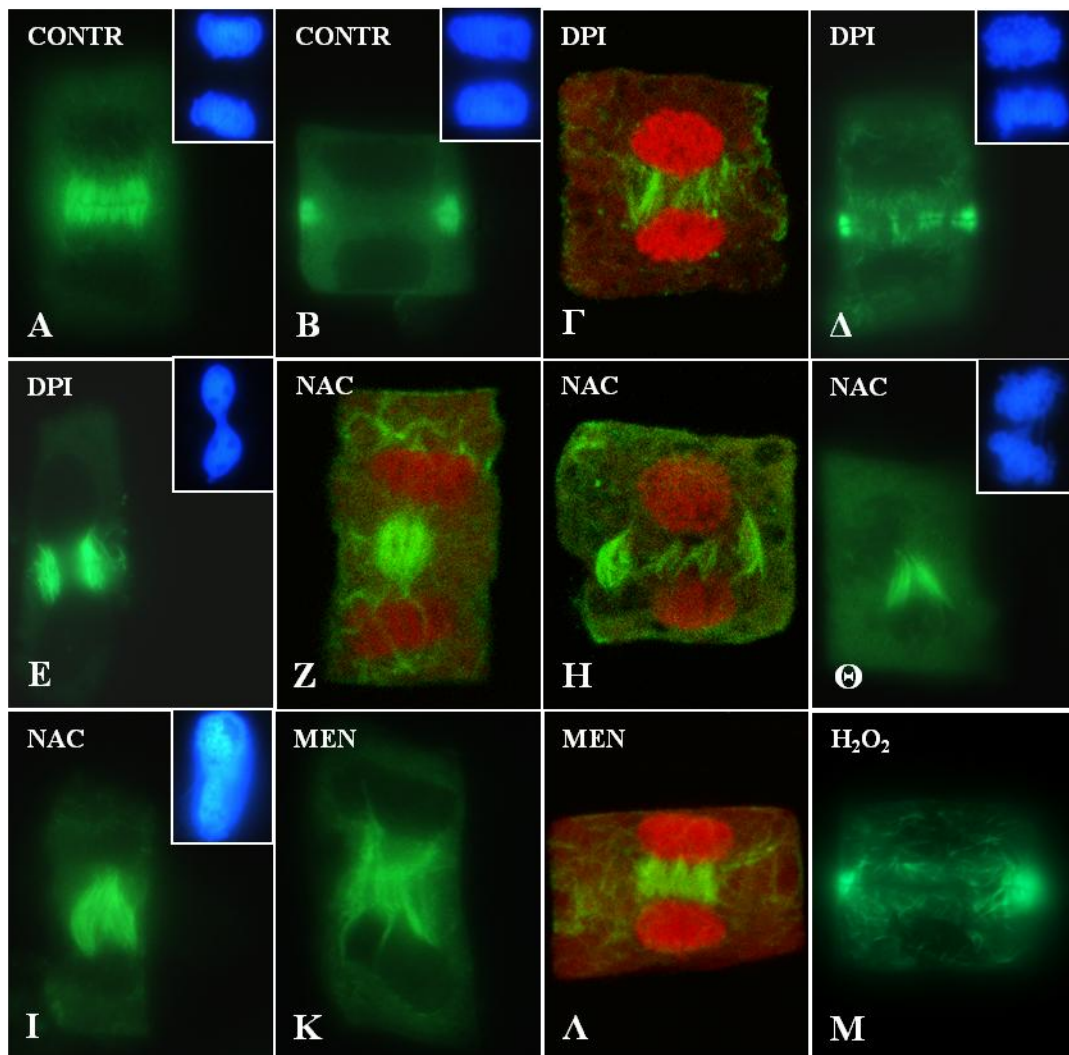
Εικόνα 20. Τελοφασικά κύτταρα ακρόρριζων *T. turgidum* (Α-Ε) και *A. thaliana* (Ζ-Κ) φυσιολογικών (Α,Ζ) και επηρεασμένων με DPI (Β,Η,Θ), NAC (Γ,Ι), MEN (Δ,Κ) και H_2O_2 (Ε) αρτιβλάστων, όπως φαίνονται μετά από ανοσοσθήμανση της σωληνίνης. Η (Α) αντιπροσωπεύει προβολή οπτικών τομών CLSM, ενώ οι υπόλοιπες εικόνες έχουν ληφθεί με μικροσκόπιο επιφθορισμού. Στις ένθετες εικόνες παρουσιάζονται οι θυγατρικές ομάδες χρωμοσωμάτων, μετά τη χρώση του DNA με Hoechst 33258 (μπλε χρώμα) ή PI (κόκκινο χρώμα, Α). Επιδράσεις: CONTR: H_2O 2 h, DPI: 25 μM 1,5 h, NAC: 500 μM 1 h, MEN: 50 μM 1 h, H_2O_2 : 4 μM 1 h. Μεγέθυνση: X1100.

Επιπλέον, διαπιστώνεται καθυστέρηση της επανασυγκρότησης των θυγατρικών πυρήνων, ενώ σε μερικά τελοφασικά κύτταρα οι θυγατρικές ομάδες χρωμοσωμάτων δεν διαχωρίζονται πλήρως (ένθετες Εικ. 20Β,Γ,Δ,Θ,Κ). Στα επηρεασμένα τελοφασικά κύτταρα παρατηρούνται πολυμερή σωληνίνης σε απόσταση από τους δύο θυγατρικούς πυρήνες (Εικ. 20Γ).

III.4.5 Κυτοκίνηση/Μετακυτοκίνηση

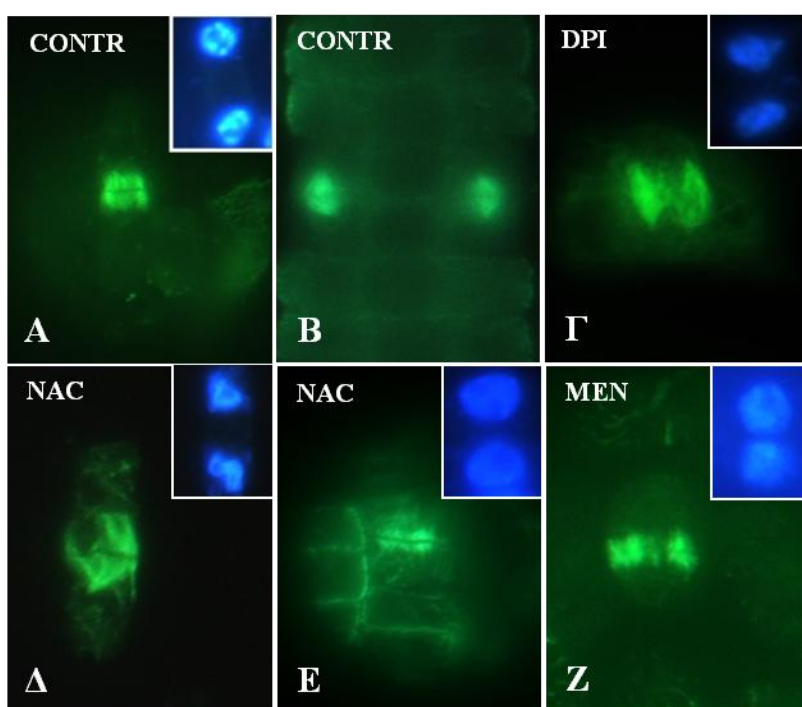
Στα φυσιολογικά κυτοκινητικά κύτταρα, μεταξύ των δύο θυγατρικών πυρήνων οργανώνεται ο φραγμοπλάστης, ένας βαρελοειδής σχηματισμός ΜΣ, ο οποίος αποτελείται από δύο υποσυστήματα παράλληλων ΜΣ αντίθετης πολικότητας που αλληλοεπικαλύπτονται στο ισημερινό επίπεδο του κυττάρου (Εικ. 21Α,Β, Εικ. 22Α). Στο επίπεδο αλληλοεπικάλυψης των

ΜΣ σχηματίζεται η κυτταρική πλάκα. Καθώς προχωρεί η κυτοκίνηση, το σύστημα φραγμοπλάστη/κυτταρικής πλάκας επεκτείνεται προς την περιφέρεια του κυττάρου με πολυμερισμό νέων ΜΣ στα περιθώριά του. Ταυτοχρόνως, αποπολυμερίζονται οι ΜΣ στις κεντρικές θέσεις, όπου η κυτταρική πλάκα έχει σταθεροποιηθεί (Εικ. 21B, Εικ. 22B). Συγχρόνως με την επέκταση του συστήματος φραγμοπλάστη/κυτταρικής πλάκας, συνεχίζεται και η ανασυγκρότηση των θυγατρικών πυρήνων με την ολοκλήρωση της συγκρότησης του πυρηνικού φακέλου και την αποσυσπείρωση της χρωματίνης (ένθετες Εικ. 21A,B και ένθετη Εικ. 22A).



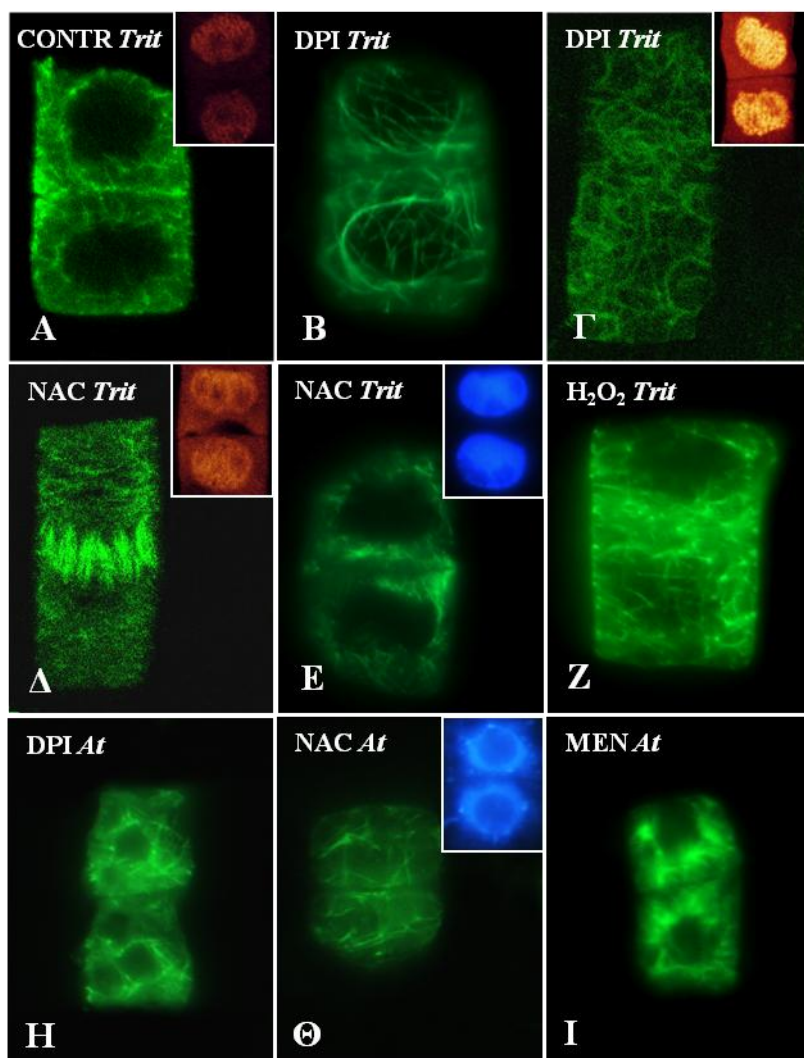
Εικόνα 21. Κυτοκινητικά κύτταρα ακρόρριζων *T. turgidum* φυσιολογικών (A,B) και επηρεασμένων από DPI (Γ-Ε), NAC (Ζ-Ι), MEN (Κ,Λ) και H₂O₂ (Μ) αρτιβλάστων, όπως φαίνονται έπειτα από ανοσοσέμανση της σωληνίνης. Οι (Γ,Ζ,Η,Λ) αντιπροσωπεύουν προβολή οπτικών τομών CLSM, ενώ οι υπόλοιπες εικόνες έχουν ληφθεί με μικροσκόπιο επιφθορισμού. Στις ένθετες εικόνες παρουσιάζονται οι θυγατρικοί πυρήνες των κυττάρων, μετά τη χρώση του DNA με Hoechst 33258 (μπλε χρώμα), ενώ στις (Γ,Ζ,Η,Λ) με κόκκινο χρώμα φαίνονται οι θυγατρικοί πυρήνες μετά από χρώση με PI. Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 25 μ M 2 h, NAC: 250 μ M 2 h, MEN: 25 μ M 2 h, H₂O₂: 4 μ M 1 h. Μεγέθυνση: X1100.

Τα επηρεασμένα κυτοκινητικά κύτταρα των ακρόρριζων των φυτών *T. turgidum* και *A. thaliana*, τα οποία έχουν υποστεί επίδραση με ουσίες που διαταράσσουν την ομοιόσταση των ROS, παρουσιάζουν σειρά ατυπιών. Στα κύτταρα, τα οποία εισέρχονται σε επίδραση σε φάση κατά την οποία είχε αρχίσει η οργάνωση του φραγμοπλάστη, διαπιστώθηκε αδυναμία επέκτασής του προς την περιφέρεια του κυττάρου. Συγχρόνως, διατηρούνται τα πολυμερή σωληνίνης στις κεντρικές περιοχές του φραγμοπλάστη (Εικ. 21Δ,Ε,Η,Λ, Εικ. 22Ε,Ζ). Σε ορισμένα κύτταρα, το διαζωνικό σύστημα αποτυγχάνει να μετασχηματιστεί σε φραγμοπλάστη. Ως αποτέλεσμα, σε αυτά τα κύτταρα, μεταξύ των θυγατρικών πυρήνων που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο ανασυγκρότησης, παρεμβάλλονται μάζες πολυμερών σωληνίνης, άτακτα διευθετημένες (Εικ. 21Γ,Ζ,Θ,Ι,Κ, Εικ. 22Γ,Δ). Τα πολυμερή αυτά δεν διαμορφώνουν διπολικό σύστημα και χαρακτηρίζονται από αδυναμία επέκτασης προς την περιφέρεια του κυττάρου. Στα επηρεασμένα κυτοκινητικά κύτταρα επάγεται επίσης η δημιουργία πολυμερών σωληνίνης σε τυχαίες κυτοπλασματικές θέσεις. Άτυπα πολυμερή βρίσκονται γύρω από τους θυγατρικούς πυρήνες, σε θέσεις μεταξύ των θυγατρικών πυρήνων ή μακριά από αυτούς (Εικ. 21Γ,Δ,Ζ,Κ,Λ,Μ, Εικ. 22Δ,Ε).



Εικόνα 22. Κυτοκινητικά κύτταρα ακρόρριζων *A. thaliana* φυσιολογικών (Α,Β) και επηρεασμένων με DPI (Γ), NAC (Δ,Ε), MEN (Ζ) αρτιβλάστων, όπως φαίνονται έπειτα από ανοσοσήμανση της σωληνίνης. Οι εικόνες έχουν ληφθεί με μικροσκόπιο επιφθορισμού. Στις ένθετες εικόνες παρουσιάζονται οι θυγατρικοί πυρήνες των κυττάρων, μετά τη χρώση του DNA με Hoechst 33258. Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 25 μM 2 h, NAC: 250 μM 2 h, MEN: 25 μM 2 h, H₂O₂: 4 μM 1 h. Μεγέθυνση: X1100.

Οι ατυπίες οργάνωσης του φραγμοπλάστη επιτρέπουν στους θυγατρικούς πυρήνες να πλησιάζουν μεταξύ τους και να συντήκονται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυπλοειδικών πυρήνων, ενώ η διατάραξη στην οργάνωση της κυτταρικής πλάκας οδηγεί στη δημιουργία διπύρηνων κυττάρων (βλέπε ενότητα III.9.1). Όπως θα περιγραφεί παρακάτω, στα επηρεασμένα κύτταρα διαταράσσεται ή αναστέλλεται η δημιουργία της κυτταρικής πλάκας.



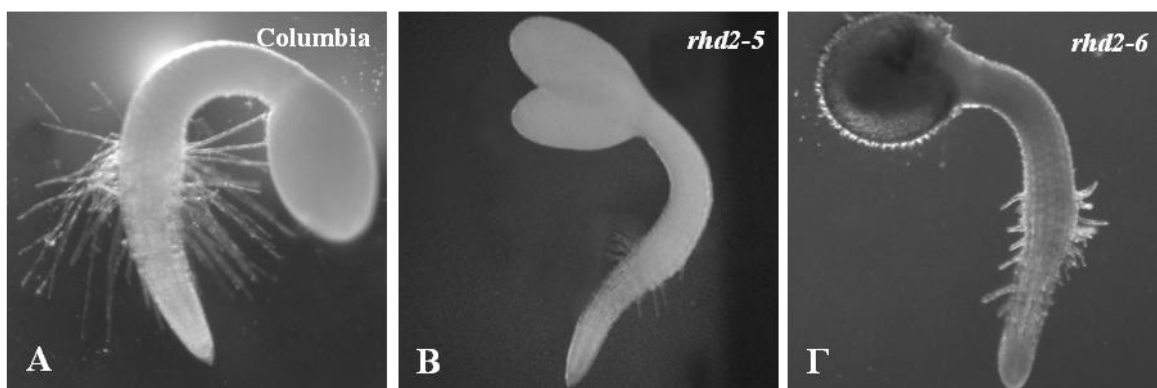
Εικόνα 23. Μετακυτοκινητικά κύτταρα ακρόρριζων *T. turgidum* (A-Z) και *A. thaliana* (H-I), από φυσιολογικά (A) και επηρεασμένα από DPI (B,Γ,H), NAC (Δ,E,Θ), MEN (I) και H₂O₂ (Z) αρτίβλαστα, όπως φαίνονται μετά από ανοσοσθήμανση της σωληνίνης. Οι (A,Γ,Δ) αντιπροσωπεύουν προβολή οπτικών τομών CLSM, ενώ οι υπόλοιπες εικόνες έχουν ληφθεί με μικροσκόπιο επιφθορισμού. Στις ένθετες εικόνες παρουσιάζονται οι θυγατρικοί πυρήνες, έπειτα από χρώση του DNA με Hoechst 33258 (μπλε χρώμα) ή PI (κόκκινο χρώμα, A,B,Γ,Δ). Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 25 μM 2 h, NAC: 500 μM 1 h, MEN: 50 μM 1 h, H₂O₂: 4 μM 1 h. Μεγέθυνση: X1200.

Τα φυσιολογικά μετακυτοκινητικά κύτταρα ακρόρριζου χαρακτηρίζονται από την παρουσία συγκροτημένων θυγατρικών πυρήνων που φέρουν χαρακτηριστικούς νεοσχηματισμένους πυρηνίσκους (ένθετη Εικ. 23A). Οι ΜΣ του φραγμοπλάστη δεν

υφίστανται πλέον, ενώ αυξάνει ο αριθμός των περιπυρηνικών ΜΣ, οι οποίοι συγκροτούν ένα ακτινωτό περιπυρηνικό σύστημα (Εικ. 23Α). Έπεται η οργάνωση των ΜΣ του περιφερειακού συστήματος. Στη συνέχεια, τα κύτταρα εισέρχονται σε μεσόφαση. Τα επηρεασμένα μετακυτοκινητικά κύτταρα συχνά φέρουν μάζες πολυμερών σωληνίνης στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα, οι οποίες δεν σχηματίζουν ακτινωτό περιπυρηνικό σύστημα (Εικ. 23Β,Ε,Η,Ι σύγκρινε με Εικ. 23Α). Σε ορισμένα από αυτά, ενώ η ανασυγκρότηση των θυγατρικών πυρήνων έχει ολοκληρωθεί και έχουν εμφανιστεί περιφερειακά πολυμερή σωληνίνης, στη θέση του φραγμοπλάστη διατηρούνται πολυμερή σωληνίνης (Εικ. 23Δ). Επιπλέον, σε πολλά μετακυτοκινητικά κύτταρα διαταράσσεται η συγκρότηση του περιφερειακού συστήματος πολυμερών σωληνίνης. Στην περιφέρεια των κυττάρων εντοπίζονται άτυπα ευθύγραμμα ή κυκλικά πολυμερή σωληνίνης με τυχαίο προσανατολισμό, τα οποία συχνά σχηματίζουν δίκτυο (Εικ. 23Γ,Θ,Ζ).

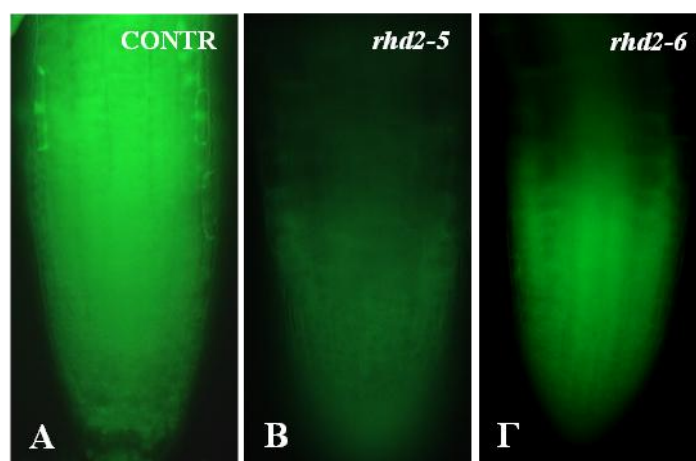
III.5 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ ΤΗΣ ΣΩΛΗΝΙΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΚΡΟΡΡΙΖΟΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ *rhd2*

Από όσα έχουν περιγραφεί προηγουμένως, συνάγεται ότι η επίδραση του DPI, το οποίο, προκαλώντας ανασχεση της δραστηριότητας της NADPH-οξειδάσης, μειώνει τα επίπεδα των ROS, επιφέρει εκτεταμένες αλλαγές στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης. Για την περαιτέρω ενίσχυση της άποψης αυτής, μελετήθηκαν μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis*, τα οποία στερούνται της δραστηριότητας της AtRbohC, μίας από τις 10 συνολικά NADPH-οξειδάσες που διαθέτει το φυτό *A. thaliana*. Τα φυτά αυτά είναι τα μεταλλάγματα *rhd2* και στερούνται της δραστηριότητας της συγκεκριμένης οξειδάσης, επειδή η λειτουργία του γονιδίου της έχει απενεργοποιηθεί με ένθεση T-DNA (Foreman και συν. 2003). Χρησιμοποιήθηκαν δύο σειρές μεταλλαγμάτων, τα *rhd2-5* και *rhd2-6*, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το σημείο του γονιδίου στο οποίο έχει γίνει η ένθεση του T-DNA. Το γονίδιο αυτό εκφράζεται κατά κύριο λόγο στις ρίζες και περισσότερο έντονα στη ζώνη των ριζικών τριχιδίων, στη ζώνη επιμήκυνσης, στα κύτταρα της ριζοδερμίδας και της ενδοδερμίδας και στα ριζικά τριχίδια (Foreman και συν. 2003). Αποτέλεσμα της έλλειψης της δραστηριότητας της AtRbohC στα φυτά *rhd2* είναι η δημιουργία βραχύτερων ριζικών τριχιδίων σε σύγκριση με αυτά του αγρίου τύπου, ενώ φαίνεται ότι έχουν και βραχύτερες ρίζες (Εικ. 24). Ο φαινότυπος των *rhd2-5* φυτών είναι παρόμοιος με εκείνο των *rhd2-6* (Εικ. 24).



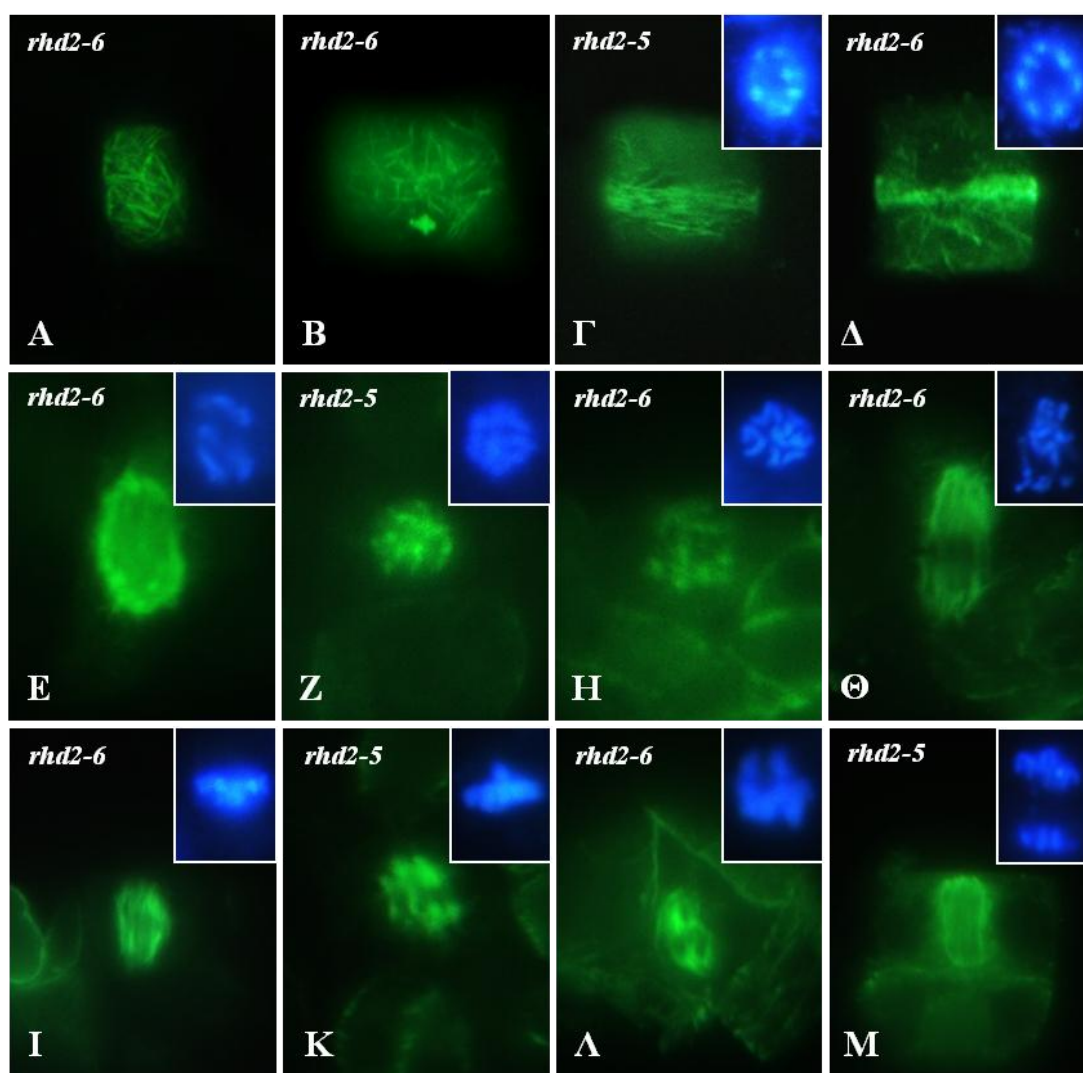
Εικόνα 24. Αρτίβλαστα τριών ημερών φυτών *A. thaliana* αγρίου τύπου (Α) και μεταλλαγμάτων *rhd2-5* (Β) και *rhd2-6* (Γ), όπως φαίνονται στο στερεοσκόπιο. Τα μεταλλάγματα των (Β,Γ) διαθέτουν ριζικά τριχίδια, τα οποία έχουν σημαντικά μικρότερο μήκος σε σύγκριση με εκείνα των φυτών αγρίου τύπου (Α). Επιπλέον, οι ρίζες των φυτών του αγρίου τύπου έχουν μεγαλύτερο μήκος. Μεγέθυνση: X100.

Πραγματοποιήθηκε χρώση με DCF για να διαπιστωθεί εάν η απουσία της AtRbohC επηρεάζει τη συσσώρευση των ROS στα κύτταρα του ακρόρριζου και των μεταλλαγμάτων *rhd2*. Στην Εικ. 25 παρουσιάζονται ακρόρριζα αγρίου τύπου (Α) και των μεταλλαγμάτων *rhd2-5* και *rhd2-6* (Β,Γ), μετά από χρώση με DCF για 30 min. Οι εικόνες έχουν ληφθεί με τον ίδιο χρόνο έκθεσης. Η μελέτη των εικόνων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στα φυτά *rhd2* τα επίπεδα των ROS είναι μειωμένα σε σύγκριση με τα ακρόρριζα των φυτών του αγρίου τύπου (Εικ. 25Β). Η μέτρηση της έντασης στα ακρόρριζα με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού έδειξε ότι αυτή ήταν 47% και 70% αντίστοιχα, της έντασης που προσδιορίστηκε για τα ακρόρριζα του αγρίου τύπου.



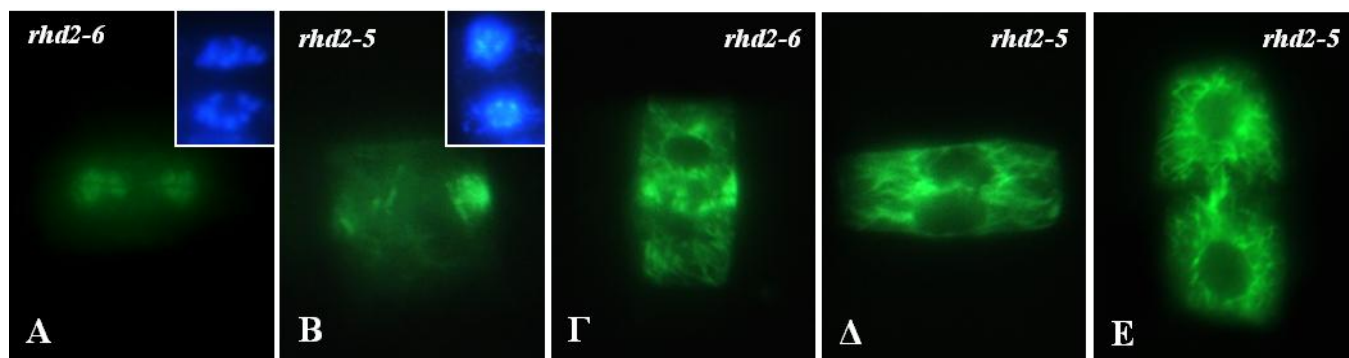
Εικόνα 25. Αρτίβλαστα τριών ημερών φυτών *A. thaliana* αγρίου τύπου (Α) και μεταλλαγμένων *rhd2-5* (Β) και *rhd2-6* (Γ), όπως φαίνονται έπειτα από επώαση με DCF για 30 min και παρατήρηση στο μικροσκόπιο επιφθορισμού. Οι οπτικές τομές διέρχονται από τη ριζοδερμίδα. Μεγέθυνση: X700.

Ακολούθησε ανοσοεντόπιση της σωληνίνης στα ακρόρριζα των φυτών *rhd2*. Βρέθηκε ότι σε πολλά κύτταρα η οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης ήταν τυπική, όμοια με εκείνη των φυτών αγρίου τύπου. Ωστόσο, σε ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων διαπιστώθηκαν ατυπίες συγκρίσιμες με αυτές που εμφανίζονται μετά από επίδραση με DPI και NAC (Εικ. 26). Το εύρημα παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς αυτά τα φυτά δεν υπέστησαν κάποια επίδραση. Στα μεσοφασικά κύτταρα του ακρόρριζου υπήρχαν γραμμικά πολυμερή σωληνίνης πάχους μεγαλύτερου από εκείνου των περιφερειακών ΜΣ των κυττάρων ακρόρριζου αγρίου τύπου (Εικ. 26Α,Β). Επιπλέον, τα πολυμερή αυτά δεν είχαν παράλληλη διάταξη, αλλά ο προσανατολισμός τους ήταν τυχαίος (Εικ. 26Α,Β). Δημιουργούνται όχι μόνο στο περιφερειακό κυτόπλασμα, αλλά και σε άλλες κυτοπλασματικές θέσεις (Εικ. 26Β).



Εικόνα 26. Κύτταρα ακρόρριζου των φυτών *rhd2*, τα οποία βρίσκονται μεσόφαση ή σε διαφορετικές φάσεις της μίτωσης, μετά από ανοσοεντόπιση της σωληνίνης και παρατήρηση στο μικροσκόπιο επιφθορισμού. Στις ένθετες εικόνες, με μπλε χρώμα φαίνονται οι πυρήνες και τα χρωμοσώματα των κυττάρων, μετά από χρώση με Hoechst 33258. Μεγέθυνση: X1200.

Άτυπα πολυμερή παρατηρήθηκαν στο περιφερειακό κυτόπλασμα κυττάρων, τα οποία είχαν εισέλθει στην πρόφαση (Εικ. 26Δ). Αρκετά κύτταρα φαίνεται ότι καθυστερούν να περάσουν από τα διάφορα στάδια της πρόφασης, με αποτέλεσμα την ύπαρξη ασυμφωνίας μεταξύ της συμπίκνωσης της χρωματίνης και του βαθμού ωρίμανσης της προ-προφασικής ζώνης (Εικ. 26Γ,Δ). Στα προφασικά κύτταρα διαπιστώθηκε επίσης απουσία περιπυρηνικών ΜΣ. Συχνά, στα κύτταρα που βρίσκονται στο τέλος της πρόφασης, καθυστερεί η αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια τα προμεταφασικά χρωμοσώματα να περιβάλλονται από πολυμερή σωληνίνης, χωρίς όμως να συνδέονται με τους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων. Ακόμη, παρατηρήθηκαν δεσμίδες ΜΣ συνδεδεμένες με τους κινητοχώρους, χωρίς ωστόσο να έχουν σωστό προσανατολισμό (Εικ. 26Ε,Ζ,Η). Ως αποτέλεσμα της δημιουργίας άτυπης μεταφασικής ατράκτου, τα χρωμοσώματα αποτυγχάνουν να διαταχθούν στο ισημερινό επίπεδο (Εικ. 26Θ,Ι,Κ). Η αναφασική μετακίνηση των χρωμοσωμάτων καθυστερεί, γεγονός που εξηγείται από την οργάνωση άτυπης αναφασικής ατράκτου (Εικ. 26Λ). Τα τελοφασικά κύτταρα διαθέτουν διαζωνικό σύστημα πολυμερών σωληνίνης, η εμφάνιση του οποίου δεν είναι τυπική. Στα ίδια κύτταρα καθυστερεί και η αποδιοργάνωση των δεσμίδων πολυμερών σωληνίνης, τα οποία είναι συνδεδεμένα με τους κινητοχώρους (Εικ. 26Μ).



Εικόνα 27. Κυτοκινητικά (Α-Γ) και μετακυτοκινητικά (Δ,Ε) κύτταρα από ακρόρριζα των φυτών *rhd2*. Στις ένθετες εικόνες με μπλε χρώμα εμφανίζονται οι πυρήνες και τα χρωμοσώματα των κυττάρων, μετά από χρώση με Hoechst 33258. Μεγέθυνση: X1200.

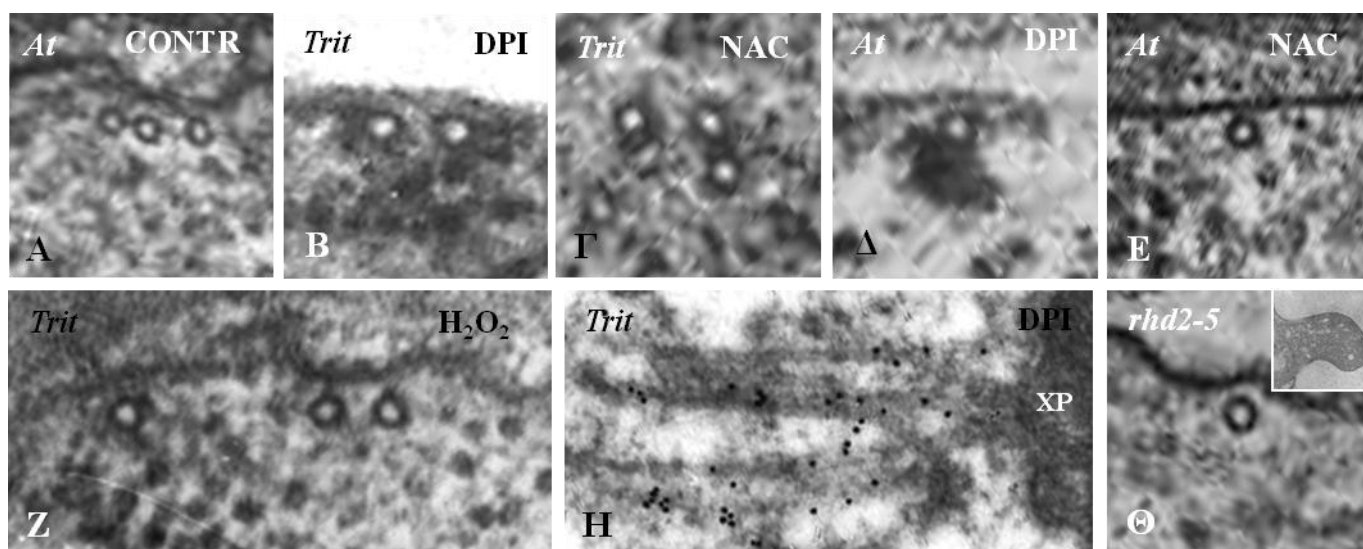
Σε πολλά κυτοκινητικά κύτταρα *rhd2* ο φραγμοπλάστης παρουσιάζει τυπική εμφάνιση. Ωστόσο ακόμη και σε αυτά παρατηρείται καθυστέρηση της επέκτασής του προς την περιφέρεια του κυττάρου (Εικ. 27Α-Γ). Επιπλέον, ο φραγμοπλάστης συχνά αποτελείται από μικρά ανεξάρτητα τμήματα (Εικ. 27Γ), ενώ στη θέση του εντοπίζονται και μάζες από πολυμερή σωληνίνης που δεν σχηματίζουν δύο διακριτά υποσυστήματα (Εικ. 27Β). Παράλληλα, οι ΜΣ του φραγμοπλάστη καθυστερούν να αποδιοργανωθούν στις κεντρικές περιοχές, παρότι αυτός έχει φθάσει στην περιφέρεια του κυττάρου (Εικ. 27Γ). Σε έναν αριθμό μετακυτοκινητικών κυττάρων παρατηρούνται, μεταξύ των δύο θυγατρικών πυρήνων,

παραμένοντες ΜΣ φραγμοπλάστη (Εικ. 27Ε), αλλά και άτυπα πολυμερή σωληνίνης, τα οποία ξεκινούν από το περιπυρηνικό κυτόπλασμα και είναι διευθετημένα ακτινωτά γύρω από τους πυρήνες ή διατρέχουν ολόκληρο το κυτόπλασμα (Εικ. 27Δ,Ε).

III.6 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΤΥΠΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΣΩΛΗΝΙΝΗΣ

III.6.1 Μακροσωληνίσκοι

Με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης διερευνήθηκε η δομή των πολυμερών της σωληνίνης σε φυσιολογικά και επηρεασμένα κύτταρα των φυτών *T. turgidum* και *A. thaliana*, καθώς επίσης και σε κύτταρα ρίζας των μεταλλαγμάτων *rhd2* του φυτού *Arabidopsis*. Μελετήθηκαν τα κύτταρα της ριζοδερμίδας, του φλοιού και του κεντρικού κυλίνδρου στην περιοχή του μεριστώματος και της ζώνης επιμήκυνσης της ρίζας.



Εικόνα 28. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης. (Α) Περιφερειακοί ΜΣ από φυσιολογικό κύτταρο ακρόρριζου *A. thaliana* σε εγκάρσια τομή. (Β-Ζ) Μακροσωληνίσκοι σε εγκάρσια τομή από κύτταρα *T. turgidum* (Β,Γ,Ζ) και *A. thaliana* (Δ,Ε) επηρεασμένα με DPI (Β,Δ), NAC (Γ,Ε) και H_2O_2 (Ζ). Η μεγέθυνση είναι ίδια για τις (Α-Θ). (Η) Μακροσωληνίσκοι από κύτταρο *T. turgidum* επηρεασμένο με DPI, όπως φαίνονται μετά από ανοσοσθήμανση της σωληνίνης με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού (XP, χρωμόσωμα). (Θ) Μακροσωληνίσκος από ριζικό τριχίδιο (ένθετη εικόνα) του μεταλλάγματος *rhd2-5*. Επιδράσεις: CONTR: dH_2O , DPI: 25 μM 1,5h, NAC: 500 μM 1 h, H_2O_2 : 4 mM 1 h. Μεγέθυνση: X60000.

Μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν από εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έδειξαν ότι οι ΜΣ των φυσιολογικών κυττάρων έχουν εξωτερική διάμετρο 19-25 nm περίπου (Εικ. 28Α, Πίνακας 6). Όμως, τα κύτταρα που είχαν υποστεί την επίδραση DPI ή NAC, εκτός από ΜΣ, περιείχαν σωληνοειδείς δομές με εξωτερική διάμετρο μεγαλύτερη από 25 nm (Εικ. 28Β-Ε σύγκρινε με Εικ. 28Α, Πίνακας 6). Το γεγονός αυτό διαπιστώθηκε τόσο σε κύτταρα αρτιβλάστων *T. turgidum* όσο και σε εκείνα του φυτού *A. thaliana*. Η μελέτη δειγμάτων μετά

από ανοσοεντόπιση της σωληνίνης με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού, έδειξε ότι αυτές οι σωληνοειδείς δομές αποτελούνται από σωληνίνη (Εικ. 28H). Το εύρημα αυτό υποστηρίζει ότι η ανάσχεση της καταλυτικής δραστηριότητας της NADPH-οξειδάσης αλλά και η μείωση των επιπέδων των ROS, λόγω της παρουσίας NAC, επάγει τη αφενός την καταστροφή των ΜΣ και αφετέρου τη δημιουργία μακροσωληνίσκων στα κύτταρα του ακρόρριζου. Παρουσιάζει ενδιαφέρον η παρατήρηση μακροσωληνίσκων και σε κύτταρα της ρίζας των αρτιβλάστων των μεταλλαγμάτων *rhd2* του φυτού *Arabidopsis*, τα οποία στερούνται της δράσης της AtRbohC και λόγω αυτού τα επίπεδα των ROS είναι χαμηλά (Εικ. 28Θ, Πίνακας 6). Η επίδραση με H_2O_2 είχε επίσης ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μακροσωληνίσκων (Εικ. 28Ζ, Πίνακας 6). Αντίθετα, όταν η οξειδωτική καταπόνηση προκλήθηκε από την επίδραση με MEN, δεν παρατηρήθηκαν μακροσωληνίσκοι, αλλά ένας άλλος τύπος πολυμερών σωληνίνης, ο οποίος θα περιγραφεί στη συνέχεια.

Ακολούθησε η καταμέτρηση μεγάλου αριθμού ΜΣ και μακροσωληνίσκων των φυσιολογικών και επηρεασμένων κυττάρων και υπολογίστηκαν τα ποσοστά τους, η μέση, η ελάχιστη και η μέγιστη διάμετρός τους. Τα δεδομένα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Με εξαίρεση τα κύτταρα που είχαν υποστεί επίδραση με MEN, τα οποία έφεραν μόνο λίγους ΜΣ, σε όλες σχεδόν τις υπόλοιπες περιπτώσεις οι μακροσωληνίσκοι αποτελούσαν την πλειοψηφία των πολυμερών σωληνίνης και συνυπήρχαν με ένα μικρό πληθυσμό ΜΣ (Πίνακας 6). Το ποσοστό των μακροσωληνίσκων ήταν 93-95% στα κύτταρα *T. turgidum*, τα οποία είχαν υποστεί επίδραση με DPI και NAC (Πίνακας 6). Το αντίστοιχο ποσοστό των κυττάρων του *Arabidopsis* ήταν 71-74% (Πίνακας 6). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η οξειδωτική καταπόνηση με H_2O_2 προκαλεί τη δημιουργία μακροσωληνίσκων, το ποσοστό των οποίων ανέρχεται στο 77,27% του συνόλου των πολυμερών της σωληνίνης (Πίνακας 6). Τα κύτταρα των μεταλλαγμάτων *rhd2* περιείχαν επίσης σημαντικό αριθμό μακροσωληνίσκων (Πίνακας 6). Αυτοί ήταν περισσότεροι στα φυτά *rhd2-6* (63,9%) σε σύγκριση με τα *rhd2-5* (32,4%).

Η διάμετρος των μακροσωληνίσκων που καταμετρήθηκαν κυμαίνεται από 25,92 έως 43,89 nm. Στο φυτό *A. thaliana* οι μακροσωληνίσκοι είχαν μέγιστη εξωτερική διαμέτρου 34,58 nm. Σε όλες τις περιπτώσεις, η μέση τιμή της εξωτερικής διαμέτρου κυμαίνεται από 29,00 nm έως 32,52 nm (Πίνακας 6).

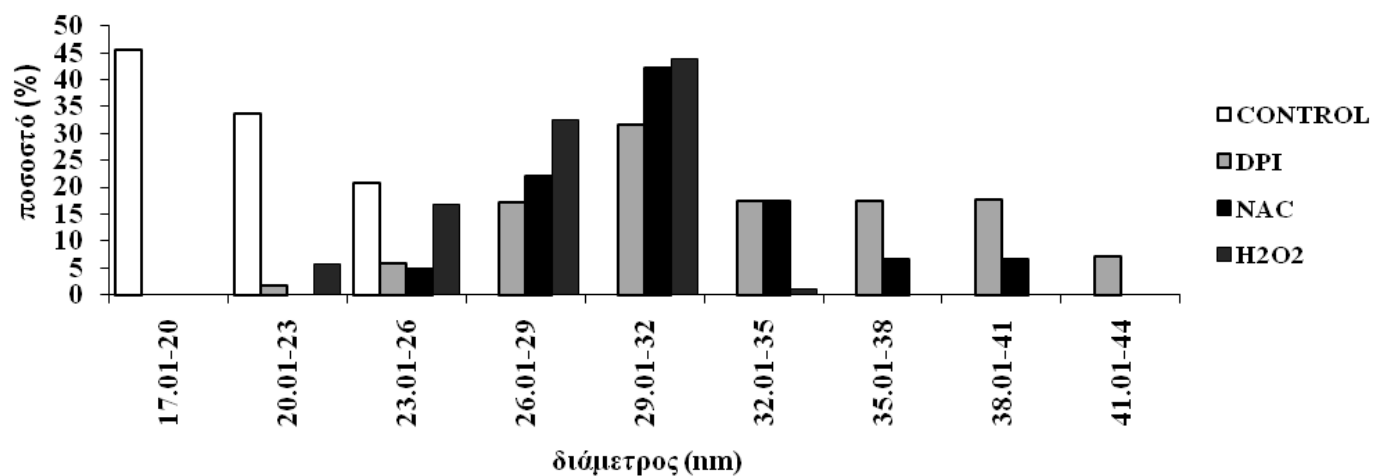
Συχνότητες και εξωτερική διάμετρος πολυμερών σωληνίνης σε κύτταρα ακρόρριζου των φυτών *T. turgidum* και *A. thaliana*

	Μικροσωληνίσκοι			Μακροσωληνίσκοι		
	Συχνότητα %	Εύρος Διαμέτρου (nm)	Μέση Διάμετρος (nm)	Συχνότητα %	Εύρος Διαμέτρου (nm)	Μέση διάμετρος (nm)
<i>Triticum</i>						
CONTROL	100 (n=365)	19.13-25.51	20.67 ± 0.13	0	-	-
DPI	7.4 (n=52)	20.25-25.27	23.77 ± 0.22	92.6 (n=646)	25.92-43.89	32.52 ± 0.16
NAC	4.9 (n=11)	23.49-25.27	24.30 ± 0.29	95.1 (n=212)	25.92-39.90	31.80 ± 0.23
MEN	100 (n=45)	19.95-25.27	22.99 ± 0.30	0	-	-
H ₂ O ₂	22.7 (n=20)	22.61-25.27	24.27 ± 0.30	77.27 (n=68)	26.60-33.25	29.00 ± 0.22
<i>Arabidopsis</i>						
CONTROL	100 (n=286)	19.95-25.27	22.43 ± 0.10	0	-	-
DPI	29.0 (n=34)	19.44-25.27	24.02 ± 0.30	71.0 (n=83)	25.92-34.58	29.49 ± 0.23
NAC	26.0 (n=44)	22.61-25.27	24.29 ± 0.16	74.0 (n=125)	25.92-34.58	29.67 ± 0.21
MEN	100 (n=42)	19.95-25.27	22.45 ± 0.15	0	-	-
<i>rhd2-5</i>	67.6 (n=234)	19.95-25.27	22.94 ± 0.12	32.4 (n=112)	25.92-34.58	29.3 ± 0.17
<i>rhd2-6</i>	34.1 (n=317)	19.95-25.27	23.56 ± 0.10	63.9 (n=560)	26.60-34.58	29.8 ± 0.08

Πίνακας 6. Οι τιμές της εξωτερικής διαμέτρου, η μέση διάμετρος και οι συχνότητες των πολυμερών σωληνίνης, όπως προέκυψαν από την ανάλυση των εικόνων του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (n: ο αριθμός των πολυμερών που καταμετρήθηκαν σε κάθε περίπτωση).

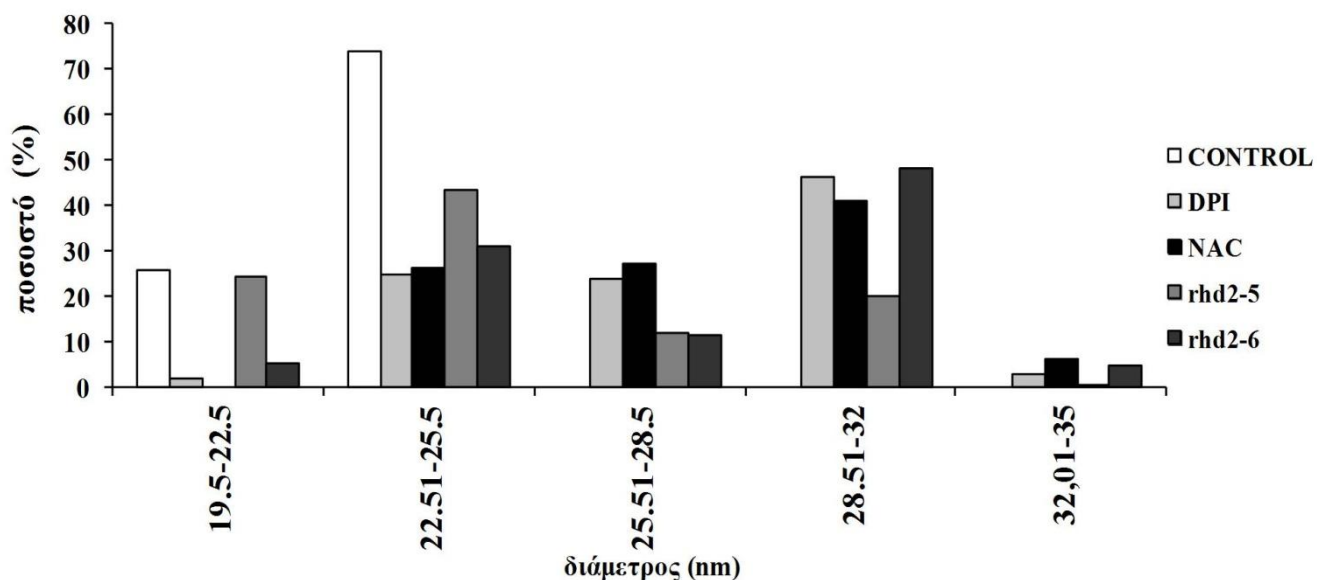
Ακολούθησε κατάταξη των πολυμερών της σωληνίνης σε κατηγορίες, ανάλογα με την εξωτερική τους διάμετρο, και υπολογίστηκαν οι συχνότητες των πολυμερών για κάθε μία από αυτές. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στις Εικ. 29, 30. Η Εικ. 29 περιλαμβάνει τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στα φυσιολογικά και επηρεασμένα κύτταρα των ακρόρριζων του φυτού *T. turgidum*, ενώ η Εικ. 30 εκείνες των αρτιβλάστων του *A. thaliana*. Στο *T. turgidum* τα περισσότερα πολυμερή είχαν εξωτερική διάμετρο μεταξύ 29,0-32,00 nm και 28,51-32,00 nm στο *A. thaliana* (Εικ. 29,30).

Triticum turgidum διάμετρος πολυμερών σωληνίνης



Εικόνα 29. Κατάταξη των πολυμερών της σωληνίνης που μετρήθηκαν στα κύτταρα του φυτού *T. turgidum* με βάση την εξωτερική τους διάμετρο. CONTROL: H₂O, DPI: 50 μM 2 h, NAC: 500 μM 1 h, H₂O₂: 4 mM 1 h.

Arabidopsis thaliana διάμετρος πολυμερών σωληνίνης



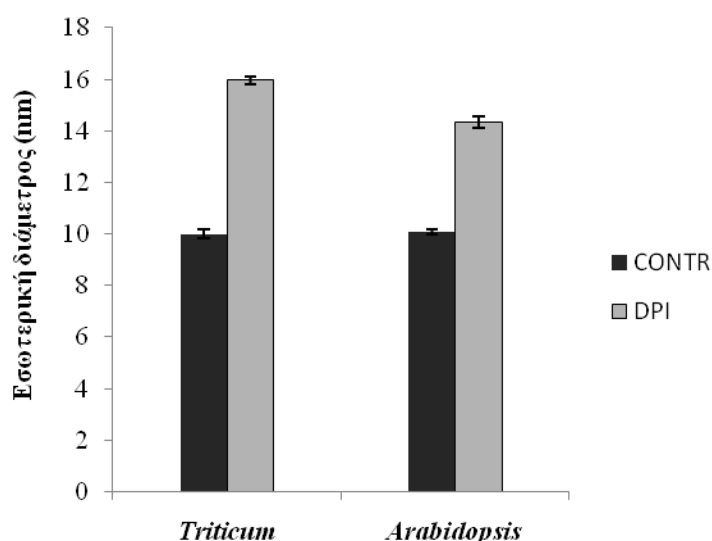
Εικόνα 30. Κατάταξη των πολυμερών της σωληνίνης που μετρήθηκαν στα κύτταρα του φυτού *A. thaliana* με βάση την εξωτερική τους διάμετρο. CONTROL: H₂O, DPI: 50 μM 2 h, NAC: 500 μM 1 h.

Επιπλέον, εξετάστηκε εάν η αύξηση της εξωτερικής διαμέτρου των μακροσωληνίσκων συνοδεύεται και από ανάλογη αύξηση της εσωτερικής διαμέτρου. Η εσωτερική διάμετρος υπολογίστηκε, όπως ακριβώς και η εξωτερική. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι οι μακροσωληνίσκοι δεν διαθέτουν μόνο μεγαλύτερη εξωτερική διάμετρο από εκείνη των ΜΣ, αλλά και εσωτερική (Πίνακας 7).

Εσωτερική διάμετρος πολυμερών σωληνίνης σε κύτταρα ακρόρριζου των φυτών *T. Turgidum* και *A. thaliana*

	<i>Triticum</i>	<i>Arabidopsis</i>
Επίδραση	Μέση Διάμετρος (nm)	Μέση Διάμετρος (nm)
CONTROL	10 ± 0.11 (n=158)	10.07 ± 0.16 (n=101)
DPI	15.96 ± 0.15 (n=112)	14.32 ± 0.22 (n=102)

Πίνακας 7. Η μέση εσωτερική διάμετρος των πολυμερών της σωληνίνης σε φυσιολογικά και επηρεασμένα κύτταρα ακρόρριζων *T. turgidum* και *A. thaliana*. Επιδράσεις: CONTROL: H₂O, DPI: 50 μM 2 h. (n: ο αριθμός των πολυμερών που καταμετρήθηκαν σε κάθε περίπτωση).



Εικόνα 31. Διαγραμματική απεικόνιση των δεδομένων των μετρήσεων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Στην Εικ. 31 παρατίθεται το διάγραμμα που προέκυψε από τα δεδομένα του Πίνακα 7. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η μέση εσωτερική διάμετρος των πολυμερών της σωληνίνης που συγκροτούνται παρουσία DPI είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την αντίστοιχη των ΜΣ των φυσιολογικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, αυτή ήταν 60% μεγαλύτερη από εκείνη των ΜΣ στην περίπτωση του *T. turgidum* και 39% μεγαλύτερη στο *A. thaliana* (Πίνακας 7, Εικ. 31).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα πολυμερή της σωληνίνης των κυττάρων του ακρόρριζου των μεταλλαγμάτων του φυτού *Arabidopsis* είναι μακροσωληνίσκοι και ΜΣ. Αυτό διαπιστώθηκε στα μεταλλάγματα και των δύο διαγονιδιακών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή στα φυτά *rhd2-5* και *rhd2-6* (Πίνακας 6, Εικ. 30). Στις σειρές αυτές, μελετήθηκε επίσης το ποσοστό εμφάνισης των μακροσωληνίσκων σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους της ρίζας (Πίνακας 8). Τα μεγαλύτερα ποσοστά μακροσωληνίσκων στο σύνολο των πολυμερών σωληνίνης διαπιστώθηκαν στα ριζικά τριχίδια. Το ποσοστό τους στα κύτταρα της ριζοδερμίδας και ενδοδερμίδας στη ζώνη επιμήκυνσης ήταν επίσης υψηλό (Πίνακας 8). Στη ριζοδερμίδα στην περιοχή του μεριστώματος της ρίζας οι μακροσωληνίσκοι ήταν 32,7% και 24,5% των πολυμερών σωληνίνης, στα κύτταρα της ρίζας των φυτών *rhd2-5* και *rhd2-6*, αντίστοιχα (Πίνακας 8). Τέλος, δεν εντοπίστηκαν μακροσωληνίσκοι στα διαφοροποιούμενα τραχειακά στοιχεία των φυτών *rhd2* (Πίνακας 8). Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι το πρότυπο εμφάνισης των μακροσωληνίσκων στα φυτά *rhd2* συμπίπτει με το αντίστοιχο της έκφρασης του γονιδίου της AtRbohC (Foreman και συν. 2003). Αυτό υποδηλώνει ότι η απώλεια της δραστηριότητας της NADPH-οξειδάσης AtRbohC συνδέεται με την εμφάνιση μακροσωληνίσκων στο ακρόρριζο των φυτών *rhd2*.

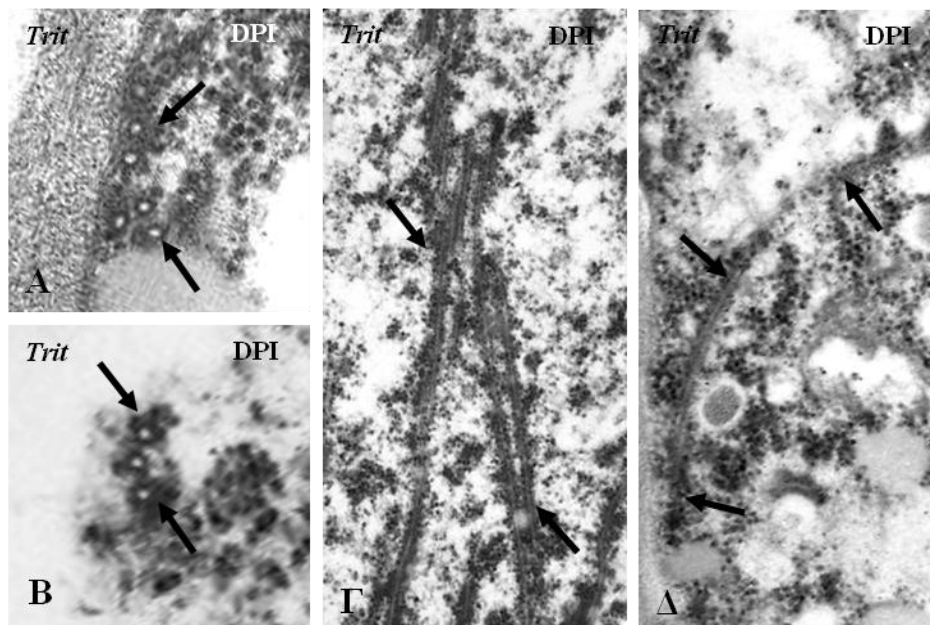
Συχνότητες πολυμερών της σωληνίνης σε κύτταρα ρίζας μεταλλαγμάτων *rhd2* του φυτού *A. thaliana*

Κυτταρικός τύπος	Μακροσωληνίσκοι	Μικροσωληνίσκοι
Ριζικά τριχίδια (<i>rhd2-5</i>)	89.3 % (n=75)	10.7 % (n=9)
Ριζοδερμίδα-Ζώνη Επιμήκυνσης (<i>rhd2-6</i>)	80.6 % (n=282)	19.4 % (n=68)
Ενδοδερμίδα-Ζώνη Επιμήκυνσης (<i>rhd2-6</i>)	77.7 % (n=254)	22.3 % (n=73)
Ριζοδερμίδα-Μερίστωμα (<i>rhd2-5</i>)	32.7 % (n=35)	67.3 % (n=72)
Ριζοδερμίδα-Μερίστωμα <i>rhd2-6</i>)	24.5 % (n=37)	75.5 % (n=114)
Τραχειακά στοιχεία (<i>rhd2-5</i>)	0 %	100 % (n=111)
Τραχειακά στοιχεία (<i>rhd2-6</i>)	0 %	100 % (n=86)

Πίνακας 8. Συχνότητες εμφάνισης των πολυμερών σωληνίνης στους διάφορους κυτταρικούς τύπους της ρίζας των μεταλλαγμάτων *rhd2* του φυτού *Arabidopsis* (n: ο αριθμός των πολυμερών που καταμετρήθηκαν σε κάθε περίπτωση).

Η μελέτη λεπτών τομών με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε ότι πλήθος μεμονωμένων μακροσωληνίσκων, αλλά και δεσμίδες μακροσωληνίσκων, διατρέχουν το κυτόπλασμα χωρίς συγκεκριμένο προσανατολισμό (Εικ. 32Α-Γ). Επιπλέον, παρατηρήθηκαν και καμπύλοι μακροσωληνίσκοι (Εικ. 32Δ). Τα δεδομένα που προέκυψαν με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης επιβεβαιώνουν εκείνα που προέκυψαν μετά από ανοσοσήμανση της σωληνίνης. Προφανώς, οι δεσμίδες μακροσωληνίσκων αντιστοιχούν στα γραμμικά πολυμερή σωληνίνης. Επιπλέον, η ικανότητα των μακροσωληνίσκων να λαμβάνουν καμπύλο σχήμα θα μπορούσε να οδηγήσει στη συγκρότηση κυκλικών διατάξεων,

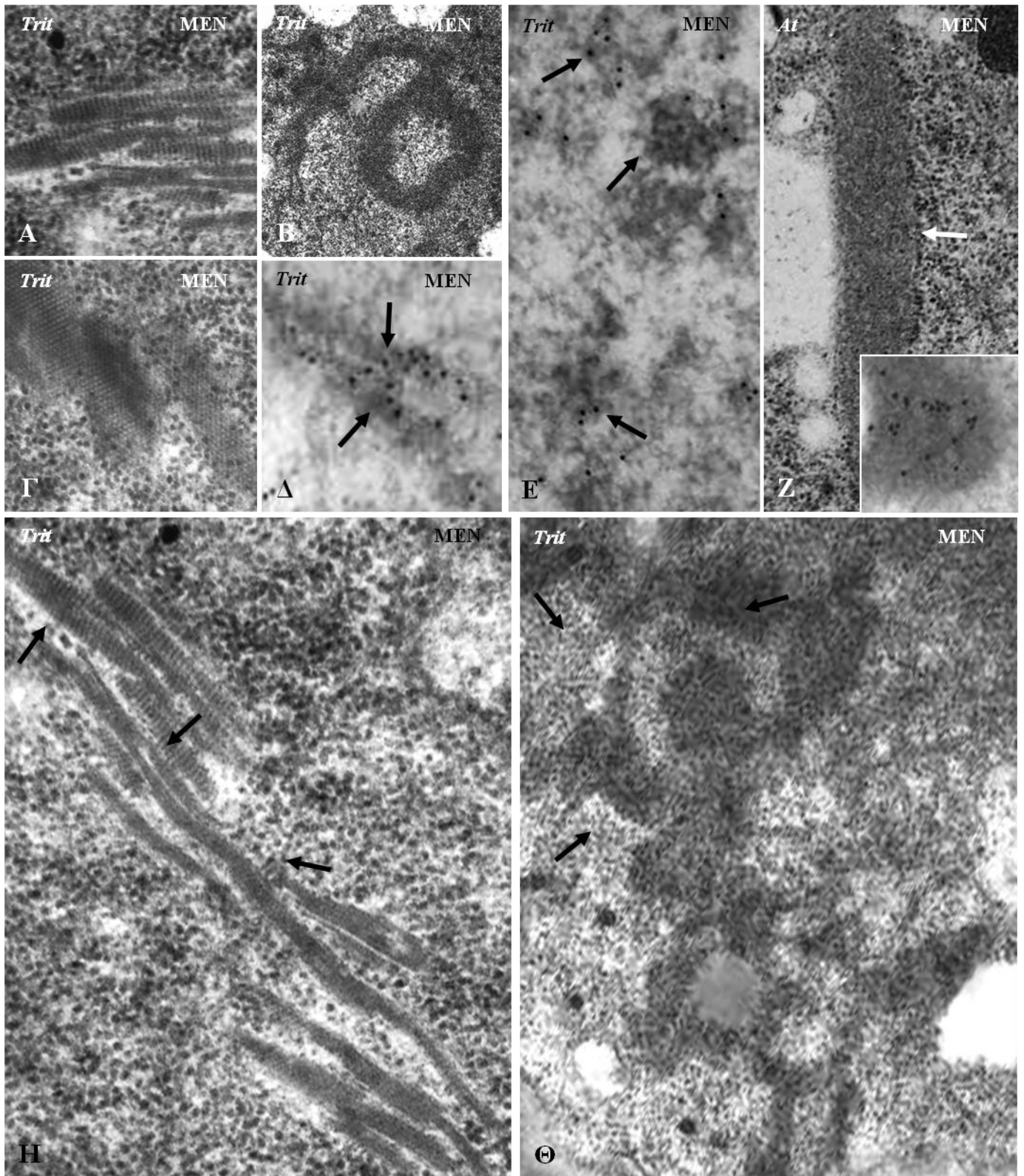
που να αντιστοιχούν στα κυκλικά πολυμερή σωληνίνης που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο επιφθορισμού (Εικ. 32 σύγκρινε με Εικ. 9). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι όταν διαταράσσεται η ομοιόσταση των ROS μπορούν να παρατηρηθούν μεμονωμένοι μακροσωληνίσκοι, δεσμίδες μακροσωληνίσκων ή ακόμη και διπολικά συστήματα μακροσωληνίσκων σε διάφορες περιοχές του κυτοπλάσματος (Εικ. 32).



Εικόνα 32. (Α-Δ) Κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum* επηρεασμένα με DPI, όπως φαίνονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Τα βέλη δείχνουν τους μακροσωληνίσκους. (Α,Β) Μακροσωληνίσκοι σε εγκάρσια τομή, οι οποίοι σχηματίζουν δεσμίδες στο περιφερειακό κυτόπλασμα (Α) και το ενδόπλασμα (Β). (Γ) Δεσμίδα μακροσωληνίσκων σε κατά μήκος τομή. (Δ) Μακροσωληνίσκος σε κατά μήκος τομή, ο οποίος εμφανίζει καμπύλο σχήμα. Επιδράσεις: DPI: 25 μ M 2 h. Μεγέθυνση: X50000.

III.6.2. Παρακρύσταλλοι σωληνίνης

Αν και η επίδραση με MEN δεν προκαλεί δημιουργία μακροσωληνίσκων, σε επηρεασμένα κύτταρα *T. turgidum* και *A. thaliana* βρέθηκαν ελάχιστοι ΜΣ (Πίνακας 6). Το γεγονός υποδηλώνει ότι η MEN επάγει την εξαφάνιση των τυπικών ΜΣ.



Εικόνα 33. Παρακρύσταλλοι σωληνίνης (βέλη στις Z,H) και συγκεντρώσεις ηλεκτρονιόπυκνου υλικού (βέλη στις E,Θ) σε επηρεασμένα κύτταρα ακρόρριζου των φυτών *T. turgidum* (A-E,H,Θ) και *A. thaliana* (Z). (Δ,E, Z ένθετη) Ανοσοσήμανση της σωληνίνης με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού. Το κοκκία χρυσού εντοπίζονται σε συγκεντρώσεις άμορφου ηλεκτρονιόπυκνου υλικού και στους παρακρυστάλλους. Επιδράσεις: MEN: 50 μ M 1 h. Μεγέθυνση: (A-Γ) X25000, (Δ,E) X80000, (Z) X30000, (H,Θ) X35000.

Τα κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί οξειδωτική καταπόνηση, έπειτα από επίδραση με MEN, διέθεταν παρακρυσταλλικούς σχηματισμούς με δομή παρόμοια με εκείνη των παρακρυστάλλων σωληνίνης που έχουν περιγραφεί σε άλλες περιπτώσεις (Apostolakis και συν. 1990, Karagiannidou και συν. 1995, Εικ. 33Α,Γ,Ζ). Επιπλέον, στο κυτόπλασμα των επηρεασμένων κυττάρων βρέθηκαν ηλεκτρονιόπυκνες συγκεντρώσεις άμορφου υλικού (Εικ. 33Β,Θ). Η ανοσοεντόπιση της σωληνίνης με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού αποκάλυψε ότι τόσο οι παρακρυσταλλικές δομές, όσο και το άμορφο υλικό περιέχουν ή αποτελούνται από σωληνίνη. Στις δομές αυτές εντοπίζονται κοκκία χρυσού (Εικ. 33Δ-Ζ). Οι σχηματισμοί αυτοί συχνά καταλαμβάνουν μεγάλο μέρος του κυτοπλάσματος και σχηματίζουν δίκτυα (Εικ. 33Η,Θ). Επομένως, είναι λογική η υπόθεση ότι αυτά τα δίκτυα αντιστοιχούν στο διάχυτο πρότυπο κατανομής των πολυμερών της σωληνίνης που διαπιστώθηκε στα επηρεασμένα κύτταρα, μετά από ανοσοσήμανση της σωληνίνης, στο μικροσκόπιο επιφθορισμού (Εικ. 33 σύγκρινε με Εικ. 9).

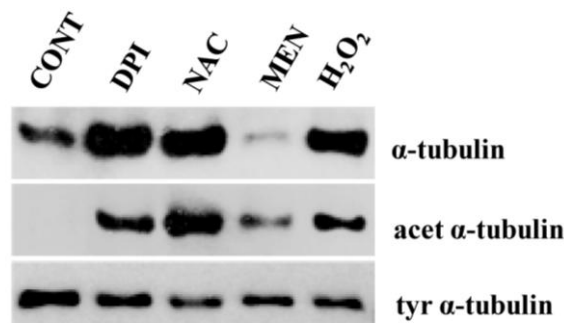
III.7 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΤΥΠΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΣΩΛΗΝΙΝΗΣ

III.7.1 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επάγει αλλαγές στη σωληνίνη

Ακολούθως, διερευνήθηκαν οι μηχανισμοί με τους οποίους οι μεταβολές στα επίπεδα των ROS προκαλούν την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης και τη δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης. Αρχικά μελετήθηκε κατά πόσο η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS σχετίζεται με το πρότυπο των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της σωληνίνης στα κύτταρα του ακρόρριζου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση πρωτεϊνών από ρίζες αρτιβλάστων *T. turgidum* που υπέστησαν την επίδραση ουσιών, οι οποίες μεταβάλλουν τα επίπεδα των ROS. Την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και προσδιορισμός των επιπέδων της ολικής α-σωληνίνης, της τυροσινωμένης α-σωληνίνης και της ακετυλιωμένης α-σωληνίνης με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων.

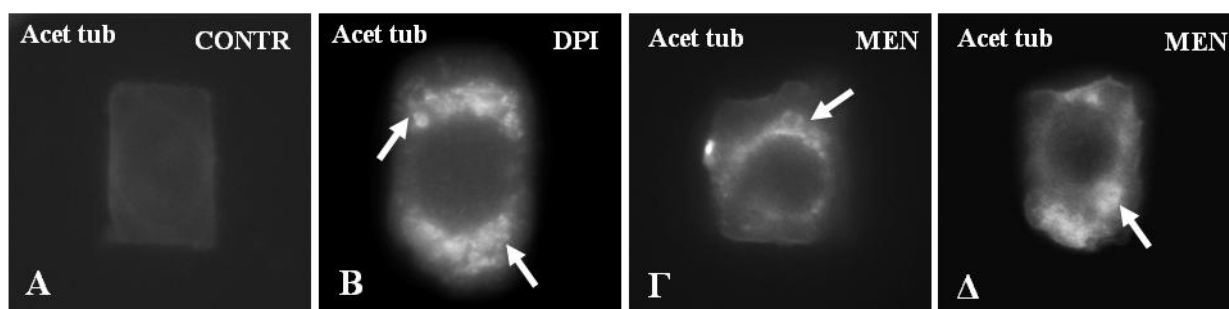
Η μελέτη των επιπέδων της σωληνίνης αποκάλυψε ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS προκαλεί μεταβολές στα επίπεδα της α-σωληνίνης. Διαπιστώθηκε ότι η ανάσχεση της NADPH-οξειδάσης από το DPI, η εξουδετέρωση των ROS από την NAC αλλά και η οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από το H₂O₂ αυξάνει τα επίπεδα της σωληνίνης (Εικ. 34). Αντίθετα, τα επίπεδα της α-σωληνίνης των κυττάρων που είχαν υποστεί επίδραση με MEN, ήταν σημαντικά μειωμένα σε σύγκριση με εκείνα των φυσιολογικών ακρόρριζων (Εικ. 34). Επιπλέον, με τη χρήση του αντισώματος 6-11B-1, διαπιστώθηκε ότι σε όλες τις επιδράσεις επάγεται η ακετυλίωση της σωληνίνης (Εικ. 34). Το αντίσωμα αυτό ανιχνεύει εκλεκτικά τη α-σωληνίνη, η οποία έχει υποστεί ακετυλίωση της λυσίνης στη θέση 40. Το γεγονός αυτό παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς η ακετυλιωμένη ισομορφή της α-σωληνίνης

απουσιάζει από τα φυσιολογικά κύτταρα της ρίζας του φυτού *T. turgidum* (Εικ. 34). Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS προκαλεί μείωση των επιπέδων της τυροσινιωμένης α -σωληνίνης (Εικ. 34).



Εικόνα 34. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ριζών του φυτού *T. turgidum*. Τα αρτίβλαστα παρέμειναν στο διάλυμα της επίδρασης για 1 h. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 20 μ g πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε με την μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών Bradford. Επιδράσεις: CONT: dH₂O, DPI: 25 mM, NAC: 250 mM, MEN: 25 mM, H₂O₂: 4 mM.

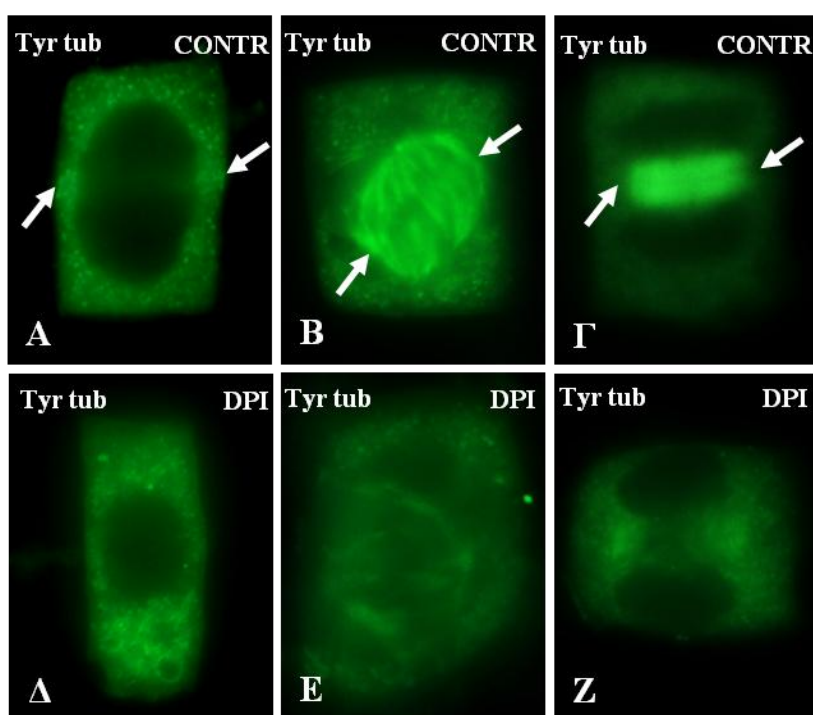
Η παρουσία της ακετυλιωμένης α -σωληνίνης στα επηρεασμένα κύτταρα του ακρόρριζου επιβεβαιώθηκε με ανοσοσήμανση, με τη χρήση του ίδιου αντισώματος. Οι ΜΣ των φυσιολογικών κυττάρων του ακρόρριζου δεν περιέχουν ακετυλιωμένη σωληνίνη (Εικ. 35Α). Αντίθετα, στα επηρεασμένα ακρόρριζα, η ισομορφή αυτή ανιχνεύεται στις κυτταρικές θέσεις, όπου εντοπίζονται συναθροίσεις άτυπων πολυμερών σωληνίνης (Εικ. 35Β-Γ).



Εικόνα 35. Κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum*, από φυσιολογικά (Α) και επηρεασμένα με DPI (Β) και MEN (Γ,Δ) αρτίβλαστα, όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο επιφθορισμού, μετά από ανοσοσήμανση της ακετυλιωμένης σωληνίνης με το αντίσωμα 6-11B-1. Στα φυσιολογικά κύτταρα δεν ανιχνεύεται σήμα φθορισμού ακετυλιωμένης σωληνίνης (Α). Αντίθετα, στα επηρεασμένα κύτταρα ακετυλιωμένη σωληνίνη εντοπίζεται σε διάφορες κυτοπλασματικές θέσεις (βέλη στις Β-Δ). Επιδράσεις: CONTR: dH₂O, DPI: 25 mM 1 h, MEN: 50 mM 2 h. Μεγέθυνση: X1000.

Επιπλέον, διερευνήθηκε εάν η μείωση της τυροσινιωμένης α -σωληνίνης που πιστοποιήθηκε μετά από ανίχνευση των επιπέδων της σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των

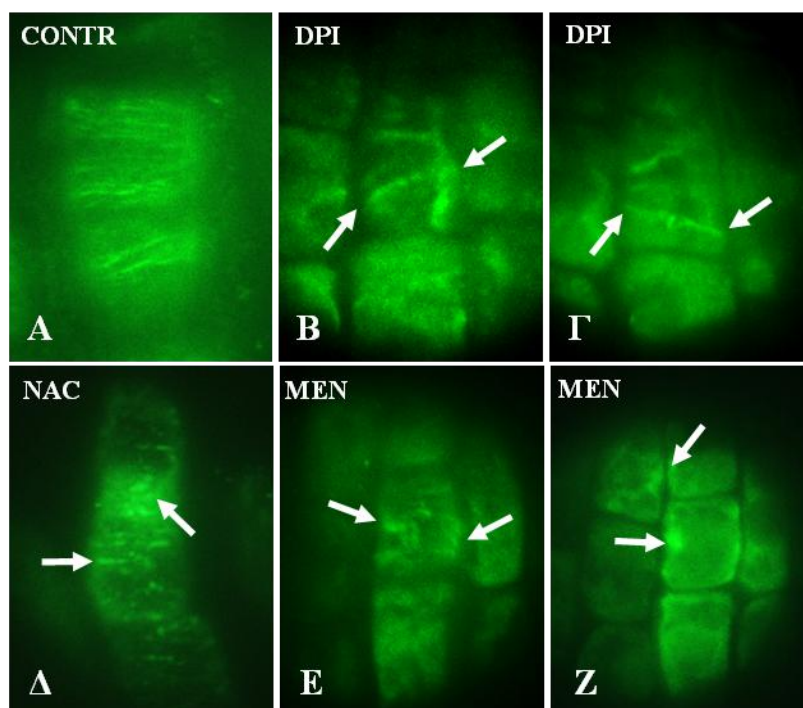
επηρεασμένων ακρόρριζων, αντικατοπτρίζεται στα διάφορα συστήματα των άτυπων πολυμερών σωληνίνης. Στα φυσιολογικά κύτταρα η τυροσινιωμένη α -σωληνίνη απαντά σε όλα τα συστήματα ΜΣ (Εικ. 36Α-Γ). Η παρουσία της είναι πολύ έντονη στους ΜΣ των διπολικών συστημάτων, όπως εκείνους της μιτωτικής ατράκτου ή του φραγμοπλάστη και ανιχνεύεται σε μικρότερο βαθμό στους περιφερειακούς ΜΣ (Εικ. 36Α-Γ). Στα επηρεασμένα ακρόρριζα, τα άτυπα πολυμερή σωληνίνης των μεσοφασικών, μιτωτικών και κυτοκινητικών κυττάρων περιέχουν τυροσινιωμένη α -σωληνίνη (Εικ. 36Δ-Ζ). Ωστόσο, η ένταση του σήματος του φθορισμού σε αυτά είναι μειωμένη (Εικ. 36 Δ-Ζ σύγκρινε με Εικ. 36 Α-Γ). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων της τυροσινιωμένης α -σωληνίνης (Εικ. 34).



Εικόνα 36. Κύτταρα του φυτού *T. turgidum* από φυσιολογικά (Α-Γ) και επηρεασμένα με DPI (Δ-Ζ) ακρόρριζα, όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο επιφθορισμού, μετά από ανοσοσθήμανση της τυροσινιωμένης α -σωληνίνης. Στα φυσιολογικά αρτίβλαστα σήμα φθορισμού τυροσινιωμένης α -σωληνίνης εντοπίζεται στην προ-προφασική ζώνη ΜΣ, στη μιτωτική άτρακτο και το φραγμοπλάστη (βέλη στις Α-Γ). Αυτό είναι πιο έντονο στις δύο τελευταίες περιπτώσεις. Αντίθετα, στα επηρεασμένα κύτταρα, στην αντίστοιχη φάση του κυτταρικού κύκλου το σήμα φθορισμού της τυροσινιωμένης α -σωληνίνης είναι πιο ασθενές σε σχέση με τα φυσιολογικά (Δ-Ζ σύγκρινε με Α-Γ). Επιδράσεις: CONTR: dH₂O 1 h, DPI: 25 mM 1 h. Μεγέθυνση: X1100.

III.7.2 Οι MAPs συμμετέχουν στην οργάνωση των άτυπων πολυμερών σωληνίνης

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η πιθανή συμμετοχή MAP πρωτεϊνών στην οργάνωση των άτυπων πολυμερών σωληνίνης, τα οποία δημιουργούνται όταν η ομοιόσταση των ROS διαταράσσεται. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η συμμετοχή της MAP65-1 επειδή έχει συσχετισθεί με τη συγκρότηση παρακρυστάλλων σωληνίνης που δημιουργούνται στα κύτταρα του φυτού *Vigna sinensis*, έπειτα από επίδραση κολχικίνης (Panteris και συν. 2010). Πραγματοποιήθηκε ανοσοεντόπιση με τη βοήθεια ενός αντισώματος που αναγνωρίζει εκλεκτικά την MAP65-1 του φυτού *A. thaliana*.



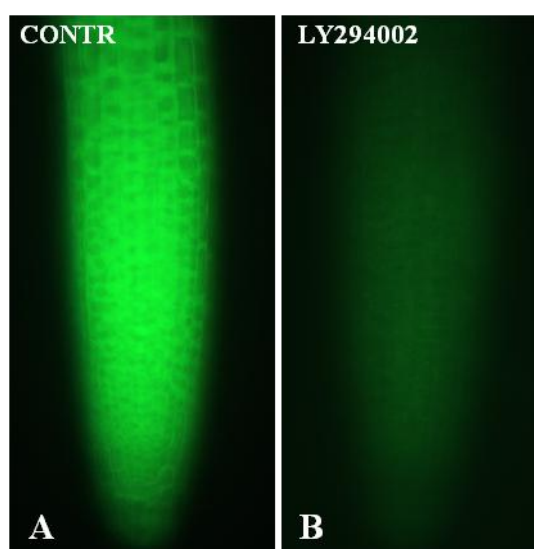
Εικόνα 37. Ανοσοεντόπιση της MAP65-1 σε κύτταρα ακρόρριζου από φυσιολογικά (A) και επηρεασμένα (B-Z) αρτίβλαστα *A. thaliana*. Στην (A) η MAP65-1 συνεντοπίζεται με τους περιφερειακούς ΜΣ, ενώ στα επηρεασμένα κύτταρα η MAP65-1 (βέλη στις B-Z) απαντά σε σχηματισμούς που προσομοιάζουν στα άτυπα πολυμερή σωληνίνης. Επιδράσεις: CONTR: dH₂O 2 h, DPI: 25 μM 2 h, NAC: 250 μM 2 h, MEN: 25 μM 2 h. Μεγέθυνση: X 1100.

Με το αντίσωμα αυτό επιβεβαιώθηκε ότι η MAP65-1 συνεντοπίζεται με τους ΜΣ των κυττάρων των φυσιολογικών ακρόρριζων του φυτού *A. thaliana* (Εικ. 37Α). Στα κύτταρα που έχουν επηρεαστεί με DPI, NAC ή MEN η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται σε σχηματισμούς που έχουν δομή όμοια με εκείνη των άτυπων πολυμερών σωληνίνης αυτών των κυττάρων (Εικ. 37Β-Ζ σύγκρινε με Εικ. 10Β-Δ). Επομένως, η MAP65-1 φαίνεται ότι εμπλέκεται όχι μόνο στη συγκρότηση ή/και οργάνωση των ΜΣ, αλλά επίσης και σε εκείνη των μακροσωληνίσκων και των παρακρυστάλλων σωληνίνης (βλέπε επίσης Panteris και συν. 2010).

III.8 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΜΗΝΥΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΤΥΠΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΣΩΛΗΝΙΝΗΣ

III.8.1 Συμμετοχή της PI3-κινάσης στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης των διαιρούμενων κυττάρων

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής διερευνήθηκαν επίσης πιθανοί μηχανισμοί μεταγωγής μηνύματος, οι οποίοι συμμετέχουν στην καθιέρωση της ομοιόστασης ή την αντίληψη των επιπέδων των ROS και στον έλεγχο της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της σωληνίνης. Μεταξύ άλλων, μελετήθηκε η συμμετοχή του ενζύμου PI3K στα παραπάνω φαινόμενα, λαμβάνοντας υπόψη ότι εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης και επομένως ευθύνεται για την αύξηση της συγκέντρωσης των ROS στα κύτταρα (βλέπε ενότητα 1.1.7.3). Αρτίβλαστα *T. turgidum* και *A. thaliana* υπέστησαν την επίδραση της ουσίας LY294002, η οποία είναι εξειδικευμένος αναστολέας της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου.



Εικόνα 38. Ακρόρριζο μάρτυρα *A. thaliana* (A) και επηρεασμένο με LY294002 (B), μετά από χρώση με DCF, όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο επιφθορισμού. Οι εικόνες είναι εστιασμένες στο επίπεδο της ριζοδερμίδας και έχουν ληφθεί με τον ίδιο χρόνο έκθεσης. Πριν από το τέλος της επίδρασης (30 min) προστέθηκαν στο διάλυμα 25 μ M DCF. Είναι σαφής η διαφορά στην ένταση της ακτινοβολίας μεταξύ (A) (B). Επιδράσεις: CONTR: dH₂O 1 h, LY294002: 50 μ M 2 h. Μεγέθυνση: X600.

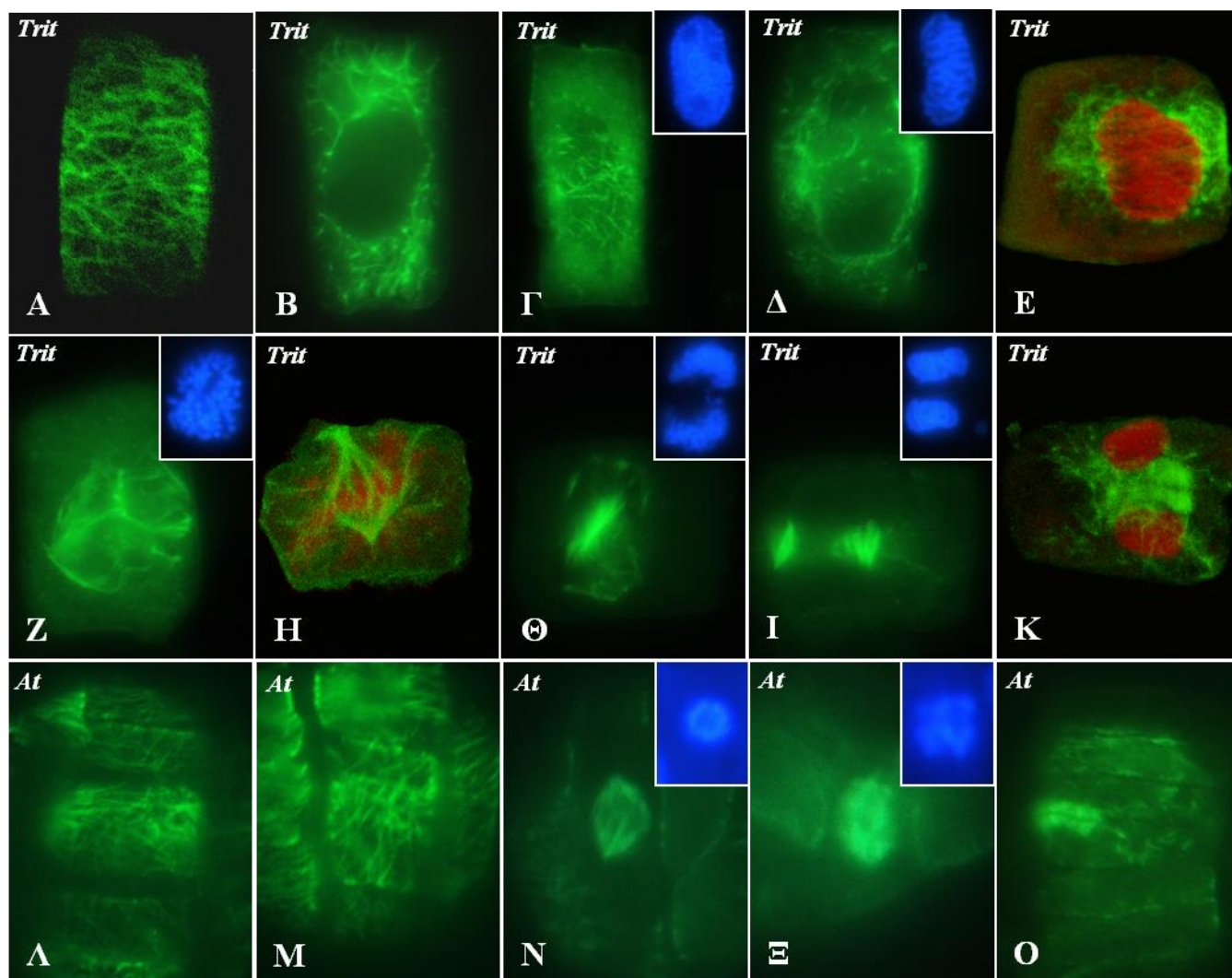
Διαπιστώθηκε ότι η ανάσχεση της δραστηριότητας της PI3K, μετά την επίδραση του LY294002, μεταβάλλει τα επίπεδα των ROS στα ακρόρριζα (Εικ. 38). Στην Εικ. 38 παρουσιάζονται ένα φυσιολογικό και ένα επηρεασμένο ακρόρριζο, μετά από χρώση με DCF. Η σύγκριση της έντασης του φθορισμού των δύο ακρόρριζων της Εικ. 38 αποκαλύπτει την ύπαρξη σημαντικής διαφοράς στα επίπεδα των ROS.

Τα επηρεασμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση ατυπιών στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, οι οποίες έχουν αρκετές ομοιότητες με

εκείνες που προκαλούνται από την επίδραση με DPI. Συγκεκριμένα, στα επηρεασμένα μεσοφασικά κύτταρα απουσιάζει το τυπικό περιφερειακό σύστημα ΜΣ, αυτά διαθέτουν όμως πλήθος άτυπων περιφερειακών πολυμερών σωληνίνης με τυχαία διευθέτηση (Εικ. 39Α,Λ). Σε αρκετές περιπτώσεις, πολυάριθμα άτυπα πολυμερή σωληνίνης διατρέχουν και το ενδόπλασμα (Εικ. 39Β). Συχνά, η προ-προφασική ζώνη ΜΣ απουσιάζει ή αποτελείται από ελάχιστα άτυπα πολυμερή σωληνίνης (Εικ. 39Γ,Μ), ενώ είναι εμφανής και η απουσία τυπικής προφασικής ατράκτου από τα προφασικά κύτταρα (Εικ. 39Δ). Σε ορισμένα από αυτά εντοπίζονται έντονες συναθροίσεις άτυπων πολυμερών σωληνίνης σε ολόκληρο το περιπυρηνικό κυτόπλασμα ή στην περιοχή των πόλων, οι οποίες όμως δεν σχηματίζουν διπολικό σύστημα (Εικ. 39Δ,Ε,Ζ). Επιπλέον, καθυστερεί η αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η απελευθέρωση των προμεταφασικών χρωμοσωμάτων (Εικ. 39Ε,Ζ,Ν).

Τα επηρεασμένα μεταφασικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από έντονες διαταραχές της οργάνωσης της μεταφασικής ατράκτου (Εικ. 39Η). Συνήθως αυτά διαθέτουν δεσμίδες πολυμερών σωληνίνης που συνδέονται με τους κινητοχώρους και εμφανίζουν έντονη σύγκλιση στους πόλους. Υπάρχουν όμως πολλές περιπτώσεις, κατά τις οποίες αυτά δεν έρχονται σε επαφή με τους κινητοχώρους και έχουν τυχαίους προσανατολισμούς (Εικ. 39Η). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία διεύθετησης των κινητοχώρων στο ισημερινό επίπεδο και τη διασπορά των μεταφασικών χρωμοσωμάτων σε όλο τον κυτταρικό χώρο (Εικ. 39Η).

Η αναφασική άτρακτος στερείται επίσης τυπικής οργάνωσης και συγκροτείται από άτυπα πολυμερή σωληνίνης. Γενικά, διαπιστώνεται καθυστέρηση της βράχυνσης των δεσμίδων πολυμερών σωληνίνης που συνδέονται με τους κινητοχώρους και επομένως της μετακίνησης των χρωμοσωμάτων προς τους πόλους (Εικ. 39Ξ). Κατά την τελόφαση, μεταξύ των θυγατρικών πυρήνων παρατηρούνται άτυπες μάζες πολυμερών σωληνίνης (Εικ. 39Θ). Άτυπα πολυμερή σωληνίνης εντοπίζονται στο άμεσο περιβάλλον των θυγατρικών χρωμοσωμάτων αλλά και μεταξύ των χρωμοσωμάτων, ενώ η διαδικασία ανασυγκρότησης των θυγατρικών πυρήνων φαίνεται ότι καθυστερεί (Εικ. 39Θ). Τέλος, ο φραγμοπλάστης των επηρεασμένων κυτοκινητικών κυττάρων εμφανίζει σημαντικές διαταραχές (Εικ. 39Ι,Κ). Ο φραγμοπλάστης των κυττάρων, τα οποία εισέρχονται στην επίδραση σε κυτοκινητικό στάδιο, εμφανίζει ατυπίες στη δομή του, ενώ αναστέλλεται η επέκτασή του προς την περιφέρεια του κυττάρου (Εικ. 39Ι,Κ). Παράλληλα με την αδυναμία επέκτασης του φραγμοπλάστη, είναι εμφανής και η καθυστέρηση της αποδιοργάνωσής του (Εικ. 39Ο).



Εικόνα 39. Κύτταρα ακρόρριζου των φυτών *T. turgidum* (A-K) και *A. thaliana* (Λ-O), τα οποία έχουν υποστεί την επίδραση LY294002, όπως φαίνονται έπειτα από ανοσοσθήμανση της σωληνίνης, σε μικροσκόπιο επιφθορισμού (A-Δ,Z,Θ-O) και σε CLSM (E,H,K). Στις ένθετες εικόνες, με μπλε χρώμα εμφανίζονται τα χρωμοσώματα και οι πυρήνες των κυττάρων, μετά από χρώση με Hoechst 33258. Το κόκκινο χρώμα των χρωμοσωμάτων και των πυρήνων των κυττάρων των εικόνων (E,H,K), οφείλεται στη χρώση με PI. Επιδράσεις: LY294002 50 μ M 2 h. Μεγέθυνση: (A-K) X1100, (Λ-O) X1200.

III.8.2 Η ενεργοποίηση μίας κινάσης παρόμοιας με την p38-MAPK σχετίζεται με την αντίληψη των επιπέδων των ROS και εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS και η ανασχεση της δραστηριότητας της PI3K, η οποία προκαλεί μείωση στα επίπεδά τους, οδηγούν στην καταστροφή των ΜΣ και την αντικατάστασή τους με άτυπα πολυμερή σωληνίνης, επιχειρήθηκε η διερεύνηση των πιθανών μηχανισμών μεταγωγής μηνύματος, με τους οποίους τα κύτταρα αντιλαμβάνονται τις μεταβολές των επιπέδων των ROS. Επιπλέον, μελετήθηκε η συμμετοχή των μηχανισμών αυτών στις αλλαγές που πυροδοτούν οι μεταβολές των ROS

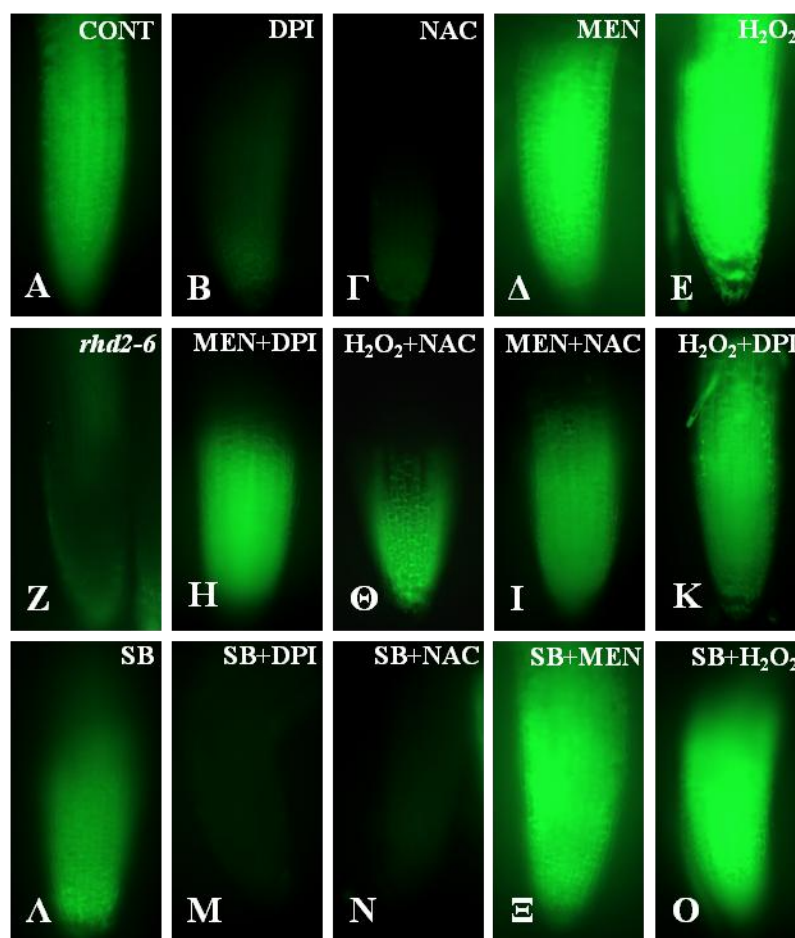
στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης. Στο πλαίσιο αυτό διερευνήθηκε ο ρόλος μίας κινάσης των φυτών, η οποία παρουσιάζει ανοσολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες όμοιες με εκείνες της p38-MAPK των ζωικών κυττάρων (Komis και συν. 2004). Ο λόγος ήταν ότι αφενός μεν η p38-MAPK σχετίζεται με την απόκριση των κυττάρων στην οξειδωτική καταπόνηση και σε άλλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Zarubin και Han 2005, Gaitanaki και συν. 2006), αφετέρου δε διότι στα κύτταρα του ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum* η κινάση των φυτών p46-MAPK, η οποία είναι όμοια με την p38-MAPK, εμπλέκεται στην αντίληψη της υπερωσμωτικής καταπόνησης και της επακόλουθης δημιουργίας μακροσωληνίσκων (Komis και συν. 2004).

III.8.2.1 Η φωσφορυλίωση της p46 και τα επίπεδα των ROS

Σύμφωνα με όσα αναφέρονται παραπάνω, μελετήθηκαν οι επιπτώσεις των ουσιών που προκαλούν αύξηση ή μείωση των επιπέδων των ROS ή συνδυασμοί των ουσιών αυτών στα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής αυτής της κινάσης (p46-MAPK) σε ακρόρριζα των φυτών *T. turgidum* και *A. thaliana*. Παράλληλα, διερευνήθηκαν και οι επιπτώσεις της αναστολής της καταλυτικής δραστηριότητάς της με τη χρήση του εξειδικευμένου αναστολέα SB203580. Η μελέτη επεκτάθηκε και στα μεταλλάγματα *rhd2* του φυτού *Arabidopsis*.

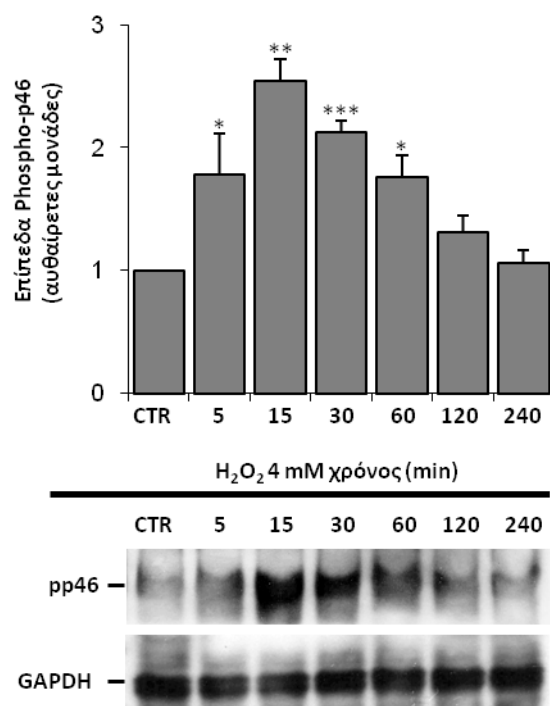
Αρχικά, διερευνήθηκε με τη χρήση του DCF εάν οι πειραματικοί χειρισμοί που πραγματοποιήθηκαν επηρεάζουν τα επίπεδα των ROS στο ακρόρριζο. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως (ενότητα III.1), η επίδραση με DPI και NAC προκαλεί μείωση στα επίπεδα των ROS (Εικ. 40B,Γ σύγκρινε με Εικ. 40A), ενώ αυτά παρουσιάζονται ιδιαίτερα αυξημένα όταν τα αρτίβλαστα έχουν υποστεί την επίδραση MEN ή H₂O₂ (Εικ. 40Δ,Ε σύγκρινε με Εικ. 40Α).

Στην Εικ. 40Z παρουσιάζεται ένα ακρόρριζο του μεταλλάγματος *rhd2-6*, ενώ στις Εικ. 40H-K ακρόρριζα στα οποία έγινε επίδραση με ένα οξειδωτικό μέσο (MEN ή H₂O₂) και μία από τις ουσίες που προκαλούν μείωση των επιπέδων των ROS (DPI ή NAC). Με το συνδυασμό των ενώσεων αυτών, τα επίπεδα των ROS στα ακρόρριζα είναι συγκρίσιμα με εκείνα των ακρόρριζων των αρτιβλάστων του μάρτυρα (Εικ. 40H-K σύγκρινε με Εικ. 40Α). Επιπλέον, τα επίπεδα των ROS στα αρτίβλαστα, στο διάλυμα της επίδρασης των οποίων (DPI, NAC, MEN και H₂O₂) είχε προστεθεί ο αναστολέας SB203580, δεν μεταβάλλονται σε σχέση με εκείνα των αντίστοιχων ακρόρριζων που υπέστησαν την επίδραση των διαλυμάτων απουσία του αναστολέα (Εικ. 40Α-Ο σύγκρινε με Εικ. 40Α-Ε). Επομένως, ο SB203580 δεν επηρεάζει τα επίπεδα των ROS.



Εικόνα 40. Φυσιολογικά (A), επηρεασμένα (B-E,H-O) και *rhd2-6* (Z) ακρόρριζα, όπως φαίνονται έπειτα από χρώση με DCF και παρατήρηση με το μικροσκόπιο επιφθορισμού. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί με τον ίδιο χρόνο έκθεσης, ενώ οι οπτικές τομές διέρχονται από τη ριζοδερμίδα. Η προσθήκη του DCF πραγματοποιήθηκε 30 min πριν από το τέλος κάθε επίδρασης σε τελική συγκέντρωση 25 μ M. Η ένταση του σήματος είναι ενδεικτική της συγκέντρωσης των ROS. Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 25 μ M 2 h, NAC: 250 μ M 2 h, MEN 25 μ M 2 h, H₂O₂: 4 mM 2 h. Μεγέθυνση: X500.

Αρχικά, επιβεβαιώθηκε ότι, στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των ριζών του φυτού *T. turgidum*, το αντίσωμα έναντι της phospho-p38-MAPK αναγνωρίζει μία πρωτεΐνη 46 kDa (p46, Komis και συν. 2004). Επίσης, βρέθηκε ότι η φωσφορυλίωση αυτής της πρωτεΐνης επάγεται από την παρουσία H₂O₂ (Εικ. 41). Η αύξηση των επιπέδων της p46 στα κύτταρα, τα οποία υφίστανται επίδραση με H₂O₂, εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωσή του (Εικ. 42), όσο και από το χρόνο της επίδρασης (Εικ. 41).

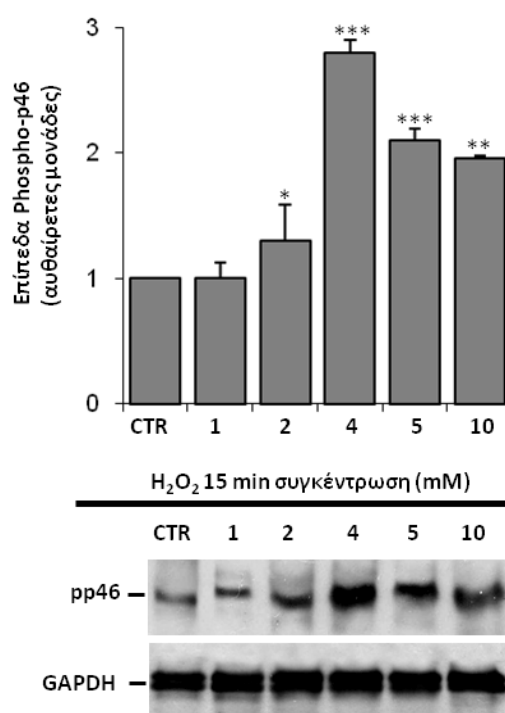


Εικόνα 41. Η οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από το H₂O₂ συνοδεύεται από αύξηση των επιπέδων της phospho-p46. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western της phospho-p46, έπειτα από επίδραση ριζών αρτιβλάστων του φυτού *T. turgidum* με H₂O₂ σε διαφορετικούς χρόνους. Η απόκριση εξαρτάται από το χρόνο της επίδρασης. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα επίπεδα της phospho-p46 σε αυθαίρετες μονάδες, σε σύγκριση με εκείνα του μάρτυρα. Τα δεδομένα έχουν προκύψει από το μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Με τη συγκέντρωση αυτή, μεγαλύτερη ενεργοποίηση επιτυγχάνεται 15 min μετά από την έναρξη της επίδρασης. Ως πρωτεΐνη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η GAPDH. Η επίδραση πραγματοποιήθηκε σε απομονωμένες ρίζες που βρίσκονταν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland. Επίδραση: CTR:Hoagland, H₂O₂: 4 mM. Οι διαφορές με το μάρτυρα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές όταν η τιμή P ήταν μικρότερη από 0,05. *τιμή-P < 0,05, ** τιμή-P < 0,01, *** τιμή-P < 0,001.

Από τη μελέτη της εικόνας 41 διαπιστώνεται αύξηση των επιπέδων της phospho-p46 από τα πρώτα 5 min της επίδρασης. Η μέγιστη απόκριση παρατηρείται στα 15 min, ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους η ενεργοποίηση μειώνεται σταδιακά (Εικ. 41). Η συγκέντρωση H₂O₂, στην οποία καταγράφεται η μέγιστη μεταβολή των επιπέδων της phospho-p46, είναι 4 mM (Εικ. 42). Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε για τα υπόλοιπα πειράματα. Για τις ουσίες DPI, NAC και MEN χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις, οι οποίες είχαν επιλεγεί προηγουμένως με βάση τις επιπτώσεις που προκαλούν στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης.

Τα αρτίβλαστα του φυτού *T. turgidum*, στα οποία μελετήθηκαν τα επίπεδα της phospho-p46, ακολούθησαν τη μία από τις δύο διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν ρίζες νεαρών αρτιβλάστων, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Hoagland. Στο διάλυμα αυτό παρέμειναν για 3 h προκειμένου να ανακάμψουν από τον τραυματισμό, ώστε να αποφευχθεί η πιθανή αύξηση των επιπέδων των

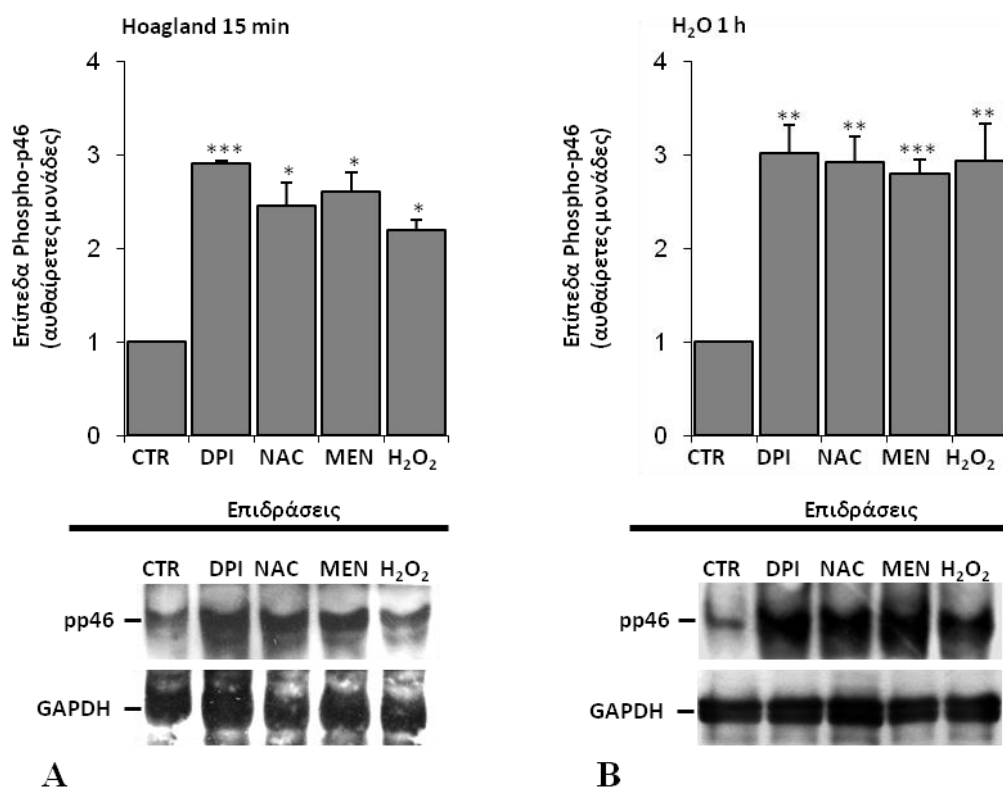
ROS, λόγω του τραυματισμού. Ακολούθως, οι ρίζες υπέστησαν επίδραση με τις επιλεγμένες ουσίες, οι οποίες είχαν προστεθεί στο διάλυμα Hoagland. Στη δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα αρτίβλαστα και οι ουσίες διαλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό. Και οι δύο πειραματικοί χειρισμοί έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα, με τη διαφορά ότι η μέγιστη απόκριση στη δεύτερη περίπτωση διαπιστώθηκε μετά από χρόνο επίδρασης μίας ώρας (Εικ.43).



Εικόνα 42. Η οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από το H₂O₂ επάγει την αύξηση των επιπέδων της phospho-p46. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western της phospho-p46, έπειτα από επίδραση με διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂ (1-10 mM) σε ρίζες αρτίβλαστων του φυτού *T. turgidum*, για 15 min. Η απόκριση εξαρτάται από το χρόνο της επίδρασης. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα επίπεδα της phospho-p46 σε αυθαίρετες μονάδες, σε σύγκριση με το μάρτυρα. Τα δεδομένα έχουν προκύψει από το μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Η μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων της phospho-p46 επιτυγχάνεται με τη συγκέντρωση 4 mM H₂O₂. Ως πρωτεΐνη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η GAPDH. Η επίδραση πραγματοποιήθηκε σε απομονωμένες ρίζες που βρίσκονταν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland. Επίδραση: CTR:Hoagland, H₂O₂: 1-10 mM, 15 min. Οι διαφορές με το μάρτυρα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές, όταν η τιμή P ήταν μικρότερη από 0,05. *τιμή-P < 0,05, ** τιμή-P < 0,01, *** τιμή-P < 0,001.

Τα δεδομένα της Εικ. 43 δείχνουν ότι όλες οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διατάραξη της ομοιόστασης των ROS οδήγησαν στην αύξηση των επιπέδων της phospho-p46. Τα επίπεδά της ήταν κατά μέσο όρο $2,90 \pm 0,04$, $2,45 \pm 0,24$, $2,60 \pm 0,21$ και $2,20 \pm 0,12$ μονάδες στις επηρεασμένες ρίζες με DPI, NAC, MEN και H₂O₂, αντίστοιχα, για 15 min (Εικ. 43Α). Στα αρτίβλαστα που είχαν υποστεί επίδραση για 1 h με υδατικά διαλύματα DPI, NAC,

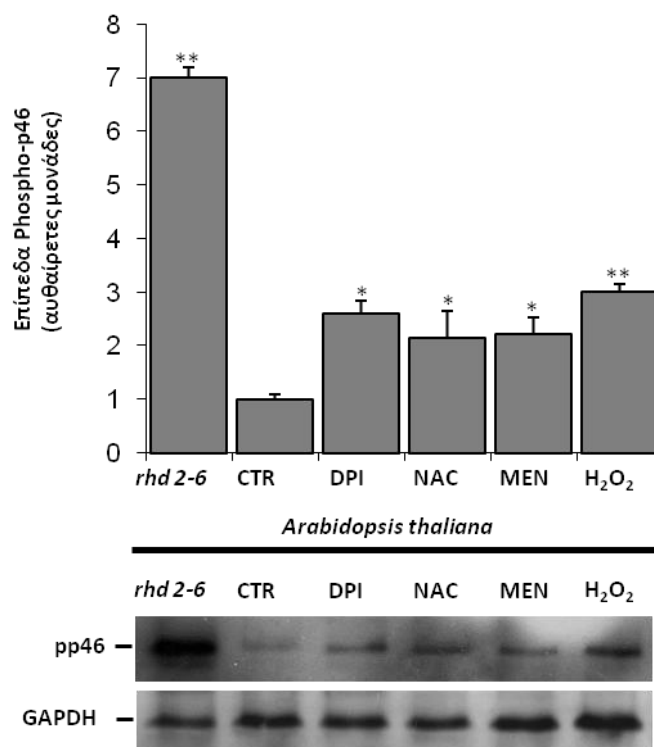
MEN και H_2O_2 η συσσώρευση της phospho-p46 ήταν $3,02 \pm 0,29$, $2,92 \pm 0,27$, $2,80 \pm 0,14$, $2,93 \pm 0,4$ μονάδες, μεγαλύτερη σε σύγκριση με εκείνη του φυσιολογικού υλικού (Εικ. 43B).



Εικόνα 43. Ανίχνευση των επιπέδων της phospho-p46, έπειτα από διατάραξη της ομοιόστασης των ROS σε κομμένες ρίζες (A) ή ολόκληρα αρτίβλαστα (B) του φυτού *T. turgidum*. Τα επίπεδα της phospho-p46 παρουσιάζονται στα διαγράμματα σε αυθαίρετες μονάδες, σε σύγκριση με εκείνα των φυτών-μαρτύρων. Σε όλες τις περιπτώσεις, αυτά έχουν προκύψει από το μέσο όρο των τιμών τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων. Ως πρωτεΐνη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η GAPDH. Είναι σαφές ότι σε όλες τις επιδράσεις προκαλείται αύξηση της φωσφορυλιωμένης μορφής της p46. Επιδράσεις: (A) CTR: Hoagland 15 min, DPI: 25 μ M 15 min, NAC: 250 μ M 15 min, MEN: 25 μ M 15 min, H_2O_2 : 4 mM 15 min, (B) CTR: dH₂O 1 h, DPI: 25 μ M 1 h, NAC: 250 μ M 1 h, MEN: 25 μ M 1 h, H_2O_2 : 4 mM 1 h. Οι διαφορές με το μάρτυρα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές, όταν η τιμή P ήταν μικρότερη από 0,05. *τιμή-P < 0,05, ** τιμή-P < 0,01, *** τιμή-P < 0,001.

Οι παραπάνω επιδράσεις πραγματοποιήθηκαν και σε αρτίβλαστα των φυτών *A. thaliana*. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση του ίδιου αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει την p38-MAPK των ζωικών οργανισμών. Διαπιστώθηκε ότι στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του φυτού *Arabidopsis* το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει μία πρωτεΐνη, η οποία έχει MB περίπου 46 kDa, δηλαδή ίδιου μεγέθους με εκείνο της MAPK του *T. turgidum* (Εικ. 44). Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS προκαλεί επίσης την φωσφορυλίωση της p46, όπως αυτή διαπιστώνεται από την αύξηση των επιπέδων της στα επηρεασμένα ακρόρριζα (Εικ. 44). Στην Εικ. 44 φαίνεται ότι, τόσο η αύξηση των επιπέδων

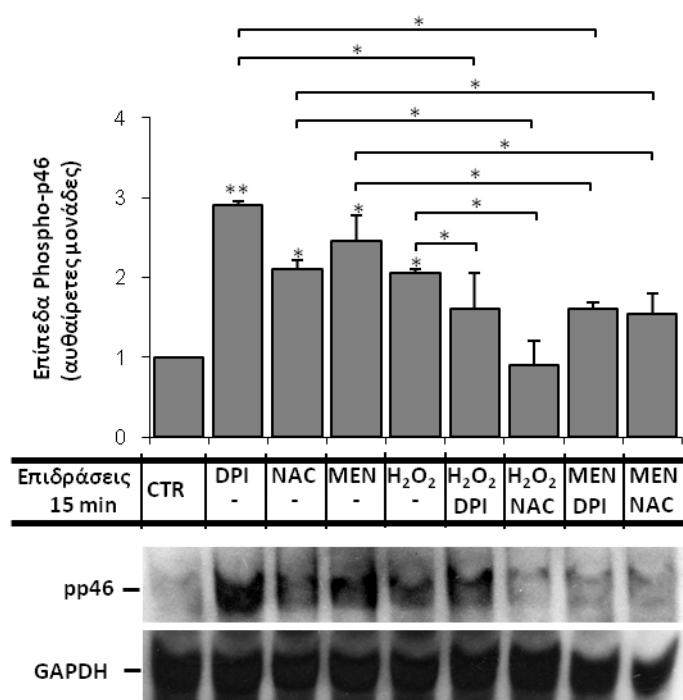
των ROS (επίδραση με MEN και H_2O_2) όσο και η μείωσή τους (επίδραση με DPI και NAC) αυξάνει την ενεργοποιημένη μορφή της p46 (Εικ. 40, Εικ. 44). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της phospho-p46 ήταν 2,6 μονάδες στα επηρεασμένα με DPI αρτίβλαστα, υψηλότερα σε σχέση με εκείνα του μάρτυρα, 2,15 στα επηρεασμένα με NAC, 2,22 στα επηρεασμένα με MEN και 3 μονάδες σε εκείνα που είχαν υποστεί επίδραση με H_2O_2 (Εικ. 44). Είναι ενδιαφέρον ότι στα αρτίβλαστα των μεταλλαγμάτων *rhb2*, τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα ROS (Εικ. 40), τα επίπεδα της phospho-p46 ήταν θεαματικά υψηλότερα συγκριτικά με τα φυσιολογικά ακρόρριζα του άγριου τύπου (Εικ. 44).



Εικόνα 44. Ανίχνευση των επιπέδων της phospho-p46, μετά από τη διατάραξη της ομοιόστασης των ROS σε αρτίβλαστα *rhb2* και σε ολόκληρα αρτίβλαστα *A. thaliana* άγριου τύπου, φυσιολογικά ή επηρεασμένα. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα επίπεδα της phospho-p46 σε αυθαίρετες μονάδες, σε σύγκριση με εκείνα του μάρτυρα. Αυτό έχει προκύψει από το μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Ως πρωτεΐνη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η GAPDH. Σε όλες τις επιδράσεις διαπιστώνεται αύξηση της φωσφορυλιωμένης μορφής της p46, ενώ στα φυτά *rhb2-6* τα επίπεδά της είναι εντυπωσιακά αυξημένα. Επιδράσεις: CTR: dH₂O 2 h, DPI: 25 μ M 2 h, NAC: 250 μ M 2 h, MEN: 25 μ M 2 h, H_2O_2 : 4 mM 2 h. Οι διαφορές με το μάρτυρα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές, όταν η τιμή P ήταν μικρότερη από 0,05. *τιμή-P < 0,05, ** τιμή-P < 0,01.

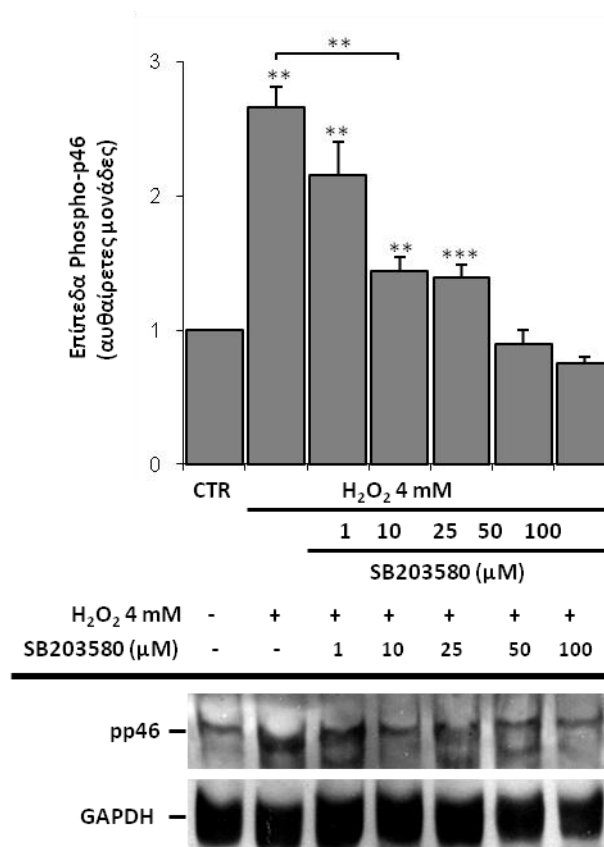
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειράματα προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι μεταβολές των επιπέδων της phospho-p46 είναι όντως αποτέλεσμα των αλλαγών στα επίπεδα των ROS που προκαλούνται από τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν. Για το σκοπό αυτό τα αρτίβλαστα επωάστηκαν συγχρόνως με δύο ενώσεις, μία που προκαλεί αύξηση και μία που προκαλεί μείωση των επιπέδων των ROS. Συγκεκριμένα, αρτίβλαστα *T. turgidum*

επωάσθηκαν σε διαλύματα Hoagland τα οποία περιείχαν τα ακόλουθα ζεύγη ενώσεων: (1) H_2O_2 + DPI, (2) H_2O_2 + NAC, (3) MEN + DPI και (4) MEN + NAC. Όπως φαίνεται στην Εικ. 40H-K τα ακρόρριζα που υφίστανται την επίδραση αυτών των συνδυασμών ουσιών εμφανίζουν ένταση του φθορισμού συγκρίσιμη με αυτή που παρατηρείται στα φυσιολογικά ακρόρριζα (Εικ. 40H-K σύγκρινε με Εικ. 40Α). Έχει ενδιαφέρον ότι ο συνδυασμός των παραπάνω επιδράσεων προκαλεί σημαντική μεταβολή των επιπέδων της phospho-p46, ώστε να προσεγγίζουν εκείνα των ριζών του μάρτυρα (Εικ. 45). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τα πολύ υψηλά επίπεδα που παρατηρούνται στα φυτά *rhd2*, τα οποία δεν έχουν υποστεί καμία επίδραση (Εικ. 44), υποστηρίζει ότι η phospho-p46 ενεργοποιείται όταν συμβαίνει σημαντική μεταβολή των επιπέδων των ROS, είτε μείωση, είτε αύξηση (Εικ. 40, Εικ. 44, Εικ. 45).



Εικόνα 45. Η ταυτόχρονη επίδραση με ένα οξειδωτικό μέσο και με ένα μέσο, το οποίο προκαλεί μείωση στα επίπεδα των ROS, επιφέρουν μείωση των επιπέδων της phospho-p46 σε σύγκριση με τα επίπεδα της ίδιας πρωτεΐνης σε ρίζες, οι οποίες έχουν επηρεαστεί μόνο με ένα από τα παραπάνω μέσα. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα επίπεδα της phospho-p46 σε αυθαίρετες μονάδες, σε σύγκριση με εκείνα του μάρτυρα. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Ως πρωτεΐνη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η GAPDH. Επιδράσεις: CTR: dH_2O , DPI: 25 μM , NAC: 250 μM , MEN: 25 μM , H_2O_2 : 4 mM. Οι επιδράσεις έγιναν σε ρίζες *T. turgidum* που βρισκόταν σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland και είχαν διάρκεια 15 min. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές, όταν η τιμή P ήταν μικρότερη από 0,05. *τιμή-P < 0,05, ** τιμή-P < 0,01.

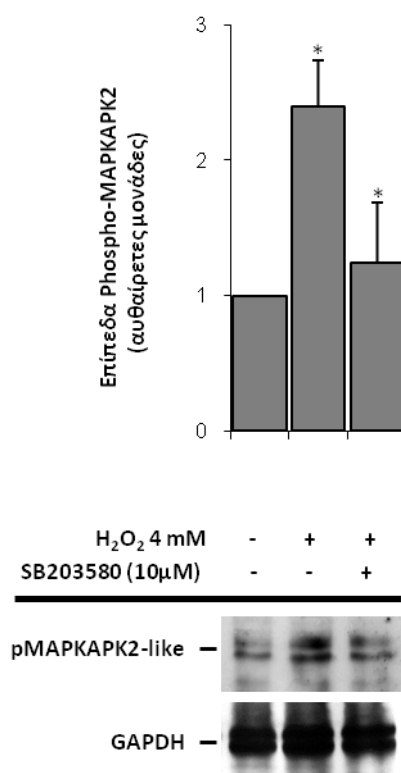
Επιπλέον, διερευνήθηκε εάν ο εξειδικευμένος αναστολέας της καταλυτικής δραστηριότητας της p38-MAPK SB203580 ήταν σε θέση να αναστείλει και την ενεργοποίηση της p46 στο σύστημά μας. Ρίζες αρτιβλάστων *T. turgidum*, οι οποίες είχαν προεπωαστεί με τον αναστολέα SB203580 υπέστησαν την επίδραση H_2O_2 παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του SB203580. Συγκρίνοντας τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p46 στην περίπτωση του H_2O_2 και τα επίπεδά της όταν ο SB203580 συνυπήρχε με το H_2O_2 , παρατηρείται ότι στην τελευταία περίπτωση αυτά είναι σημαντικά μειωμένα (Εικ. 46).



Εικόνα 46. Οι επιπτώσεις της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα SB203580 στην φωσφορυλίωση της p46, η οποία επάγεται από την επίδραση 4 mM H_2O_2 για 15 min. Αρχικά οι ρίζες προ-επωάστηκαν για 30 min με τον SB203580. Ο αναστολέας αυτός προκαλεί μείωση των επιπέδων της phospho-p46, η οποία εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αναστολέα. Τα επίπεδα της phospho-p46 παρουσιάζονται στο διάγραμμα σε αυθαίρετες μονάδες, σε σύγκριση με εκείνα του μάρτυρα. Τα δεδομένα έχουν προκύψει από το μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Ως πρωτεΐνη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η GAPDH. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές, όταν η τιμή P ήταν μικρότερη από 0,05. *τιμή-P < 0,05, ** τιμή-P < 0,01, *** τιμή-P < 0,001.

Η διάρκεια επίδρασης στα παραπάνω πειράματα ήταν 15 min, καθώς στο χρόνο αυτό είχε διαπιστωθεί η μέγιστη απόκριση (Εικ. 41). Στα επόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η μικρότερη συγκέντρωση του αναστολέα (10 μM), η οποία επιφέρει σημαντική μείωση στην ενεργοποίηση της p46. Η παρουσία 10 μM SB203580 προκάλεσε μείωση στα επίπεδα της phospho-p46, μεγαλύτερη από 46% κατά μέσο όρο, σε σύγκριση με εκείνα των ριζών που είχαν υποστεί επίδραση μόνο με H_2O_2 .

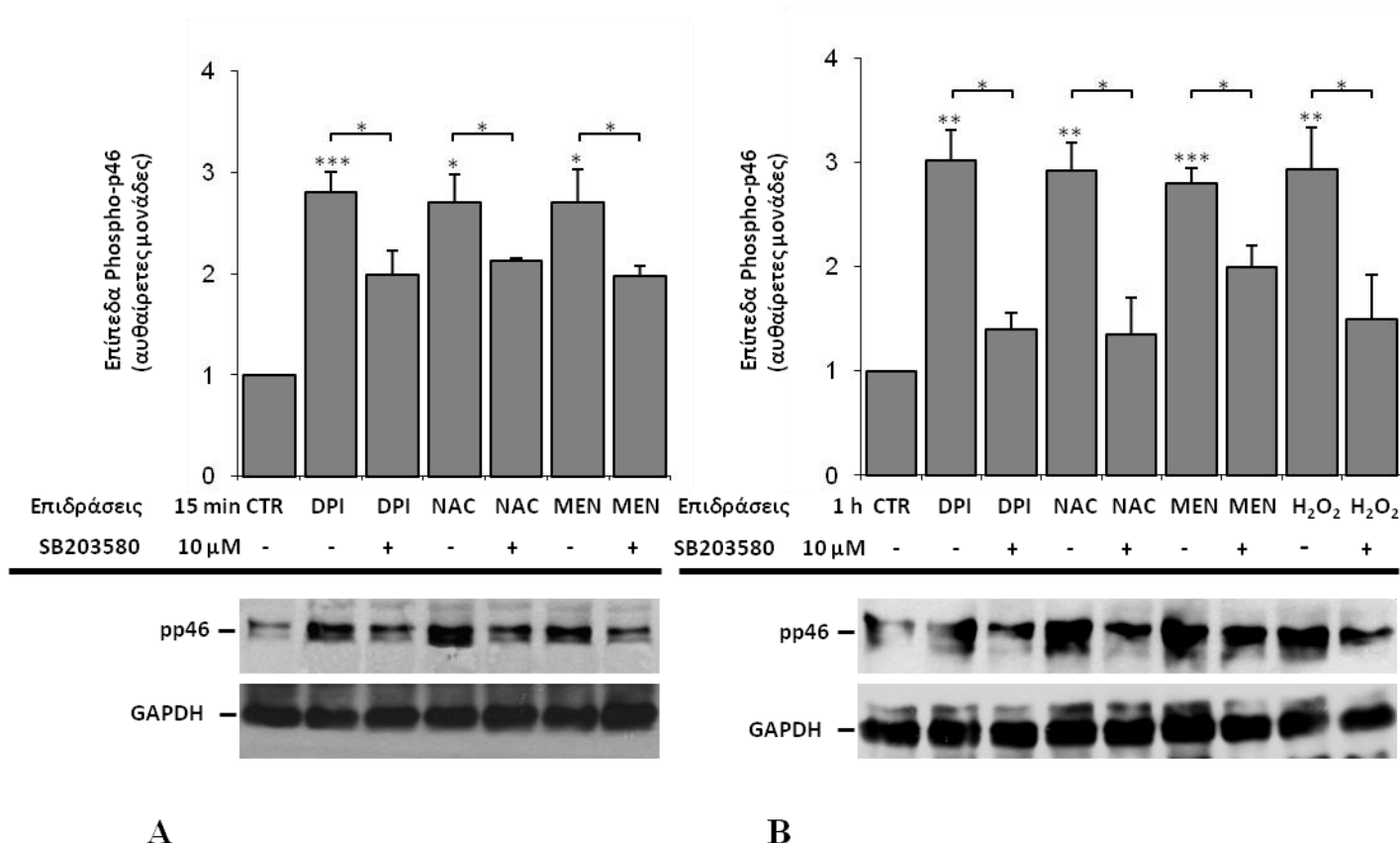
Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι η p46-MAPK είναι όμοια με την p38-MAPK των ζωικών οργανισμών (βλέπε επίσης και Komis και συν. 2004). Η άποψη αυτή ενισχύθηκε περαιτέρω από δεδομένα πειραμάτων, στα οποία χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα που αναγνωρίζει την phospho-MAPKAPK2. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί ένα από τα υποστρώματα της p38-MAPK των ζωικών οργανισμών (Yuan και συν. 2010).



Εικόνα 47. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ριζών του φυτού *T. turgidum* στο οποίο χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι της phospho-MAPKAPK2. Το αντίσωμα αυτό στο σύστημά μας αναγνωρίζει μία πρωτεΐνη περίπου 50 kDa. Τα επίπεδά της αυξάνονται παρουσία H_2O_2 , ενώ είναι συγκρίσιμα με εκείνα του μάρτυρα όταν στο διάλυμα της επίδρασης προστίθεται ο αναστολέας SB203580. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα επίπεδα της phospho-p46 σε αυθαίρετες μονάδες, σε σύγκριση με εκείνα του μάρτυρα. Το διάγραμμα έχει προκύψει από το μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Ως πρωτεΐνη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η GAPDH. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές, όταν η τιμή P ήταν μικρότερη από 0,05. *τιμή-P < 0,05.

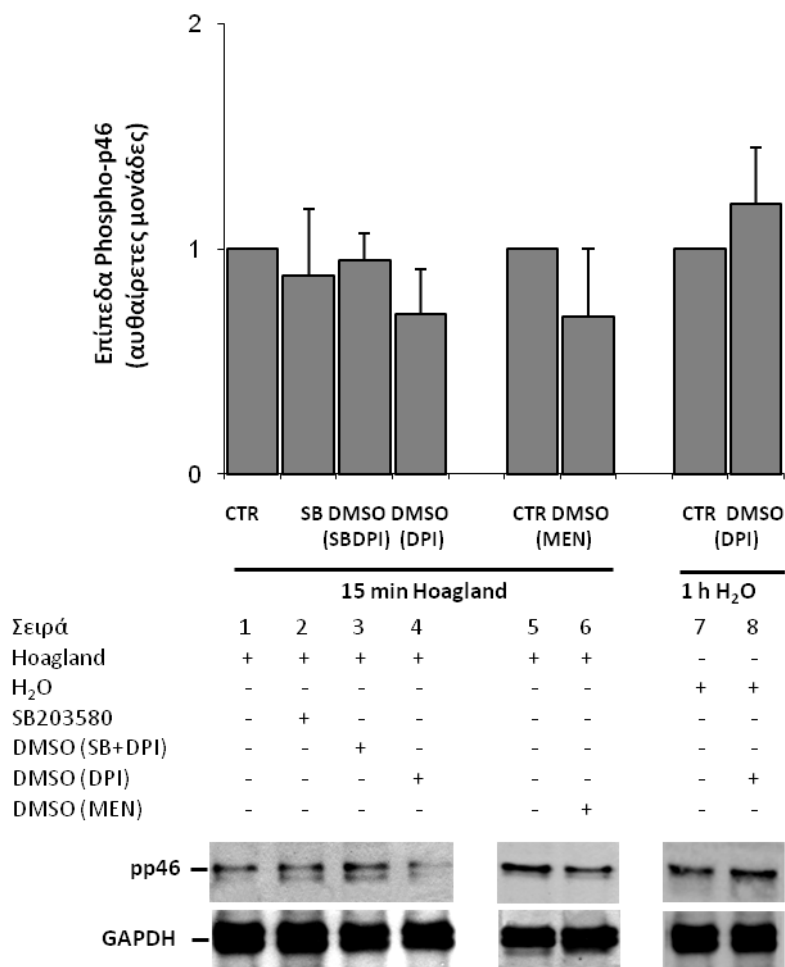
Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ριζών του φυτού *T. turgidum* το αντίσωμα έναντι της phospho-MAPKAPK2 αναγνωρίζει μία πρωτεΐνη με MB 50 KDa περίπου. Στην Εικ. 47 φαίνεται ότι, έπειτα από επίδραση με H_2O_2 , τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής αυξάνουν (2,4 μονάδες κατά μέσο όρο). Ωστόσο, η αύξηση αυτή αναστέλλεται όταν οι ρίζες υφίστανται αρχικά επίδραση με 10 μM SB203580 για 30 min και έπειτα με το διάλυμα της επίδρασης με H_2O_2 , στο οποίο είχαν προστεθεί 10 μM SB203580 (Εικ. 47). Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι η p46 είναι μία MAPK όμοια με την p38 και, επιπλέον ότι ο αναστολέας SB203580 αναστέλλει την καταλυτική δραστηριότητα της πρωτεΐνης αυτής.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η πιθανότητα ο SB203580 να επηρεάζει και την ενεργοποίηση της p46, η οποία επάγεται από τις υπόλοιπες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως σχετικά με την επίδραση με H_2O_2 , ο SB203580 προκάλεσε επίσης ανάσχεση της αύξησης των επιπέδων της phospho-p46, σε σύγκριση με τις ρίζες που είχαν υποστεί επίδραση με DPI, NAC και MEN (Εικ. 48). Η μείωση αυτή στην περίπτωση του DPI ήταν κατά μέσο όρο 29,00%, 21,10% μετά από την επίδραση με NAC και 27,00% μετά από την επίδραση με MEN (Εικ. 48A). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα όταν η επίδραση με υδατικά διαλύματα των ουσιών πραγματοποιήθηκε σε ολόκληρα αρτίβλαστα. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης p46 ήταν μειωμένα κατά 53,60% στα διαλύματα που περιείχαν SB203580 μαζί DPI, 53,80% σε εκείνα που περιείχαν SB203580 μαζί με NAC. Αντίστοιχα, ήταν μειωμένα κατά 29,00% όταν ο αναστολέας βρισκόταν στο διάλυμα μαζί με MEN και 48,80% όταν συνυπήρχε με H_2O_2 (Εικ. 48 B). Οι επιδράσεις είχαν διάρκεια μίας ώρας, ενώ πριν από αυτές τα αρτίβλαστα επώαστηκαν με 10 μM SB203580 για 30 min. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία του SB203580 δεν προκαλεί μεταβολές στα επίπεδα των ROS στο ακρόρριζο. Όπως φαίνεται στην Εικ. 40Λ, τα επίπεδα των ROS μετά από επώαση των αρτιβλάστων μόνο με τον αναστολέα, είναι συγκρίσιμα με εκείνα των ακρόρριζων του μάρτυρα (Εικ. 40Λ σύγκρινε με Εικ. 40Α). Επιπλέον, η παρουσία του SB203580 στα διαλύματα του DPI, NAC, MEN και H_2O_2 δεν επηρεάζει την αναμενόμενη μεταβολή των επιπέδων των ROS (Εικ. 40B-E σύγκρινε με Εικ. 40M-O).



Εικόνα 48. Οι επιπτώσεις του αναστολέα SB203580 στα επίπεδα της phospho-46, μετά από διατάραξη της ομοιόστασης των ROS σε κομμένες ρίζες (A) ή ολόκληρα αρτίβλαστα (B) του φυτού *T. turgidum*. Προηγήθηκε επώαση των δειγμάτων με τον SB203580 για 30 min. Στα διαγράμματα παρουσιάζονται τα επίπεδα της phospho-p46 σε αυθαίρετες μονάδες, σε σύγκριση με εκείνα του μάρτυρα. Αυτά έχουν προκύψει από το μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Η παρουσία του SB203580 προκαλεί ανάσχεση της αύξησης των επιπέδων που προκαλείται από DPI, NAC, MEN και H₂O₂. Ως πρωτεΐνη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η GAPDH. Επιδράσεις: (A) CTR: Hoagland 15 min, DPI: 25 μM 15 min, NAC: 250 μM 15 min, MEN: 25 μM 1 h, (B) CTR: dH₂O 1 h, DPI: 25 μM 1 h, NAC: 250 μM 1 h, MEN: 25 μM 1 h, H₂O₂: 4 mM 1 h. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές, όταν η τιμή P ήταν μικρότερη από 0.05. *τιμή-P < 0.05, ** τιμή-P < 0.01, *** τιμή-P < 0.001.

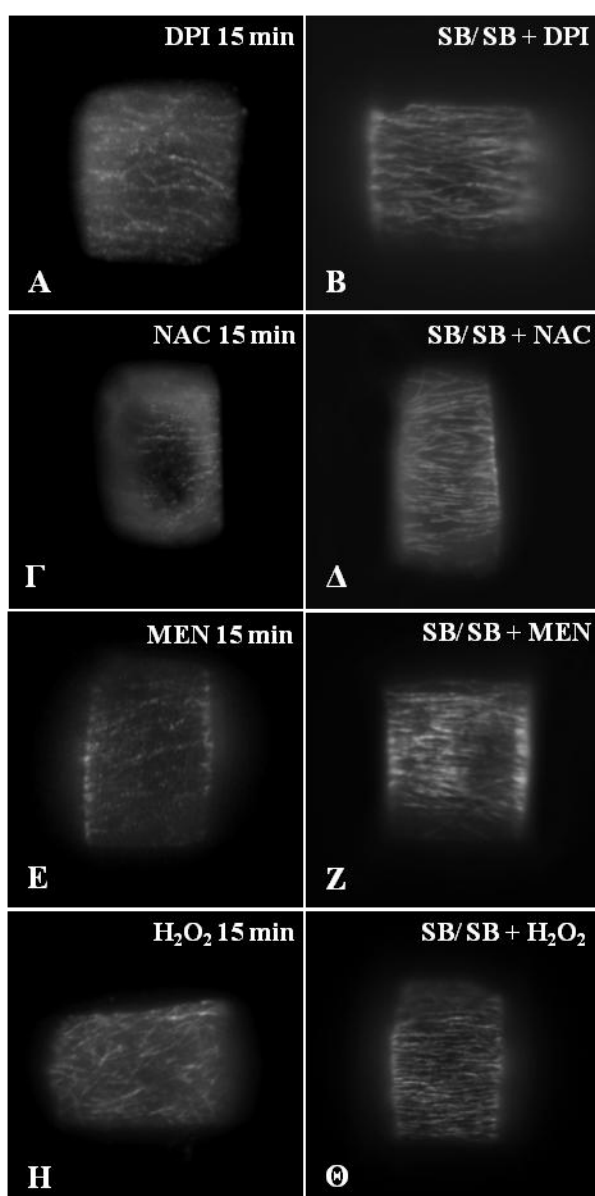
Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι πειράματα ελέγχου έδειξαν ότι οι μεταβολές των επιπέδων της phospho-p46 δεν σχετίζονται με την παρουσία DMSO ή του αναστολέα SB203580 στα διαλύματα της επίδρασης. Ορισμένα από αυτά παρουσιάζονται στην Εικ. 49. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν επώσεις ριζών ή ολόκληρων αρτιβλάστων σε διαλύματα Hoagland ή υδατικά διαλύματα, στα οποία είχε προστεθεί κατάλληλη ποσότητα DMSO, ώστε η συγκέντρωσή του να είναι κάθε φορά ίση με εκείνη των διαλυμάτων της επίδρασης (Εικ. 49). Επιπλέον, είναι σαφές ότι ο SB203580 μόνος του δεν προκαλεί σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της phospho-p46 (Εικ. 49).



Εικόνα 49. Οι επιπτώσεις του SB203580 και του DMSO στα επίπεδα της phospho-p46. Η επώαση έγινε σε ρίζες αρτιβλάστων του φυτού *T. turgidum* (δεξιά) ή σε ολόκληρα αρτιβλαστα (αριστερά). Στην πρώτη περίπτωση, το DMSO και ο αναστολέας είχαν διαλυθεί σε διάλυμα Hoagland, ενώ στη δεύτερη σε απεσταγμένο νερό (δεξιά). Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα επίπεδα της phospho-p46 σε αυθαίρετες μονάδες, σε σύγκριση με εκείνα του μάρτυρα. Τα δεδομένα του διαγράμματος έχουν προκύψει από το μέσο όρο των τιμών τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων. Ως πρωτεΐνη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η GAPDH. Επιδράσεις (από αριστερά): 1. Διάλυμα Hoagland 15 min, 2. 10 μ M SB203580 15 min, 3. 0,35% (v/v) DMSO 15 min (Συγκέντρωση DMSO αντίστοιχή της επίδρασης SB+DPI), 4. 0,25% (v/v) DMSO 15 min (Συγκέντρωση DMSO αντίστοιχή της επίδρασης DPI), 5. Διάλυμα Hoagland 15 min, 6. 0,025% (v/v) DMSO 15 min (Συγκέντρωση DMSO αντίστοιχή της επίδρασης MEN), 7. dH₂O 1 h, 8. 0,25% (v/v) DMSO 1 h (Συγκέντρωση DMSO αντίστοιχή της επίδρασης DPI). Οι διαφορές με το μάρτυρα δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (τιμή P μεγαλύτερη από 0,05).

III.8.2.2 Η φωσφορυλίωση της p46 και η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης

Όπως περιγράφηκε σε προηγούμενα κεφάλαια, η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS στα ακρόρριζα επάγει την αποδιοργάνωση των τυπικών ΜΣ και τη συγκρότηση άτυπων πολυμερών σωληνίνης στα κύτταρα του ακρόρριζου. Επίσης, η μείωση των επιπέδων των ROS που προκαλείται από την επίδραση με DPI και NAC, αλλά και η συσσώρευση ROS στα κύτταρα, τα οποία ήταν επηρεασμένα με MEN και H₂O₂ προκαλεί αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης p46-MAPK. Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε εάν οι αλλαγές της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, οι οποίες επάγονται από τις μεταβολές της συγκέντρωσης των ROS, σχετίζονται με κάποιο τρόπο με την ενεργοποίηση της p46.

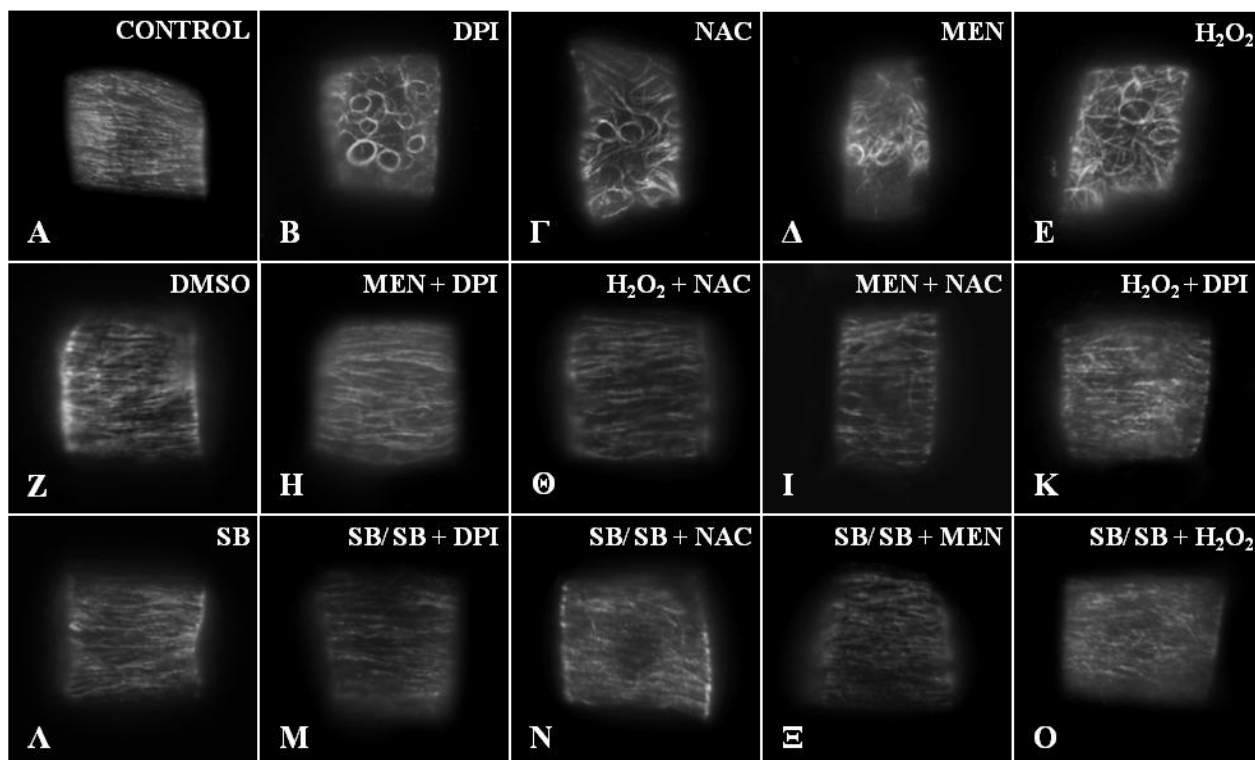


Εικόνα 50. Ο αναστολέας της p38-MAPK SB203580 αναστέλλει την αποδιοργάνωση των ΜΣ που προκαλεί η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS. Ανοσοεντόπιση της σωληνίνης σε μεσοφασικά κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum* επηρεασμένα με DPI (Α), NAC (Γ), MEN (Ε), H₂O₂ (Η) για 15 min και κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε προ-επώαση με τον αναστολέα SB203580 για 30 min και στη συνέχεια επίδραση με SB203580 + DPI (Β), SB203580 + NAC (Δ), SB203580 + MEN (Ζ), SB203580 + H₂O₂ (Θ) για 15 min. Επιδράσεις: DPI: 25 μM, NAC: 250 μM, MEN: 25 μM, H₂O₂: 4mM, SB203580: 10 μM. Μεγέθυνση: X1000.

Διερευνήθηκε η πιθανότητα η αποδιοργάνωση των ΜΣ, η οποία επάγεται από την αύξηση ή τη μείωση των ROS στο ακρόρριζο, να επιτελείται μέσω μηχανισμών οι οποίοι περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της p46. Ακρόρριζα επώαστηκαν αρχικά με SB203580 για 30 min, στη συνέχεια υπέστησαν επίδραση με SB203580 + DPI, SB203580 + NAC, SB203580 + MEN, SB203580 + H₂O₂ για 15 min, και ακολούθησε ανοσοεντόπιση της σωληνίνης. Στην Εικ. 50 φαίνεται ότι η αποδιοργάνωση των ΜΣ, η οποία είναι ορατή 15 min από την έναρξη της επίδρασης, αναστέλλεται παρουσία του αναστολέα της p38-MAPK (Εικ. 50B,Δ,Ζ,Θ σύγκρινε με Εικ. 50A,Γ,Ε,Η). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση της p46 εμπλέκεται στην καταστροφή των ΜΣ που προκαλείται από τη διατάραξη της ομοιόστασης των ROS.

Λόγω του ότι η αποδιοργάνωση των ΜΣ στα επηρεασμένα κύτταρα ακολουθείται από το σχηματισμό άτυπων πολυμερών σωληνίνης (Εικ. 51Α-Ε), εξετάστηκε εάν όντως η μεταβολή των επιπέδων των ROS συνιστά την κύρια αιτία δημιουργίας των άτυπων πολυμερών σωληνίνης. Η επίδραση ακρόρριζων με συνδυασμούς ουσιών, οι οποίες έχουν αντίθετες επιπτώσεις στα επίπεδα των ROS και τις διατηρούν σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του μάρτυρα (Εικ. 40Η-Κ σύγκρινε με Εικ. 40Α), φαίνεται ότι αναστέλλει τη συγκρότηση των άτυπων πολυμερών σωληνίνης στα κύτταρα του ακρόρριζου (Εικ. 51Η-Κ σύγκρινε με Εικ. 51Β-Ε). Η οργάνωση των πολυμερών της σωληνίνης στο περιφερειακό κυτόπλασμα των επηρεασμένων κυττάρων ήταν όμοια με εκείνη των φυσιολογικών κυττάρων (Εικ. 51Η-Κ σύγκρινε με Εικ. Α,Ζ). Πρέπει να σημειωθεί ότι σε αυτές τις συνθήκες και τα επίπεδα της phospho-p46 είναι χαμηλά και συγκρίσιμα με εκείνα των κυττάρων του μάρτυρα (Εικ. 45), γεγονός που υποστηρίζει ότι η p46-MAPK εμπλέκεται στη δημιουργία των άτυπων πολυμερών σωληνίνης.

Για να τεκμηριωθεί περαιτέρω η άποψη αυτή, πραγματοποιήθηκε επίδραση για 1 h με DPI, NAC, MEN και H₂O₂ ταυτόχρονα με 10 μM SB203580 σε κύτταρα ακρόρριζων, στα οποία είχε γίνει προ-επώαση με 10 μM SB203580 για 30 min. Διαπιστώθηκε ότι, όταν διαταράσσονται τα επίπεδα των ROS, παρουσία του αναστολέα SB203580, η οργάνωση των πολυμερών σωληνίνης προσομοιάζει με εκείνη των φυσιολογικών κυττάρων. Από το περιφερειακό κυτόπλασμα των κυττάρων αυτών απουσιάζουν τα δακτυλιοειδή ή γραμμικά πολυμερή της σωληνίνης, όπως και τα δίκτυα από άμορφες μάζες σωληνίνης (Εικ. 51Μ-Ο σύγκρινε με Εικ. 51Β-Ε). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο το DMSO, όσο και ο SB203580, δεν προκαλούν ορατές αλλοιώσεις στην οργάνωση του περιφερειακού κυτταροσκελετού της σωληνίνης των μεσοφασικών κυττάρων (Εικ. 51Ζ,Λ σύγκρινε με 51Α).



Εικόνα 51. Άτυπα πολυμερή σωληνίνης δεν σχηματίζονται, όταν το πειραματικό υλικό υφίσταται ταυτόχρονη επίδραση με δύο ουσίες που έχουν αντίθετη δράση στα επίπεδα των ROS ή όταν στο διάλυμα της επίδρασης συνυπάρχει ο αναστολέας SB203580. (A-E): Φυσιολογικά (A) και επηρεασμένα για 1 h, με ουσίες που διαταράσσουν την ομοιόσταση των ROS (B-E), μεσοφασικά κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum*. (Z-K): Μεσοφασικά κύτταρα, στα οποία έγινε επίδραση με DMSO (Z) και συνδυασμούς ουσιών: MEN + DPI (H), H₂O₂ + NAC (Θ), MEN + NAC (I), H₂O₂ + DPI (K) για 1 h. (Λ-O) Μεσοφασικά κύτταρα επηρεασμένα με SB203580 για 1,5 h (Λ) και επηρεασμένα με ίδιο αναστολέα για 30 min και, στη συνέχεια, για 1 h με DPI + SB203580 (M), NAC + SB203580 (N), MEN + SB203580 (Ξ), H₂O₂ + SB203580 (O). Σε όλες τις περιπτώσεις έχει πραγματοποιηθεί ανοσοσήμανση της σωληνίνης. Επιδράσεις: DPI: 25 μM, NAC: 250 μM, MEN: 25 μM, H₂O₂: 4 mM, SB203580: 10 μM. Μεγέθυνση: X1000.

Τα δεδομένα από τα πειράματα ανοσοφθορισμού της σωληνίνης με τη χρήση του αναστολέα SB203580 επιβεβαιώθηκαν και μετά από τη μελέτη των κυττάρων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Όταν αναστέλλεται η καταλυτική δραστηριότητα της p46, μειώνεται σε μεγάλο βαθμό η παρουσία άτυπων πολυμερών σωληνίνης. Στα κύτταρα ριζών, στις οποίες έγινε επίδραση με SB203580 + MEN, δεν βρέθηκαν παρακρύσταλλοι σωληνίνης, ενώ όλα τα πολυμερή που καταμετρήθηκαν ήταν ΜΣ, με μέση διάμετρο $23,94 \pm 0,16$ nm. Τα δεδομένα από την καταμέτρηση των πολυμερών σωληνίνης για τις περιπτώσεις των επιδράσεων με DPI, NAC και H₂O₂ παρουσία SB203580 συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Επιδράσεις	Μικροσωληνίσκοι		Μακροσωληνίσκοι	
	Συχνότητα (%)	Μέση Διάμετρος (nm)	Συχνότητα (%)	Μέση Διάμετρος (nm)
CONTROL	100.00 (n=365)	20.67 ± 0.13	-	-
DPI	7.40 (n=52)	23.77 ± 0.22	92.60 (n=646)	32.52 ± 0.16
SB/SB + DPI	73.50 (n=86)	23.84 ± 0.13	26.50 (n=31)	30.77 ± 0.56
NAC	4.90 (n=11)	24.30 ± 0.29	95.10 (n=212)	31.80 ± 0.23
SB/SB + NAC	74.65 (n=106)	24.06 ± 0.11	25.53 (n=36)	30.56 ± 0.40
H ₂ O ₂	22.73 (n=20)	24.27 ± 0.25	77.27 (n=68)	29.00 ± 0.22
SB/SB + H ₂ O ₂	72.44 (n=71)	23.63 ± 0.19	27.56 (n=27)	31.38 ± 0.55

Πίνακας 9. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης και τις καταμετρήσεις των πολυμερών της σωληνίνης σε κύτταρα επηρεασμένα με DPI, NAC, H₂O₂ (βλέπε και Πίνακα 6) και κύτταρα επηρεασμένα με SB203580 για 30 min και, στη συνέχεια, με DPI + SB203580, NAC + SB203580, H₂O₂ + SB203580 για 1 h (n: ο αριθμός των πολυμερών που καταμετρήθηκαν σε κάθε περίπτωση). Επιδράσεις: DPI: 25 μM, NAC: 250 μM, H₂O₂: 4 mM, SB203580: 10 μM.

Παρουσία του SB203580, σε όλες τις περιπτώσεις, ο αριθμός των μακροσωληνίσκων μειώνεται σημαντικά. Το ποσοστό των μακροσωληνίσκων ήταν αντίστοιχα 26,50%, 25,53% και 27,56% στα κύτταρα, τα οποία ήταν επηρεασμένα με SB203580 + DPI, SB203580 + NAC και SB203580 + H₂O₂ (Πίνακας 9). Αντίθετα, σε αυτά που είχαν επηρεαστεί μόνο με DPI, NAC και H₂O₂ οι μακροσωληνίσκοι αντιστοιχούσαν στο 92,60%, 95,10% και 77,27% του συνόλου των πολυμερών της σωληνίνης. Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι η δημιουργία των άτυπων πολυμερών σωληνίνης πραγματοποιείται μόνο όταν μεταβάλλονται σημαντικά τα επίπεδα των ROS και ότι η p46-MAPK συμμετέχει στους μηχανισμούς που οδηγούν στη δημιουργία τους.

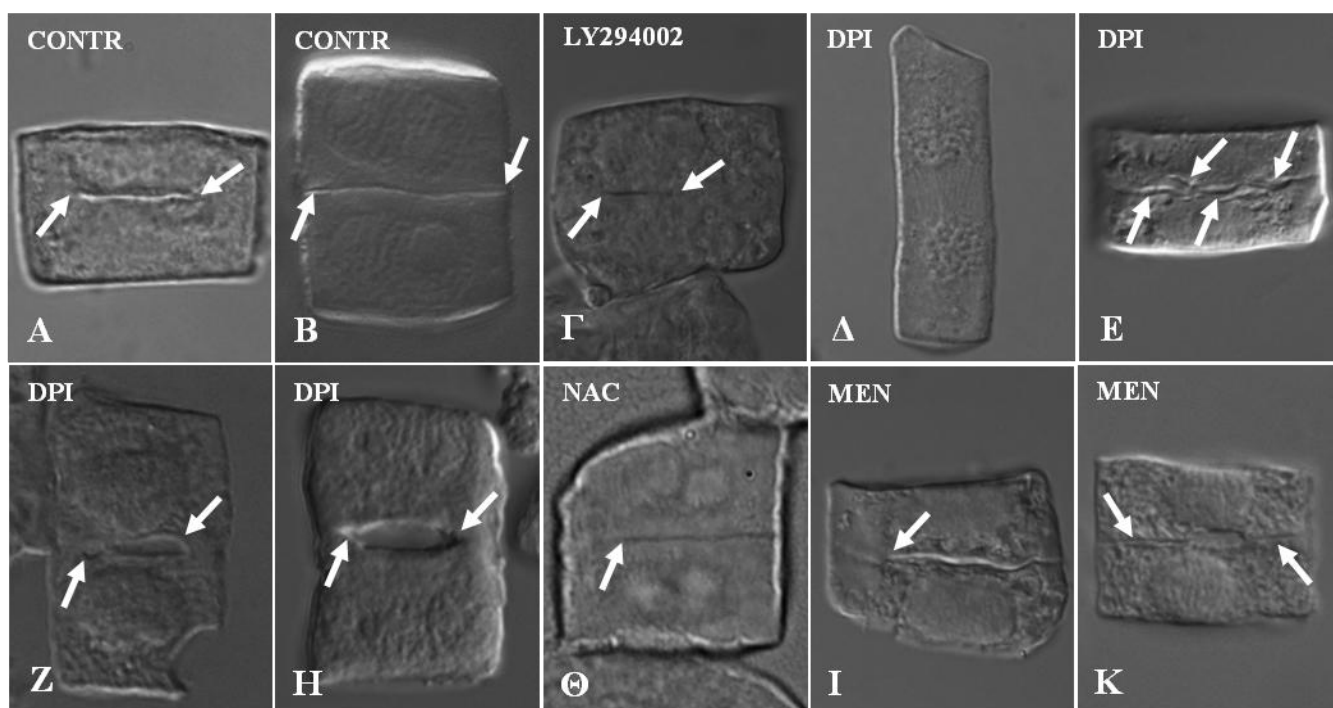
III.9 ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ROS ΣΤΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΔΙΑΙΡΕΣΗΣ

III.9.1 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει τη δημιουργία της κυτταρικής πλάκας

III.9.1.1 Δεδομένα οπτικού και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι μεταβολές των επιπέδων των ROS στα κυτοκινητικά κύτταρα επηρεάζουν την οργάνωση του φραγμοπλάστη (βλέπε ενότητα III.4.5), διερευνήθηκε εάν η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει και την ανάπτυξη της κυτταρικής πλάκας. Η κυτοκίνηση και ειδικότερα ο σχηματισμός της κυτταρικής πλάκας στα διαιρούμενα κύτταρα

των φυσιολογικών αρτιβλάστων των φυτών, τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, ακολουθεί το πρότυπο ανάπτυξης που περιγράφεται στην ενότητα I.2.4.1.1.1, και είναι κοινό στα ανώτερα φυτά.



Εικόνα 52. Κυτοκινητικά κύτταρα ακρόρριζων φυσιολογικών (Α,Β) και επηρεασμένων με LY294002 (Γ), DPI (Δ-Η), NAC (Θ), MEN (Ι,Κ) αρτιβλάστων του φυτού *T. turgidum*, όπως φαίνονται με το οπτικό σύστημα Nomarski. Τα βέλη δείχνουν την κυτταρική πλάκα. Επιδράσεις: CONTR: dH₂O 2 h, LY294002: 50 μM 2 h, DPI: 25 μM 2 h NAC: 250 μM 1,5 h, MEN 25 μM 2 h. Μεγέθυνση: X1300.

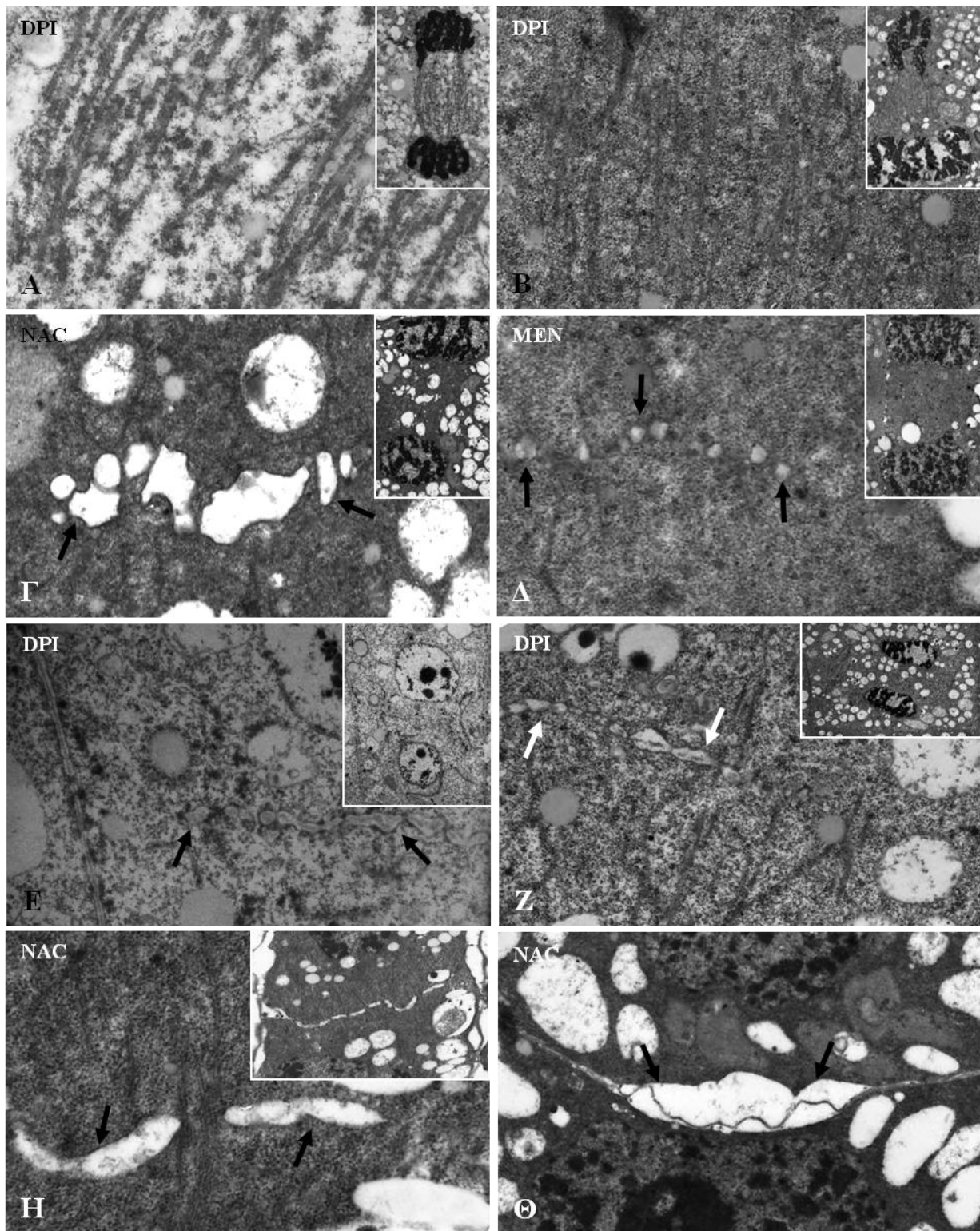
Στα απομονωμένα κυτοκινητικά κύτταρα φυσιολογικών και επηρεασμένων ακρόρριζων η κυτταρική πλάκα είναι ορατή με το οπτικό σύστημα Nomarski (Εικ. 52). Στις Εικ. 52Α,Β παρουσιάζονται διαδοχικά στάδια ανάπτυξης της κυτταρικής πλάκας σε κυτοκινητικά κύτταρα φυσιολογικών ακρόρριζων. Στην Εικ. 52Α αυτή εντοπίζεται μεταξύ των δύο θυγατρικών πυρήνων, ενώ στην Εικ. 52Β η φυγόκεντρη ανάπτυξή της προς την περιφέρεια του κυττάρου έχει ολοκληρωθεί. Η λεπτομερής μελέτη των επιπτώσεων της διατάραξης της ομοιόστασης των ROS στην οργάνωση της κυτταρικής πλάκας έδειξε ότι αυτές σχετίζονται με το επίπεδο της οργάνωσής της κατά την έναρξη της επίδρασης. Στα κύτταρα, τα οποία υφίστανται την επίδραση σε αρχικά στάδια της κυτοκίνησης, η δημιουργία της κυτταρικής πλάκας αναστέλλεται πλήρως (Εικ. 52Δ). Στην περίπτωση, κατά την οποία εισέρχονται στην επίδραση κυτοκινητικά κύτταρα με κυτταρική πλάκα σε ενδιάμεσα στάδια ανάπτυξης, σχηματίζεται άτυπη κυτταρική πλάκα στο ισημερινό επίπεδο, η οποία αποτελείται από ένα ή δύο μεγάλα ή από πολλά μικρότερα ανεξάρτητα διογκωμένα τμήματα (Εικ. 52Ε-Η). Σε πολλές περιπτώσεις αυτά δεν εντοπίζονται όλα στο ίδιο επίπεδο, φαίνεται δε ότι στερούνται της δυνατότητας περαιτέρω επέκτασης (Εικ. 52Ε). Οι κυτταρικές πλάκες που

υφίστανται επίδραση όταν βρίσκονται σε τελικά στάδια ανάπτυξης, σταθεροποιούνται στο κέντρο του κυττάρου ή εμφανίζονται να έχουν συντηχθεί με το ένα μητρικό τοίχωμα. Η περαιτέρω ανάπτυξή τους αναστέλλεται (Εικ. 52Γ,Θ,Ι), με αποτέλεσμα τη δημιουργία ατελών θυγατρικών τοιχωμάτων (Εικ. 52Γ,Θ,Ι). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκαν επηρεασμένα μετακυτοκινητικά κύτταρα, στα οποία η κεντρική περιοχή του νεαρού θυγατρικού κυτταρικού τοιχώματος ήταν διογκωμένη (Εικ. 52Κ). Η διόγκωση αυτή, συνήθως, οδηγεί στη δημιουργία ασυνέχειας στο κέντρο του θυγατρικού τοιχώματος.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν και με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Στις εικόνες 53Α,Β παρουσιάζονται κύτταρα επηρεασμένα με DPI. Με κριτήριο την οργάνωση των θυγατρικών πυρήνων και τα δύο κύτταρα έπρεπε να διαθέτουν μη σταθεροποιημένη κυτταρική πλάκα αρχικών σταδίων ανάπτυξης. Και στις δύο περιπτώσεις απουσιάζει η κυτταρική πλάκα από το ισημερινό επίπεδο, αν και τα κύτταρα περιέχουν δομές που αποτελούνται από μακροσωληνίσκους που προσομοιάζουν σε φραγμοπλάστη. Στο κύτταρο της Εικ. 53Α δεν εντοπίζονται κυστίδια μεταξύ των μακροσωληνίσκων. Επιπλέον, είναι ενδιαφέρον ότι στο κύτταρο της Εικ. 53Β, αν και συγκεντρώνονται κυστίδια μεταξύ των μακροσωληνίσκων του φραγμοπλάστη, αυτά δεν είναι διευθετημένα σε ένα επίπεδο και δεν συντήκονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν μεμβρανικές δομές κυτταρικής πλάκας, όμοιες εκείνων των φυσιολογικών κυτοκινητικών κυττάρων. Τα δεδομένα αυτά δικαιολογούν την απουσία κυτταρικών πλακών που διαπιστώνεται με το οπτικό μικροσκόπιο σε ορισμένα κύτταρα (Εικ. 52Δ).

Σε κυτοκινητικά κύτταρα, τα οποία εισέρχονται σε επίδραση με περισσότερο ή λιγότερο σταθεροποιημένη κυτταρική πλάκα, αυτή αποκτά άτυπη οργάνωση, ενώ αναστέλλεται η επέκτασή της προς την περιφέρεια του κυττάρου. Τα κύτταρα αυτά κατατάσσονται σε δύο ομάδες. Στην πρώτη σχηματίζονται σε κεντρική περιοχή ανεξάρτητες νησίδες μεμβρανικού υλικού, οι οποίες συχνά διευθετούνται σε διαφορετικά επίπεδα. Οι άτυπες αυτές νησίδες της κυτταρικής πλάκας εμφανίζουν ποικιλία μεγεθών, ορισμένες φορές είναι ιδιαίτερες διογκωμένες (Εικ. 53Γ,Δ), φαίνεται δε ότι αντιστοιχούν σε τομές των άτυπων κυτταρικών πλακών που έχουν παρατηρηθεί με το οπτικό μικροσκόπιο (Εικ. 52Ε-Η).

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν κύτταρα, τα οποία στην αρχή της επίδρασης διαθέτουν κυτταρικές πλάκες που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης. Αυτές σταθεροποιούνται στο κέντρο του κυττάρου, αλλά αναστέλλεται πλήρως η επέκτασή τους προς την περιφέρεια του κυττάρου, παρά το ότι στα περιθώριά τους υπάρχει «φραγμοπλάστης» μακροσωληνίσκων (Εικ. 53Ε,Ζ). Στο κύτταρο της Εικ. 53Η, η κυτταρική πλάκα έχει συντηχθεί με τα μητρικά τοιχώματα στη μία πλευρά του κυττάρου, ενώ έχει ανασταλεί η επέκτασή της προς την άλλη πλευρά. Αυτή σε τομή φαίνεται ότι αποτελείται από πολλά ανεξάρτητα διογκωμένα τμήματα, μεταξύ των οποίων υπάρχουν μακροσωληνίσκοι. Στα περιθώρια και στα διάκενά της δεν παρατηρούνται κυστίδια.

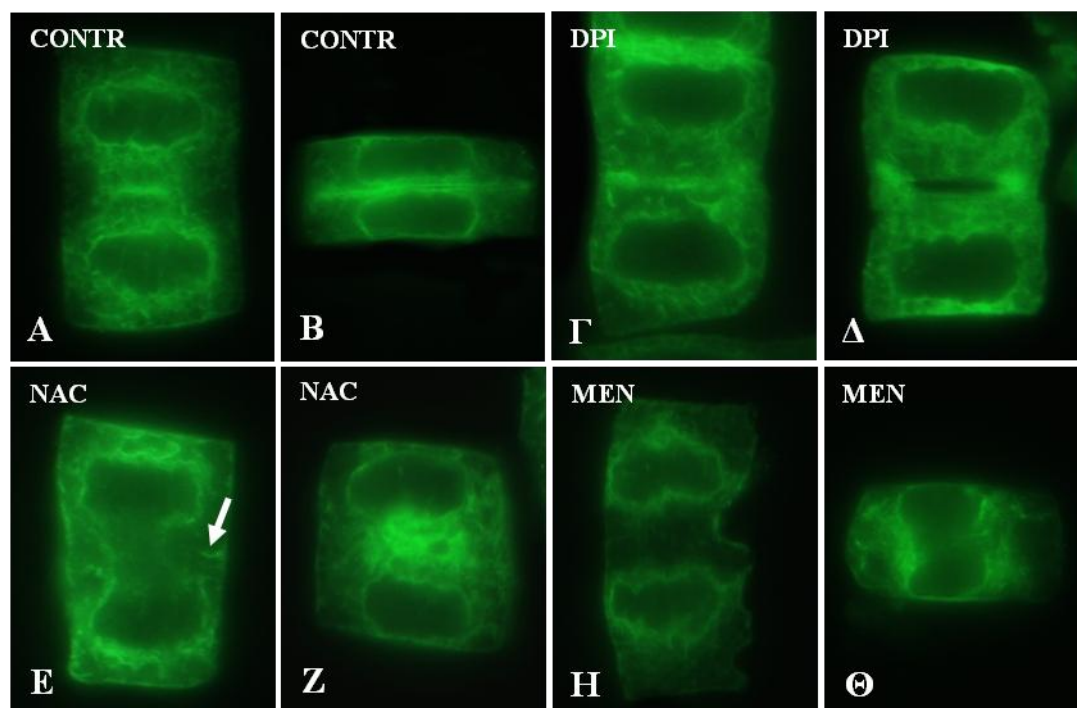


Εικόνα 53. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης κυτοκινητικών κυττάρων επηρεασμένων με DPI (Α,Β,Ε,Ζ), NAC (Γ,Η), MEN (Δ) και μετακυτοκινητικού κυττάρου επηρεασμένου με NAC (Θ). Οι ένθετες εικόνες στις (Α-Ζ) δείχνουν τους θυγατρικούς πυρήνες, ενώ στην (Η) την κυτταρική πλάκα. Στις (Γ-Η) τα βέλη δείχνουν περιοχές των άτυπων κυτταρικών πλακών. Στην (Θ) τα βέλη δείχνουν την κεντρική περιοχή του θυγατρικού τοιχώματος, η οποία έχει διογκωθεί. Επιδράσεις: DPI: 25 μ M 2 h, NAC: 100 μ M 4 h, MEN 50 μ M 2 h. Μεγέθυνση: (Α) X40000, (Β) X15000, (Γ-Η) X20000, (Θ) 12000.

Στο μετακυτοκινητικό κύτταρο της Εικ. 53Θ η κεντρική περιοχή του θυγατρικού κυτταρικού τοιχώματος έχει διογκωθεί και έχει μετασχηματιστεί σε ένα ηλεκτρονικά διαφανή μεμβρανώδη σχηματισμό. Τα περιθώρια του θυγατρικού κυτταρικού τοιχώματος αυτού που είναι αντίστοιχο εκείνου της Εικ. 52Κ, έχουν τυπική δομή. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η διογκωμένη περιοχή του θυγατρικού κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να καταστραφεί με αποτέλεσμα τη δημιουργία τοιχωματικής ασυνέχειας στην περιοχή αυτή.

III.9.1.2 Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών ενδοπλασματικού δικτύου

Είναι γνωστό ότι σε αρχικά κυτοκινητικά στάδια συσσωρεύεται στην περιοχή του φραγμοπλάστη και της κυτταρική πλάκας ενδοπλασματικό δίκτυο (Seguí-Simarro και συν. 2004). Η ανοσοεντόπιση του ενδοπλασματικού δικτύου και του πυρηνικού φακέλου με το αντίσωμα 2E7, το οποίο αναγνωρίζει τις πρωτεΐνες που φέρουν το πεπτίδιο HDEL, έδειξε ότι μεγάλες ποσότητες ενδοπλασματικού δικτύου εντοπίζονται στη νεαρή κυτταρική πλακά των φυσιολογικών κυτοκινητικών κυττάρων, και γύρω από αυτή. Στα μετακυτοκινητικά κύτταρα, στοιχεία ενδοπλασματικού δικτύου εντοπίζονται κατά μήκος του νεαρού θυγατρικού τοιχώματος (Εικ. 54Α,Β).



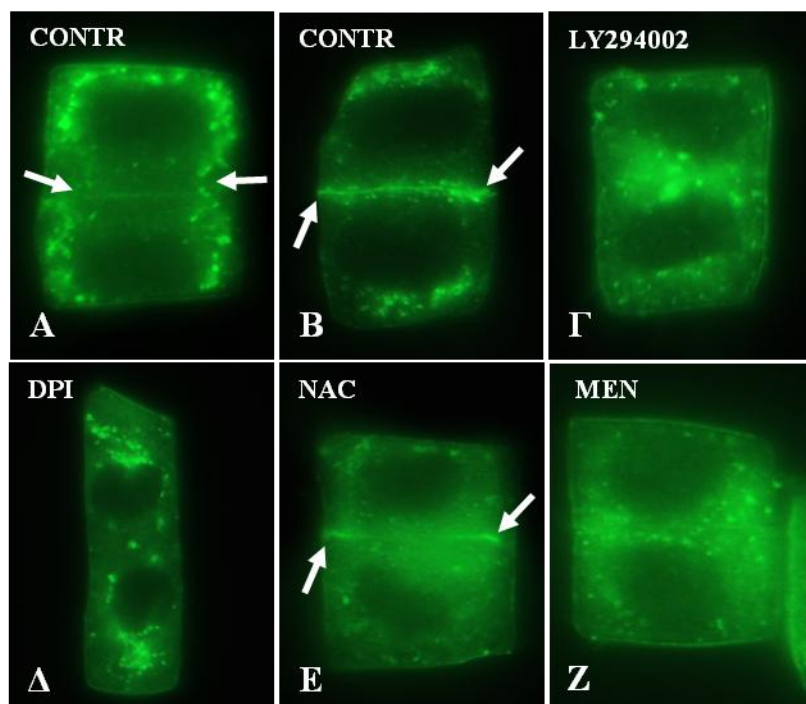
Εικόνα 54. Κυτοκινητικά κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum* από φυσιολογικά (Α,Β) και επηρεασμένα (Γ-Θ) αρτίβλαστα, μετά από ανοσοεντόπιση των πρωτεϊνών που φέρουν το πεπτίδιο HDEL. Με το αντίσωμα αυτό επιτυγχάνεται η ανοσοεντόπιση του ενδοπλασματικού δικτύου και του πυρηνικού φακέλου. Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 50 μM 2 h, NAC: 500 μM 1,5 h, MEN 25 μM 2 h. Μεγέθυνση: X1200.

Τα κυτοκινητικά κύτταρα των επηρεασμένων ακρόρριζων χαρακτηρίζονται από διατάραξη της κατανομής του ενδοπλασματικού δικτύου. Σε μερικά από αυτά απουσιάζει το ενδοπλασματικό δίκτυο από το ισημερινό επίπεδο (Εικ. 54H), ενώ αντίθετα άλλα κύτταρα φέρουν ιδιαίτερα αυξημένες συναθροίσεις ενδοπλασματικού δικτύου σε ολόκληρη την περιοχή μεταξύ των δύο θυγατρικών πυρήνων (Εικ. 54Z). Στην Εικ. 54Γ παρουσιάζεται κυτοκινητικό κύτταρο επηρεασμένο από DPI, στο οποίο η κυτταρική πλάκα αποτελείται από περισσότερα του ενός τμήματα. Πλησίον αυτών εντοπίζονται συναθροίσεις ενδοπλασματικού δικτύου, ανομοιόμορφα κατανεμημένες. Επίσης, το κυτόπλασμα που περιβάλλει τις διογκωμένες κυτταρικές πλάκες στερείται μεμβρανών ενδοπλασματικού δικτύου, το οποίο εντοπίζεται μόνο στα περιθώριά τους (Εικ. 54Δ,Θ). Σε ορισμένα κύτταρα δεν ανιχνεύεται ενδοπλασματικό δίκτυο στο κυτόπλασμα μεταξύ των δύο θυγατρικών πυρήνων, αλλά μόνο σε περιφερειακές θέσεις, όπου η κυτταρική πλάκα φαίνεται ότι έχει συντηχθεί με το μητρικό τοίχωμα (βέλος στην Εικ. 54Ε).

III.9.1.3 Ανοσοσήμανση PLDs

Λαμβάνοντας υπόψη τα όσα περιγράφηκαν προηγουμένως και το γεγονός ότι η κυτοκίνηση χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη παραγωγή, μεταφορά και σύντηξη κυστιδίων δικτυοσωματίων, επιχειρήθηκε η διερεύνηση της κατανομής των PLDs μετά τη διατάραξη της ομοιόστασης των ROS στα κυτοκινητικά κύτταρα. Οι PLDs επελέγησαν να μελετηθούν διότι είναι ένζυμα τα οποία εντοπίζονται, μεταξύ άλλων, στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και των δικτυοσωματίων. Επιπλέον, προωθούν την παραγωγή κυστιδίων από τα τελευταία, εμπλέκονται δε και σε πορείες ενδοκύτωσης και εξωκύτωσης (Freyberg και συν. 2003).

Η ανοσοσήμανση των PLDs αποκάλυψε ότι τα φυσιολογικά κύτταρα που βρίσκονται στην αρχή της κυτοκίνησης διαθέτουν πολυάριθμους σφαιρικούς σχηματισμούς που εκπέμπουν σήμα φθορισμού. Οι περισσότεροι από αυτούς εντοπίζονται γύρω από τους δύο θυγατρικούς πυρήνες, λίγοι δε μεταξύ αυτών (Εικ. 55Α). Οι σχηματισμοί αυτοί είναι πιθανόν ότι αντιστοιχούν σε δικτυοσωμάτια, τα οποία σε αυτή τη φάση παράγουν πολυάριθμα κυστίδια. Το σήμα του φθορισμού που εκπέμπει η αναπτυσσόμενη κυτταρική πλάκα δεν είναι ιδιαίτερα έντονο (Εικ. 55Α). Στα κύτταρα που βρίσκονται στο τέλος της κυτοκίνησης εντοπίζεται έντονο σήμα φθορισμού κατά μήκος όλης της κυτταρικής πλάκας, ενώ εκατέρωθεν αυτής υπάρχουν πολυάριθμοι φθορίζοντες μικροί σφαιρικοί σχηματισμοί (Εικ. 55Β). Έντονα φθορίζοντες σφαιρικοί σχηματισμοί εντοπίζονται επίσης στην περιοχή των θυγατρικών κυττάρων απέναντι από την κυτταρική πλάκα (Εικ. 55Β).

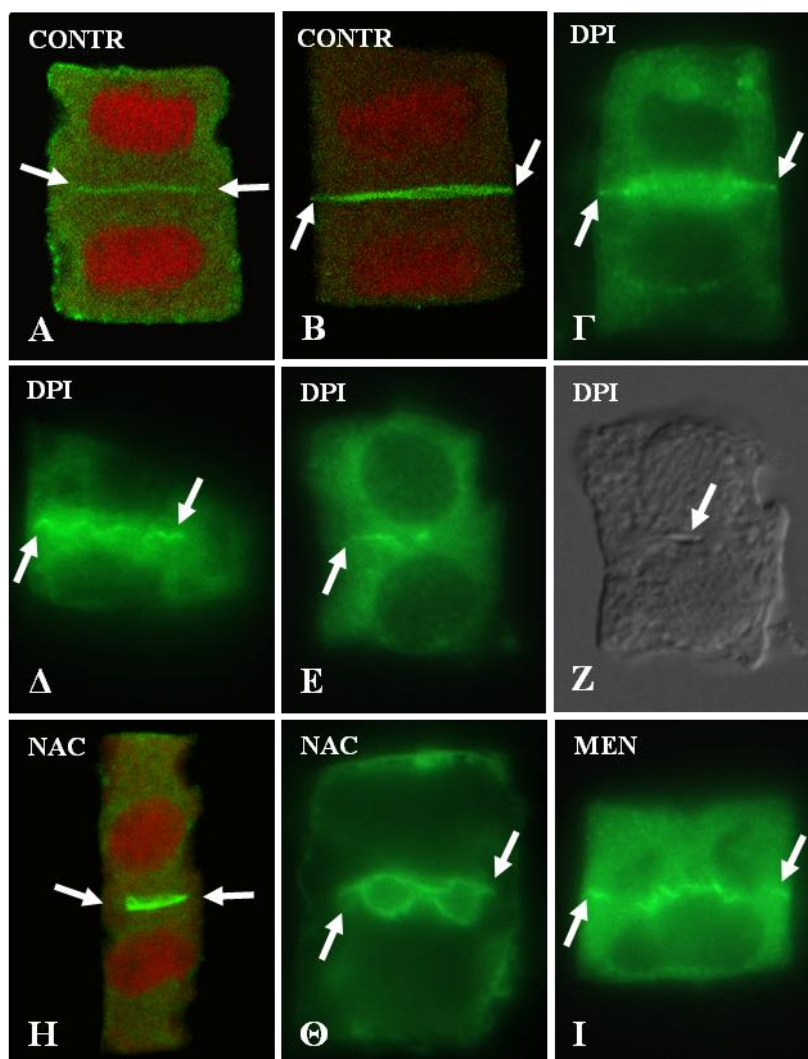


Εικόνα 55. Κυτοκινητικά/μετακυτοκινητικά κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum* από φυσιολογικά (A,B) και επηρεασμένα (Γ-Z) αρτίβλαστα, μετά από ανοσοεντόπιση της PLD. Τα βέλη δείχνουν την κυτταρική πλάκα ή το νεαρό θυγατρικό κυτταρικό τοίχωμα. Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, LY294002: 50 μ M 2 h, DPI: 25 μ M 2 h, NAC: 250 μ M 1,5 h, MEN 25 μ M 2 h. Μεγέθυνση: X1200.

Στα επηρεασμένα κυτοκινητικά κύτταρα, οι σφαιρικοί σχηματισμοί που εκπέμπουν σήμα φθορισμού είναι λιγότεροι σε αριθμό και εμφανίζουν διαφορετική κατανομή από εκείνη των φυσιολογικών κυτοκινητικών κυττάρων (Εικ. 55Γ-Z σύγκρινε με Εικ. 55Α,Β). Η παρουσία των PLDs στα κύτταρα, στα οποία έχει ανασταλεί ο σχηματισμός της κυτταρικής πλάκας, είναι περιορισμένη στην περιοχή μεταξύ των θυγατρικών πυρήνων (Εικ. 55Δ,Ζ). Φθορίζοντες σφαιρικοί σχηματισμοί εντοπίζονται στην περιοχή των πόλων, όπου σχηματίζουν εκτεταμένες συναθροίσεις ή παρουσιάζουν τυχαία κατανομή (Εικ. 55Δ,Ζ), γεγονός το οποίο δεν παρατηρείται στα φυσιολογικά κυτοκινητικά κύτταρα. Στα επηρεασμένα κυτοκινητικά κύτταρα, τα διογκωμένα μεμβρανικά τμήματα της κυτταρικής πλάκας εκπέμπουν επίσης σήμα φθορισμού (Εικ. 55Γ). Τέλος, σε κύτταρα που βρίσκονται στο τέλος της κυτοκίνησης, PLDs εντοπίζονται μόνο στα περιθώρια της κυτταρικής πλάκας, ενώ απουσιάζουν από την κεντρική περιοχή της (Εικ. 55Ε σύγκρινε με Εικ. 55Β). Είναι πιθανό ότι η περιοχή αυτή αντιστοιχεί στη διογκωμένη περιοχή των νεαρών θυγατρικών τοιχωμάτων, όπως εκείνων που παρουσιάζονται στις Εικ. 52Κ, Εικ. 53Θ.

III.9.1.4 Ανοσοσήμανση της συνταξίνης KNOLLE

Η σύντηξη των κυστιδίων που οδηγεί στη συνέχεια στη δημιουργία της κυτταρικής πλάκας, επιτυγχάνεται με τη βοήθεια πρωτεϊνών που εντοπίζονται στην επιφάνειά τους. Μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών είναι και οι συνταξίνες. Μία από τις συνταξίνες των φυτικών κυττάρων είναι η πρωτεΐνη KNOLLE, η οποία είναι ομόλογη της συνταξίνης 1 των ζωικών κυττάρων (Verma 2001).



Εικόνα 56. Κυτοκινητικά κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum* από φυσιολογικά (Α,Β) και επηρεασμένα (Γ-Ι) αρτίβλαστα, μετά από ανοσοεντόπιση της συνταξίνης KNOLLE. Οι (Α,Β,Η) είναι αποτέλεσμα προβολής οπτικών τομών CLSM. Σε αυτές με κόκκινο χρώμα εμφανίζονται οι πυρήνες των κυττάρων, έπειτα από χρώση του DNA με PI. Οι (Γ-Ε,Θ,Ι) έχουν ληφθεί με τη βοήθεια μικροσκοπίου επιφθορισμού. Η (Ζ) παρουσιάζει το κύτταρο της εικόνας (Ε), όπως αυτό φαίνεται με το οπτικό σύστημα Nomarski. Τα βέλη δείχνουν την κυτταρική πλάκα. Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 25 μM 2 h, NAC: 250 μM 2 h, MEN 25 μM 2 h. Μεγέθυνση: X1200.

Χρησιμοποιώντας αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη KNOLLE, επιχειρήθηκε να διερευνηθεί το ενδεχόμενο οι ατυπίες της ανάπτυξης της κυτταρικής πλάκας στα

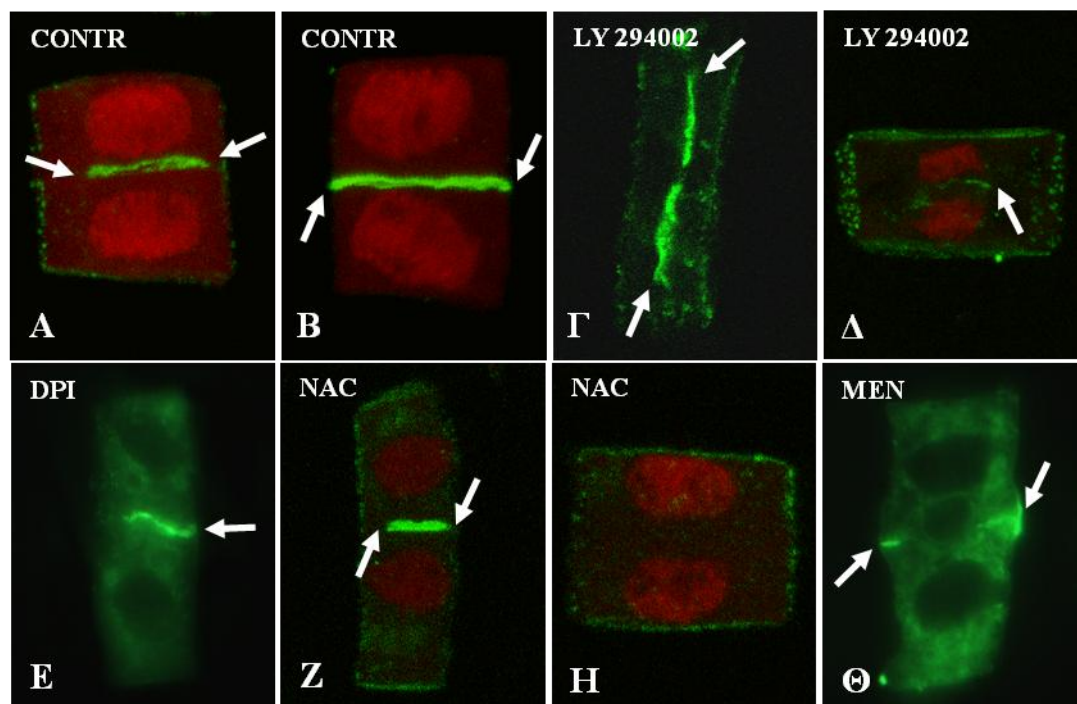
επηρεασμένα κυτοκινητικά κύτταρα, να σχετίζονται με την ανάσχεση της σύντηξης των κυστιδίων με αυτή. Στα φυσιολογικά κυτοκινητικά κύτταρα, η KNOLLE απαντά τόσο στις αναπτυσσόμενες κυτταρικές πλάκες, όσο και σε εκείνες των οποίων η επέκταση έχει ολοκληρωθεί και έχουν συντηχθεί με τα μητρικά τοιχώματα (Εικ. 56Α,Β). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι σύντηξη κυστιδίων πραγματοποιείται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της κυτταρικής πλάκας. Στα τελικά στάδια ανάπτυξης, η σύντηξη κυστιδίων συμβάλλει στο κλείσιμο των ασυνεχειών και τη μετατροπή της σε συνεχή σχηματισμό.

Στα επηρεασμένα κυτοκινητικά κύτταρα, το σήμα φθορισμού της KNOLLE είναι έντονο στις σταθεροποιημένες περιοχές της κυτταρικής πλάκας, η επέκταση των οποίων προς την περιφέρεια έχει ανασταλεί (Εικ. 56Δ,Η,Ι). Η απουσία της από κάποια συγκεκριμένη περιοχή είναι πιθανόν να σχετίζεται με την ανάσχεση της διαδικασίας σύντηξης κυστιδίων και την πορεία επιπεδοποίησης της κυτταρικής πλάκας. Για παράδειγμα, όπως προκύπτει από την κατανομή του σήματος φθορισμού στην Εικ. 56Ε, η KNOLLE εντοπίζεται σε δύο θέσεις της κυτταρικής πλάκας. Η θέση, από την οποία απουσιάζει, αντιστοιχεί σε άτυπο διογκωμένο τμήμα κυτταρικής πλάκας (Εικ. 56Ζ). Σε άλλες περιπτώσεις φθορισμός εντοπίζεται περιμετρικά των άτυπων διογκωμένων τμημάτων της κυτταρικής πλάκας (Εικ. 56Θ). Σε μετακυτοκινητικά κύτταρα, στα οποία έχει αρχίσει ο μετασχηματισμός της κυτταρικής πλάκας σε θυγατρικό τοίχωμα και η κεντρική περιοχή είναι διογκωμένη (Εικ. 52Κ, Εικ. 53Θ), έντονο σήμα φθορισμού εντοπίζεται στις περιφερειακές θέσεις, όχι όμως και στο κέντρο της (Εικ. 56Γ).

III.9.1.5 Ανοσοεντόπιση καλλόξης

Είναι γνωστό ότι, στην αναπτυσσόμενη κυτταρική πλάκα, συντίθενται μεγάλες ποσότητες καλλόξης από ειδικά ενζυμικά σύμπλοκα που εντοπίζονται στη μεμβράνη που την επενδύει. Κατά το μετασχηματισμό της κυτταρικής πλάκας σε κυτταρικό τοίχωμα, η καλλόξη αποικοδομείται και αντικαθίσταται από κυτταρίνη (Samuels και συν. 1995). Σε κυτοκινητικά κύτταρα φυσιολογικών ακρόρριζων, στα οποία έχει ανοσοσημανθεί η καλλόξη, φθορίζει όλη η επιφάνεια των αναπτυσσόμενων κυτταρικών πλακών, όπως και εκείνων που έχουν συντηχθεί με τα μητρικά τοιχώματα (Εικ. 57Α,Β). Στα επηρεασμένα κύτταρα, στα οποία έχει ανασταλεί η δημιουργία της κυτταρικής πλάκας, καλλόξη εντοπίζεται κατά μήκος των μητρικών τοιχωμάτων (Εικ. 57Η). Φαίνεται επίσης ότι σύνθεση καλλόξης διεξάγεται και στις νησίδες κυτταρικής πλάκας, οι οποίες αδυνατούν να συντηχθούν, γεγονός που υποστηρίζεται από τις κοκκιώδεις εναποθέσεις καλλόξης που εντοπίζονται μεταξύ των θυγατρικών πυρήνων στα επηρεασμένα κυτοκινητικά κύτταρα (Εικ. 56Δ). Επίσης, μεγάλες ποσότητες καλλόξης εναποτίθενται στις άτυπες κυτταρικές πλάκες, που αποτελούνται από ανεξάρτητα τμήματα και σε εκείνες, των οποίων η επέκταση προς την περιφέρεια έχει ανασταλεί, συχνά σε μεγάλες ποσότητες (57Γ,Ε,Ζ). Σε κύτταρα, στα οποία το νεαρό θυγατρικό τοίχωμα διαθέτει

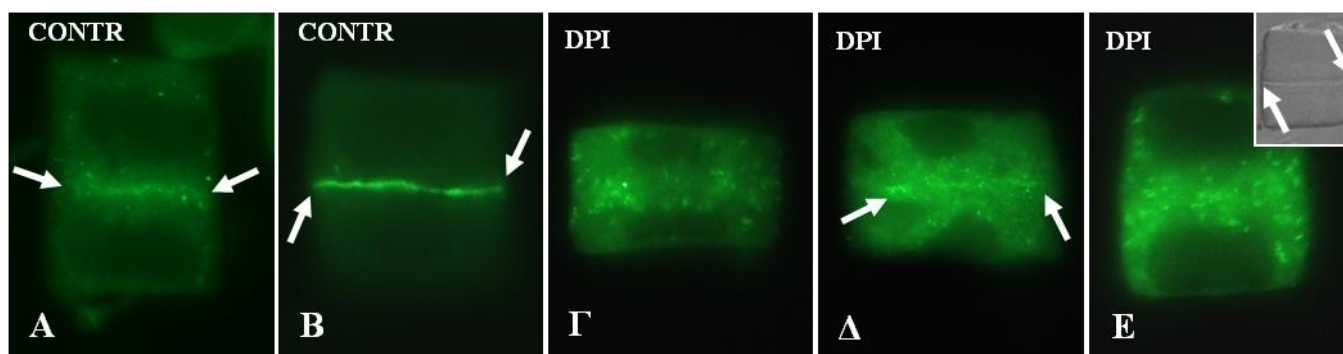
στο κέντρο μεγάλους διογκωμένους σχηματισμούς, το σήμα της καλλόξης απουσιάζει από κεντρικές θέσεις, ενώ εντοπίζεται σε περιφερειακές θέσεις του (Εικ. 57Θ).



Εικόνα 57. Κυτοκινητικά κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum* από φυσιολογικά (Α,Β) και επηρεασμένα (Γ-Θ) αρτίβλαστα, μετά από ανοσοσήμανση της καλλόξης. Η (Γ) αντιπροσωπεύει κεντρική οπτική τομή που έχει ληφθεί σε CLSM. Οι (Α,Β,Δ,Ζ,Η) είναι αποτέλεσμα προβολής οπτικών τομών του CLSM. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζονται οι πυρήνες των κυττάρων, έπειτα από τη χρώση του DNA με PI. Οι (Ε,Θ) έχουν ληφθεί με τη βοήθεια μικροσκοπίου επιφθορισμού. Τα βέλη δείχνουν τυπικές ή άτυπες κυτταρικές πλάκες. Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, LY294002 50 μM 2 h, DPI: 25 μM 2 h, NAC: 250 μM 2 h, MEN 25 μM 2 h. Μεγέθυνση: X1200.

III.9.1.6 Ανοσοεντόπιση μερικώς εστεροποιημένων ομογαλακτουρονανών

Έχει αναφερθεί, ότι στη συγκρότηση της κυτταρικής πλάκας συμβάλλουν και ενδοκυττωτικά κυστίδια που παράγονται από το πλασμαλήμμα, τα οποία μεταφέρουν πηκτίνες, κυρίως ορισμένες μερικώς εστεροποιημένες ομογαλακτουρονάνες (Dhonukshe και συν. 2006). Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε η πιθανότητα οι μεταβολές των επιπέδων των ROS να επηρεάζουν την κατανομή των πηκτινών αυτών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα JIM5, που αναγνωρίζει τις μερικώς εστεροποιημένες ομογαλακτουρονάνες, των οποίων ο βαθμός εστεροποίησης είναι έως 40% (Willats και συν. 2000).



Εικόνα 58. Κυτοκινητικά κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum* από φυσιολογικά (Α,Β) και επηρεασμένα (Γ-Ε) αρτίβλαστα, μετά από ανοσοσήμανση με το αντίσωμα JIM5 που αναγνωρίζει εκλεκτικά τις μερικώς εστεροποιημένες (μέχρι 40%) πηκτίνες. Στην (Ε) η ένθετη εικόνα δείχνει το κύτταρο, όπως φαίνεται με το οπτικό σύστημα Nomarski. Τα βέλη δείχνουν την κυτταρική πλάκα. Επιδράσεις: CONTR: H₂O 2 h, DPI: 25 μM 2 h. Μεγέθυνση: X1150.

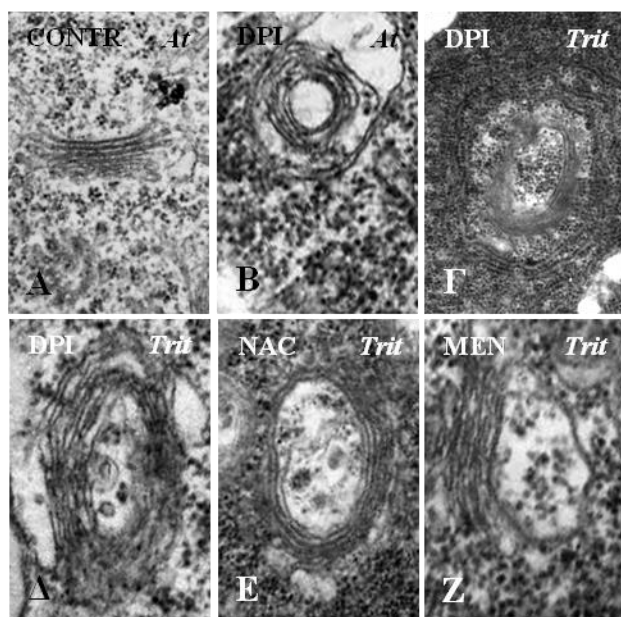
Στα φυσιολογικά κυτοκινητικά κύτταρα το αντίσωμα αυτό «αναγνωρίζει» κυτταρικές πλάκες σε προχωρημένα στάδια ανάπτυξης, καθώς επίσης και μικρούς σφαιρικούς σχηματισμούς που εντοπίζονται πλησίον της κυτταρικής πλάκας ή σε άλλες θέσεις (Εικ. 58Α). Αυτοί οι σχηματισμοί πιθανόν αντιστοιχούν σε ενδοσώματα, στα οποία κατευθύνονται τα ενδοκυτταρικά κυστίδια (Baluška και συν. 2005). Σε κύτταρα που βρίσκονται στο τέλος της κυτοκίνησης, αυτή η κατηγορία πηκτινών έχει ιδιαίτερα έντονη παρουσία σε ολόκληρη την επιφάνεια της κυτταρικής πλάκας που έχει συντηχθεί με τα μητρικά τοιχώματα (Εικ. 58Β).

Στα επηρεασμένα κυτοκινητικά κύτταρα οι σφαιρικοί σχηματισμοί που αναγνωρίζονται από το αντίσωμα JIM5 είναι περισσότεροι σε αριθμό και μεγαλύτεροι σε μέγεθος σε σύγκριση με εκείνους των φυσιολογικών κυττάρων (Εικ. 58Γ-Ε σύγκρινε με Εικ. 58Α,Β). Αυτοί εντοπίζονται πλησίον των άτυπων κυτταρικών πλακών, καθώς και σε άλλες κυτοπλασματικές θέσεις (Εικ. 58Γ,Δ). Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι σε κύτταρα, στα οποία η κυτταρική πλάκα είχε ήδη συντηχθεί με τα μητρικά τοιχώματα στην αρχή της επίδρασης (ένθετη Εικ. 58Ε), δεν παρατηρείται σήμα φθορισμού κατά μήκος αυτής (Εικ. 58Ε σύγκρινε με Εικ 58Β). Αντίθετα, σε αυτά υπάρχουν πολυάριθμοι φθορίζοντες σφαιρικοί σχηματισμοί, οι οποίοι κατανέμονται τυχαία σε ολόκληρο τον κυτταρικό χώρο (Εικ. 58Ε σύγκρινε με Εικ 58Β). Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS δεν επηρεάζει τη μεταφορά των μερικώς εστεροποιημένων πηκτινών από το κυτταρικό τοίχωμα στο εσωτερικό των κυττάρων, μέσω ενδοκύτωσης. Ωστόσο, είναι πιθανόν ότι αναστέλλεται η μετέπειτα στόχευση των μορίων αυτών προς την κυτταρική πλάκα.

III.9.1.7. Διατάραξη της δομής των δικτυοσωματίων στα επηρεασμένα κύτταρα

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, σε αριθμό επηρεασμένων κυττάρων που βρίσκονται στην αρχή της κυτοκίνησης δεν παρατηρούνται κυστίδια στην περιοχή του άτυπου φραγμοπλάστη. Ως εκ τούτου, μελετήθηκε η δομή των δικτυοσωματίων σε κύτταρα επηρεασμένα με DPI, NAC και MEN. Στα φυσιολογικά κύτταρα και των δύο φυτών που μελετήθηκαν, τα δικτυοσωμάτια έχουν την τυπική δομή των οργανιδίων αυτών στα ανώτερα φυτά. Στην Εικ. 59Α φαίνεται ένα δικτυοσωμάτιο του φυτού *A. thaliana*, στο οποίο αναγνωρίζεται η εκκριτική και η αναγεννώμενη πλευρά, καθώς και τα κυστίδια που αποκόπτονται από τα άκρα των σακκιδίων.

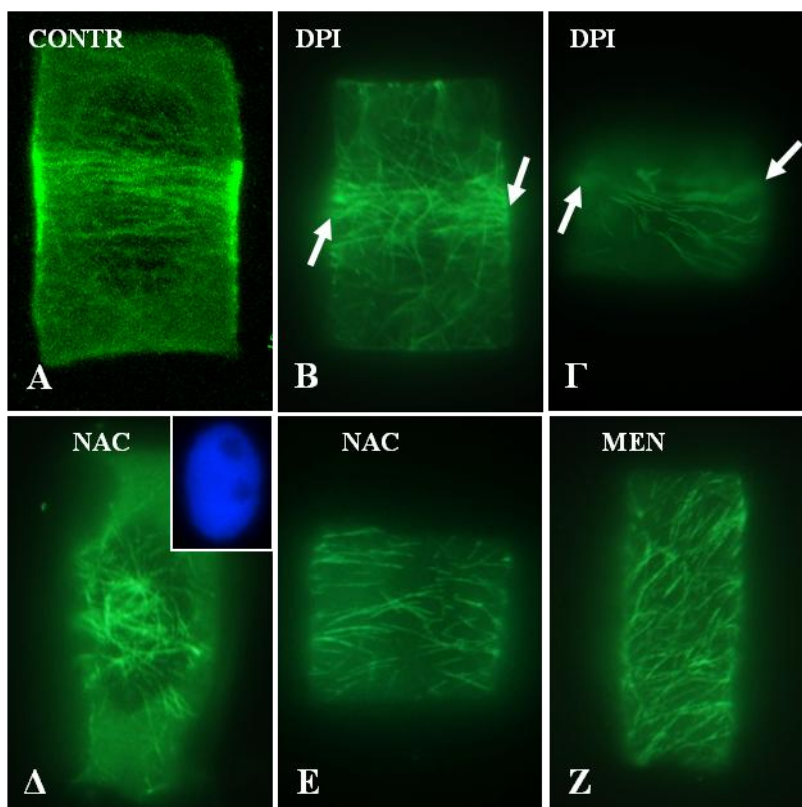
Έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι ουσίες που διαταράσσουν την ομοιόσταση των ROS, διαταράσσουν και την παραγωγή κυστιδίων από τα δικτυοσωμάτια. Η επιφάνεια των σακκιδίων αυξάνει και συχνά αυτά καθίστανται καμπύλα, ορισμένες φορές μάλιστα τα δικτυοσωμάτια σε τομές εμφανίζουν δακτυλιοειδή μορφή ή μορφή U (Εικ. 59Β-Ζ). Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή των δικτυοσωματίων σε «κυπελοειδείς» σχηματισμούς, στο εσωτερικό των οποίων εγκλωβίζονται κυτοπλασματικά στοιχεία (Εικ. 59Β-Ζ). Τα άτυπα αυτά δικτυοσωμάτια εγκλωβίζουν κυστίδια και ριβοσώματα. Σε μερικές περιπτώσεις το εσωτερικό σακκίδιο, το οποίο πιθανόν αντιστοιχεί στο TGN (*trans*-golgi network, *trans*-δίκτυο Golgi), «απελευθερώνεται» από τη συστοιχία των σακκιδίων του δικτυοσωματίου (Εικ. 59Ζ), ενώ σε άλλες παραμένει σε αυτό (Εικ. 59Ε). Σε κάποιες περιπτώσεις τα επηρεασμένα δικτυοσωμάτια περιβάλλονται από ενδοπλασματικό δίκτυο (Εικ. 59Γ). Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι οι σημαντικές μεταβολές των επιπέδων των ROS επηρεάζουν δραματικά τη δομή και τη δραστηριότητα των δικτυοσωματίων.



Εικόνα 59. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου φυσιολογικών (Α) και επηρεασμένων (Β-Ζ) κυττάρων *A. thaliana* (Α,Β) και *T. turgidum* (Γ-Ε) με DPI (Β-Δ), NAC (Ε) και MEN (Ζ). Οι εικόνες δείχνουν δικτυοσωμάτια. Ορισμένες φορές στα επηρεασμένα κύτταρα, τα δικτυοσωμάτια εμφανίζουν δακτυλιοειδή μορφή και στο εσωτερικό τους εντοπίζονται κυτοπλασματικά στοιχεία. Επιδράσεις: DPI: 25 μ M 2 h, NAC: 500 μ M 1 h, MEN: 50 μ M 2 h. Μεγέθυνση: X40000.

III.9.2 Οι ROS εμπλέκονται στον καθορισμό του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης

Τα δεδομένα της ενότητας III.4.2 αποκάλυψαν για πρώτη φορά ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS οδηγεί στη διατάραξη της οργάνωσης και ωρίμανσης της προ-προφασικής ζώνης ΜΣ. Μεταξύ άλλων, η προ-προφασική ζώνη απουσιάζει από έναν αριθμό επηρεασμένων προ-προφασικών/προφασικών κυττάρων (Εικ. 60Δ-Z σύγκρινε με Εικ. 60Α), τα οποία αναγνωρίζονται από την προχωρημένη συμπίκνωση της χρωματίνης (ένθετη Εικ. 60Δ), ενώ σε αριθμό άλλων εμφανίζονται στην περιοχή της άτυπα πολυμερή σωληνίνης (Εικ. 60Β, Γ σύγκρινε με Εικ. 60Α).



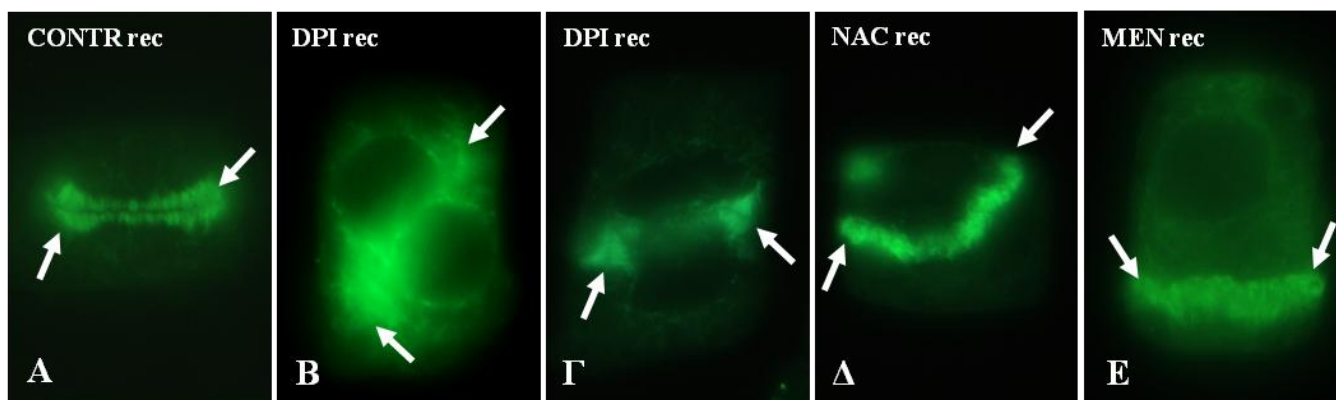
Εικόνα 60. Προ-προφασικά/προφασικά κύτταρα ακρόρριζου φυσιολογικών (Α) και επηρεασμένων (Β-Ζ) αρτιβλάστων του φυτού *T. turgidum*, όπως φαίνονται μετά από ανοσοεντόπιση της σωληνίνης σε μικροσκόπιο επιφθορισμού. Στην (Δ) η ένθετη εικόνα δείχνει τον πυρήνα του κυττάρου, μετά από χρώση του DNA με Hoechst 33258. Άτυπα πολυμερή σωληνίνης εντοπίζονται στην περιοχή της προ-προφασικής ζώνης (βέλη στις Β,Γ σύγκρινε με Α). Στα κύτταρα στις (Δ-Ζ) η προ-προφασική ζώνη απουσιάζει. Επιδράσεις: DPI: 25 μ M 2 h, NAC: 250 μ M 2 h, MEN: 25 μ M 2 h. Μεγέθυνση: X1200.

Δεδομένης της απουσίας της προ-προφασικής ζώνης από σημαντικό αριθμό επηρεασμένων κυττάρων, διερευνήθηκε η συμμετοχή των ROS στους μηχανισμούς καθορισμού του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης στο ακρόρριζο. Αρχικά προσδιορίστηκε το ποσοστό των κυττάρων που στερούνται προ-προφασικής ζώνης. Σε απομονωμένα μεριστωματικά κύτταρα αρτιβλάστων, τα οποία είχαν υποστεί επίδραση DPI, NAC ή MEN για 4 h, πραγματοποιήθηκε ανοσοσήμανση της σωληνίνης και χρώση του DNA με Hoechst

33258. Αυτά κατατάχθηκαν στις επιμέρους φάσεις του κυτταρικού κύκλου, με βάση τη συμπύκνωση της χρωματίνης και την οργάνωση των πολυμερών της σωληνίνης. Μετρήθηκαν συνολικά 1029, 1003 και 792 κύτταρα επηρεασμένα με DPI, NAC και MEN αντίστοιχα. Μεταξύ αυτών, υπήρχαν 250 προ-προφασικά/προφασικά κύτταρα επηρεασμένα με DPI, 230 επηρεασμένα με NAC και 182 κύτταρα επηρεασμένα με MEN. Το 23,87% των προφασικών/προφασικών κυττάρων που είχε υποστεί επίδραση DPI, στερείτο προ-προφασικής ζώνης ΜΣ. Το αντίστοιχο ποσοστό των προ-προφασικών/προφασικών κυττάρων των επηρεασμένων με NAC ήταν 28,35% και εκείνο των κυττάρων που είχαν επηρεαστεί με MEN 22,15%.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο προσανατολισμός του φραγμοπλάστη και η διευθέτηση των θυγατρικών κυτταρικών τοιχωμάτων ακρόρριζων, στα οποία είχε διαταραχθεί η ομοιόσταση των ROS, μετά την ανάκαμψή τους σε φυσιολογικές συνθήκες. Με αυτό τον τρόπο επιχειρήθηκε η διερεύνηση της συμπεριφοράς των κυτοκινητικών κυττάρων, τα οποία κατά τη διάρκεια της επίδρασης εστερούντο προ-προφασικής ζώνης, ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή συμμετοχή των ROS στον καθορισμό του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης.

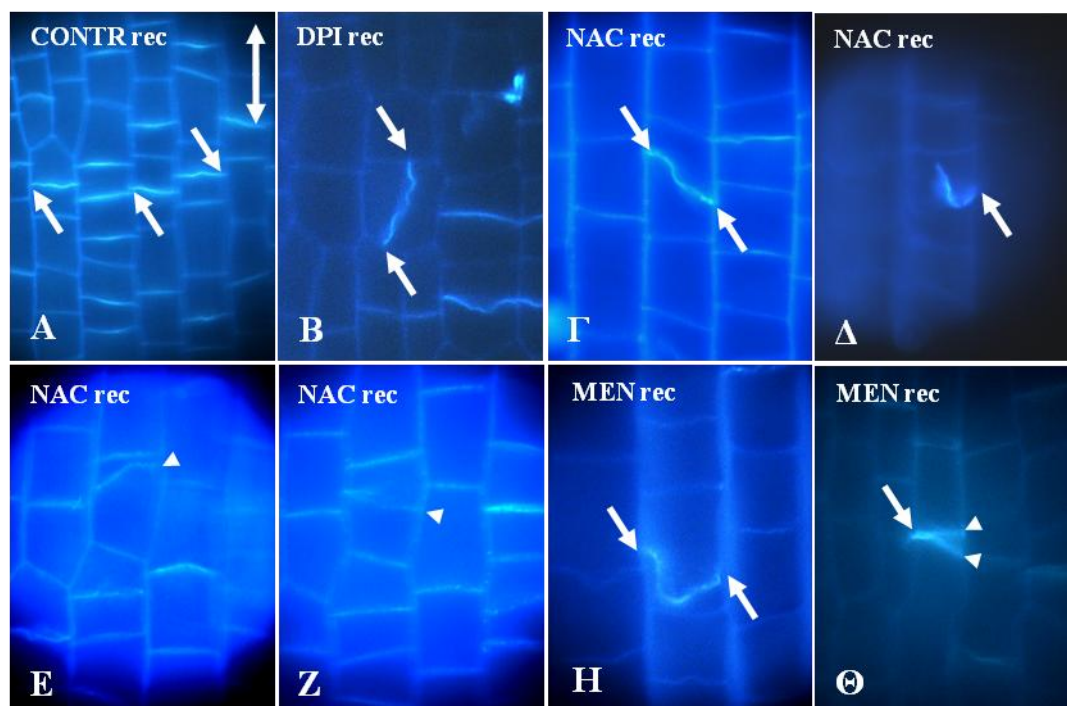
Η ανοσοσήμανση της σωληνίνης στα ανακάμπτοντα ακρόρριζα αποκάλυψε την επανεμφάνιση των ΜΣ στα μεριστωματικά κύτταρα, τα οποία υφίστανται τυπική μίτωση και κυτοκίνηση. Ωστόσο, σε σημαντικό αριθμό κυτοκινητικών κυττάρων ο προσανατολισμός του φραγμοπλάστη απέκλινε σημαντικά σε σύγκριση με εκείνον των φυσιολογικών κυτοκινητικών κυττάρων (Εικ. 61B-E σύγκρινε με Εικ. 61A).



Εικόνα 61. Ανακάμπτοντα κυτοκινητικά κύτταρα ακρόρριζου αρτιβλάστων του φυτού *T. turgidum* που είχαν υποστεί επίδραση με dH₂O (A), DPI (B,Γ), NAC (Δ), MEN (E), όπως φαίνονται μετά από ανοσοεντόπιση της σωληνίνης και παρατήρηση με το μικροσκόπιο επιφθορισμού. Τα βέλη δείχνουν το φραγμοπλάστη. Επιδράσεις: CONTR rec: dH₂O 4 h + dH₂O 2 h, DPI rec: DPI 10 μM 4 h + dH₂O 2 h, NAC rec: NAC 100 μM 4 h + dH₂O 2 h, MEN rec: MEN 10 μM 4 h + dH₂O 2 h. Μεγέθυνση: X1200.

Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι, σε αριθμό διαιρουμένων κυττάρων που ανακάμπτουν από τις επιδράσεις, διαταράσσεται ο προσανατολισμός του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης. Για

την περαιτέρω θεμελίωση του φαινομένου αυτού, καταγράφηκε η ποικιλία των διαφορετικών διευθετήσεων των κυτταρικών τοιχωμάτων στα ανακάμπτοντα ακρόρριζα και συγκρίθηκε με εκείνη των φυσιολογικών ακρόρριζων. Τα νεαρά θυγατρικά τοιχώματα καθίστανται εμφανή, μετά από χρώση με κυανούν της ανιλίνης, η οποία αντιδρά με την καλλόζη που περιέχουν. Στο μικροσκόπιο επιφθορισμού τα τοιχώματα αυτά φθορίζουν πολύ πιο έντονα από τα υπόλοιπα κυτταρικά τοιχώματα.



Εικόνα 62. Κύτταρα ριζοδερμίδας ακρόρριζων *T. turgidum* από αρτίβλαστα, τα οποία ανέκαμπταν από επίδραση με dH₂O (A), DPI (B), NAC (Γ-Z), MEN (H,Θ), όπως φαίνονται μετά από χρώση με κυανούν της ανιλίνης και παρατήρηση με το μικροσκόπιο επιφθορισμού. Οι (E,Z) δείχνουν τα ίδια κύτταρα σε διαφορετικά επίπεδα εστίασης. Τα βέλη δείχνουν νεαρά θυγατρικά τοιχώματα και οι κεφαλές βελών (E,Z,Θ) τις θέσεις σύντηξης του θυγατρικού τοιχώματος με τα μητρικά τοιχώματα. Το διπλό βέλος (A) δείχνει τον άξονα της ρίζας. Επιδράσεις: CONTR rec: dH₂O 4 h + dH₂O 24 h, DPI rec: DPI 10 μM 4 h + dH₂O 24 h, NAC rec: NAC 100 μM 4 h + dH₂O 24 h, MEN rec: MEN 10 μM 4 h + dH₂O 24 h. Μεγέθυνση: X900.

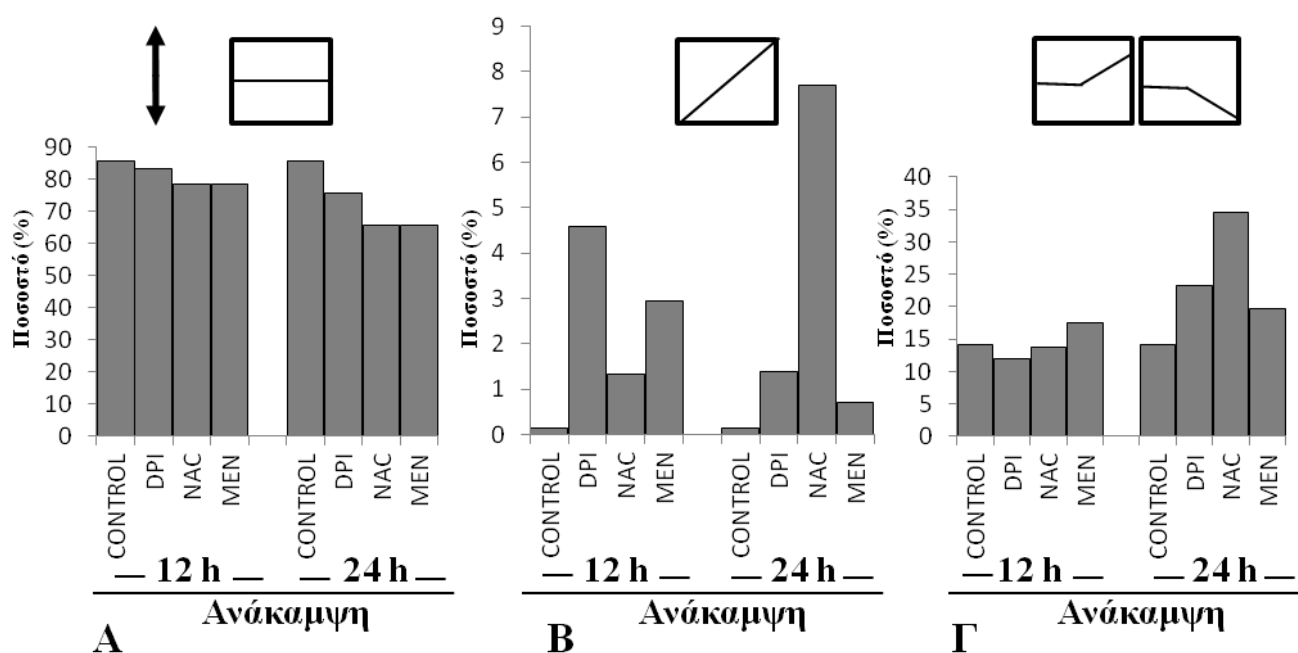
Τα περισσότερα νεαρά κυτταρικά τοιχώματα της ριζοδερμίδας των φυσιολογικών ακρόρριζων είναι προσανατολισμένα κάθετα προς τον άξονα της ρίζας (Εικ. 62Α, Εικ. 63). Σε μικρό αριθμό κυττάρων αυτά διευθετούνται διαγώνια, ενώ υπάρχουν και κύτταρα στα οποία οι θέσεις σύντηξης των θυγατρικών τοιχωμάτων «μετακινούνται» κατά μήκος των αντικλινών μητρικών τοιχωμάτων.

Οι διευθετήσεις των νεαρών θυγατρικών τοιχωμάτων καταμετρήθηκαν σε φυσιολογικά και επηρεασμένα ακρόρριζα που βρίσκονται σε ανάκαμψη, έπειτα από χρώση

με το κυανούν της ανιλίνης. Ακολούθησε η κατάταξή τους στις κατηγορίες που αναφέρθηκαν παραπάνω (Εικ. 63).

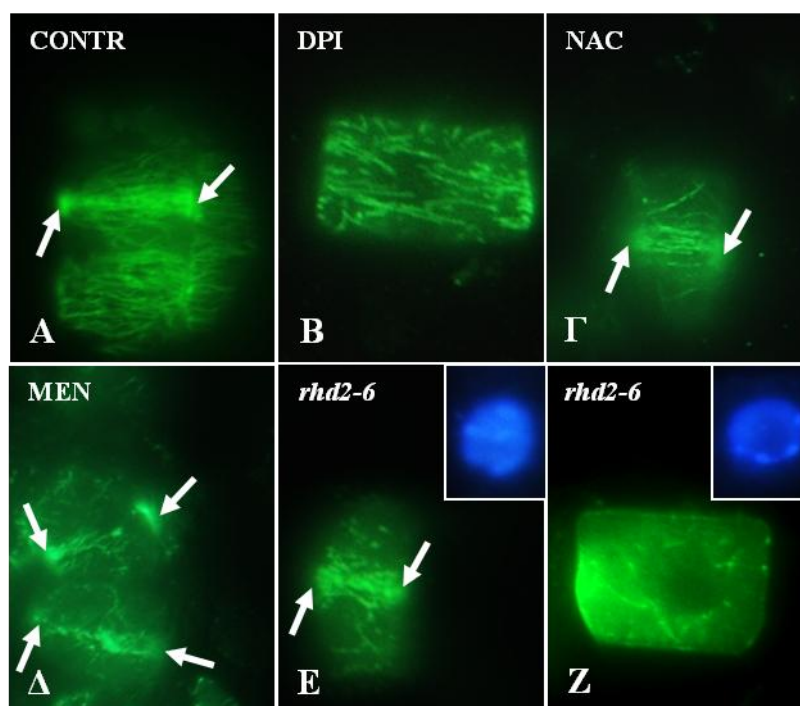
Στα επηρεασμένα ακρόρριζα που ανακάμπτουν διαπιστώθηκε μικρή μείωση του ποσοστού των θυγατρικών τοιχωμάτων με εγκάρσια διευθέτηση (Εικ. 63Α) και εμφανής αύξηση του ποσοστού θυγατρικών τοιχωμάτων με διαγώνια διευθέτηση (Εικ. 62Β,Γ σύγκρινε με 63Β). Αν και στα ακρόρριζα του μάρτυρα, το ποσοστό των διαγώνιων θυγατρικών τοιχωμάτων ανερχόταν στο 0,14% του συνόλου των 704 διαιρεθέντων κυττάρων που μετρήθηκαν, το αντίστοιχο ποσοστό στα επηρεασμένα ακρόρριζα που ανέκαμψαν ήταν πολύ μεγαλύτερο (Εικ. 63Β). Για παράδειγμα, έπειτα από 12 ώρες ανάκαμψης από το DPI, το ποσοστό αυτό ήταν 4,58% (n=415 κύτταρα) και 7,7% 24 h μετά από την επίδραση με NAC (n=190 κύτταρα). Επίσης, σε μικρό αριθμό κυττάρων το θυγατρικό τοίχωμα ήταν προσανατολισμένο παράλληλα προς τον άξονα της ρίζας (Εικ. 62Β), γεγονός το οποίο δεν συμβαίνει στη ριζοδερμίδα των φυσιολογικών αρτιβλάστων.

Μετά από 12 ώρες ανάκαμψης από τις επιδράσεις με NAC και MEN, το ποσοστό των διαιρεθέντων κυττάρων, τα οποία είχαν θυγατρικά τοιχώματα της τρίτης κατηγορίας, ήταν ελαφρά αυξημένο και αυξανόταν περισσότερο έπειτα από 24 ώρες ανάκαμψης (Εικ. 63Γ). Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενώ οι θέσεις σύντηξης του θυγατρικού τοιχώματος με το ένα αντικλινές τοίχωμα δεν μεταβάλλονται στο χώρο, οι αντίστοιχες θέσεις σύντηξης με το απέναντι αντικλινές τοίχωμα «μετακινούνται» (Εικ. 62Ε,Ζ,Θ). Στις Εικ. 62Ε,Ζ παρουσιάζονται οπτικές τομές των ίδιων κυττάρων σε διαφορετικά επίπεδα εστίασης, όπου είναι ευδιάκριτη η μεταβολή των θέσεων σύντηξης (κεφαλές βελών) κατά μήκος του μητρικού τοιχώματος. Τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις υπήρχαν κύτταρα, τα οποία διέθεταν ατελή θυγατρικά τοιχώματα με τυχαίο προσανατολισμό (Εικ. 62Δ). Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι η απουσία της προ-προφασικής ζώνης, που προκαλείται από τη διατάραξη της ομοιόστασης των ROS, ακολουθείται από διατάραξη της διευθέτησης των θυγατρικών κυτταρικών τοιχωμάτων. Επομένως, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι οι ROS αποτελούν στοιχείο του μηχανισμού, με τον οποίο τα φυτικά κύτταρα καθορίζουν το επίπεδο διαίρεσής τους.



Εικόνα 63. Διαγράμματα που προέκυψαν από την καταμέτρηση διαιρεθέντων κυττάρων ακρόρριζων που ανέκαμψαν μετά από επίδραση με dH_2O , DPI, NAC και MEN. Τα διαγράμματα αναφέρονται στις κατηγορίες διευθέτησης των νεαρών κυτταρικών τοιχωμάτων που απεικονίζονται στο σχήμα στην κορυφή κάθε διαγράμματος. Τα δύο σχήματα στο (Γ) δείχνουν τη διευθέτηση του ίδιου κυτταρικού τοιχώματος σε διαφορετικά επίπεδα. Οι κάθετες στήλες αντιστοιχούν στο ποσοστό των κυττάρων κάθε κατηγορίας, ενώ στον οριζόντιο άξονα σημειώνεται η επίδραση που είχε πραγματοποιηθεί. Το διπλό βέλος δείχνει τον άξονα της ρίζας. Αριθμός κυττάρων (n): CONTROL: n=704, DPI rec: 12 h n=415, DPI rec: 24 h n=458, NAC rec: 12 h n=637, NAC rec: 24 h n=190, MEN rec: 12 h n=437, MEN rec: 24 h n=143. Επιδράσεις: DPI 10 μM 4 h, NAC 100 μM 4 h, MEN 10 μM 4 h.

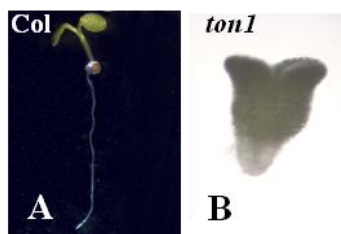
Η αδυναμία συγκρότησης προ-προφασικής ζώνης ΜΣ σε κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε προ-πρόφαση/πρόφαση, με κριτήριο τη συμπύκνωση της χρωματίνης και η παρουσία άτυπων πολυμερών σωληνίνης στην περιοχή της προ-προφασικής ζώνης, είναι επίσης έντονη στα ακρόρριζα *A. thaliana*, στα οποία έχουν διαταραχθεί τα επίπεδα των ROS (Εικ. 64B-Δ σύγκρινε με Εικ. 64A). Αντίστοιχες ατυπίες παρατηρήθηκαν και στα κύτταρα ακρόρριζου των μεταλλαγμάτων *rhd2* (Εικ. 64E,Z).



Εικόνα 64. Προ-προφασικά/προφασικά κύτταρα ακρόρριζου φυσιολογικών (A), επηρεασμένων (B-Δ) και *rhd2* (E,Z) αρτιβλάστων του φυτού *A. thaliana*, όπως φαίνονται μετά από ανοσοσθήμανση της σωληνίνης σε μικροσκόπιο επιφθορισμού. Οι ένθετες εικόνες (E,Z) δείχνουν τον πυρήνα του κυττάρου, μετά από χρώση του DNA με Hoechst 33258. Να σημειωθεί η παρουσία άτυπων πολυμερών σωληνίνης στην περιοχή της προ-προφασικής ζώνης (βέλη). Τα κύτταρα των εικόνων (B,Z) στερούνται προ-προφασικής ζώνης. Επιδράσεις: CONTR: dH₂O 2 h, DPI: 25 μM 2 h, NAC: 250 μM 2 h, MEN: 25 μM 2 h. Μεγέθυνση: X1200.

Λαμβάνοντας υπόψη τα όσα προαναφέρθηκαν, διερευνήθηκε περαιτέρω η σχέση των ROS με τους μηχανισμούς δημιουργίας της προ-προφασικής ζώνης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των μεταγράφων του γονιδίου *TONNEAU1a* (*TON1a*) από αρτίβλαστα *A. thaliana* που είχαν επηρεαστεί με DPI, NAC, MEN και H₂O₂. Το συγκεκριμένο γονίδιο επελέγη, διότι κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TON1a, η οποία μαζί με την TON1b συνεντοπίζονται με τους μεσοφασικούς περιφερειακούς ΜΣ και εκείνους της προ-προφασικής ζώνης. Οι πρωτεΐνες αυτές (TON1) αποτελούν ρυθμιστική υπομονάδα του συμπλόκου της πρωτεϊνικής φωσφατάσης PP2A και συμμετέχουν στη δημιουργία της προ-προφασικής ζώνης (Spinner και συν. 2013). Τα μεταλλάγματα *ton1*, τα οποία στερούνται των πρωτεϊνών TON1a και TON1b, όπως και τα *fass/tonneau2*, είναι τα μόνα μεταλλάγματα του φυτού *Arabidopsis*, τα οποία αδυνατούν να σχηματίσουν προ-προφασική ζώνη ΜΣ (Azimzadeh και συν. 2008). Αυτό έχει σημαντικές επιπτώσεις στον καθορισμό του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης, γεγονός

που επηρεάζει εμφανώς την ιστολογική οργάνωση και τη μορφογένεση των μεταλλαγμένων φυτών (Εικ. 65B σύγκρινε με 65A, Azimzadeh και συν. 2008).

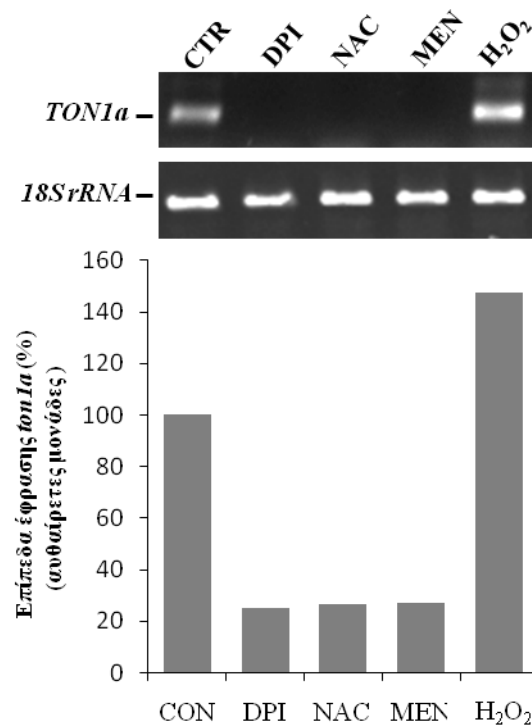


Εικόνα 65. Αρτίβλαστα *A. thaliana* αγρίου τύπου (Α) και μεταλλαγμένα αρτίβλαστα *ton1* (Β) ηλικίας μίας εβδομάδας. Η απουσία της λειτουργίας των γονιδίων *TON1* προκαλεί σημαντική διατάραξη της οργανογένεση και της μορφής των φυτών. Μεγέθυνση: X100.

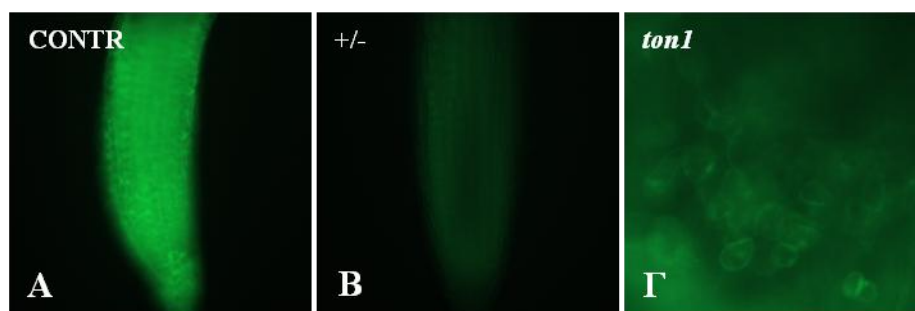
Η μελέτη των επιπέδων των μεταγράφων του γονιδίου *TON1a* με την ημιποσοτική μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης-πολυμεράσης (RT-PCR) αποκάλυψε ότι τα επίπεδα της έκφρασής του είναι σημαντικά μειωμένα στα επηρεασμένα αρτίβλαστα με DPI, NAC ή MEN σε σύγκριση με εκείνα των μαρτύρων (Εικ. 66). Είναι ενδιαφέρον ότι η παρουσία H_2O_2 , αντίθετα με την MEN, δεν προκάλεσε μείωση στην έκφραση του γονιδίου *TON1a* αλλά αντίθετα επέφερε μικρή αύξησή της (Εικ. 66).

Η διαπίστωση ότι οι επιδράσεις με ουσίες που μεταβάλλουν τις συγκεντρώσεις των ROS επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου *TON1a*, οδήγησε στη διερεύνηση του ερωτήματος, κατά πόσο η απουσία της λειτουργίας των γονιδίων *ton1* έχει αντίκτυπο στα επίπεδα των ROS. Βρέθηκε ότι, τόσο στη ρίζα των ετερόζυγων φυτών που στερούνται ενός λειτουργικού αντιγράφου των γονιδίων *TON1*, όσο και σε εκείνη των ομόζυγων μεταλλαγμένων αρτιβλάστων, το σήμα φθορισμού μετά την επώαση με DCF για το ίδιο χρονικό διάστημα ήταν αισθητά μειωμένο (Εικ 67B,Γ σύγκρινε με Εικ. 67A). Το γεγονός αυτό υποστηρίζει ότι τα επίπεδα των ROS στα μεταλλάγματα είναι πολύ χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα των αρτιβλάστων-μαρτύρων.

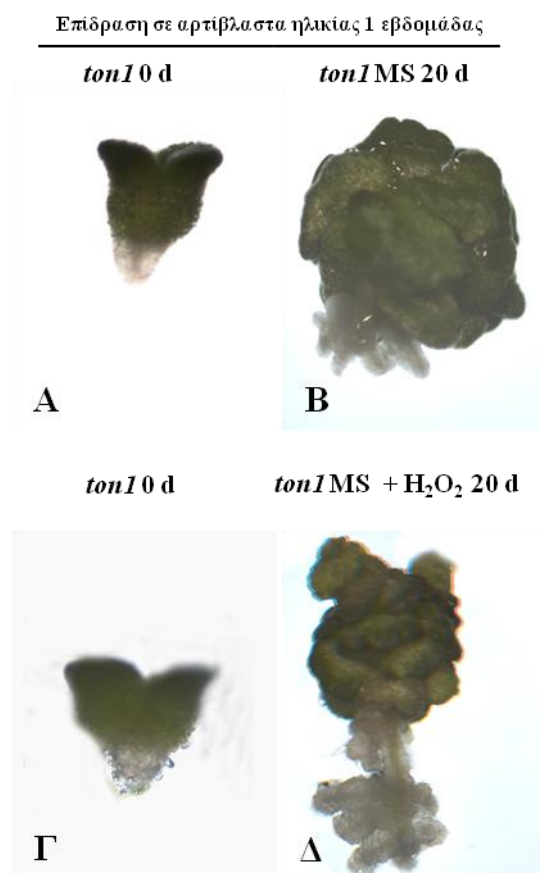
Δεδομένης της διαφορετικής συμπεριφοράς των αρτιβλάστων αγρίου τύπου σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου *TON1a*, όταν στο διάλυμα της επίδρασης υπάρχει H_2O_2 (Εικ. 66), μεταλλαγμένα φυτά *ton1* ηλικίας μίας εβδομάδας (Εικ. 68A,Γ) μεταφέρθηκαν σε διάλυμα H_2O_2 συγκέντρωσης 4 mM σε υγρό θρεπτικό μέσο, το οποίο ανανεωνόταν καθημερινά. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε αυτές τις συνθήκες για 20 ημέρες. Διαπιστώθηκε ότι, σε σχέση με τα *ton1* μεταλλάγματα που βρισκόντουσαν σε υγρό θρεπτικό απουσία H_2O_2 , η παρουσία H_2O_2 στο θρεπτικό μέσο προώθησε την ανάπτυξη των φυτών (Εικ. 68Δ σύγκρινε με Εικ. 68B), χωρίς ωστόσο να μεταβάλλει το διαταραγμένο πρότυπο ανάπτυξης των φυτών αυτών (Εικ. 68B,Δ σύγκρινε Εικ. 68A,Γ).



Εικόνα 66. Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *TON1a* σε αρτίβλαστα μάρτυρα και επηρεασμένα με DPI, NAC, MEN και H₂O₂, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *18S RNA*. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης του *TON1a* στα επηρεασμένα αρτίβλαστα σε σχέση με εκείνα του μάρτυρα. Επιδράσεις: CONTR: υγρό θρεπτικό μέσο MS 12 h, DPI: 25 μM 12 h, NAC: 250 μM 12 h, MEN: 25 μM 12 h, H₂O₂ 4 mM 12h.

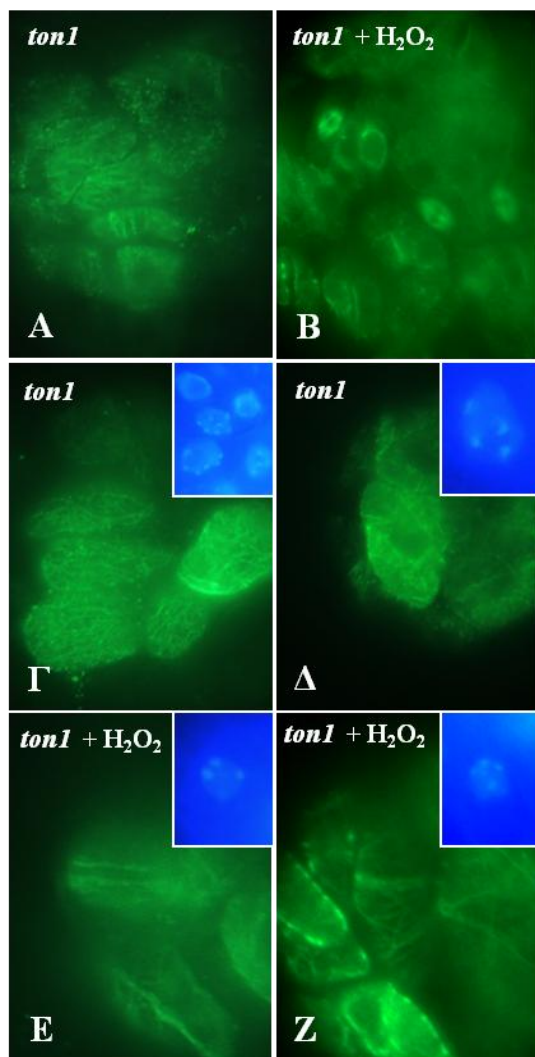


Εικόνα 67. Ακρόρριζα φυσιολογικών (A), ετερόζυγων (+/-) (B) και ομόζυγων μεταλλαγμένων *ton1* (Γ) αρτιβλάστων, όπως φαίνονται μετά από χρώση με DCF στο μικροσκόπιο επιφθορισμού. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί με τον ίδιο χρόνο έκθεσης. Επίδραση: DCF 25 μM 30 min. Μεγέθυνση: (A,B) X500, (Γ) X700.



Εικόνα 68. Αρτίβλαστα *ton1* ηλικίας μίας εβδομάδας (Α,Γ), τα οποία επωάστηκαν για 20 ημέρες σε υγρό θρεπτικό μέσο MS (Β) και θρεπτικό μέσο MS που περιείχε 4 mM H₂O₂ (Δ). Τα φυτά που μεγαλώνουν παρουσία H₂O₂ εμφανίζονται περισσότερο ανεπτυγμένα σε σύγκριση με εκείνα των φυτών-μαρτύρων (Δ σύγκρινε με Β). Τα φυτά Β και Δ είναι αυτά των εικόνων Α και Γ αντίστοιχα, μετά από 20 ημέρες παραμονής στο διάλυμα της επίδρασης. Μεγέθυνση: X100.

Σε κύτταρα ακρόρριζων φυτών του μεταλλάγματος *ton1* μελετήθηκε η οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, μετά την ανοσοσήμανσή της. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν ποικίλα σχήματα, λόγω της αποτυχίας καθορισμού του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης. Κατά τη μεσόφαση, είναι εμφανής η διατάραξη της οργάνωσης των περιφερειακών ΜΣ (Εικ. 69Α,Γ σύγκρινε με Εικ. 10Α). Στο περιφερειακό κυτόπλασμα εντοπίζονται πολυμερή σωληνίνης, τα οποία είναι προσανατολισμένα παράλληλα, εγκάρσια ή τυχαία σε σχέση με τον κατά μήκος άξονα του κυττάρου, ενώ ορισμένες φορές τα πολυμερή σωληνίνης έχουν εντελώς άτυπη εμφάνιση (Εικ. 69Α,Γ, Azimzadeh και συν. 2008). Οι ίδιες ατυπίες χαρακτηρίζουν και τα περιφερειακά πολυμερή σωληνίνης των κυττάρων, τα οποία με κριτήριο τη συμπίκνωση της χρωματίνης βρίσκονται σε προ-πρόφαση/πρόφαση (Εικ. 69Γ,Δ). Τα κύτταρα αυτά δεν σχηματίζουν προ-προφασική ζώνη (Εικ. 69Γ,Δ). Αντίθετα, η προφασική άτρακτος, η μιτωτική άτρακτος και ο φραγμοπλάστης ΜΣ έχουν τυπική οργάνωση (Azimzadeh και συν. 2008, βλέπε επίσης Εικ. 69Β).



Εικόνα 69. Κύτταρα ακρόρριζου αρτιβλάστων *ton1* του φυτού *Arabidopsis*, όπως φαίνονται μετά από ανοσοσήμανση της σωληνίνης στο μικροσκόπιο επιφθορισμού. Οι ένθετες εικόνες (Γ-Z) δείχνουν τους πυρήνες των κυττάρων, μετά από χρώση του DNA με Hoechst 33258. Επιδράσεις: CONTR: υγρό θρεπτικό μέσο MS 1 εβδομάδα, H_2O_2 : 4 mM σε υγρό θρεπτικό μέσο MS 1 εβδομάδα. Μεγέθυνση: (Α,Β) X700, (Γ,Δ) 800, (Ε,Ζ) 900.

Στα αρτίβλαστα *ton1* τα οποία έχουν υποστεί επίδραση με H_2O_2 είναι εμφανής η αύξηση του αριθμού των διαιρούμενων κυττάρων (Εικ. 69Β), γεγονός το οποίο πιθανόν εξηγεί και τη μεγαλύτερη ανάπτυξη των φυτών αυτών σε σχέση με εκείνα που είχαν αναπτυχθεί απουσία H_2O_2 (Εικ. 68). Επιπλέον, σε μεταλλάγματα επηρεασμένα με H_2O_2 , ένας πληθυσμός κυττάρων, τα οποία με κριτήριο τη συμπύκνωση της χρωματίνης βρίσκονταν σε προ-πρόφαση/πρόφαση, έφερε στο περιφερειακό κυτόπλασμα ευθύγραμμα πολυμερή. Αυτά εμφάνιζαν τάση ομαδοποίησης και είχαν περισσότερο τυπική εμφάνιση συγκριτικά με εκείνα των φυτών-μαρτύρων (Εικ. 69Ε,Ζ).

Τα ευρήματα που περιγράφηκαν στην ενότητα αυτή οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι ROS συμμετέχουν στους μηχανισμούς καθορισμού του επιπέδου της κυτταροδιαίρεσης. Επίσης, είναι πιθανόν ότι οι ROS σχετίζονται με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη συγκρότηση της προ-προφασικής ζώνης ΜΣ.

III.10 ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ROS ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΣΤΟΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *Z. mays*

III.10.1 Γενικά

Η «στρατολόγηση» των ROS, οι οποίες συμμετέχουν στη μεταγωγή μηνυμάτων που ελέγχουν μορφογενετικές διεργασίες των φυτών, επάγεται, μεταξύ άλλων, από ορμονικά ερεθίσματα (Kwak και συν. 2006), ενώ συχνά η παραγωγή τους ελέγχεται τοπικά και χρονικά από τη δράση της αυξίνης (Joo και συν. 2005). Επιπλέον, τα δεδομένα της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι η ομοιόσταση των ROS διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση των διαφόρων γεγονότων του κυτταρικού κύκλου.

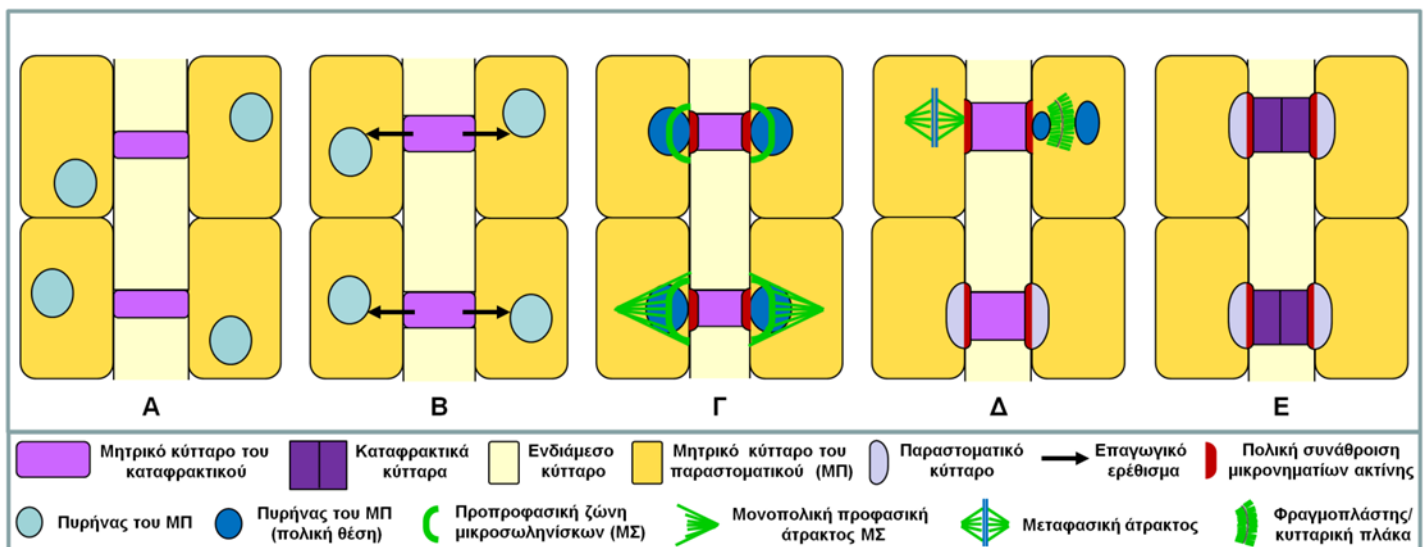
Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, και πρόσφατα δεδομένα που δείχνουν ότι η ορμόνη αυξίνη εμπλέκεται στο μηχανισμό επαγωγής των ασύμμετρων διαιρέσεων που δημιουργούν τα παραστοματικά κύτταρα των στοματικών συμπλόκων του φυτού *Zea mays* (Livanos και συν. 2015), διερευνήθηκε ο ρόλος των ROS στην ανάπτυξη των τελευταίων. Στη διαδικασία αυτή καθοριστικό ρόλο διαδραματίζουν κατευθυνόμενα τοπικά επαγωγικά διακυτταρικά ερεθίσματα, ενώ η αλληλουχία και ο προσανατολισμός των κυτταροδιαιρέσεων ακολουθούν αυστηρά καθορισμένα πρότυπα (Γαλάτης 1974, Galatis και Apostolakos 2004, Facette και Smith 2012). Ως εκ τούτου, νεαρά αρτίβλαστα του φυτού *Z. mays* υπέστησαν επιδράσεις με DPI, NAC, MEN και H₂O₂ και μελετήθηκαν οι επιπτώσεις τους στην ανάπτυξη των στοματικών συμπλόκων. Χρησιμοποιήθηκε επίσης ο εξειδικευμένος αναστολέας της PI3K LY294002, λόγω του ότι το ένζυμο αυτό επηρεάζει τα επίπεδα των ROS και εμπλέκεται στους μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος της αυξίνης (Joo και συν. 2005).

III.10.2 Οντογένεση των στοματικών συμπλόκων σε φυσιολογικά αρτίβλαστα

Τα στοματικά σύμπλοκα του φυτού *Z. mays* αποτελούνται από ένα ζεύγος καταφρακτικών κυττάρων, τα οποία πλαισιώνονται από δύο παραστοματικά κύτταρα (Εικ. 70Ε). Η οντογένεση των στοματικών συμπλόκων αρχίζει σε ορισμένες κυτταρικές σειρές (στοματικές σειρές), πλησίον του μεριστώματος που λειτουργεί στη βάση του φύλλου. Τα κύτταρα των στοματικών σειρών διαιρούνται ασύμμετρα, με άξονα της ατράκτου προσανατολισμένο παράλληλα προς τον άξονα του φύλλου. Κάθε διαιρούμενο κύτταρο δημιουργεί προς την κορυφή του φύλλου ένα μικρό κύτταρο, το μητρικό κύτταρο των καταφρακτικών κυττάρων (MK, guard cell mother cell) και ένα μεγαλύτερο που διαφοροποιείται σε ενδιάμεσο κύτταρο της στοματικής σειράς (Εικ. 70Α). Σε κατ' επιφάνεια παρατήρηση, τα νεοσχηματισμένα MK εμφανίζουν παραλληλόγραμμο σχήμα, με μήκος πολύ μικρότερο από το πλάτος τους. Ο μεγαλύτερος άξονάς τους είναι προσανατολισμένος κάθετα προς τον άξονα της στοματικής σειράς (Εικ. 70Α). Ως μήκος ορίζεται η διάσταση που είναι παράλληλη προς τον άξονα της στοματικής σειράς, ενώ ως πλάτος η κάθετη προς αυτόν. Τα MK που διαθέτουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά ορίζονται ως «νεαρά». Στη συνέχεια, αυτά αυξάνουν σε μέγεθος παράλληλα

προς τον άξονα της στοματικής σειράς και τείνουν να αποκτήσουν τετράγωνο, σε κατ' επιφάνεια παρατήρηση, σχήμα. Τα παραπάνω MK χαρακτηρίζονται ως «ώριμα» (Εικ. 70B,Γ). Τα κύτταρα, τα οποία βρίσκονται εκατέρωθεν των MK λειτουργούν, στη συνέχεια, ως μητρικά κύτταρα των παραστοματικών κυττάρων (ΜΠ, subsidiary cell mother cell). Πριν τη διαίρεσή τους, τα ΜΠ αυξάνουν σε μέγεθος και προεκβάλλουν προς το γειτονικό MK, γεγονός που οφείλεται στον ασυνήθη μορφογενετικό μηχανισμό των τελευταίων (Εικ. 70Γ).

Τα ώριμα MK εκπέμπουν ένα μορφογενετικό ερέθισμα που επάγει την καθιέρωση πόλωσης και την ασύμμετρη διαίρεση στα γειτονικά ΜΠ (Εικ. 70B). Η καθιέρωση της πόλωσης εκδηλώνεται σε μορφολογικό επίπεδο με: (1) τη μετανάστευση του πυρήνα στο πολικό άκρο του ΜΠ, δηλαδή πλησίον του επάγοντος MK, (2) το σχηματισμό μίας πολικής πλάκας-ΜΑ στο περιφερειακό κυτόπλασμα που επενδύει το τμήμα του τοιχώματος του ΜΠ που εφάπτεται εκείνου του επάγοντος MK, (3) τη δημιουργία μίας ιδιόμορφης προ-προφασικής ζώνης ΜΣ πλευρικά του επάγοντος MK, (4) την οργάνωση μονοπολικής προφασικής ατράκτου που συνδέεται με την προ-προφασική ζώνη ΜΣ, και (5) τη σταθεροποίηση του ενός πόλου της ατράκτου πλησίον του επάγοντος MK (Εικ. 70Γ,Δ).



Εικόνα 70. Σχηματική απεικόνιση της ανάπτυξης των στοματικών συμπλόκων του φυτού *Zea mays*, στην οποία παρουσιάζεται η μοναδική αλληλουχία των γεγονότων που χαρακτηρίζουν την ασύμμετρη διαίρεση των μητρικών κυττάρων των παραστοματικών κυττάρων.

Το επίπεδο της ασύμμετρης διαίρεσης που ακολουθεί είναι παράλληλο προς τον άξονα της στοματικής σειράς (Εικ. 70Δ), ενώ το καμπύλο θυγατρικό τοίχωμα αναπτύσσεται με καθορισμένο τρόπο, ώστε να συντηχθεί με τις προκαθορισμένες από την προ-προφασική ζώνη περιοχές του μητρικού τοιχώματος. Η ασύμμετρη διαίρεση έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο μικρών φακοειδών παραστοματικών κυττάρων εκατέρωθεν του επάγοντος MK (Εικ. 70Δ). Η οντογένεση των στοματικών συμπλόκων ολοκληρώνεται με την κατά

μήκος σύμμετρη διαίρεση του MK που δίνει γένεση στα δύο καταφρακτικά κύτταρα (Εικ. 70E).

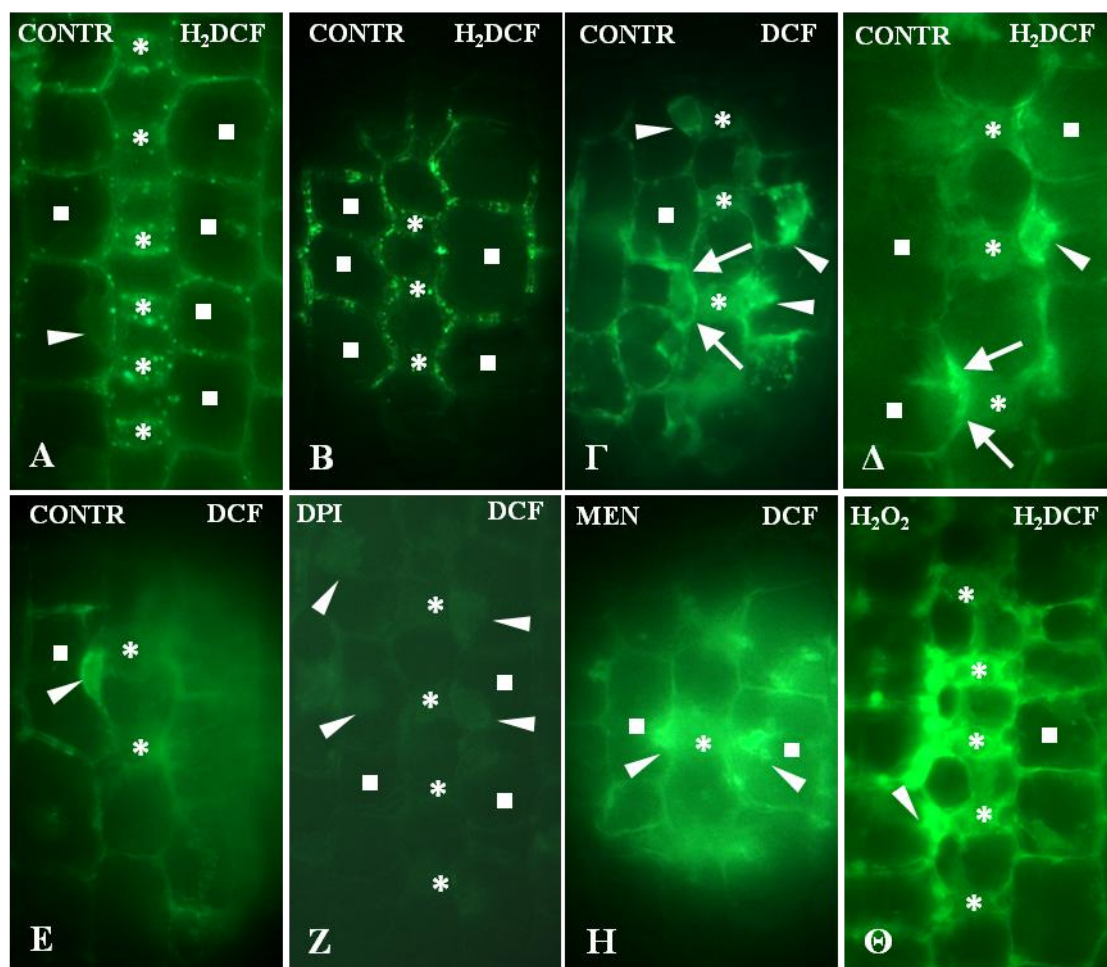
III.10.3 Κατανομή των ROS σε αναπτυσσόμενα στοματικά σύμπλοκα

Η χρώση τομών φύλλου με DCF και H_2DCF αποκάλυψε ότι οι ROS παρουσιάζουν καθορισμένο πρότυπο κατανομής σε διαφορετικές περιοχές του πρωτοδέρματος του φυτού *Z. mays*. Πλησίον της βάσης του φύλλου εντοπίζονται μικροί σχηματισμοί που εκπέμπουν σήμα φθορισμού, οι οποίοι κατανέμονται ομοιόμορφα κατά μήκος των εγκάρσιων κυτταρικών τοιχωμάτων και του περιφερειακού κυτοπλάσματος που τα επενδύει (Εικ. 71A). Η κατανομή αυτή διαπιστώθηκε στα νεαρά MK και ΜΠ, στα ενδιάμεσα κύτταρα της στοματικής σειράς αλλά και στα υπόλοιπα πρωτοδερμικά κύτταρα (Εικ. 71A). Το φθορίζον σήμα στα ως άνω κύτταρα δεν είναι τόσο έντονο. Ως εγκάρσια ορίζονται τα τοιχώματα, τα οποία είναι κάθετα προς τον άξονα του φύλλου και ως κατά μήκος εκείνα που διευθετούνται παράλληλα προς αυτόν. Σε περιοχές του πρωτοδέρματος που περιέχουν περισσότερα διαφοροποιημένα MK, οι ROS κατανέμονται μάλλον ομοιόμορφα σε όλες τις πλευρές των πρωτοδερμικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των MK και ΜΠ (Εικ. 71B). Το ενδόπλασμα των κυττάρων εκπέμπει ασθενές σήμα φθορισμού ROS (Εικ. 71B).

Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός, ότι στις περιοχές του πρωτοδέρματος που φέρουν πολωμένα ΜΠ σε επαφή με ώριμα MK, ROS εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στα ΜΠ, η πολική περιοχή των οποίων εκπέμπει έντονο σήμα φθορισμού. Συγκεκριμένα, φθορίζει τόσο το κοινό κυτταρικό τοίχωμα μεταξύ του ΜΠ και του επάγοντος MK, όσο και το κυτόπλασμα που τα επενδύει (Εικ. 71Γ,Δ). Στα πολωμένα ΜΠ, ROS συσσωρεύονται, επίσης, στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα και τα πλαστίδια, τα οποία εντοπίζονται σε αυτό (Εικ. 71Γ,Δ). Η ως άνω κατανομή ROS παρατηρείται και σε ΜΠ, στα οποία ο πυρήνας είναι σε πορεία μετανάστευσης προς στην πολική περιοχή του ΜΠ (Εικ. 71Γ,Ε). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι στα πολωμένα ΜΠ οι ROS έχουν πολική κατανομή. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι τα νεαρά καταφρακτικά και παραστοματικά κύτταρα δεν διαθέτουν αξιόλογο σήμα φθορισμού ROS, με εξαίρεση το φακοειδές κυτταρικό τοίχωμα που διαχωρίζει το παραστοματικό κύτταρο από το γειτονικό του πρωτοδερμικό κύτταρο.

Η χρώση τομών επηρεασμένων φύλλων επιβεβαίωσε το γεγονός, ότι οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για τους πειραματισμούς, μεταβάλλουν τα επίπεδα των ROS στα κύτταρα του πρωτοδέρματος. Στην Εικ. 71Z παρουσιάζεται περιοχή του πρωτοδέρματος φύλλου επηρεασμένου με DPI, τα κύτταρα του οποίου διαθέτουν εμφανώς μειωμένα επίπεδα ROS (σύγκρινε με Εικ. 71B). Αντίθετα, η επίδραση με MEN και H_2O_2 έχει ως αποτέλεσμα την εμφανή αύξηση των επιπέδων των ROS. Για παράδειγμα, στις επηρεασμένες περιοχές του πρωτοδέρματος που περιέχουν πολωμένα ΜΠ, εκτός από τις θέσεις που αναφέρθηκαν και

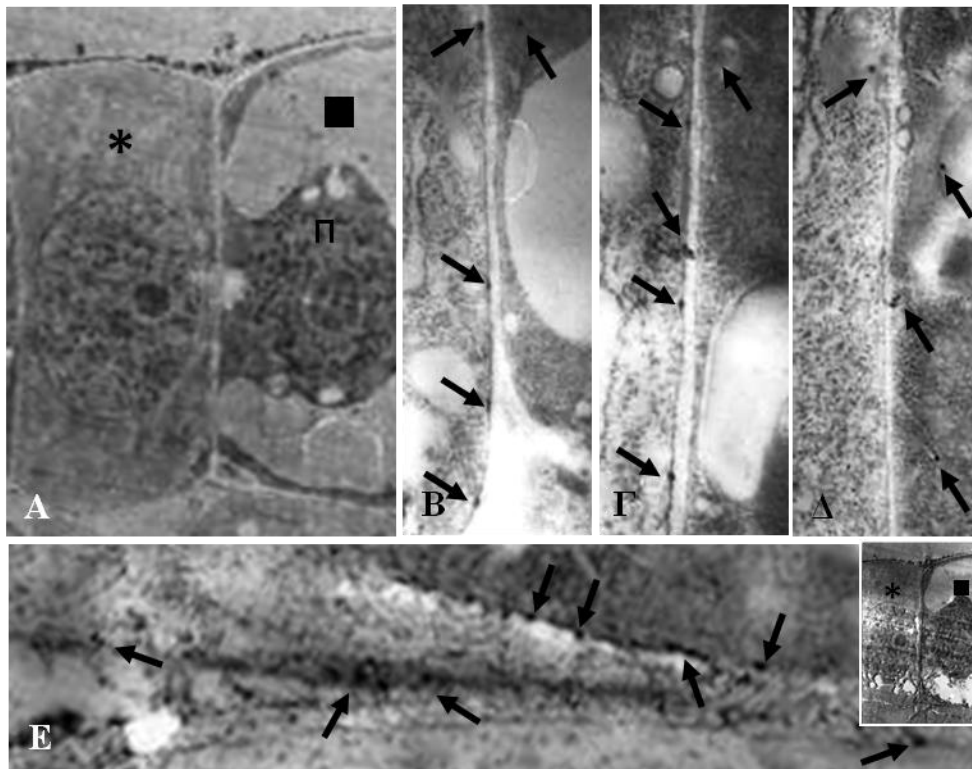
στις οποίες το σήμα φθορισμού είναι έντονο, ROS εντοπίζονται και σε άλλες θέσεις των ΜΠ, όπως επίσης και στα ΜΚ (Εικ. 71Η,Θ σύγκρινε με Εικ. 71Γ,Δ).



Εικόνα 71. Περιοχές του πρωτοδέρματος φύλλων του φυτού *Z. mays* από φυσιολογικά (Α-Ε) ή επηρεασμένα με DPI (Ζ), MEN (Η) και H_2O_2 (Θ) αρτίβλαστα, όπως φαίνονται μετά από χρώση με 25 μM DCF (Γ,Ε-Θ) ή 20 μM H_2DCF (Α,Γ,Δ). Με αστερίσκο σημειώνονται τα ΜΚ, ενώ τα ΜΠ δείχνονται με λευκό τετράγωνο. Τα βέλη δείχνουν το τοίχωμα μεταξύ ΜΠ και ΜΚ, ενώ οι κεφαλές βελών τον πυρήνα των ΜΠ. Το ΜΠ στην (Ε) βρίσκεται σε επαφή με δύο ΜΚ. Επιδράσεις: CONTR: dH_2O , DPI: 50 μM 48 h, MEN: 50 μM 48 h, H_2O_2 5 mM 48 h. Μεγέθυνση: X850.

Η παρουσία ROS στην πολωμένη περιοχή των ΜΠ επιβεβαιώθηκε και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μετά από κατεργασία του ιστού με $CeCl_3$, το οποίο αντιδρά με H_2O_2 . Στις θέσεις όπου εντοπίζεται το τελευταίο σχηματίζονται ηλεκτρονιόπυκνες εναποθέσεις cerium perhydroxide (Bestwick και συν. 1997, Libik-Konieczny και συν. 2014). Στην Εικ. 72 παρουσιάζονται ώριμα ΜΚ σε εγκάρσια τομή και το ένα γειτονικό τους ΜΠ. Στα τελευταία έχει καθιερωθεί πολικότητα, καθώς ο πυρήνας βρίσκεται σε επαφή με το επάγον ΜΚ (Εικ. 72Α, ένθετη Εικ. 72Ε). Το κοινό κυτταρικό τοίχωμα μεταξύ ΜΚ και ΜΠ,

οι θέσεις συναρμογής των τοιχωμάτων μεταξύ ΜΚ και ΜΠ, το πλασμαλήμμα που επενδύει τις παραπάνω τοιχωματικές περιοχές, ο μεσοκυττάριος χώρος που έχει αναπτυχθεί μεταξύ ΜΚ και ΜΠ, όπως επίσης και το κυτόπλασμα στο πολικό άκρο του ΜΠ, φέρουν πολλά κοκκία ηλεκτρονικά πυκνού υλικού (Εικ. 72B-E). Ηλεκτρονιόπυκνες εναποθέσεις cerium perhydroxide δεν εντοπίζονται στις υπόλοιπες περιοχές του ΜΠ. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι H_2O_2 συσσωρεύεται στον αποπλάστη μεταξύ ΜΚ και ΜΠ, όπως επίσης και στο πολικό άκρο του ΜΠ.



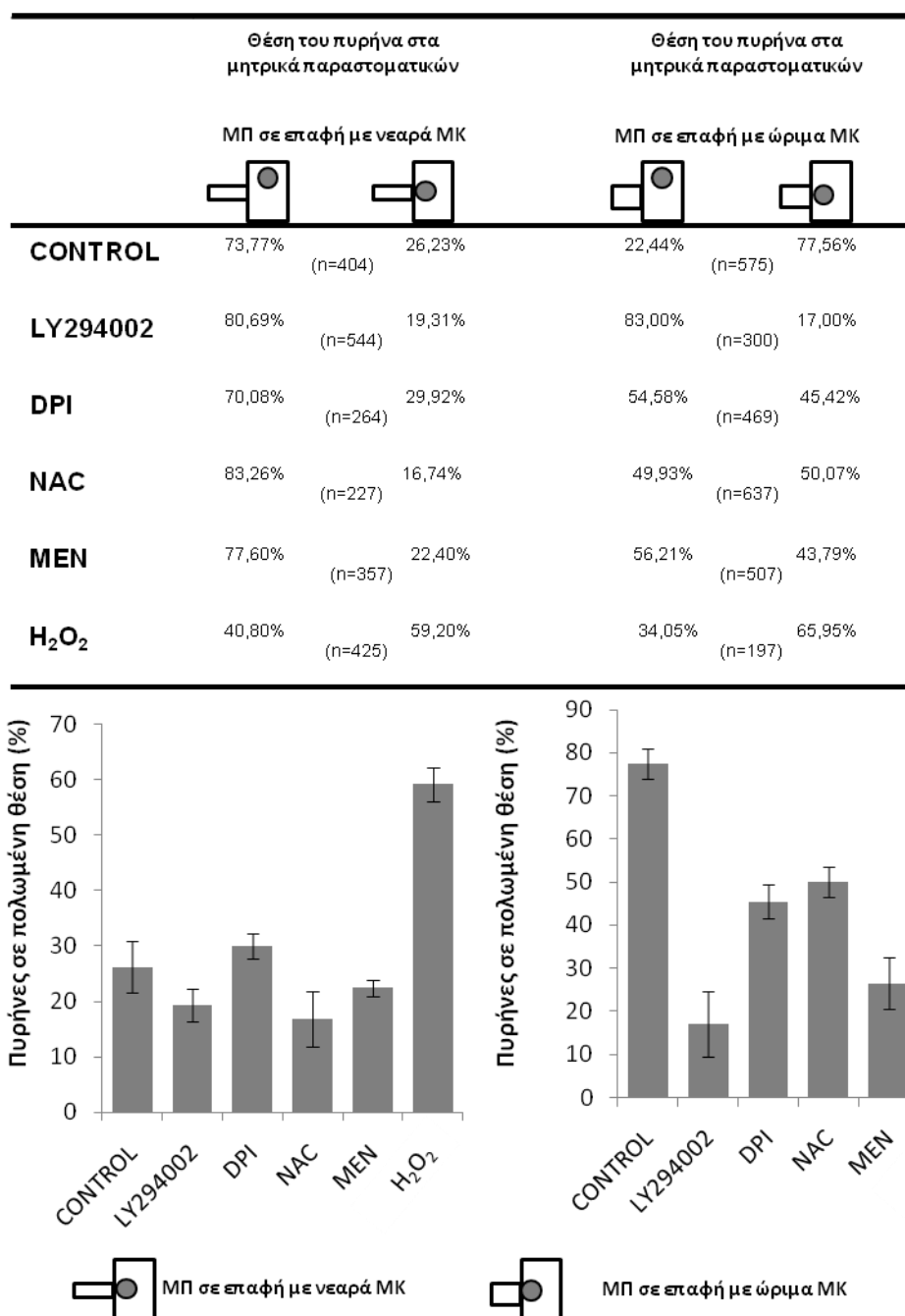
Εικόνα 72. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου που έχουν ληφθεί από εγκάρσιες τομές φύλλων φυσιολογικών αρτιβλάστων *Z. mays*, τα οποία έχουν επωαστεί σε διάλυμα $CeCl_3$, για 1 h. Στην (A) και στην ένθετη (E) διακρίνονται ΜΚ (αστερίσκος) και τμήμα του ενός ΜΠ (τετράγωνο), ο πυρήνας του οποίου βρίσκεται σε πολική θέση. Στις B-Δ δείχνονται σε μεγαλύτερη μεγέθυνση περιοχές της θέσης επαφής μεταξύ ΜΚ και ΜΠ της Εικ. Α. Στην Ε παρουσιάζεται σε μεγαλύτερη μεγέθυνση η θέση συναρμογής του εσωτερικού περικλινούς τοιχώματος του ΜΠ της ένθετης εικόνας με το τοίχωμα του γειτονικού ΜΚ. Τα βέλη σημειώνουν τα ηλεκτρονιόπυκνα κοκκία cerium perhydroxide. Μεγέθυνση: (A) X2000, (B-Δ) X20000, (E) X35000.

III.10.4 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει την πολική τοποθέτηση του πυρήνα στα ΜΠ

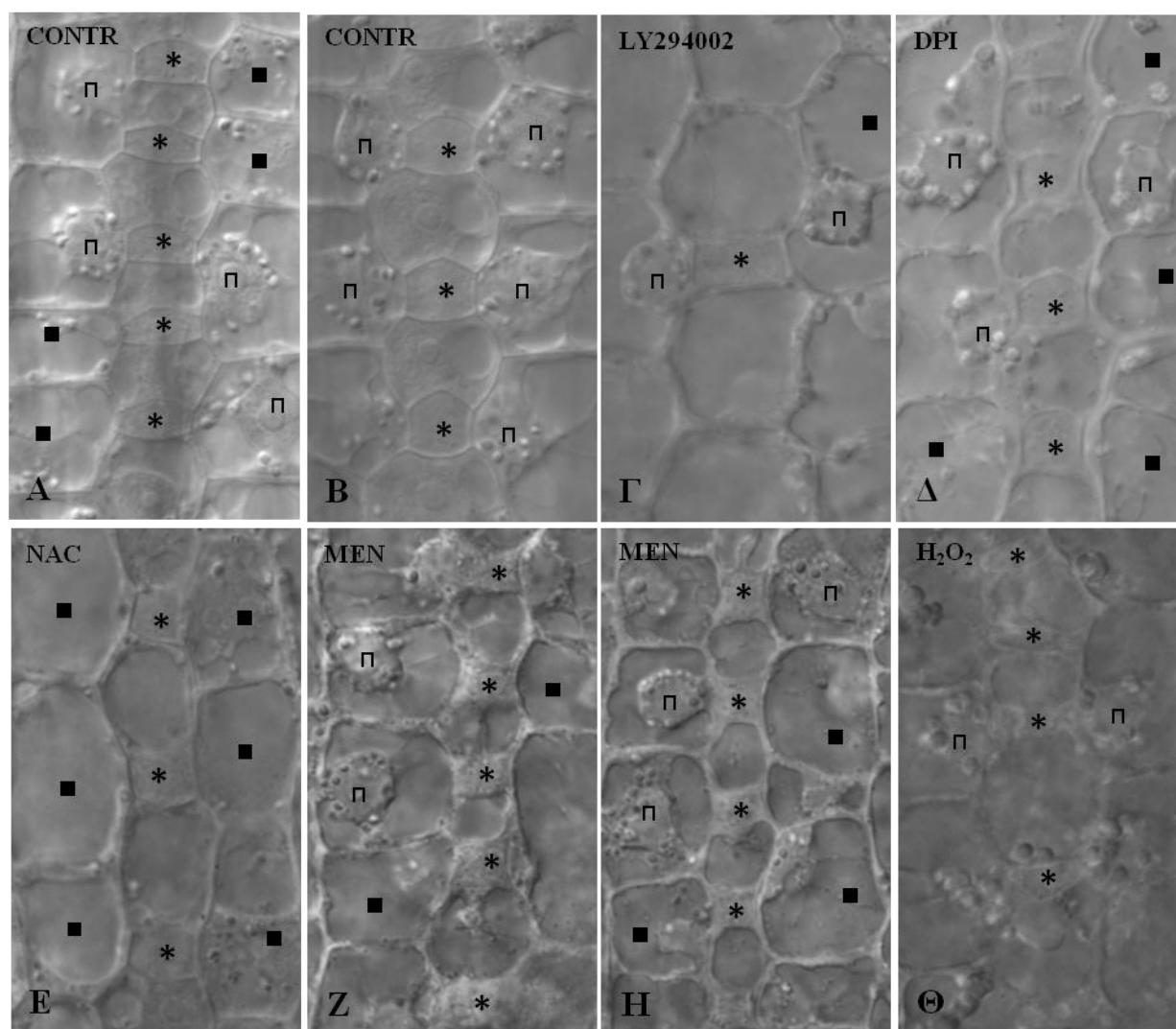
Προηγούμενες μελέτες σε αρτίβλαστα *Z. mays* που έχουν αναπτυχθεί στους 25 ± 1 °C, σε σκοτάδι, έχουν δείξει ότι τα ΜΚ των οποίων ο λόγος πλάτους/μήκους κυμαίνεται μεταξύ 0,8 και 1,4, είναι στην πλειοψηφία τους ικανά να επάγουν πόλωση στα γειτονικά τους ΜΠ (Apostolakos και συν. 2008). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα διατριβή. Στο 77,56% των ΜΠ (575 καταμετρημένα ΜΠ), τα οποία ήταν σε επαφή με ώριμα ΜΚ, ο πυρήνας είχε λάβει πολική θέση (Εικ. 73, Εικ. 74B). Αντίθετα, μόλις το 26,23% (404 καταμετρημένα ΜΠ) των ΜΠ, σε επαφή με νεαρά ΜΚ, δηλαδή ΜΚ με λόγο πλάτους/μήκους μεγαλύτερο του 1,4, διέθεταν πολωμένους πυρήνες (Εικ. 73, Εικ. 74A).

Με βάση το κριτήριο αυτό, διερευνήθηκε εάν στα αρτίβλαστα που υφίστανται επίδραση με LY294002, DPI, NAC, MEN και H_2O_2 επηρεάζεται η πολική τοποθέτηση του πυρήνα στα ΜΠ. Η καταμέτρηση μεγάλου αριθμού επηρεασμένων ΜΠ με LY294002, DPI, NAC, MEN, τα οποία γειτνιάζαν με ώριμα ΜΚ, έδειξε ότι οι επιδράσεις αυτές αναστέλλουν τη μετανάστευση του πυρήνα στο πολικό άκρο των ΜΠ. Τα ποσοστά των πολωμένων ΜΠ, τα οποία βρίσκονται σε επαφή με ώριμα ΜΚ είναι σημαντικά μειωμένα, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά των φυσιολογικών αρτιβλάστων (Εικ. 73). Στις Εικ. 74Γ-Η δείχνονται επηρεασμένα ΜΠ σε επαφή με ώριμα ΜΚ, όπως φαίνονται με το οπτικό σύστημα Nomarski. Στα περισσότερα από αυτά ο πυρήνας βρίσκεται εκτός της πολικής θέσης.

Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η επίδραση με H_2O_2 προωθεί την πολική τοποθέτηση του πυρήνα στα ΜΠ. Στα επηρεασμένα με H_2O_2 αρτίβλαστα ο πυρήνας έχει λάβει την πολική θέση στο 59,20% (425 καταμετρηθέντα ΜΠ) και στο 65,95% (197 καταμετρηθέντα ΜΠ) των ΜΠ, τα οποία βρίσκονται σε επαφή με νεαρά και ώριμα ΜΚ αντίστοιχα (Εικ. 73). Το ποσοστό των πολωμένων ΜΠ σε επαφή με νεαρά ΜΚ είναι διπλάσιο σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό των φυσιολογικών αρτιβλάστων (Εικ. 73). Στην Εικ. 74Θ δείχνονται επηρεασμένα με H_2O_2 ΜΠ σε επαφή με νεαρά ΜΚ, όπως φαίνονται με το οπτικό σύστημα Nomarski. Είναι σαφές ότι ο πυρήνας των ΜΠ έχει τοποθετηθεί πλησίον των ΜΚ. Αντίθετα, τα ποσοστά των πολωμένων ΜΠ σε επαφή με ώριμα ΜΚ είναι ελαφρώς μικρότερα σε σχέση με εκείνα των φυσιολογικών αρτιβλάστων (Εικ. 73).



Εικόνα 73. Πίνακας (επάνω) που παρουσιάζει τα δεδομένα, τα οποία προέκυψαν από καταμετρήσεις της θέσης του πυρήνα φυσιολογικών και επηρεασμένων ΜΠ σε επαφή με νεαρά (αριστερά) και ώριμα (δεξιά) MK. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται τα διαγράμματα που προέκυψαν από τις καταμετρήσεις. Επιδράσεις: CONTR: dH₂O, LY294002: 50 μ M 72 h, DPI: 50 μ M 48 h, NAC: 500 μ M 48 h, MEN: 50 μ M 72 h, H₂O₂ 5 mM 48 h.



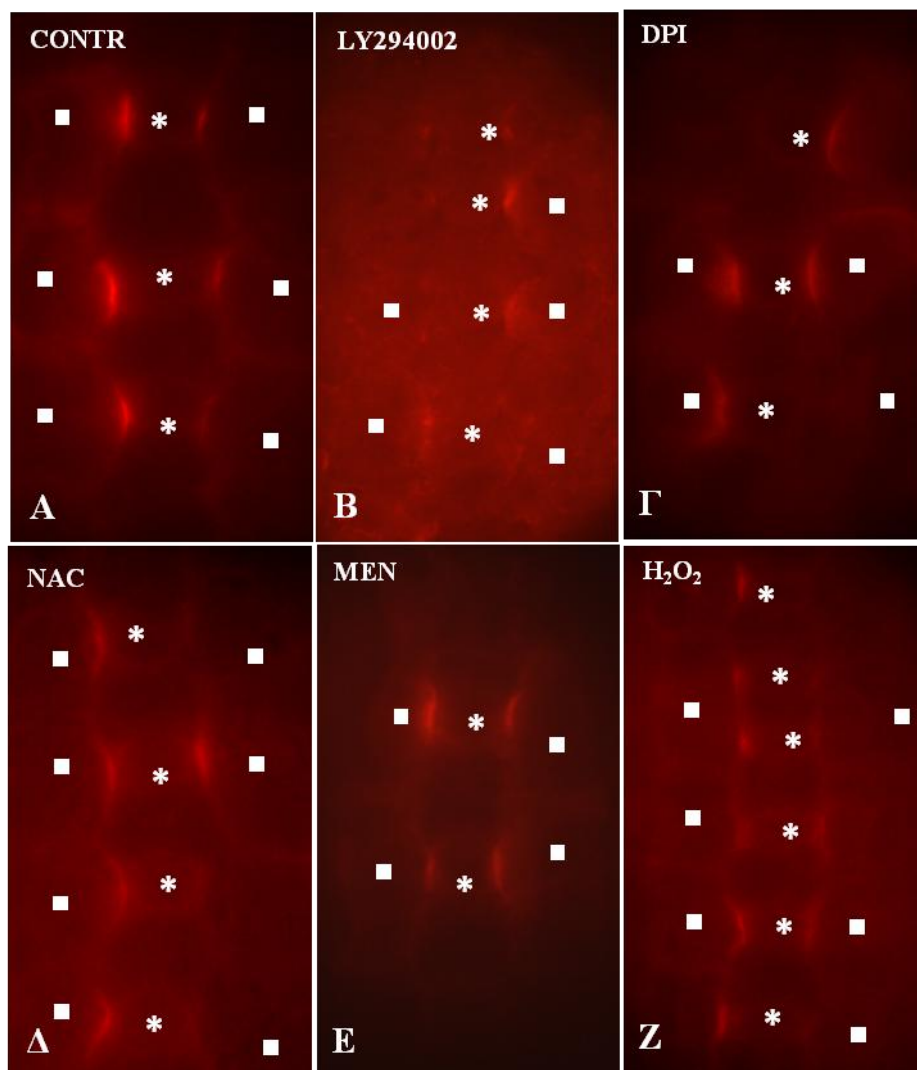
Εικόνα 74. Περιοχές του πρωτοδέρματος φύλλων του φυτού *Z. mays* που έχουν ληφθεί από φυσιολογικά (Α,Β) ή επηρεασμένα με LY294002 (Γ), DPI (Δ), NAC (Ε), MEN (Ζ,Η) και H_2O_2 (Θ) αρτίβλαστα, όπως φαίνονται με το οπτικό σύστημα Nomarski. Με αστερίσκο σημειώνονται τα ΜΚ, ενώ τα ΜΠ δείχνονται με μαύρο τετράγωνο. Επιδράσεις: CONTR: dH_2O , LY294002: 50 μM 72 h, DPI: 50 μM 48 h, NAC: 500 μM 48 h, MEN: 50 μM 72 h, H_2O_2 5 mM 48 h. Π: Πυρήνας (ΜΠ). Μεγέθυνση: X900.

III.10.5 Οργάνωση του περιφερειακού κυτταροσκελετού στα επηρεασμένα ΜΠ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στο πολικό άκρο των ΜΠ του φυτού *Z. mays* σχηματίζεται πλάκα-MA, η οποία επενδύει το πλασμαλήμμα στην περιοχή του κυτταρικού τοιχώματος που προεκβάλλει προς το επάγον ΜΚ (Εικ. 75Α). Αυτή διατηρείται στα διαιρούμενα ΜΠ και κληρονομείται στα νεαρά παραστοματικά κύτταρα (Panteris και συν. 2007).

Τα ΜΠ που έχουν υποστεί την επίδραση με DPI, NAC και MEN και τα οποία βρίσκονται σε επαφή με «ώριμα» ΜΚ, διαθέτουν πλάκες-MA. Αυτές επενδύουν την περιοχή του κυτταρικού τοιχώματος του ΜΠ που προεκβάλλει προς το ΜΚ (Εικ. 75Γ-Ε). Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι πλάκες-MA είναι καλά οργανωμένες. Στα ΜΠ που είχαν

υποστεί επίδραση με LY294002 η παρουσία των MA στο πολικό άκρο του ΜΠ δεν ήταν τόσο έντονη, λόγω του ότι η πλάκα-MA δεν ήταν τόσο καλά οργανωμένη όσο εκείνη των φυσιολογικών ΜΠ (Εικ. 75B σύγκρινε με Εικ. 75A). Σε αρκετά επηρεασμένα ΜΠ, η πλάκα-MA επεκτείνεται και πέρα από την επαφή MK/ΜΠ, γεγονός το οποίο δείχνει ότι αυτή διαθέτει μεγαλύτερη επιφάνεια από εκείνη των φυσιολογικών ΜΠ (Εικ. 75Γ, Δ). Στα επηρεασμένα ΜΠ, τα οποία διαθέτουν πλάκες-MA, ο πυρήνας μπορεί να βρίσκεται σε πολική ή μη πολική θέση. Τα επηρεασμένα ΜΠ που βρίσκονται σε επαφή με νεαρά MK δεν έφεραν πλάκα-MA.

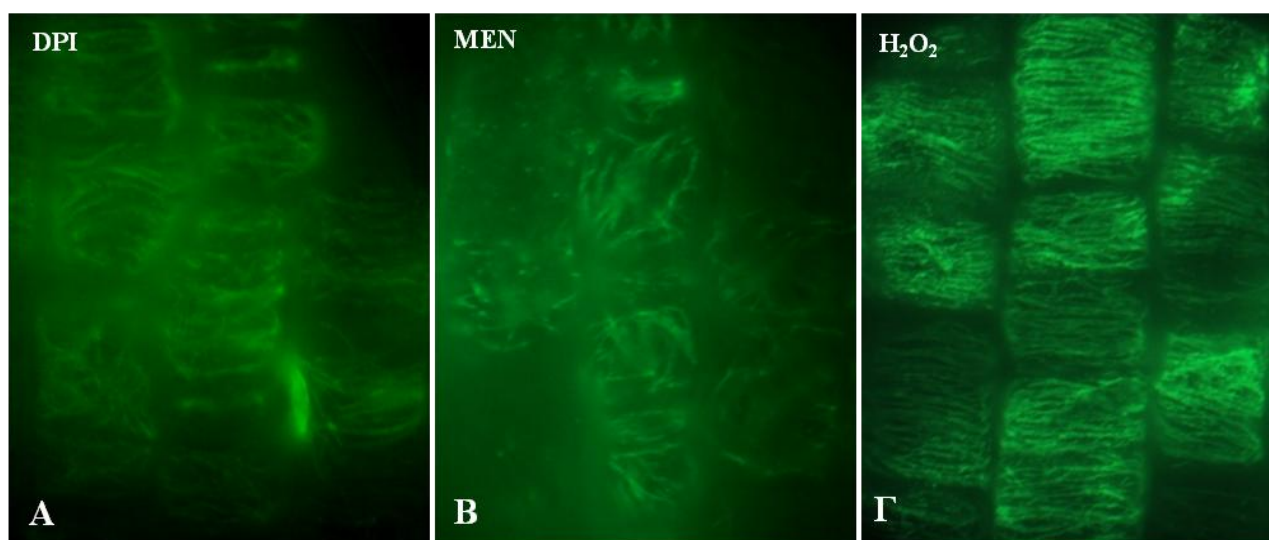


Εικόνα 75. Περιοχές του πρωτοδέρματος φύλλων του φυτού *Z. mays* από φυσιολογικά (A) ή επηρεασμένα με LY294002 (B), DPI (Γ), NAC (Δ), MEN (Ε) και H_2O_2 (Ζ) αρτίβλαστα, όπως φαίνονται μετά από χρώση των MA με φαλλοϊδίνη συζευγμένη με το φθοριόχρωμα Alexa 568. Οι αστερίσκοι σημειώνουν τα MK, ενώ τα τετράγωνα τα ΜΠ. Επιδράσεις: CONTR: dH₂O, LY294002: 50 μ M 72 h, DPI: 50 μ M 48 h, NAC: 500 μ M 48 h, MEN: 50 μ M 48 h, H_2O_2 5 mM 48 h. Μεγέθυνση: X900.

Τα ΜΠ των αρτίβλαστων, τα οποία είχαν υποστεί την επίδραση H_2O_2 , διέθεταν καλά οργανωμένες πλάκες-MA, όταν ήταν σε επαφή με ώριμα MK και αρκετές φορές όταν ήταν

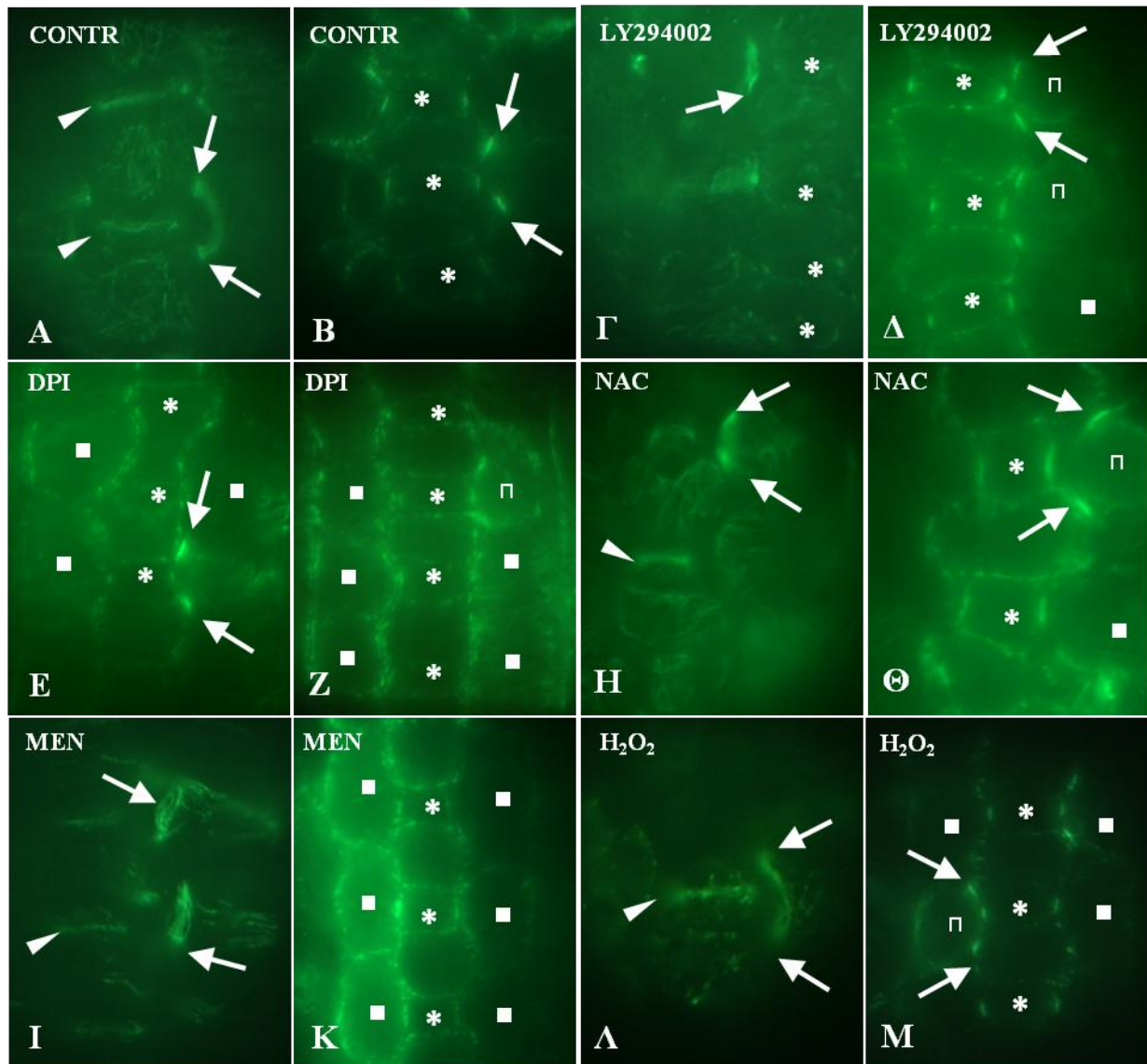
σε επαφή με νεαρά MK (Εικ. 75Z). Στην τελευταία περίπτωση, τα ΜΠ δεν είχαν σχηματίσει προεκβολή προς το γειτονικό MK (Εικ. 75Z). Τέλος, σε όλα τα επηρεασμένα αρτίβλαστα τα διαιρούμενα ΜΠ, καθώς και τα νεαρά παραστοματικά κύτταρα διέθεταν πλάκες-MA, όπως συμβαίνει και στα φυσιολογικά αρτίβλαστα.

Τα πρωτοδερμικά κύτταρα, τα οποία έχουν υποστεί επίδραση με LY294002, DPI, NAC και H_2O_2 , φέρουν μεγάλο αριθμό περιφερειακών πολυμερών σωληνίνης, τα οποία διευθετούνται σε δεσμίδες, προσανατολισμένες κυρίως κάθετα προς το μεγάλο άξονα του κυττάρου (Εικ. 76A,Γ). Επομένως, η οργάνωση του περιφερειακού κυτταροσκελετού της σωληνίνης σε αυτά τα κύτταρα έχει πολλές ομοιότητες με εκείνη του συστήματος των περιφερειακού ΜΣ των φυσιολογικών πρωτοδερμικών κυττάρων.



Εικόνα 76. Περιοχές του πρωτοδέρματος φύλλων του φυτού *Z. mays* από επηρεασμένα με DPI (Α), MEN (Β) και H_2O_2 (Γ) αρτίβλαστα, όπως φαίνονται μετά από ανοσοσθήμανση της σωληνίνης. Οι οπτικές τομές διέρχονται από το περιφερειακό κυτόπλασμα που επενδύει το εξωτερικό περικλινές τοίχωμα των κυττάρων. Επιδράσεις: DPI: 50 μ M 48 h, MEN: 50 μ M 48 h, H_2O_2 5 mM 48 h. Μεγέθυνση: X1100.

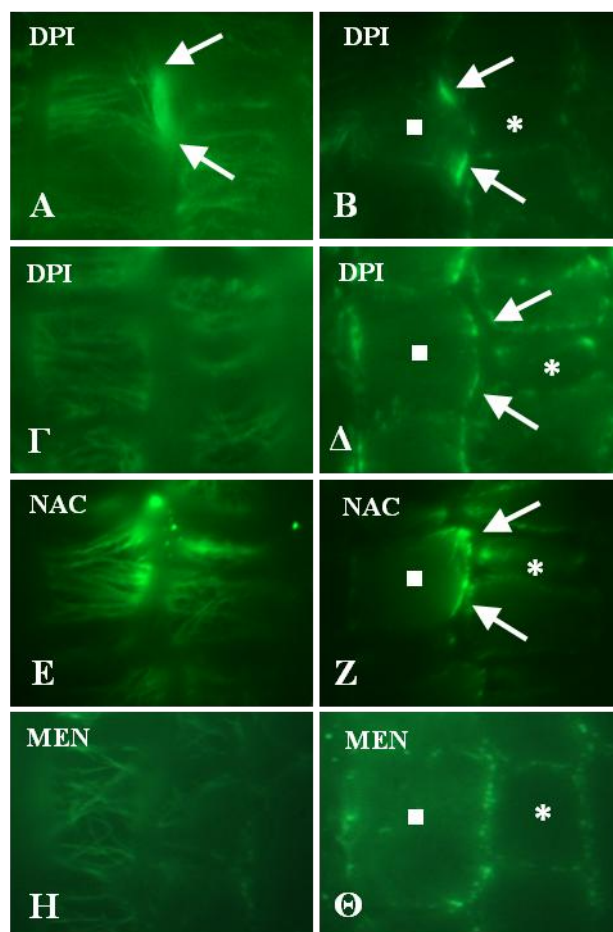
Τα πολωμένα ΜΠ των φυσιολογικών αρτιβλάστων χαρακτηρίζονται από την απουσία ΜΣ από το περιφερειακό κυτόπλασμα που επενδύει το κοινό τοίχωμα μεταξύ ΜΠ και MK και από την οργάνωση μίας ιδιόμορφης προ-προφασικής ζώνης ΜΣ πλευρικά του επάγοντος MK (Εικ. 77A,B, βλέπε επίσης Galatis και Apostolakis 2004, Panteris και συν. 2006). Η τελευταία προσδιορίζει με ακρίβεια τις θέσεις, στις οποίες, κατά το τέλος της κυτοκίνησης, η κυτταρική πλάκα θα συντηχθεί με τα μητρικά τοιχώματα, ώστε να διαμορφωθεί το καμπύλο θυγατρικό τοίχωμα που διαχωρίζει το παραστοματικό κύτταρο. Σε αυτή τη φάση είναι εμφανής ο μεσοφασικός δακτύλιος ΜΣ, ο οποίος ελέγχει, κατά κύριο λόγο, τη μορφογένεση του MK (Galatis 1982, Galatis και Apostolakis 2004, βλέπε επίσης Εικ. 77A,B).



Εικόνα 77. Περιοχές του πρωτοδέρματος φύλλων του φυτού *Z. mays* από φυσιολογικά (Α,Β) ή επηρεασμένα με LY294002 (Γ,Δ), DPI (Ε,Ζ), NAC (Η,Θ), MEN (Ι,Κ) και H_2O_2 (Λ,Μ) αρτίβλαστα, όπως φαίνονται μετά από ανοσοσήμανση σωληνίνης. Με αστερίσκο σημειώνονται τα ΜΚ, ενώ τα ΜΠ δείχνονται με λευκό τετράγωνο. Οι κεφαλές βελών σημειώνουν το μεσοφασικό δακτύλιο των ΜΚ, ενώ τα βέλη την προ-προφασική ζώνη πολυμερών σωληνίνης των ΜΠ. (Α,Γ,Ε,Η,Ι,Λ): Εξωτερική οπτική τομή των κυττάρων, (Β,Δ,Ζ,Θ,Κ,Μ): Κεντρική οπτική τομή των κυττάρων. Επιδράσεις: CONTR: dH_2O , LY294002: 50 μM 72 h, DPI: 50 μM 48 h, NAC: 500 μM 48 h, MEN: 50 μM 48 h, H_2O_2 5 mM 48 h. Μεγέθυνση: X900.

Στα επηρεασμένα αρτίβλαστα το κυτόπλασμα που επενδύει το κοινό τοίχωμα μεταξύ των ΜΠ και ώριμων ΜΚ στερείται πολυμερών σωληνίνης (Εικ. 77Δ). Τα περισσότερα επηρεασμένα ΜΠ χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολυμερών σωληνίνης στην περιοχή της προ-προφασικής ζώνης, τα οποία τείνουν να διαμορφώσουν δομή όμοια σε οργάνωση με την προ-προφασική ζώνη ΜΣ (Εικ. 77Γ-Θ,Λ,Μ, 78Α,Β σύγκρινε με Εικ. 77Α,Β). Η προ-

προφαντική ζώνη πολυμερών σωληνίνης συνυπάρχει και με άλλα πολυμερή, τα οποία είναι διευθετημένα κάθετα προς αυτή (Εικ. 78Α,Β). Τα ΜΚ που βρίσκονται σε επαφή με τα παραπάνω ΜΠ, διαθέτουν δακτύλιο πολυμερών σωληνίνης, παρόμοιο σε οργάνωση και διευθέτηση με το μεσοφασικό δακτύλιο ΜΣ των φυσιολογικών ΜΚ (Εικ. 77Η,Λ σύγκρινε με Εικ. 77Α).



Εικόνα 78. Περιοχές του πρωτοδέρματος φύλλων του φυτού *Z. mays* επηρεασμένων με DPI (Α-Δ), NAC (Ε,Ζ) και MEN (Η,Θ) αρτιβλάστων, όπως φαίνονται μετά από ανοσοσθήμανση σωληνίνης. Σε κάθε ζεύγος εικόνων παρουσιάζεται το ίδιο κύτταρο σε εξωτερικό και κεντρικό επίπεδο εστίασης. Με αστερίσκο σημειώνονται τα ΜΚ, ενώ τα ΜΠ δείχνονται με λευκό τετράγωνο. Τα βέλη σημειώνουν την προ-προφαντική ζώνη των ΜΠ. Επιδράσεις: DPI: 50 μ M 48 h, NAC: 500 μ M 48 h, MEN: 50 μ M 48 h. Μεγέθυνση: X1000.

Παράλληλα, διαπιστώθηκε η παρουσία αριθμού επηρεασμένων ΜΠ, στα οποία είχαν οργανωθεί τα αντικλινικά τμήματα της προ-προφαντικής ζώνης πολυμερών σωληνίνης, ενώ απουσίαζαν τα αντίστοιχα περικλινικά τμήματά της (Εικ. 78Γ-Ζ σύγκρινε με Εικ. 78Α,Β). Ως αντικλινικές ορίζονται οι πλευρές του κυττάρου που είναι κάθετες προς την επιφάνεια του φύλλου και ως περικλινικές εκείνες που είναι παράλληλες προς αυτή. Σε αυτά τα ΜΠ το περιφερειακό κυτόπλασμα που εφάπτεται των περικλινικών τοιχωμάτων διατρέχεται από

δεσμίδες πολυμερών σωληνίνης που καταλήγουν στην περιοχή της προ-προφασικής ζώνης (Εικ. 78Γ,Ε σύγκρινε με Εικ. 78Α). Επομένως, μπορεί να υποθεθεί ότι τα παραπάνω ΜΠ διαθέτουν ατελείς ή άτυπες προ-προφασικές ζώνες. Ατελείς προ-προφασικές ζώνες έχουν διαπιστωθεί και σε άλλους κυτταρικούς τύπους (Apostolakis και Galatis 1985, 1992). Αξίζει να σημειωθεί ότι στα επηρεασμένα με H_2O_2 αρτίβλαστα σχηματίζονται προ-προφασικές ζώνες πολυμερών σωληνίνης και σε ΜΠ που βρίσκονται σε επαφή με νεαρά ΜΚ (Εικ. 77Μ).

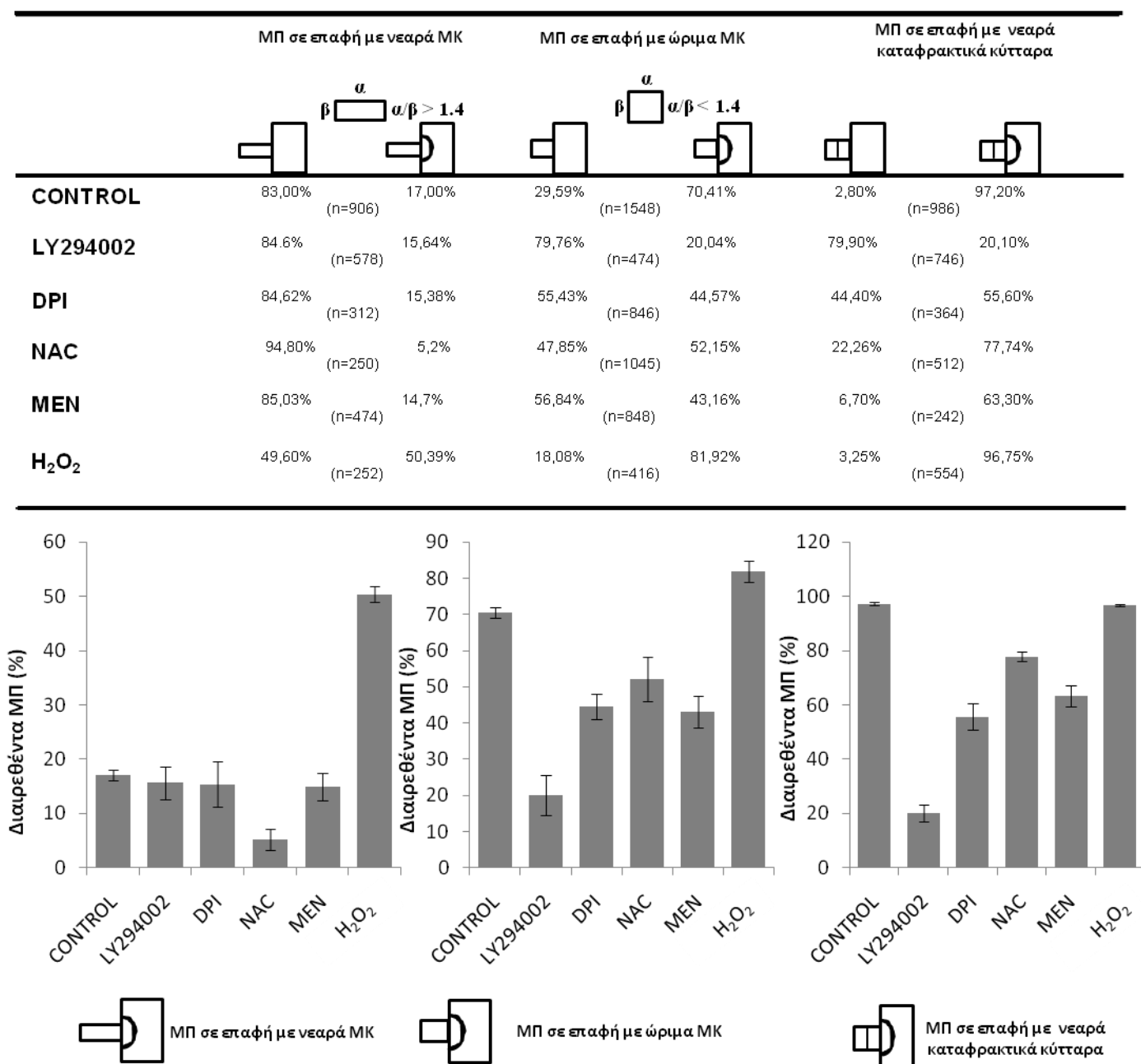
Τα πρωτοδερμικά κύτταρα που έχουν υποστεί επίδραση με ΜΕΝ, διαθέτουν άτυπες συναθροίσεις πολυμερών σωληνίνης, οι οποίες διατρέχουν το περιφερειακό κυτόπλασμα και συχνά σχηματίζουν δίκτυο (Εικ. 76Β). Επιπλέον, σε αρκετά επηρεασμένα με ΜΕΝ ΜΠ, τα οποία βρίσκονται σε επαφή με ώριμα ΜΚ, δεν διαμορφώνεται προ-προφασική ζώνη αλλά τα πολυμερή σωληνίνης δείχνουν τυχαία κατανομή στο περιφερειακό κυτόπλασμα (Εικ. 77Κ, Εικ. 78Η,Θ). Σε λίγα ΜΠ, τα πολυμερή σωληνίνης τείνουν να «συγκεντρωθούν» στην περιοχή της προ-προφασικής ζώνης (Εικ. 77Ι). Τέλος, πολλές φορές στα γειτονικά ΜΚ τα πολυμερή σωληνίνης εμφανίζονται τυχαία κατανεμημένα στο περιφερειακό κυτόπλασμα (Εικ. 77Κ, Εικ. 78Θ).

III.10.6 Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει τη δημιουργία των παραστοματικών κυττάρων

Με σκοπό τη διερεύνηση του ερωτήματος κατά πόσο οι ROS επηρεάζουν την εκδήλωση των ασυμμέτρων διαιρέσεων στα ΜΠ, πραγματοποιήθηκαν στο πρωτόδερμα φυσιολογικών και επηρεασμένων αρτιβλάστων καταμετρήσεις των αναπτυσσόμενων στοματικών συμπλόκων που φέρουν παραστοματικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, από το σύνολο των καταμετρηθέντων ΜΠ που βρίσκονται σε επαφή με νεαρά ή ώριμα ΜΚ και με νεαρά καταφρακτικά κύτταρα, προσδιορίστηκε το ποσοστό αυτών που έχει σχηματίσει ή όχι παραστοματικά κύτταρα. Ο αριθμός των καταμετρηθέντων ΜΠ σε κάθε περίπτωση, όπως επίσης και τα δεδομένα που προέκυψαν παρουσιάζονται στην Εικ. 79.

Από την αξιολόγηση των στοιχείων της Εικ. 79 προκύπτει ότι στα αρτίβλαστα, τα οποία είναι επηρεασμένα με LY294002, DPI, NAC και ΜΕΝ, αναστέλλεται η δημιουργία παραστοματικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των επηρεασμένων ΜΠ που εφάπτονται ώριμων ΜΚ ή νεαρών καταφρακτικών κυττάρων και έχει δώσει γένεση σε παραστοματικά κύτταρα είναι σημαντικά μειωμένος σε σύγκριση με αυτό των φυσιολογικών αρτιβλάστων (Εικ. 79). Αντίθετα, το ποσοστό των επηρεασμένων ΜΠ που βρίσκονται σε επαφή με νεαρά ΜΚ και έχουν δώσει γένεση σε παραστοματικά κύτταρα είναι παρόμοιο ή ελαφρώς μειωμένο σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό των φυσιολογικών αρτιβλάστων (Εικ. 79). Στις Εικ. 80Γ-Κ, παρουσιάζονται περιοχές του πρωτοδέρματος επηρεασμένων αρτιβλάστων, μετά από χρώση με κυανούν της ανιλίνης ή με το οπτικό σύστημα Nomarski,

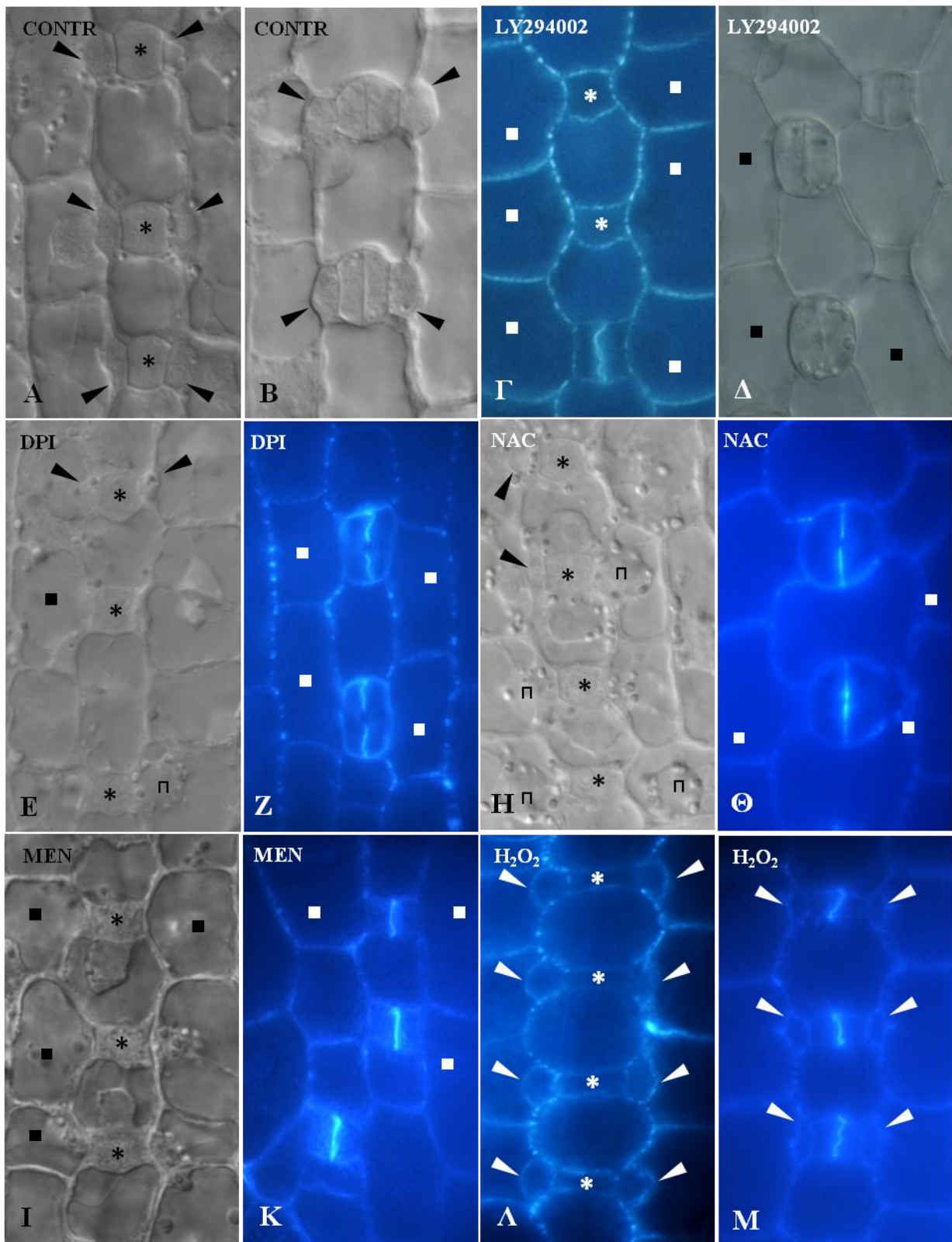
στις οποίες είναι σαφής η ανάσχεση της δημιουργίας παραστοματικών κυττάρων (σύγκρινε με Εικ. 80Α,Β).



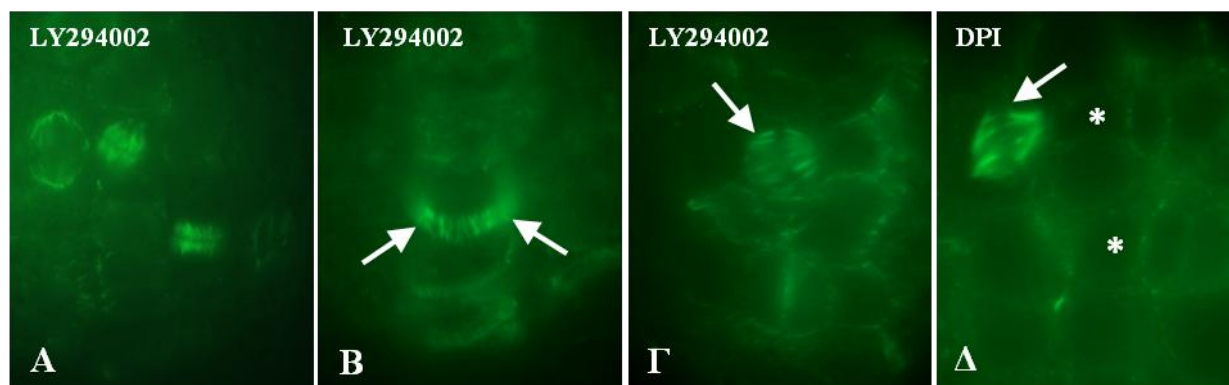
Εικόνα 79. Πίνακας (επάνω) που παρουσιάζει τα δεδομένα, τα οποία προέκυψαν από καταμετρήσεις φυσιολογικών και επηρεασμένων ΜΠ που έχουν ή δεν έχουν διαιρεθεί και βρίσκονται σε επαφή με νεαρά ή ώριμα ΜΚ και νεαρά καταφρακτικά κύτταρα. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται τα διαγράμματα που προέκυψαν από τις καταμετρήσεις. Επιδράσεις: CONTR: dH₂O, LY294002: 50 μΜ 72 h, DPI: 50 μΜ 48 h, NAC: 500 μΜ 48 h, MEN: 50 μΜ 72 h, H₂O₂ 5 mM 48 h.

Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται σε γενικότερη ανάσχεση των κυτταροδιαιρέσεων στο πρωτόδερμα ή στην εξειδικευμένη ανάσχεση της μεταγωγής του ερεθίσματος που επάγει την ασύμμετρη διαίρεση των ΜΠ. Η πρώτη άποψη δεν φαίνεται να ισχύει, καθόσον στα επηρεασμένα αρτίβλαστα παρατηρήθηκαν σύμμετρα ή ασύμμετρα διαιρούμενα πρωτοδερμικά κύτταρα (Εικ. 81Α,Β), διαιρούμενα ΜΚ (Εικ. 81Γ) και πάρα πολλά νεαρά στοματικά σύμπλοκα που έφεραν μεγάλες ποσότητες καλλόζης στο κοιλιακό τοίχωμα (Εικ. 80Γ,Κ). Η παρουσία καλλόζης δείχνει ότι το κοιλιακό τοίχωμα έχει δημιουργηθεί πρόσφατα. Επιπλέον, εντοπίστηκαν και λίγα διαιρούμενα ΜΠ, στα οποία η άτρακτος είχε σχεδόν τυπική οργάνωση (Εικ. 81Δ). Η μόνη εμφανής διαφορά τους από τα φυσιολογικά διαιρούμενα ΜΠ ήταν η διαγώνια διευθέτηση του άξονα της ατράκτου ως προς το επάγον ΜΚ (Εικ. 81Δ σύγκρινε με Εικ. 70Δ). Από τα παραπάνω συνάγεται ότι η αναστολή δημιουργίας παραστοματικών κυττάρων στα επηρεασμένα αρτίβλαστα οφείλεται στην ανάσχεση της μεταγωγής του ερεθίσματος που εκπέμπει το ΜΚ και επάγει τη διαίρεση των γειτονικών ΜΠ. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι στα επηρεασμένα αρτίβλαστα υπάρχει μικρό ποσοστό «επίμονων» ΜΚ (LY294002 7,40%, DPI 6,18%, NAC 5,32%, MEN 11,01%). Τα ΜΚ της κατηγορίας αυτής αποτυγχάνουν να διαιρεθούν, ωστόσο αποκτούν μορφολογικά χαρακτηριστικά καταφρακτικών κυττάρων (Galatis 1977, 1982, Livanos και συν. 2015).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι το H_2O_2 προωθεί τη δημιουργία παραστοματικών κυττάρων. Τα ποσοστά των επηρεασμένων ΜΠ που βρίσκονται σε επαφή με νεαρά ΜΚ και έχουν διαιρεθεί είναι 50,39% (252 καταμετρηθέντα ΜΠ), θεαματικά υψηλότερο σε σχέση με εκείνο (17,00%) των φυσιολογικών ΜΠ (Εικ. 79, Εικ. 80Λ). Το ποσοστό των αντίστοιχων ΜΠ σε επαφή με ώριμα ΜΚ ή νεαρά στόματα είναι 81,92% (416 καταμετρηθέντα ΜΠ) και 96,75% (554 καταμετρηθέντα ΜΠ). Στα φυσιολογικά αρτίβλαστα, τα αντίστοιχα ποσοστά των ΜΠ που έχουν διαιρεθεί είναι 70,41% και 97,6% (Εικ. 79). Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι το H_2O_2 προωθεί τη δημιουργία παραστοματικών κυττάρων σε περιοχές του πρωτοδέρματος κοντά στη βάση του φύλλου (Εικ. 80Λ). Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι στα επηρεασμένα με H_2O_2 αρτίβλαστα, μεγάλος αριθμός νεαρών ΜΚ έχει διαιρεθεί σύμμετρα, πριν αυτά αποκτήσουν το μάλλον τετράγωνο σχήμα τους (Εικ. 80Μ). Επομένως, το H_2O_2 προωθεί τόσο τις ασύμμετρες όσο και τις σύμμετρες διαιρέσεις του πρωτοδέρματος, γεγονός που έχει ως συνέπεια την ολοκλήρωση της δημιουργίας στοματικών συμπλόκων σε περιοχές κοντά στο μερίστωμα του φύλλου (Εικ. 80Λ,Μ).



Εικόνα 80. Περιοχές του πρωτοδέρματος φύλλων του φυτού *Z. mays* από φυσιολογικά (Α,Β) ή επηρεασμένα με LY294002 (Γ,Δ), DPI (Ε,Ζ), NAC (Η,Θ), MEN (Ι,Κ) και H_2O_2 (Λ,Μ) αρτίβλαστα, όπως φαίνονται με το οπτικό σύστημα Nomarski (Α,Β,Δ,Ε,Η,Ι) ή έπειτα από χρώση με κυανούν της ανιλίνης (Γ,Ζ,Θ,Κ-Μ). Με αστερίσκο σημειώνονται τα ΜΚ, ενώ τα ΜΠ δείχνονται με τετράγωνο. Οι κεφαλές βελών δείχνουν παραστοματικά κύτταρα. Επιδράσεις: CONTR: dH_2O , LY294002: 50 μM 72 h, DPI: 50 μM 48 h, NAC: 500 μM 48 h, MEN: 50 μM 72 h, H_2O_2 5 mM 48 h. Π: πυρήνας. Μεγέθυνση: X950.

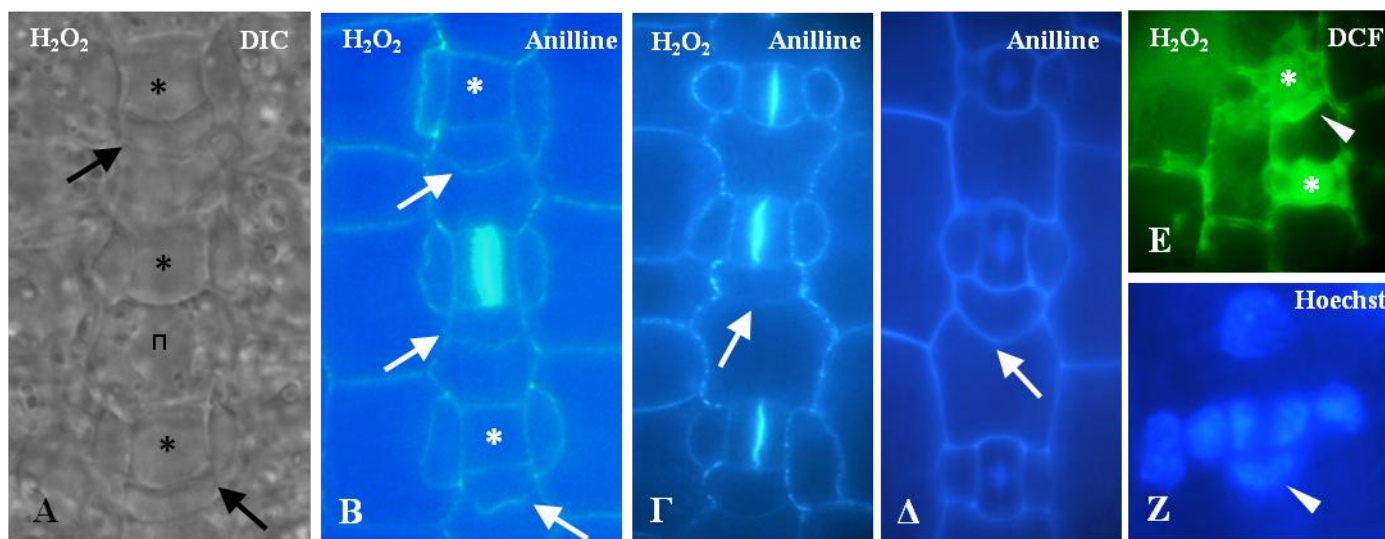


Εικόνα 81. Περιοχές του πρωτοδέρματος φύλλων του φυτού *Z. mays* από αρτίβλαστα επηρεασμένα με LY294002 (Α-Γ) και DPI (Δ), όπως φαίνονται μετά από ανοσοσήμανση σωληνίνης. Με αστερίσκο σημειώνονται τα MK. Στην Εικ. Α διακρίνεται προφανική άτρακτος, μεταφασική άτρακτος και φραγμοπλάστης σύμμετρα διαιρούμενων κυττάρων του πρωτοδέρματος. Τα βέλη δείχνουν το φραγμοπλάστη της ασύμμετρης διαίρεσης που δημιουργεί το MK (Β), τη μεταφασική άτρακτο σύμμετρης διαίρεσης του MK (Γ) και τη μεταφασική άτρακτο της ασύμμετρης διαίρεσης ενός ΜΠ (Δ). Επιδράσεις: LY294002: 50 μ M 48 h, DPI: 50 μ M 48 h. Μεγέθυνση: X900.

Αξίζει ιδιαίτερης προσοχής το γεγονός ότι, στα επηρεασμένα με H_2O_2 αρτίβλαστα, πολλά ενδιάμεσα κύτταρα της στοματικής σειράς διαιρούνται ασύμμετρα σε επίπεδο κάθετο προς τον άξονα του φύλλου (Εικ. 82Α-Δ). Το θυγατρικό κυτταρικό τοίχωμα αυτής της διαίρεσης είναι καμπύλο και διαχωρίζει ένα μικρό κύτταρο στην πλευρά του ενδιάμεσου κυττάρου που βρίσκεται προς την κορυφή του φύλλου. Το μικρό αυτό κύτταρο έρχεται σε επαφή με το έμπροσθεν αυτού στοματικό σύμπλοκο (Εικ. 82Α-Δ), είναι δε αντίστοιχο με τα «τελικά» (terminal) παραστοματικά κύτταρα που απαντούν στα στοματικά σύμπλοκα άλλων μονοκοτυλήδων φυτών (Cleary 1995). Στην παρούσα διατριβή τα κύτταρα αυτά ονομάζονται «κορυφαία» παραστοματικά κύτταρα. Οι παρατηρήσεις έδειξαν ότι τα περισσότερα «υπεράριθμα» παραστοματικά κύτταρα εντοπίζονται σε περιοχές των στοματικών σειρών που περιείχαν ώριμα MK ή νεαρά στοματικά σύμπλοκα (Εικ. 82Α-Δ). Κορυφαία παραστοματικά κύτταρα σχηματίζονται και στα φυσιολογικά αρτίβλαστα. Το ποσοστό τους στο φυσιολογικό υλικό είναι 1,27% (790 καταμετρηθέντα στοματικά σύμπλοκα), ενώ στα αρτίβλαστα που είχαν υποστεί επίδραση με H_2O_2 ανέρχεται στο 10,78% (677 καταμετρηθέντα στοματικά σύμπλοκα). Δηλαδή ο αριθμός τους στα επηρεασμένα αρτίβλαστα σχεδόν δεκαπλασιάζεται.

Επιπλέον, στο επηρεασμένο με H_2O_2 πρωτόδερμα, παρατηρήθηκαν στοματικές σειρές με ώριμα MK ή νεαρά καταφρακτικά κύτταρα, στις οποίες ο πυρήνας πολλών ενδιάμεσων κυττάρων ήταν σε επαφή με ένα από τα αναπτυσσόμενα στοματικά σύμπλοκα (Εικ. 82Α,Ζ). Στα ίδια αρτίβλαστα διαπιστώθηκε, μετά από χρώση με DCF, σήμα φθορισμού και στα ενδιάμεσα κύτταρα της στοματικής σειράς. Ειδικότερα, το σήμα εντοπίζεται στην

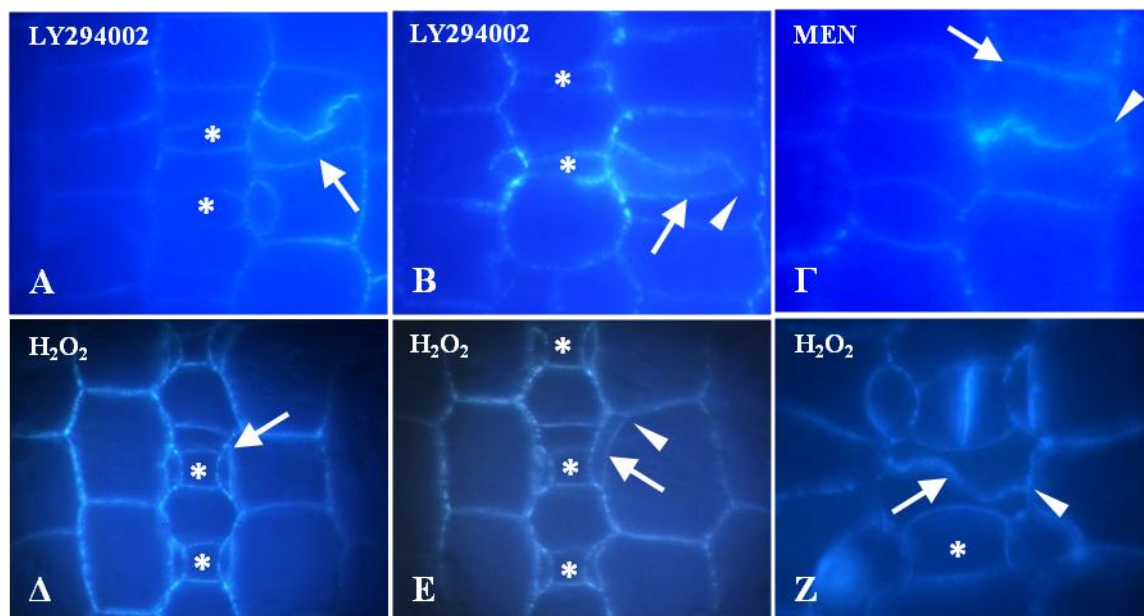
πλευρά του ενδιάμεσου κυττάρου που είναι σε επαφή με ένα από τα γειτονικά MK (Εικ. 82Ε). Συνήθως, τα ενδιάμεσα κύτταρα των στοματικών σειρών δεν εκπέμπουν έντονο σήμα φθορισμού ROS (βλέπε Εικ. 71Δ,Ε). Όλα τα παραπάνω, υποστηρίζουν ότι η οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από την επίδραση με H_2O_2 , δεν αναστέλλει αλλά αντίθετα, ευνοεί τη μεταγωγή του επαγωγικού ερεθίσματος που εκπέμπεται από το MK. Φαίνεται ότι είτε το επαγωγικό ερέθισμα, εκτός από κάθετα, μεταφέρεται και παράλληλα προς τον άξονα της στοματικής σειράς ή ότι η επίδραση με το H_2O_2 καθιστά τα ενδιάμεσα κύτταρα της στοματικής σειράς ικανά να ανταποκριθούν στο επαγωγικό ερέθισμα του MK.



Εικόνα 82. Περιοχές του πρωτοδέρματος του φυτού *Z. mays* από αρτίβλαστα επηρεασμένα με H_2O_2 , όπως φαίνονται με το οπτικό σύστημα Nomarski (Α), έπειτα από χρώση με κυανούνη της ανιλίνης (Β-Δ), χρώση με 25 μM DCF (Ε) ή Hoechst 33258 (Ζ). Με αστερίσκο σημειώνονται τα MK. Τα βέλη δείχνουν τα κορυφαία παραστοματικά κύτταρα, ενώ οι κεφαλές βελών τους πυρήνες ενδιάμεσων κυττάρων της στοματικής σειράς. Επίδρασεις: H_2O_2 5 mM 48 h. Π: Πυρήνας. Μεγέθυνση: X950.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις τα επηρεασμένα ΜΠ, τα οποία διαιρούνται κατά τη διάρκεια της επίδρασης, δημιουργούν άτυπα παραστοματικά κύτταρα. Αυτά έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από τα φυσιολογικά, ενώ το σχήμα τους αποκλίνει από το φακοειδές (Εικ. 83Α-Ε σύγκρινε με 80Α,Β). Το ένα άκρο του θυγατρικού τοιχώματος της ασύμμετρης διαίρεσης που δημιουργεί τα άτυπα παραστοματικά, συντήκεται με το μητρικό τοίχωμα στη θέση της προ-προφασικής ζώνης, ενώ το άλλο αποκλίνει και συντήκεται σε τυχαίες θέσεις του μητρικού τοιχώματος, εκτός της περιοχής της προ-προφασικής ζώνης (Εικ. 83Α-Ε). Μελέτη των κυττάρων αυτών σε σειρά οπτικών τομών αποκάλυψε ότι, συνήθως, η τελευταία θέση σύντηξης μετατοπίζεται στο χώρο (Εικ. 83Δ,Ε). Επομένως, η διατάραξη της ομαλής διεξαγωγής της κυτοκίνησης στα επηρεασμένα ΜΠ οδηγεί στη δημιουργία άτυπων παραστοματικών κυττάρων, γεγονός το οποίο έχει διαπιστωθεί και στο φυσιολογικό πρωτόδερμα φύλλων ειδών του γένους *Triticum* (Galatis

και συν. 1984α). Ο ίδιος μηχανισμός οδηγεί και στη δημιουργία ορισμένων άτυπων κορυφαίων παραστοματικών κυττάρων (Εικ. 83Z σύγκρινε με Εικ. 82B-Δ). Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περιοχές του πρωτοδέρματος με τα άτυπα παραστοματικά κύτταρα, το μήκος των ΜΠ και των ενδιάμεσων κυττάρων της στοματικής σειράς είναι μικρότερο από εκείνο των αντίστοιχων κυττάρων των φυσιολογικών αρτιβλάστων (Εικ. 83 σύγκρινε με Εικ. 80A,B).



Εικόνα 83. Περιοχές του πρωτοδέρματος φύλλων του φυτού *Z. mays* από αρτίβλαστα επηρεασμένα με LY294002 (A,B), MEN (Γ) και H₂O₂ (Δ-Z), οι οποίες περιέχουν στοματικά σύμπλοκα με άτυπα παραστοματικά κύτταρα (βέλη), όπως φαίνονται έπειτα από χρώση με κυανούν της ανιλίνης. Οι κεφαλές βελών σημειώνουν τις τυχαίες θέσεις συντήξεις του θυγατρικού τοιχώματος, το οποίο διαχωρίζει το άτυπο παραστοματικό κύτταρο, με το τοίχωμα του μητρικού κυττάρου. Οι (Δ,Ε) δείχνουν την ίδια περιοχή σε διαφορετικό επίπεδο εστίασης. Με αστερίσκο σημειώνονται τα MK. Επιδράσεις: LY294002: 50 μ M 72 h, MEN: 50 μ M 72 h, H₂O₂ 5 mM 48 h. Μεγέθυνση: X900.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

IV.1 ΓΕΝΙΚΑ

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε για πρώτη φορά η λειτουργική σχέση των ROS με το φυτικό κυτταροσκελετό και συγκεκριμένα, οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης των ROS με τον κυτταροσκελετό, κατά κύριο λόγο της σωληνίνης, σε τρία είδη αγγειοσπέρμων φυτών. Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκαν χημικές ενώσεις, οι οποίες μεταβάλλουν τα επίπεδα των ROS με διαφορετικούς τρόπους. Για τη μείωση των επιπέδων τους χρησιμοποιήθηκαν οι ουσίες DPI, NAC και ο αναστολέας LY294002. Το DPI θεωρείται εξειδικευμένος αναστολέας της NADPH-οξειδάσης, η NAC αλληλεπιδρά με ROS, ενώ ο LY294002, αναστέλλοντας την καταλυτική δραστηριότητα της PI3K, προκαλεί μείωση των επιπέδων των ROS σε σύγκριση με εκείνα των φυσιολογικών ακρόρριζων. Είναι ενδιαφέρον, ότι η PI3K και το προϊόν που παράγεται από την καταλυτική δραστηριότητά της, η PI3P, σχετίζονται με την ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης (Liu και συν. 2012α). Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η NAC δεν αλληλεπιδρά το ίδιο αποτελεσματικά με όλες τις ROS (Aruoma και συν. 1989, Benrahmoune και συν. 2000).

Για την αύξηση των επιπέδων των ROS χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις MEN και H_2O_2 . Η MEN, παρουσία οξυγόνου, οδηγεί στην αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ROS (Kawamura και συν. 2006β). Το H_2O_2 , εξαιτίας της σταθερότητας και της δραστικότητάς του, θεωρείται ότι εμφανίζει χαρακτηριστικά μορίου μεταγωγής μηνύματος (Azzi και συν. 2004). Επιπλέον, διαχέεται εύκολα μέσω του πλάσμαλήμματος (Neill και συν. 2002).

Η αποτελεσματικότητα των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να μεταβάλλουν τα επίπεδα των ROS εκτιμήθηκε σε μορφολογικό επίπεδο, με χρώση των επηρεασμένων ιστών με ουσίες, οι οποίες αντιδρώντας με τις ROS, φθορίζουν. Αυτές είναι παράγωγα της fluorescein και χρησιμοποιούνται ευρέως για να καταστήσουν ορατές τις ROS. Αν και συχνά αναφέρονται ως ειδικές για την εμφάνιση H_2O_2 ή $O_2^{\cdot-}$, η δράση τους δεν είναι τόσο ειδική, καθώς μπορούν να αντιδρούν και με άλλες ROS (Swanson και συν. 2011). Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μάρτυρες, ενώ η φωτογράφιση των δειγμάτων έγινε στον ίδιο χρόνο έκθεσης. Η ικανότητα των ενώσεων να μεταβάλλουν τα επίπεδα των ROS επιβεβαιώθηκε σε σειρά ανεξάρτητων πειραμάτων, μετά από μέτρηση της έντασης του φθορισμού με κατάλληλο λογισμικό.

Στο σημείο αυτό, πρέπει να αναφερθεί ότι διερευνήθηκε το ενδεχόμενο οι εκτεταμένες μεταβολές των επιπέδων των ROS να οδηγούν στην εμφάνιση νεκρωτικών φαινομένων. Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκαν, μετά από σειρά πειραμάτων, οι συγκεντρώσεις των ουσιών και οι χρόνοι των επιδράσεων που δεν προκαλούν νέκρωση των κυττάρων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικά πειράματα, στα οποία τα

αρτίβλαστα, μετά το τέλος της επίδρασης, μεταφέρθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες. Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώθηκε ότι τα επηρεασμένα αρτίβλαστα είχαν ικανότητα ανάκαμψης.

Τα κύρια αποτελέσματα της παρούσας διατριβής συνοψίζονται στα εξής:

1. Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει σημαντικά τον κυτταροσκελετό της σωληνίνης. Οι επιδράσεις με τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν προκαλούν αρχικά αποδιοργάνωση των ΜΣ και, στη συνέχεια, την αντικατάστασή τους από άτυπα πολυμερή σωληνίνης. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και μετά από αντίστοιχες επιδράσεις σε αρτίβλαστα του φυτού *Arabidopsis*, τα οποία παράγουν GFP-TUB. Παρόμοιες ατυπίες διαπιστώθηκαν, μετά από ανοσοσήμανση της σωληνίνης στα κύτταρα της ρίζας των μεταλλαγμάτων *rhd2* του φυτού *Arabidopsis*.

2. Η μελέτη με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης αποκάλυψε ότι τα αυξημένα επίπεδα ROS επάγουν τη δημιουργία παρακρυστάλλων σωληνίνης, έπειτα από επίδραση με MEN, και την οργάνωση μακροσωληνίσκων παρουσία H_2O_2 . Επιπλέον, οι ουσίες NAC και DPI, οι οποίες προκαλούν μείωση των επιπέδων των ROS, οδηγούν στη συγκρότηση μακροσωληνίσκων.

3. Διερευνήθηκαν περαιτέρω οι συνέπειες της διατάραξης της ομοιόστασης των ROS στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης και μελετήθηκε εάν επηρεάζεται η ίδια η σωληνίνη στα επηρεασμένα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, σε συνθήκες επίδρασης μεταβάλλονται τα επίπεδα της α -σωληνίνης, επάγεται η ακετυλίωσή της, ενώ μειώνονται τα επίπεδα της τυροσινωμένης α -σωληνίνης. Επιπλέον, η MAP65-1 εντοπίστηκε σε σχηματισμούς όμοιους με εκείνους των άτυπων πολυμερών σωληνίνης που σχηματίζονται στα επηρεασμένα κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να εμπλέκεται στη οργάνωσή τους.

4. Η χρήση του εξειδικευμένου αναστολέα LY294002, ο οποίος αναστέλλει την καταλυτική δραστηριότητα της PI3K, διαταράσσει την οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης και οδηγεί στην εμφάνιση άτυπων πολυμερών. Επιπλέον, μία πρωτεϊνική κινάση με MB 46 kDa, όμοια με την p38-MAPK των ζωικών κυττάρων, συμμετέχει στους μηχανισμούς αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της σωληνίνης που προκαλείται από τις μεταβολές των επιπέδων των ROS.

5. Τα άτυπα πολυμερή σωληνίνης των επηρεασμένων κυττάρων δεν σχηματίζουν λειτουργικά συστήματα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία των διαιρούμενων κυττάρων του ακρόρριζου να εισέλθουν σε διαίρεση ή να μεταβούν από το ένα στάδιο του κυτταρικού κύκλου στο επόμενο. Διερευνήθηκε, εάν οι αιτίες του φαινομένου οφείλονται αποκλειστικά στις ατυπίες του κυτταροσκελετού της σωληνίνης ή εάν η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει και άλλα γεγονότα της κυτταροδιαίρεσης. Η μελέτη φυτών *Arabidopsis* GUS:cyclin B1 αποκάλυψε τη μεταβολή του προτύπου έκφρασης του γονιδίου

της κυκλίνης B1. Η κυκλίνη αυτή αποτελεί κομβικό μόριο σε πολλά σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι στα επηρεασμένα κύτταρα καθυστερεί η αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου στο τέλος της πρόφασης και η επανασυγκρότησή του κατά την τελόφαση. Επίσης, διαταράσσεται τόσο η πορεία ανάπτυξης της κυτταρικής πλάκας όσο και ο καθορισμός του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης.

6. Οι ROS εμπλέκονται γενικά σε διαδικασίες μεταγωγής μορφογενετικών ερεθισμάτων. Επιλέχθηκε να διερευνηθεί η συμμετοχή τους, ως μορίων μηνυμάτων, στο μηχανισμό που ελέγχει την καθιέρωση πολικότητας και την εκδήλωση της ασύμμετρης διαίρεσης από την οποία προκύπτουν τα παραστοματικά κύτταρα των στοματικών συμπλόκων του φυτού *Z. mays*. Η μελέτη της κατανομής των ROS στο πρωτόδερμα έδειξε ότι αυτές συσσωρεύονται στο πολικό άκρο των μητρικών κυττάρων των παραστοματικών κυττάρων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν επιδράσεις σε αρτίβλαστα *Z. mays* με DPI, NAC, MEN, H_2O_2 αλλά και LY294002. Σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από εκείνη της επίδρασης με H_2O_2 , αναστέλλονται ειδικά οι ασύμμετρες κυτταροδιαιρέσεις, οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία παραστοματικών κυττάρων. Αντίθετα, στην περίπτωση επίδρασης με H_2O_2 τα παραστοματικά κύτταρα δημιουργούνται κανονικά, και επιπλέον, εκτός από τα τυπικά παραστοματικά κύτταρα, δημιουργούνται και άλλα, μετά από ασύμμετρη διαίρεση των ενδιαμέσων κυττάρων της στοματικής σειράς.

Στα επόμενα κεφάλαια, θα συζητηθεί ο ρόλος των ROS και οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους τα μόρια αυτά εμπλέκονται στις παραπάνω βιολογικές διεργασίες.

IV.2 ROS ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΣΩΛΗΝΙΝΗΣ

IV.2.1 Πορεία αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, έπειτα από τη διατάραξη της ομοιόστασης των ROS

Τα αποτελέσματα των επιδράσεων μικρής διάρκειας έδειξαν ότι οι μεταβολές των επιπέδων των ROS προκαλούν σε σύντομο χρονικό διάστημα καταστροφή των ΜΣ στα κύτταρα του ακρόρριζου των φυτών *T. turgidum* και *A. thaliana*. Η αποδιοργάνωση των ΜΣ είναι ορατή από τα πρώτα λεπτά της επίδρασης. Αυτό επιβεβαιώνεται και μετά από πειράματα με φυτά *A. thaliana* που εκφράζουν *GFP-TUB*. Η χρήση των φυτών αυτών επιτρέπει την παρατήρηση της συμπεριφοράς του κυτταροσκελετού σε ζώντα αρτίβλαστα. Εντός χρονικού διαστήματος 30 min, τα πολυμερή της σωληνίνης εξαφανίζονται σταδιακά από τα επηρεασμένα επιδερμικά κύτταρα των κοτυληδόνων και του υποκοτυλίου. Παράλληλα, στα κύτταρα των φυτών αυτών, εντοπίζονται τυχαία κατανεμημένες μάζες από κοκκία GFP-TUB, η παρουσία των οποίων είναι εντονότερη σε παρατεταμένους χρόνους επίδρασης. Η καταστροφή των ΜΣ υποστηρίζεται επίσης από τα δεδομένα που προέκυψαν από την καταμέτρηση των πολυμερών της σωληνίνης, έπειτα από παρατήρηση των επηρεασμένων κυττάρων με το

ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Τα δεδομένα δείχνουν ότι οι ΜΣ αποτελούν τη μειοψηφία του συνόλου των πολυμερών της σωληνίνης (Πίνακας 6).

Η ανάσχεση της καταλυτικής δραστηριότητας της NADPH-οξειδάσης, όπως επίσης και η εξουδετέρωση των ROS από την NAC, έχουν ως αποτέλεσμα τη συγκρότηση μακροσωληνίσκων στα κύτταρα του ακρόρριζου. Η εντόπιση των ROS, μετά από χρώση, έδειξε ότι και οι δύο ενώσεις προκαλούν μείωση των επιπέδων των ROS στα κύτταρα του ακρόρριζου. Η μελέτη φυτών *rhd2* ενισχύει την άποψη ότι η δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης δεν αποτελεί παρενέργεια των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν, αλλά σχετίζεται άμεσα με την απώλεια λειτουργίας της NADPH-οξειδάσης ή με τη μείωση των επιπέδων των ROS που αυτή προκαλεί. Ο συνδυασμός μελέτης κυττάρων ακρόρριζων των μεταλλαγμάτων, τα οποία στερούνται της λειτουργίας της *AtRbohC*, με μικροσκόπιο φθορισμού μετά από ανοσοσήμανση της σωληνίνης, και με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, έδειξε ότι αυτά φέρουν άτυπα πολυμερή. Είναι ενδιαφέρον ότι, στα κύτταρα αυτά, οι μακροσωληνίσκοι αντιπροσωπεύουν μεγάλο ποσοστό του συνόλου των πολυμερών της σωληνίνης.

Ωστόσο, στην περίπτωση της οξειδωτικής καταπόνησης που προκαλείται από τα αυξημένα επίπεδα ROS, οι επιπτώσεις στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης των κυττάρων του ακρόρριζου διαφέρουν ανάλογα με την ουσία που χρησιμοποιήθηκε. Στα κύτταρα που έχουν υποστεί επίδραση με MEN πραγματοποιείται βαθμιαία η οργάνωση άτυπων πολυμερών. Η εξέταση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε ότι δεν δημιουργούνται μακροσωληνίσκοι, αλλά παρακρυσταλλικές δομές που περιέχουν ή αποτελούνται από σωληνίνη. Αντίθετα, η παρουσία H_2O_2 επάγει τη συγκρότηση μακροσωληνίσκων. Στα επηρεασμένα κύτταρα δεν βρέθηκαν παρακρύσταλλοι.

Η εμφάνιση των άτυπων πολυμερών που ακολουθεί την αποδιοργάνωση των τυπικών ΜΣ πραγματοποιείται σταδιακά. Αυτό επιβεβαιώνεται τόσο μετά από ανοσοσήμανση της σωληνίνης σε διαφορετικούς χρόνους επίδρασης, όσο και από τη μελέτη των φυτών GFP-TUB. Διαπιστώθηκε, επίσης, ότι τα άτυπα πολυμερή σωληνίνης δεν σχηματίζονται μόνο στα διαιρούμενα κύτταρα της ρίζας αλλά και σε μη διαιρούμενα κύτταρα που βρίσκονται σε άλλα φυτικά όργανα. Στα επιδερμικά κύτταρα του υποκοτυλίου και των κοτυληδόνων αυτών των φυτών, συγκροτούνται σταδιακά άτυπα πολυμερή σωληνίνης, η εμφάνιση των οποίων είναι όμοια με εκείνη των πολυμερών που παρατηρήθηκαν στα κύτταρα του ακρόρριζου, μετά από στερέωση του φυτικού υλικού. Τα δεδομένα από τη μελέτη με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο υποστηρίζουν ότι η δημιουργία παρακρυστάλλων σωληνίνης γίνεται επίσης, σταδιακά. Μετά την αποδιοργάνωση των ΜΣ στα επηρεασμένα με MEN κύτταρα, εμφανίζονται αρχικά μάζες από άμορφο υλικό, το οποίο περιέχει ή αποτελείται από σωληνίνη. Στη συνέχεια, δημιουργούνται οι παρακρύσταλλοι.

Όλα τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι ο κυτταροσκελετός της σωληνίνης είναι ευαίσθητος στις μεταβολές των επιπέδων των ROS. Η καταστροφή των ΜΣ και η συγκρότηση άτυπων πολυμερών δεν περιορίζονται στις περιπτώσεις οξειδωτικής καταπόνησης λόγω της αύξησης των ROS. Η μείωσή τους ή η ανάσχεση της καταλυτικής δραστηριότητας των ενζύμων που παράγουν ROS οδηγούν σε όμοιες αλλαγές στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης.

Οι πρώτες πληροφορίες για τη σχέση των ROS με τους ΜΣ στα φυτικά κύτταρα αφορούσαν σε μελέτες των κυτταρικών αποκρίσεων σε βιοτικές ή αβιοτικές καταπονήσεις. Συχνά, οι καταπονήσεις προκαλούν αύξηση των ROS, η οποία συνοδεύεται από μεταβολές του κυτταροσκελετού της σωληνίνης. Για παράδειγμα, η επίδραση εξασθενούς χρωμίου σε αρτίβλαστα του φυτού *Lens culinaris* οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων των ROS και παράλληλα στη διατάραξη της οργάνωσης των ΜΣ στα κύτταρα της ρίζας. Οι ΜΣ που υφίστανται την επίδραση του χρωμίου εμφανίζονται ανθεκτικοί στις χημικές ουσίες που προκαλούν καταστροφή των ΜΣ και τείνουν να σχηματίζουν δεσμίδες (Eleftheriou και συν. 2013). Σε φυτά GFP-TUB του φυτού *Arabidopsis*, η επώαση με σωματίδια TiO_2 , τα οποία συχνά προκαλούν την παραγωγή ROS, προκάλεσε εκτεταμένη καταστροφή των ΜΣ των επιδερμικών κυττάρων των κοτυληδόνων (Wang και συν. 2011γ). Η παραγωγή ROS συγκαταλέγεται στις πιθανές αιτίες αποπολυμερισμού των ΜΣ σε φυτά *A. thaliana*, έπειτα από επίδραση με NaCl (Wang και συν. 2007). Επίσης, η παρουσία τοξινών του μύκητα *Verticillium dahliae* στα κύτταρα των φύλλων του φυτού *A. thaliana*, οδηγεί σε ταχύτατη αύξηση των επιπέδων των ROS, η οποία συνοδεύεται από καταστροφή των ΜΣ. Είναι ενδιαφέρον ότι στο συγκεκριμένο σύστημα παρατηρείται αντιστροφή του φαινομένου, μετά από επίδραση με DPI (Yao και συν. 2011).

Αντίθετα, είναι ελάχιστες οι περιπτώσεις, στις οποίες αναφέρεται ότι ενώσεις που σχετίζονται με τη μείωση των επιπέδων των ROS επιφέρουν αλλαγές στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης. Σε μία από αυτές σημειώνεται ότι σε κύτταρα του φυτού *Picea abies*, στα οποία παρέχεται εξωγενώς το αντιοξειδωτικό τριπεπτίδιο γλουταθειόνη, προκαλούνται μεταβολές στον κυτταροσκελετό των ΜΣ. Οι περιφερειακοί ΜΣ των επηρεασμένων κυττάρων έχουν μικρό μήκος και κυματοειδή εμφάνιση, ενώ μεταξύ αυτών εντοπίζονται σφαιρικά συσσωματώματα σωληνίνης (Urbanek και συν. 2003). Επιπλέον, σε καλλιέργειες ινοβλαστών ποντικού, το DPI οδηγεί στην καταστροφή των ΜΣ (Scaife 2006). Στην περίπτωση αυτή οι επιπτώσεις του DPI δεν συσχετίζονται με την ανάσχεση της NADPH-οξειδάσης, και τις ROS. Επίσης, στα ίδια κύτταρα, η επίδραση με NAC δεν προκάλεσε κάποια ορατή διαταραχή στο σύστημα των ΜΣ (Scaife 2006). Ωστόσο, στο σύστημα που μελετήσαμε, ακόμη και αν θεωρήθει ότι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, η οποία πραγματοποιείται από ενώσεις που μειώνουν τα επίπεδα των ROS,

αντιπροσωπεύει παρενέργεια των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν, η παρουσία άτυπων πολυμερών σωληνίνης στα κύτταρα του μεταλλάγματος *rhd2* υποστηρίζει ότι η καταλυτική δραστηριότητα της NADPH-οξειδάσης ή/και η ομοιόσταση των ROS είναι απαραίτητες για τη συγκρότηση ΜΣ.

Μακροσωληνίσκοι έχουν βρεθεί σε εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους ζωικών οργανισμών, ενώ αυτοί συγκροτούνται *in vivo* υπό καθορισμένες συνθήκες (Unger και συν. 1990, Vater και συν. 1997). Η παρουσία πολυμερών σωληνίνης με διάμετρο μεγαλύτερη από εκείνη των ΜΣ έχει καταγραφεί και σε κυτταρικούς τύπους φυτικών οργανισμών. Τα ελαιοκύτταρα του ηπατικού βρυοφύτου *Marchantia palacea* φέρουν ένα σύστημα σωληνοειδών πολυμερών, διαμέτρου 33-37 nm. Τα πολυμερή αντικαθιστούν τους ΜΣ και σχηματίζουν δεσμίδες που διατρέχουν το κυτόπλασμα, το οποίο περιβάλλει το αναπτυσσόμενο ελαιοσωμάτιο (Galatis και Apostolakos 1976, Apostolakos και Galatis 1998). Παρόμοια πολυμερή έχουν παρατηρηθεί και στα επιδερμικά κύτταρα της ωοθήκης του φυτού *Ornithogalum umbellatum*, στην περιοχή όπου εντοπίζονται ελαιοσωμάτια (Kwiatowska και συν. 2006).

Ο σχηματισμός μακροσωληνίσκων στα κύτταρα των φυτικών ιστών είναι συχνό φαινόμενο, όταν αυτά υφίστανται ορισμένες μορφές καταπόνησεων. Η υπερωσμωτική καταπόνηση προκαλεί τη δημιουργία μακροσωληνίσκων σε μεριστωματικά κύτταρα φύλλου του φυτού *Chlorophytum comosum* και σε κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *Triticum turgidum* (Komis και συν. 2001, 2002). Επίσης, στα ακρόρριζα του *T. turgidum* σχηματίζονται, έπειτα από επίδραση με $AlCl_3$, άτυπα πολυμερή σωληνίνης με μεγαλύτερη διάμετρο από αυτή των ΜΣ (Frantzios και συν. 2000). Πρόσφατα, παρατηρήθηκαν μακροσωληνίσκοι σε κύτταρα του φυτού *Pisum sativum* μετά από επίδραση δισφαινόλης Α (Adamakis και συν. 2013). Είναι ενδιαφέρον ότι η έκθεση στην ουσία αυτή επάγει οξειδωτική καταπόνηση (Yi και συν. 2011). Τέλος, η σωληνίνη η οποία απομονώνεται από το φυτό *Vigna radiata* πολυμερίζεται *in vitro* σε μακροσωληνίσκους, παρουσία μικρών συγκεντρώσεων κολχικίνης (Mizuno και Suzuki 1990).

Ωστόσο, υψηλότερες συγκεντρώσεις και μεγαλύτεροι χρόνοι έκθεσης στην κολχικίνη οδηγούν στη δημιουργία δομών σωληνίνης, οι οποίες δεν έχουν σωληνοειδή εμφάνιση, αλλά εμφανίζουν παρακρυσταλλική δομή. Οι παρακρύσταλλοι σωληνίνης περιέχουν ή αποτελούνται από σωληνίνη, έχουν δε παρατηρηθεί, έπειτα από επίδραση με κολχικίνη σε κύτταρα ρίζας των φυτών *Vigna sinensis* και *Triticum aestivum* (Apostolakos και συν. 1990, Karagiannidou και συν. 1995, Lazareva και συν. 2003) ή σε ζωικά κύτταρα μετά από επίδραση με τα αλκαλοειδή βινβλαστίνη και βινκριστίνη (βλέπε Apostolakos και συν. 1990, Lazareva και συν. 2003). Παρακρύσταλλοι σωληνίνης έχουν βρεθεί και σε κύτταρα των φυτών *Chlorophytum comosum* και *T. turgidum*, τα οποία υφίστανται υπερωσμωτική

καταπόνηση (Komis και συν. 2001, 2002, 2006). Στην προηγούμενη περίπτωση, όπως και σε άλλες, οι παρακρύσταλλοι σωληνίνης συνυπάρχουν με μακροσωληνίσκους στα ίδια κύτταρα (Lazareva και συν. 2003). Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη. Οι δύο κατηγορίες άτυπων πολυμερών σωληνίνης, που οργανώνονται όταν μεταβάλλονται τα επίπεδα των ROS, δεν συνυπάρχουν στα ίδια κύτταρα ή υπό τις ίδιες συνθήκες. Τα επηρεασμένα με MEN κύτταρα διέθεταν αποκλειστικά παρακρυστάλλους σωληνίνης και λίγους ΜΣ, ενώ σε εκείνα που είχαν υποστεί επιδράσεις με DPI, NAC και H_2O_2 , ο κυτταροσκελετός της σωληνίνης αποτελούνταν από μακροσωληνίσκους και ΜΣ.

IV.2.2 Πρότυπα αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της σωληνίνης

Η άποψη ότι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης προκαλείται από μεταβολές των επιπέδων των ROS ενισχύεται και από πειράματα, στα οποία πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη επίδραση με MEN ή H_2O_2 και με μία εκ των ενώσεων DPI και NAC, που μειώνουν τα επίπεδα των ROS. Η χρώση με DCF έδειξε ότι οι συνδυασμοί αυτοί, στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, έχουν ως αποτέλεσμα τη διατήρηση των επιπέδων των ROS στα ακρόρριζα σε βαθμό συγκρίσιμο με εκείνο των φυσιολογικών ακρόρριζων. Η ανοσοσήμανση της σωληνίνης των κυττάρων, τα οποία επηρεάστηκαν με αυτό το συνδυασμό ουσιών, αποκάλυψε το σχηματισμό πολυμερών όμοιων με τους ΜΣ των φυσιολογικών κυττάρων. Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι οι μεταβολές των επιπέδων των ROS πυροδοτούν την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των ΜΣ, η οποία οδηγεί στην οργάνωση άτυπων πολυμερών σωληνίνης.

Το πρώτο στάδιο της αναδιοργάνωσης είναι η εξαφάνιση των ΜΣ, πιθανόν, λόγω της διατάραξης της ομοιόστασης των ιόντων ασβεστίου, καθώς αυτοί είναι ευαίσθητοι στις υψηλές συγκεντρώσεις αυτών των ιόντων (Hepler και Hush 1996). Συχνά, υποστηρίζεται ότι ο αποπολυμερισμός των ΜΣ αποτελεί την αιτία της αύξησης αυτής και όχι το αντίστροφο, όπως για παράδειγμα, συμβαίνει σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας, κατά τις οποίες επάγεται αρχικά αποπολυμερισμός ΜΣ και ακολουθεί αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου (Wang και συν. 2007, βλέπε επίσης White 2000). Είναι, όμως, γνωστό ότι τα αυξημένα επίπεδα ROS σχετίζονται με αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου του κυτοπλάσματος, τα οποία με τη σειρά τους, μπορούν να πυροδοτήσουν την παραγωγή ROS (Steinhorst και Kudla 2013). Για παράδειγμα, η επίδραση με H_2O_2 έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση καναλιών ιόντων ασβεστίου στο πλασμαλήμμα των καταφρακτικών κυττάρων του φυτού *A. thaliana* (Pei και συν. 2000). Στα τελευταία, η επίδραση με DPI είναι σε θέση να αναστρέψει την αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου του κυτοπλάσματος. Σε αναπτυσσόμενα ριζικά τριχίδια του φυτού *A. thaliana*, η παραγωγή ROS από την NADPH-οξειδάση AtRbohC επάγει την αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου. Στη

συνέχεια, αυτά προκαλούν αναδραστικά την παραγωγή επιπλέον ROS, μέσω της AtRbohC (Takeda και συν. 2008). Με βάση τα παραπάνω, μπορεί να υποτεθεί ότι η αύξηση των επιπέδων των ROS, μετά την επίδραση με MEN ή H₂O₂, ακολουθείται από αντίστοιχη αύξηση των ιόντων ασβεστίου του κυτοπλάσματος, γεγονός που επιφέρει την αποδιοργάνωση των ΜΣ.

Με το ίδιο σκεπτικό, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ότι η ομοιοστάση των ιόντων ασβεστίου διαταράσσεται και μετά από την επίδραση με DPI ή NAC, χωρίς ωστόσο να έχουν περιέλθει σε γνώση μας μελέτες, οι οποίες συνδέουν τη μείωση των επιπέδων των ROS με αυξημένα επίπεδα ασβεστίου. Εναλλακτικά, τα μειωμένα επίπεδα ROS θα μπορούσαν να επηρεάζουν τη δυναμική αστάθεια των ΜΣ. Σε ινοβλάστες ποντικού, το DPI αυξάνει τη δυναμική αστάθεια των ΜΣ, καθώς προκαλεί την αποδέσμευσή τους από το κεντροσωμάτιο. Τελικά, το γεγονός αυτό οδηγεί στην καταστροφή τους (Scaife 2006). Βέβαια, η αποδιοργάνωση των ΜΣ, μετά από τη διατάραξη της ομοιοστάσης των ROS, ενδεχομένως, σχετίζεται και με τροποποίηση της δραστηριότητας των MAPs, με αλλαγές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης της σωληνίνης ή με άλλες τροποποιήσεις αυτής (βλέπε παρακάτω).

Ένα από τα σημαντικά ευρήματα της διατριβής είναι ότι η διατάραξη της ομοιοστάσης των ROS προκαλεί μεταβολές στα επίπεδα της σωληνίνης. Η μελέτη των επιπέδων της α -σωληνίνης, με ανοσοαποτύπωση κατά Western, αποκάλυψε ότι αυτά μεταβάλλονται στα επηρεασμένα ακρόρριζα. Η επίδραση με DPI, NAC και H₂O₂ έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της α -σωληνίνης, ενώ το αντίθετο συμβαίνει όταν τα κύτταρα του ακρόρριζου υφίστανται επίδραση με MEN. Είναι πιθανό ότι η οξειδωτική καταπόνηση σχετίζεται με αλλαγές της έκφρασης των γονιδίων της σωληνίνης ή ότι οι μεταβολές των επιπέδων της σωληνίνης συνδέονται με τις επιπτώσεις που οι ROS προκαλούν στην ίδια τη σωληνίνη (Allani και συν. 2004). Έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα των mRNAs της σωληνίνης μειώνονται ως απόκριση σε ερεθίσματα ορμονών, όπως της ορμόνης ABA (Giani και συν. 2005), η οποία, μεταξύ άλλων, δρομολογεί την παραγωγή H₂O₂ μέσω NADPH-οξειδασών (Kwak και συν. 2006). Η παρατεταμένη επίδραση με *t*-BuOOH σε νευρώνες ανθρώπου οδηγεί στην εξαφάνιση των ΜΣ και στη μείωση των επιπέδων της α -σωληνίνης (Allani και συν. 2004). Ομοίως, η επίδραση κινονών σε νευρώνες εγκεφάλου ποντικού ή ανθρώπου μεταβάλλει τα επίπεδα της σωληνίνης (Santa Maria και συν. 2005). Πιο πρόσφατα, βρέθηκε ότι η επίδραση με σωματίδια TiO₂ σε αρτίβλαστα *A. thaliana* οδηγεί στη μείωση των επιπέδων της α - και β -σωληνίνης. Η μείωση σχετίζεται με την αποικοδόμηση της σωληνίνης, μέσω του πρωτεασώματος 26S. Σημειώνεται ότι, η επίδραση με σωματίδια TiO₂ επάγει την αύξηση των επιπέδων της σωληνίνης, παρουσία αναστολέα του πρωτεασώματος (Wang και συν. 2011γ).

Η τροποποίηση της έκφρασης των γονιδίων της σωληνίνης ή της σύνθεσής της πιθανόν αποσκοπεί στην προστασία της σε συνθήκες καταπόνησης. Ωστόσο, αυτό δεν μπορεί να εξηγήσει γιατί στην περίπτωση των επιδράσεων με DPI, NAC και H_2O_2 αυξάνονται τα επίπεδα της α -σωληνίνης. Μία εξήγηση θα ήταν ότι, στις συνθήκες αυτές, επάγεται η σύνθεση διαφορετικών ισοτύπων σωληνίνης (βλέπε Parker και συν. 2014). Η σύνθεση συγκεκριμένων ισοτύπων μπορεί να διευκολύνει τη δημιουργία ανθεκτικών πολυμερών σωληνίνης (Ludueña και Banerjee 2008). Η επαγωγή δημιουργίας ανθεκτικών πολυμερών, επειδή πραγματοποιείται συχνά σε περιπτώσεις καταπονήσεων, θεωρείται ως ένας πιθανός μηχανισμός προστασίας των κυττάρων ή/και της σωληνίνης, μέχρις ότου αυτά να επανέλθουν σε φυσιολογικές συνθήκες (Komis και συν. 2001, 2002).

Όταν διαταράσσεται η ομοιόσταση των ROS, η αποδιοργάνωση των τυπικών ΜΣ ακολουθείται από τη συγκρότηση άτυπων πολυμερών σωληνίνης, τα οποία στις περισσότερες περιπτώσεις είναι μακροσωληνίσκοι. Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της μεταβολής των επιπέδων των ROS στο μονοκοτυλήδο φυτό *T. turgidum* και στο δικοτυλήδο *A. thaliana*. Συγκρίνοντας, τα ποσοστά εμφάνισης των μακροσωληνίσκων στο σύνολο των πολυμερών της σωληνίνης, τα οποία καταμετρήθηκαν σε κύτταρα ακρόρριζων των παραπάνω φυτών, προκύπτει ότι η δημιουργία των μακροσωληνίσκων πιθανόν ευνοείται στο φυτό *T. turgidum* σε σύγκριση με το φυτό *A. thaliana* (Πίνακας 6). Εκτός από τα ποσοστά εμφάνισης των μακροσωληνίσκων στο σύνολο των πολυμερών σωληνίνης, οι μακροσωληνίσκοι στα δύο φυτά διαφέρουν και ως προς τη μέγιστη εξωτερική διάμετρο. Στην περίπτωση του φυτού *T. turgidum* η μέγιστη εξωτερική διάμετρος ήταν 43,89 nm και βρέθηκε στα επηρεασμένα με DPI κύτταρα, ενώ στο φυτό *A. thaliana*, τόσο στα φυτά *rhd2* όσο και στα επηρεασμένα αρτίβλαστα, οι μακροσωληνίσκοι έχουν μέγιστη διάμετρο 34,58 nm (Πίνακας 6).

Οι διαφορές στις διαστάσεις των μακροσωληνίσκων πιθανόν σχετίζονται με την ύπαρξη διαφορετικών ισοτύπων σωληνίνης, οι οποίοι είτε παράγονται φυσιολογικά στα κύτταρα των δύο φυτών ή στρατολογούνται όταν μεταβάλλονται τα επίπεδα των ROS (Ludueña και Banerjee 2008, Wade 2009). Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι, και στα δύο φυτά που μελετήθηκαν, οι καταμετρήσεις των διαστάσεων των μακροσωληνίσκων έδειξαν ότι η αύξηση της εξωτερικής διαμέτρου συνοδεύεται και από αντίστοιχη αύξηση της εσωτερικής διαμέτρου.

Η συγκρότηση σωληνοειδών πολυμερών σωληνίνης με μεγαλύτερη εξωτερική διάμετρο από εκείνη των ΜΣ οφείλεται στο ότι αυτά αποτελούνται από περισσότερα πρωτονημάτια ή στο ότι η απόσταση μεταξύ γειτονικών πρωτονηματίων είναι μεγαλύτερη (Unger και συν. 1990, Komis και συν. 2001, Kwiatkowska και συν. 2009). Στα επιδερμικά κύτταρα, που περιβάλλουν τους ανθικούς οφθαλμούς του φυτού *Ornithogalum umbellatum*, η

μέση τιμή της διαμέτρου των ΜΣ εξαρτάται από τον αριθμό των πρωτονηματίων. Ωστόσο, ΜΣ με τον ίδιο αριθμό πρωτονηματίων, παρουσίαζαν μεγάλες διαφορές στην εξωτερική διάμετρο. Η πραγματοποίηση μετρήσεων έδειξε ότι, στα πολυμερή μεγαλύτερης διαμέτρου, τόσο οι διαστάσεις των μονομερών της σωληνίνης, όσο και οι αποστάσεις μεταξύ γειτονικών πρωτονηματίων ήταν μεγαλύτερες (Kwiatkowska και συν. 2009). Η παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση ότι η ικανότητα των μονομερών να «συρρικνώνονται» και να «εκτείνονται» σχετίζεται με την πλαστικότητα των δεσμών μεταξύ γειτονικών πρωτονηματίων (Kwiatkowska και συν. 2009).

Οι νευρώνες του νηματώδη σκώληκα *C. elegans* διαθέτουν ΜΣ με διάμετρο 24 nm που αποτελούνται από 11-12 πρωτονημάτια. Σε ορισμένους νευρώνες, όμως, εντοπίζονται ΜΣ διαμέτρου 30 nm, οι οποίοι συγκροτούνται από 15 πρωτονημάτια (Chalfie και Thomson 1982). Στο έντομο *Blattella germanica*, υπάρχει ένας πληθυσμός ΜΣ με 15 πρωτονημάτια και διάμετρο 40 nm. Η ύπαρξη σωληνοειδών πολυμερών σωληνίνης με αριθμό πρωτονηματίων μεγαλύτερο ή μικρότερο από 13 έχει συσχετιστεί με την παρουσία διαφορετικών ισοτύπων και ισομορφών της σωληνίνης (Savage και συν. 1989, Fukushige και συν. 1999, Cueva και συν. 2012). Επιπλέον, σε κύτταρα της *Drosophila*, η έκφραση γονιδίου β-σωληνίνης από άλλο είδος εντόμου, μετά από μετασχηματισμό, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ΜΣ με διαφορετικό αριθμό πρωτονηματίων.

Ένα άλλο εύρημα που παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι η διαφορετική συμπεριφορά του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, όταν πραγματοποιείται επίδραση με MEN ή H₂O₂. Στην πρώτη περίπτωση, σχηματίζονται παρακρύσταλλοι σωληνίνης στα κύτταρα του ακρόρριζου, ενώ στη δεύτερη μακροσωληνίσκοι. Τα επίπεδα των ROS, μετά από χρώση με DCF, παρουσιάζονται αυξημένα και στις δύο περιπτώσεις, ενώ και οι δύο είναι ενώσεις που προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση. Η διαφορετική συμπεριφορά του κυτταροσκελετού στις δύο αυτές ενώσεις πιθανόν σχετίζεται με τον τρόπο με τον οποίο δρουν. Το H₂O₂ θεωρείται πιο ήπιο οξειδωτικό μέσο, το οποίο διαχέεται εύκολα μέσω του πλασμαλήμματος, ενώ κατά την παρουσία του στον αποπλάστη μπορεί να δρα ως μήνυμα (Shapiguzov και συν. 2012). Αντίθετα, η MEN εκδηλώνει τη δράση της μετά την είσοδό της στα κύτταρα και έχει ως συνέπεια την αύξηση των επιπέδων των ROS (Halliwell και Gutteridge 2006, Kawamura και συν. 2006β).

Επομένως, φαίνεται ότι η MEN επάγει αλλαγές στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης στα κύτταρα του ακρόρριζου, οι οποίες σχετίζονται με τις μεταβολές των επιπέδων των ROS ή ακόμη και με την ίδια την παρουσία της MEN ως χημικής ένωσης. Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι η MEN δεσμεύεται στη σωληνίνη και επηρεάζει την οργάνωση του κυτταροσκελετού. Συγκεκριμένα, σε κύτταρα HeLa, τα οποία είχαν υποστεί επίδραση με 25 μM MEN, μειώθηκε ο αριθμός των ΜΣ στην περιφέρεια του κυττάρου και το ενδόπλασμα

(Acharya και συν. 2009). Η χρήση διπλάσιας συγκέντρωσης MEN προκάλεσε ταχύτατο αποπολυμερισμό των ΜΣ, ενώ μετά την αφαίρεσή της από το θρεπτικό μέσο διαπιστώθηκε ότι η δράση της ήταν μη αντιστρεπτή, καθώς τα κύτταρα δεν ήταν σε θέση να επιτύχουν τον επαναπολυμερισμό της σωληνίνης (Acharya και συν. 2009). Ωστόσο, στην περίπτωση μας, η ανάκαμψη των συστημάτων των ΜΣ προχωρεί κανονικά, όταν τα επηρεασμένα με MEN αρτίβλαστα μεταφέρονται σε φυσιολογικές συνθήκες. Σε *in vitro* πειράματα πολυμερισμού της σωληνίνης, η MEN αναστέλλει τον πολυμερισμό της. Στο σύστημα αυτό, με τη βοήθεια μεθόδων φασματοσκοπίας, βρέθηκε ότι η MEN δεσμεύεται σε συγκεκριμένη θέση μεταξύ των ετεροδιμερών της σωληνίνης και αποτρέπει τη δημιουργία ΜΣ. Είναι ενδιαφέρον ότι ακριβώς στην ίδια θέση δεσμεύεται και η κολχικίνη (Acharya και συν. 2009). Στη σωληνίνη δεσμεύεται και μία άλλη κινόνη, η thymoquinone, χωρίς ωστόσο να έχει προσδιοριστεί με βεβαιότητα εάν η θέση πρόσδεσής της είναι η ίδια με εκείνη της MEN ή είναι κάποια άλλη γειτονική (Acharya και συν. 2014).

Η επίδραση κολχικίνης στα φυτικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση των τυπικών ΜΣ και την οργάνωση παρακρυστάλλων σωληνίνης (Apostolakis και συν. 1990, Karagiannidou και συν. 1995, Panteris και συν. 2010). Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι εύλογο να υποθέσουμε ότι, στα επηρεασμένα με MEN κύτταρα του ακρόρριζου δεν δημιουργούνται μακροσωληνίσκοι, αλλά παρακρύσταλλοι σωληνίνης, διότι η MEN δεσμεύεται στη θέση που δεσμεύεται και η κολχικίνη. Με τον τρόπο αυτό συγκροτούνται παρακρύσταλλοι σωληνίνης/MEN, κατ' αντιστοιχία με τους παρακρυστάλλους κολχικίνης/σωληνίνης, χωρίς να αποκλείεται και το ενδεχόμενο οι παρακρύσταλλοι να αποτελούνται μόνο από σωληνίνη (Apostolakis και συν. 1990). Τέλος, παρά τα όσα αναφέρθηκαν, η MEN, ως δραστική κινόνη, επάγει και οξειδωτικές τροποποιήσεις στη σωληνίνη (Bellomo και συν. 1990), οι οποίες ευνοούν πιθανόν τη δημιουργία παρακρυστάλλων (βλέπε παρακάτω).

Η δημιουργία των παρακρυστάλλων σωληνίνης, όπως και εκείνη των μακροσωληνίσκων, ίσως αποτελεί μηχανισμό προστασίας της σωληνίνης, η οποία αποθηκεύεται σε σταθερές δομές. Έχει υποστηριχθεί ότι η σωληνίνη αποθηκεύεται σε αυτές τις δομές ακόμα και σε φυσιολογικά κύτταρα, όταν οι συνθήκες ευνοούν τον αποπολυμερισμό των ΜΣ (Unger και συν. 1990) ή σε κύτταρα που υφίστανται κάποιας μορφής καταπόνηση (Komis και συν. 2001, 2002). Η δημιουργία παρακρυστάλλων σωληνίνης επάγεται και από την επίδραση με τα αλκαλοειδή βινβλαστίνη και βινκριστίνη που παράγονται από το φυτό *Vinca rosea* (Bensch και Malewista 1968). Τα αλκαλοειδή αυτά δεσμεύονται στη σωληνίνη σε διαφορετικές θέσεις από εκείνη της κολχικίνης (Dorléans και συν. 2009).

Οι παρακρύσταλλοι σωληνίνης σε εγκάρσια τομή έχουν οργάνωση που μοιάζει με κυψέλη. Οι αποστάσεις μεταξύ γειτονικών κυψελίδων κυμαίνονται μεταξύ 24 nm και 38 nm (Unger και συν. 1990). Πειραματικά δεδομένα, τα οποία αφορούν στους παρακρυστάλλους που επάγονται από τα αλκαλοειδή, υποστηρίζουν ότι αυτοί αποτελούνται από σωληνίσκους διευθετημένους σε εξάγωνο. Κάθε σωληνίσκος αποτελείται από ένα ή δύο συνεχόμενα ελικοειδή πρωτονημάτια, και σε κάθε στροφή υπολογίζεται ότι υπάρχουν 24-30 μονομερή σωληνίνης. Πρέπει να σημειωθεί ότι, όπως συμβαίνει με τους μακροσωληνίσκους, τα πρωτονημάτια που συγκροτούν ένα παρακρυσταλλικό «σωληνίσκο» δεν έχουν πλευρικές επαφές μεταξύ τους (Unger και συν. 1990).

Τα δεδομένα της παρούσας διατριβής υποστηρίζουν την άποψη ότι, η δημιουργία των παρακρυστάλλων σωληνίνης στα επηρεασμένα με MEN κύτταρα πραγματοποιείται σε δύο φάσεις. Πριν από την εμφάνιση των παρακρυστάλλων στα κύτταρα εμφανίζονται άμορφοι ηλεκτρονιόπυκνοι σχηματισμοί. Όπως διαπιστώθηκε, μετά από ανοσοεντόπιση της σωληνίνης με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού, οι σχηματισμοί αυτοί περιέχουν ή αποτελούνται από σωληνίνη. Επομένως, είναι πιθανό το υλικό αυτό να αποτελεί πρώιμο στάδιο της διαδικασίας συγκρότησης των παρακρυστάλλων σωληνίνης, όπως συμβαίνει και στα επηρεασμένα με κολχικίνη κύτταρα (Apostolakos και συν. 1990, Karagiannidou και συν. 1995, Lazareva και συν. 2003).

IV.2.3 Οξειδωτικές τροποποιήσεις της σωληνίνης

Επειδή οι πειραματικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία μεταβάλλουν τα επίπεδα των ROS στα ακρόρριζα, μπορεί να υποτεθεί ότι οι αλλαγές της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της σωληνίνης οφείλονται σε οξειδωτικές τροποποιήσεις της σωληνίνης ή στην μεταβολή της οξειδοαναγωγικής κατάστασής της. Η ευαισθησία του κυτταροσκελετού πιθανόν συνδέεται με το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που τον απαρτίζουν βρίσκονται στα κύτταρα σε πολύ μεγάλες ποσότητες, και για το λόγο αυτό είναι διαρκώς εκτεθειμένες σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης (Dalle-Donne και συν. 2006).

Η σωληνίνη περιέχει αρκετά κατάλοιπα κυστεΐνης, τα οποία μπορούν να οξειδωθούν μετά από έκθεση ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις ROS (Ludueña 2013). Σε καλλιέργειες διαφόρων κυτταρικών σειρών θηλαστικών διαπιστώθηκε ότι η MEN επάγει τον αποπολυμερισμό των ΜΣ, ενώ εμποδίζει *in vitro* τον πολυμερισμό της σωληνίνης που έχει απομονωθεί από τα επηρεασμένα κύτταρα, λόγω της οξείδωσης των θειολικών ομάδων της σωληνίνης (Bellomo και συν. 1990). Προς επιβεβαίωση των παραπάνω, η χρήση ενός παράγοντα, ο οποίος ανάγει τις θειολικές ομάδες, επέτρεψε τον *in vitro* πολυμερισμό της σωληνίνης, παρότι αυτή είχε απομονωθεί από κύτταρα που είχαν υποστεί την επίδραση MEN (Bellomo και συν. 1990).

Η πρωτεομική ανάλυση κυττάρων καλλιέργειας του φυτού *A. thaliana*, στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με H_2O_2 , αποκάλυψε ότι κάποιοι ισότυποι της α - και β -σωληνίνης παρουσιάζουν ευαισθησία στην έκθεση σε ROS. Διαπιστώθηκε ότι 10 min επίδρασης με 5 mM H_2O_2 αρκούν για την οξειδωση θειολικών ομάδων της σωληνίνης TUA6 και της TUB2 (Wang και συν. 2012). Η οξειδωση θειολικών ομάδων της κυστεΐνης ευνοεί τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ γειτονικών μορίων κυστεΐνης. Έχειδειχθεί ότι, μετά από επίδραση με peroxynitrite, το οποίο ανήκει στις δραστικές μορφές αζώτου, η οξειδωση ορισμένων καταλοίπων κυστεΐνης ευνοεί τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ αμινοξέων της α - και της β -σωληνίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανασχεση του πολυμερισμού της σωληνίνης *in vitro* (Landino και συν. 2002).

Μία άλλη τροποποίηση που υφίστανται τα κατάλοιπα κυστεΐνης, σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης, είναι η γλουταθειονυλίωση. Η προσθήκη γλουταθειόνης στην πλευρική ομάδα της κυστεΐνης ανήκει στις αντιστρεπτές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Επειδή συμβαίνει συχνά σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης θεωρείται ότι δρα προστατεύοντας τα κατάλοιπα κυστεΐνης από τις μη αντιστρεπτές οξειδωτικές τροποποιήσεις. Παράλληλα, η προσθήκη αυτή μπορεί να μεταβάλλει, θετικά ή αρνητικά, τη λειτουργία μίας πρωτεΐνης (Rouchier και συν. 2008). Σε κύτταρα του φυτού *A. thaliana*, η προσθήκη του οξειδωτικού μέσου *t*-BuOOH έδειξε ότι η οξειδωτική καταπόνηση προκαλεί γλουταθειονυλίωση σε τρεις ισότυπους α -σωληνίνης και σε έναν της β -σωληνίνης (Dixon και συν. 2005). Έχει διαπιστωθεί ότι η χρήση του συστήματος γλουταθειόνης/αναγωγής της γλουταρεδοξίνης μπορεί να αποκαταστήσει τις οξειδωτικές βλάβες της σωληνίνης που δημιουργούνται από την επίδραση με peroxynitrite, επιτρέποντας τον πολυμερισμό της σωληνίνης *in vitro* (Landino και συν. 2004α).

Βασίζόμενοι στα παραπάνω, οι Landino και συν. (2004α) υποστήριξαν ότι ο πολυμερισμός της σωληνίνης ρυθμίζεται από μηχανισμούς που εξαρτώνται από την οξειδοαναγωγική κατάστασή της. Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώθηκε από τους Landino και συν. (2006), με πειράματα τα οποία έδειξαν ότι το ασκορβικό οξύ, το οποίο είναι αντιοξειδωτική ένωση, έχει την ικανότητα να ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που δημιουργούνται από το peroxynitrite και να αποκαθιστά τις οξειδωτικές βλάβες της σωληνίνης, ευνοώντας τον πολυμερισμό της. Πρέπει να σημειωθεί ότι η σημασία των θειολικών ομάδων για τον πολυμερισμό της σωληνίνης έχει υποστηριχθεί πολλά χρόνια νωρίτερα (Kuriyama και Shakai 1974).

Τα όσα αναφέρθηκαν μέχρι τώρα, πιθανόν μπορούν να ερμηνεύσουν τη συμπεριφορά του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, μετά από επίδραση με MEN και H_2O_2 . Οι επιδράσεις αυτές στο σύστημά μας ενδεχομένως μεταβάλλουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση της σωληνίνης. Κάτι τέτοιο θα είχε αντίκτυπο, τόσο στην αποδιοργάνωση των ΜΣ και τον

πολυμερισμό της σωληνίνης προς άτυπα πολυμερή όσο και στη φύση των τελευταίων. Επομένως, ταυτόχρονα με τους μηχανισμούς που ελέγχουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων, θα πρέπει να λειτουργούν και μηχανισμοί που ανιχνεύουν, αντίστοιχα, την οξειδοαναγωγική κατάσταση της σωληνίνης. Προς αυτή την κατεύθυνση, έχει υποστηριχθεί ότι η ομοιότητα της γλουταθειόνης εμπλέκεται στην ικανότητα πολυμερισμού της σωληνίνης στα πολυμορφοπύρρηνα λευκά αιμοσφαίρια (Oliver και συν. 1976). Συγκεκριμένα, η μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης στα κύτταρα αυτά ευθύνεται για την αδυναμία πολυμερισμού της σωληνίνης και διατήρησης των ΜΣ (Oliver και συν. 1976).

Επιπλέον, δεν αποκλείεται η συγκρότηση άτυπων πολυμερών σωληνίνης να στοχεύει στην προστασία αυτής από περαιτέρω οξειδωτική βλάβη. Φυσικά, όπως θα αναφερθεί παρακάτω, σε συνθήκες κατά τις οποίες τα επίπεδα των ROS είναι υψηλά, η δημιουργία άτυπων πολυμερών μπορεί να οφείλεται και στη στρατολόγηση διαφορετικών ισοτύπων σωληνίνης, εξαιτίας της αδυναμίας πολυμερισμού των ισοτύπων που απαντούν φυσιολογικά (Ludueña και Banerjee 2008).

Επισημαίνεται ότι, εκτός της κυστεΐνης, και άλλα αμινοξέα είναι ευαίσθητα στην οξείδωση. Η παρουσία οξειδωτικών ενώσεων προκαλεί οξείδωση και της μεθειονίνης. Για παράδειγμα, όταν το αμινοξύ αυτό εκτίθεται σε ROS οξειδώνεται πολύ εύκολα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό σουλφοξειδίου της μεθειονίνης. Στην περισσότερο κοινή ισομορφή τους, στη σωληνίνη των θηλαστικών, τα ετεροδιμερή της σωληνίνης έχουν συνολικά 26 μεθειονίνες και 20 κυστεΐνες (Landino και συν. 2011). Η επίδραση με HOCl, το οποίο προκαλεί οξειδωτική τροποποίηση τόσο στην κυστεΐνη όσο και τη μεθειονίνη, αναστέλλει τον *in vitro* πολυμερισμό της σωληνίνης. Η ανάσχεση αυτή οφείλεται, όμως, κυρίως στην οξείδωση της κυστεΐνης (Landino και συν. 2011).

Οι τροποποιήσεις που προκαλούνται από τις ROS αφορούν και σε άλλα αμινοξέα που δεν φέρουν άτομα θείου στις πλευρικές τους ομάδες. Η καρβονυλίωση, η οποία είναι μία μη ενζυμική προσθήκη αλδεϋδών ή κετονών στις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων λυσίνη, ιστιδίνη και κυστεΐνη, θεωρείται ως μη αντιστρεπτή και μπορεί να προκληθεί από ισχυρή οξειδωτική καταπόνηση (Dalle-Donne και συν. 2003). Η δημιουργία συνθηκών που επάγουν την καρβονυλίωση των πρωτεϊνών σε κύτταρα νωτιαίου μυελού ποντικών, έδειξε ότι τα επίπεδα της β -σωληνίνης μειώνονται σημαντικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι η σωληνίνη οδηγείται σε πρωτεολυτική αποικοδόμηση (Smerjak και Bizzozero 2008). Με δεδομένο ότι τόσο το H_2O_2 όσο και η MEN είναι δυνατόν να επάγουν καρβονυλίωση (McDonagh και Sheehan 2006), μπορεί να υποθεθεί ότι στο σύστημά μας, τουλάχιστον για την περίπτωση της MEN όπου τα επίπεδα της α -σωληνίνης εμφανίζονται σημαντικά μειωμένα, η οξειδωτική καταπόνηση των κυττάρων του ακρόρριζου οδηγεί σε αποικοδόμηση της σωληνίνης.

Βέβαια, τα παραπάνω δεν μπορούν να ερμηνεύσουν τη συμπεριφορά του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, όταν τα αρτίβλαστα υφίστανται επίδραση με DPI ή NAC. Λαμβάνοντας υπόψη όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως, είναι λογικό να υποτεθεί ότι η χρήση αντιοξειδωτικών ενώσεων μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική κατάσταση της σωληνίνης. Στην περίπτωση αυτή, είναι πιθανόν ότι σε κύτταρα, στα οποία τα επίπεδα των ROS είναι χαμηλά, προκαλείται «αναγωγική» καταπόνηση (Lushchak 2011). Ήταν ήδη γνωστό αρκετά χρόνια πριν, ότι η χρήση αντιοξειδωτικών ενώσεων επηρεάζει τον πολυμερισμό της σωληνίνης και την οξειδοαναγωγική της κατάσταση (Boxer και συν. 1979). Η παρουσία ασκορβικού οξέος οδήγησε στον πολυμερισμό περισσότερων ΜΣ, συγκριτικά με τον αριθμό των ΜΣ που καταμετρήθηκε σε φυσιολογικά πολυμορφοπύρηνια λευκά αιμοσφαίρια ανθρώπου, και αύξησε την ικανότητα πολυμερισμού της σωληνίνης *in vitro* (Boxer και συν. 1979). Πιθανόν, η χρήση αντιοξειδωτικών ενώσεων ευνοεί τη δημιουργία ΜΣ. Αυτό όμως δεν είναι απαραίτητα ο κανόνας. Η επαγωγή γλουταθειονυλίωσης της α - και β -σωληνίνης στην καρκινική σειρά UACC-62 ανθρώπινων κυττάρων, προκάλεσε τη διατάραξη της οργάνωσης των ΜΣ και τη μείωση του αριθμού τους. Με βάση τα δεδομένα αυτά, προτάθηκε ότι η γλουταθειονυλίωση προκαλεί αποπολυμερισμό των ΜΣ (Chen και συν. 2012). Επίσης, η επίδραση με ανηγμένη γλουταθειόνη σε κάλλους και κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *Picea abies*, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση βραχύτερων και κυματοειδών ΜΣ, όπως επίσης και συσσωματωμάτων σωληνίνης στο περιφερειακό κυτόπλασμα (Urbanek και συν. 2003).

Επομένως, είναι εύλογο να υποθέσουμε ότι, όπως η οξειδωτική καταπόνηση, παρόμοια και η «αναγωγική» καταπόνηση επηρεάζει τη σωληνίνη. Τα αποτελέσματα από την επίδραση με NAC, στα κύτταρα του ακρόρριζου, δείχνουν ότι αυτή προκαλεί αποδιοργάνωση των ΜΣ και πολυμερισμό της σωληνίνης σε άτυπα πολυμερή. Παράλληλα, η επίδραση με DPI έχει ακριβώς τις ίδιες επιπτώσεις στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης. Γνωρίζοντας ότι το DPI δεν είναι αντιοξειδωτική ένωση, αλλά προκαλεί μείωση των επιπέδων των ROS επειδή αναστέλλει τη δραστηριότητα της NADPH-οξειδάσης, φαίνεται λογικό να υποστηριχθεί ότι η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου αυτού είναι απαραίτητη για τον πολυμερισμό της σωληνίνης στα φυτικά κύτταρα.

Η σημασία της οξειδοαναγωγικής κατάστασης της σωληνίνης για τα φυτικά κύτταρα ενισχύεται ακόμα περισσότερο από το γεγονός ότι η επίδραση με ενώσεις που αυξάνουν τα επίπεδα των ROS ταυτόχρονα με άλλες που προκαλούν τη μείωση τους, έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση των ΜΣ στα κύτταρα του ακρόρριζου.

IV.2.4 ROS και ισότυποι σωληνίνης

Δεδομένης της σημασίας της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυτταροσκελετού και της παρουσίας μεγάλου αριθμού καταλοίπων κυστεΐνης στη σωληνίνη, ορισμένα από αυτά τα

κατάλοιπα, λόγω της θέσης τους, είναι περισσότερο σημαντικά για τη διαμόρφωση της τρισδιάστατης δομής της σωληνίνης ή τη σωστή αναδίπλωσή της ή το σχηματισμό των ετεροδιμερών (βλέπε επίσης Chaudhuri και συν. 2001). Με αυτό το σκεπτικό, θεωρείται πιθανό ότι ισότυποι σωληνίνης, οι οποίοι διαφέρουν ως προς τα κατάλοιπα κυστεΐνης σε συγκεκριμένες κρίσιμες θέσεις, έχουν διαφορετική ευαισθησία στην οξειδωτική καταπόνηση.

Η περίπτωση του ισότυπου βIII της σωληνίνης των χορδωτών παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον (Ludueña και Banerjee 2008). Πρόκειται για ένα πολύ συντηρημένο ισότυπο με ελάχιστες διαφορές μεταξύ των οργανισμών. Η κατανομή των κυστεϊνών στον ισότυπο αυτό παρουσιάζει ιδιαιτερότητες, σε σχέση με τους υπόλοιπους ισότυπους της β-σωληνίνης. Η πιο χαρακτηριστική διαφορά αφορά στην κυστεΐνη που βρίσκεται στη θέση 239. Αυτή είναι παρούσα στους ισότυπους της β-σωληνίνης που εκφράζονται συνήθως, δηλαδή, τις βI, βII, βIV, ενώ απουσιάζει από τον ισότυπο βIII. Αντίθετα, η βIII σωληνίνη διαθέτει κυστεΐνη στη θέση 124, ενώ οι τρεις άλλοι ισότυποι έχουν σερίνη στη θέση αυτή (Ludueña και Banerjee 2008).

Η κυστεΐνη στη θέση 239 βρίσκεται μεταξύ α- και β-υπομονάδων της σωληνίνης και είναι πολύ εύκολο να οξειδωθεί. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια την αδυναμία πολυμερισμού της σωληνίνης. Επομένως, έχει ιδιαίτερη σημασία ότι η κυστεΐνη 239 απουσιάζει από τον ισότυπο βIII της σωληνίνης, γεγονός που δικαιολογεί την αυξημένη ανθεκτικότητα του συγκεκριμένου ισότυπου στις ROS σε σύγκριση με άλλους ισότυπους. Η παραγωγή της βIII σωληνίνης εννοείται σε κύτταρα, τα οποία διαθέτουν υψηλά επίπεδα ROS, όπως είναι τα νευρικά, τα κύτταρα Sertoli, τα κύτταρα του αιθουσαίου νεύρου, αλλά και τα καρκινικά κύτταρα (Ludueña 2013). Μάλιστα, έχειδειχθεί ότι στα κύτταρα, τα οποία υφίστανται οξειδωτική καταπόνηση, επάγεται η σύνθεση του ισότυπου βIII της σωληνίνης (Raspaglio και συν. 2008, Ludueña 2013). Τέλος, υποστηρίζεται ότι οι ΜΣ που αποτελούνται από ετεροδιμερή αβIII είναι πιο δυναμικοί *in vitro*, σε σύγκριση με αυτούς που απαρτίζονται από αβII ή αβIV (Panda και συν. 1994).

Το γεγονός ότι ορισμένα πολυμερή σωληνίνης, που παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες, αποτελούνται από συγκεκριμένους ισότυπους πιθανόν υποδηλώνει ότι η διατάραξη της ομοιοστάσης των ROS στα φυτικά κύτταρα συνοδεύεται από μεταβολή του προτύπου έκφρασης των ισότυπων της σωληνίνης. Μέχρι σήμερα, δεν έχουν δημοσιευτεί δεδομένα που να υποστηρίζουν άμεσα την άποψη αυτή, η οποία ωστόσο έχει ενδιαφέρον να διερευνηθεί. Όμως, υπάρχουν ενδείξεις ότι η παρουσία διαφορετικών ισότυπων σωληνίνης στα φυτικά κύτταρα, σχετίζεται με την ανταπόκριση και την προσαρμογή των κυττάρων σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Ludueña και Banerjee 2008). Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι σε φύλλα του φυτού *A. thaliana*, τα οποία υφίστανται επίδραση ψύχους, τα επίπεδα μεταγραφής κάποιων ισότυπων β-σωληνίνης μειώνονται, ενώ επάγεται η σύνθεση της

σωληνίνης TUB9 (Chu και συν. 1993). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι κατά τη διαδικασία προσαρμογής των κυττάρων της ρίζας του φυτού *Triticum aestivum* στο ψύχος μεταβάλλεται το πρότυπο έκφρασης των ισοτύπων της α -σωληνίνης. Είναι ενδιαφέρον ότι στην τελευταία περίπτωση, η ανθεκτικότητα των ΜΣ στο ψύχος, η οποία διαπιστώθηκε σε συγκεκριμένες καλλιεργητικές ποικιλίες, συνδέεται με το πρότυπο εμφάνισης των ισοτύπων της σωληνίνης (Abdrakhmanova και συν. 2003). Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η παρουσία πολυμερών σωληνίνης με διαφορετικά χαρακτηριστικά δεν οφείλεται μόνο στην ύπαρξη διαφορετικών ισοτύπων της σωληνίνης, αλλά και σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αυτής της πρωτεΐνης, επιπλέον της οξειδωτικής που συζητήθηκε νωρίτερα.

IV.2.5 ROS και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της σωληνίνης

Στην παρούσα διατριβή, διαπιστώθηκε ότι η οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από τις ενώσεις MEN και H_2O_2 , η δέσμευση των ROS από τη NAC και η ανασχέση της δραστηριότητας της NADPH-οξειδάσης από το DPI, προκαλούν μικρή μείωση στα επίπεδα της τυροσινωμένης α -σωληνίνης. Αυτό διαπιστώθηκε έπειτα από μελέτη των επιπέδων της τυροσινωμένης σωληνίνης με ανοσοαποτύπωση κατά Western, αλλά και ανοσοοήμανση με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Επομένως, επειδή τα μόρια της σωληνίνης που συντίθενται φυσιολογικά στο κύτταρο έχουν συνήθως τυροσίνη στο καρβοξυτελικό άκρο (Parrotta και συν. 2014), μπορούμε να υποθέσουμε ότι στις παραπάνω συνθήκες ευνοείται η αποτυροσινίωση της σωληνίνης. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται και από άλλα πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι η χρήση ενώσεων, οι οποίες μεταβάλλουν τα επίπεδα των ROS, επάγει αποτυροσινίωση της σωληνίνης.

Σε ινοβλάστες ποντικού, η επίδραση με DPI αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της αποτυροσινωμένης σωληνίνης και ταυτόχρονα επιφέρει μικρή μείωση στα επίπεδα της τυροσινωμένης σωληνίνης (Scaife 2006). Παράλληλα, η χρήση δισουλφιδίου της γλουταθειόνης που δημιουργεί συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης, εξαιτίας της μείωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης, επέφερε μείωση της τυροσινωμένης σωληνίνης σε καλλιέργεια κυττάρων γλοιοβλαστώματος NSC34 (Carletti και συν. 2011). Στα κύτταρα Neuro2A, η επίδραση με ένα οξυγονωμένο παράγωγο της πυριμιδίνης (alloxan), το οποίο επάγει την παραγωγή ROS, οδήγησε σε αποτυροσινίωση της σωληνίνης (Yoshiike και συν. 2012). Τα παραπάνω ενισχύουν την άποψη, ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επάγει στα φυτικά κύτταρα, όπως και στα ζωικά, αποτυροσινίωση της α -σωληνίνης, η οποία με τη σειρά της πιθανόν ευνοεί τη δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης. Έχει υποστηριχθεί ότι η μείωση της τυροσινωμένης σωληνίνης σχετίζεται πιθανόν με οξειδωτικές τροποποιήσεις ενζύμων που εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, των οποίων η δραστηριότητα εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση (Carletti και συν. 2011).

Η τυροσινιωμένη σωληνίνη συνδέεται τόσο στα ζωικά, όσο και τα φυτικά κύτταρα, με τη δημιουργία δυναμικών ΜΣ. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η παραπάνω σχέση συχνά αμφισβητείται (Parker και συν. 2014, Parrotta και συν. 2014). Υποστηρίζεται, τουλάχιστον για τα ζωικά κύτταρα, ότι αυτή η τροποποίηση στο καρβοξυτελικό άκρο της σωληνίνης επηρεάζει την αλληλεπίδραση των ΜΣ με MAPs, π.χ. κινητήριες πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό καθιστά τους ΜΣ που περιέχουν τυροσινιωμένη σωληνίνη πιο ευαίσθητους, ενώ όσους δεν περιέχουν πιο σταθερούς (Peris και συν. 2009).

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες ενότητες, η δημιουργία των άτυπων πολυμερών σωληνίνης που προκαλείται από τη διατάραξη των επιπέδων των ROS, έχει ως στόχο την προστασία της σωληνίνης. Με αυτό ως δεδομένο, είναι πιθανόν ότι η μείωση της τυροσινιωμένης σωληνίνης στο σύστημά μας ευνοεί τη συγκρότηση λιγότερο δυναμικών, αλλά περισσότερο ανθεκτικών πολυμερών σωληνίνης. Η ανθεκτικότητα των πολυμερών μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι αυτά φέρουν αποτυροσινιωμένη σωληνίνη, ανεξάρτητα αν αυτό επηρεάζει τις ιδιότητές τους, όπως π.χ. τις αλληλεπιδράσεις τους με MAPs (βλέπε παρακάτω). Φυσικά, δεν μπορεί να υποστηριχθεί ότι τα άτυπα πολυμερή σωληνίνης περιέχουν αποκλειστικά και μόνο αποτυροσινιωμένη σωληνίνη. Για παράδειγμα, η Εικ. 36Δ δείχνει ότι πιθανόν υπάρχουν και άτυπα πολυμερή που περιέχουν και α -σωληνίνη, της οποίας το τελευταίο αμινοξύ είναι η τυροσίνη.

Η ακετυλίωση της α -σωληνίνης στη λυσίνη 40 θεωρείται ότι συμβάλλει στη δημιουργία σταθερών πολυμερών σωληνίνης. Πολύ συχνά, πληθυσμοί σταθερών ΜΣ, όπως εκείνοι που εντοπίζονται στα αζονημάτια, τα κεντροσωμάτια ή τα βασικά σωμάτια, περιέχουν ακετυλιωμένη σωληνίνη (Ludueña 2013). Αυτή συνήθως απουσιάζει από τα κύτταρα της ρίζας των αγγειοσπέρμων, ενώ βρίσκεται σε άλλα φυτικά όργανα, όπως για παράδειγμα στα φύλλα (Wang και συν. 2004, Giannoutsou και συν. 2012). Ανιχνεύεται, ωστόσο, και σε φυσιολογικά κύτταρα του ακρόρριζου του αγγειοσπέρμου *Lens culinaris* (Eleftheriou και συν. 2013), καθώς και σε ακρόρριζα γυμνοσπέρμων (Zachariadis και συν. 2001, 2003). Στα κύτταρα του ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum* που υφίστανται επιδράσεις με DPI, NAC, MEN και H_2O_2 , επάγεται ακετυλίωση της α -σωληνίνης. Δεδομένης της απουσίας ακετυλιωμένης σωληνίνης από τα φυσιολογικά ακρόρριζα, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι τα άτυπα πολυμερή (μακροσωληνίσκοι και παρακρύσταλλοι σωληνίνης) που δημιουργούνται όταν διαταράσσεται η ομοιόσταση των ROS, περιέχουν α -σωληνίνη, της οποίας η λυσίνη στη θέση 40 έχει υποστεί ακετυλίωση.

Τα κύτταρα της ρίζας του φυτού *Triticum aestivum*, φυσιολογικά, στερούνται ακετυλιωμένης σωληνίνης. Η ανοσοσήμανση της ακετυλιωμένης σωληνίνης, μετά από επίδραση με κολχικίνη, αποκάλυψε ότι τα άτυπα πολυμερή σωληνίνης που δημιουργούνται στα κύτταρα αυτά περιέχουν ακετυλιωμένη σωληνίνη (Lazareva και συν. 2003).

Επομένως, φαίνεται ότι η τροποποίηση αυτή συχνά σχετίζεται με τη δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης στα φυτικά κύτταρα. Μπορούμε να υποθέσουμε, ότι για τη συγκρότηση αυτών των σταθερών πολυμερών σωληνίνης, ευθύνεται η ακετυλίωση. Το γεγονός αυτό ενισχύεται από πρόσφατα δεδομένα, που έδειξαν ότι επίδραση εξασθενούς χρωμίου στα κύτταρα του ακρόρριζου του φυτού *Lens culinaris*, η οποία οδηγεί στη δημιουργία ανθεκτικών πολυμερών σωληνίνης, συνοδεύεται συγχρόνως και από την αύξηση των επιπέδων της ακετυλιωμένης α -σωληνίνης (Eleftheriou και συν. 2013). Επίσης, η ακετυλίωση καθιστά τα πολυμερή ανθεκτικά στις ουσίες που επάγουν τον αποπολυμερισμό της σωληνίνης (LeDizet και Piperno 1986, Piperno και συν. 1987).

Έχει αναφερθεί ότι, σε ορισμένους νευρώνες του νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans*, η ακετυλίωση της σωληνίνης σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των πρωτονηματίων των ΜΣ (Cueva και συν. 2012). Στελέχη, τα οποία στερούνται μίας ακετυλοτρανσφεράσης που καταλύει την ακετυλίωση αυτή, διαθέτουν ΜΣ με διαφορετικό αριθμό πρωτονηματίων σε σύγκριση με εκείνον των ΜΣ των φυσιολογικών κυττάρων. Υποστηρίζεται ότι η ακετυλίωση της λυσίνης στη θέση 40 προωθεί τη δημιουργία δεσμών, οι οποίοι σταθεροποιούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών πρωτονηματίων, καθιστώντας τους ΜΣ ιδιαίτερα σταθερούς (Cueva και συν. 2012).

Τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι, όταν διαταράσσεται η ομοιόσταση των ROS, δημιουργούνται συνθήκες, οι οποίες ενεργοποιούν ένζυμα που καταλύουν την ακετυλίωση της α -σωληνίνης. Επιπλέον, πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι η επίδραση H_2O_2 σε κύτταρα HeLa οδηγεί στην υπερακετυλίωση της α -σωληνίνης. Αυτή καταλύεται από μία ακετυλοτρανσφεράση, που ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση έπειτα από την κινητοποίηση πολύπλοκων μηχανισμών μεταγωγής μηνύματος (Mackeh και συν. 2014). Η ενεργοποίηση της ακετυλοτρανσφεράσης σε συνθήκες καταπόνησης φαίνεται ότι είναι αντιστρεπτή (Mackeh και συν. 2014). Η σημασία της ομοιόστασης των ROS για την ακετυλίωση της σωληνίνης υποδηλώνεται από το γεγονός ότι, στα κύτταρα HeLa, η παρουσία NAC ταυτόχρονα με H_2O_2 επαναφέρει την ακετυλιωμένη σωληνίνη σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα των κυττάρων του μάρτυρα. Είναι ενδιαφέρον ότι, και στη δική μας περίπτωση, όταν τα κύτταρα αφήνονται να ανακάμψουν σε φυσιολογικές συνθήκες, δημιουργούν τυπικές διατάξεις ΜΣ. Πιθανόν, η ακετυλίωση της σωληνίνης σταματά όταν οι ROS επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι, σε πειράματα *in vitro*, η ακετυλίωση της σωληνίνης επηρεάζει την πρόσδεση MAPs στην επιφάνεια των ΜΣ (Reed και συν. 2006).

Μία άλλη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που εκδηλώνεται σε συνθήκες καταπόνησης είναι η φωσφορυλίωση της σωληνίνης. Στα φυτικά κύτταρα, η φωσφορυλίωση της θρεονίνης στη θέση 349 της ελεύθερης α -σωληνίνης, έπειτα από υπερωσμωτική καταπόνηση, μεταβάλλει την ικανότητα πολυμερισμού της. Η σχέση, μεταξύ της

φωσφορυλίωσης και των άλλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της σωληνίνης των φυτικών κυττάρων με μηχανισμούς που σχετίζονται με τις ROS, απομένει να διερευνηθεί.

IV.2.6 ROS, άτυπα πολυμερή σωληνίνης και δραστηριότητα των MAPs

Είναι γνωστό ότι οι αλληλεπιδράσεις των ΜΣ με τις MAPs μπορεί να διαφέρουν, ανάλογα με τους ισotypους σωληνίνης που συγκροτούν τους ΜΣ (Ludueña 2013). Παράλληλα, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της σωληνίνης μπορεί να επηρεάσουν τη φύση των αλληλεπιδράσεων των MAPs με τη σωληνίνη ή τους ΜΣ (Reed και συν. 2006, βλέπε επίσης Cai 2010). Τέλος, η επίδραση με οξειδωτικά μέσα δεν αλλάζει μόνο την οξειδοαναγωγική κατάσταση της σωληνίνης αλλά μεταβάλλει και την οξειδοαναγωγική κατάσταση των MAPs (Landino και συν. 2004β).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS έχει ως αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση των ΜΣ και τη συγκρότηση άτυπων πολυμερών σωληνίνης. Γνωρίζοντας ότι οι τροποποιήσεις στις MAPs μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίησή τους, είναι εύλογο να υποτεθεί ότι οι ROS επηρεάζουν τις MAPs που εμπλέκονται στη σταθεροποίηση ή αποσταθεροποίηση των ΜΣ, την αναδίπλωση της σωληνίνης και τη συγκρότηση άτυπων πολυμερών σωληνίνης.

Διάφορα δεδομένα δείχνουν ότι η συγκρότηση άτυπων πολυμερών σωληνίνης προωθείται από MAPs. Όπως διαπιστώθηκε με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού στα ελαιοσωμάτια των επιδερμικών κυττάρων της ωοθήκης του φυτού *Ornithogalum umbellatum*, οι ΜΣ που έχουν μεγαλύτερη διάμετρο συνεντοπίζονται με κινήσινες (Kwiatkowska και συν. 2013). Επιπλέον, η συγκρότηση δακτυλιοειδών πολυμερών σωληνίνης, *in vitro*, προωθείται από την παρουσία κινήσινης ή δυνείνης (Ito και συν. 2014).

Η επίδραση κολχικίνης στα κύτταρα της ρίζας του φυτού *Vigna sinensis* οδηγεί στη δημιουργία παρακρυστάλλων κολχικίνης/σωληνίνης (Apostolakos και συν. 1990). Η ανοσοσήμανση των πρωτεϊνών MAP65, στα επηρεασμένα κύτταρα, αποκάλυψε ότι οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται στους παρακρυστάλλους κολχικίνης/σωληνίνης (Panteris και συν. 2010). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες MAP65 συμμετέχουν στη συγκρότηση των παρακρυστάλλων. Ο ρόλος των MAP65 στη συγκρότηση άτυπων πολυμερών σωληνίνης επιβεβαιώνεται και από τα δεδομένα της διατριβής. Σε νεαρά αρτίβλαστα του φυτού *A. thaliana* πραγματοποιήθηκαν επιδράσεις με DPI, NAC και MEN και ακολούθησε ανοσοσήμανση των πρωτεϊνών AtMAP65-1 με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος. Στα επηρεασμένα κύτταρα, η AtMAP65-1 εντοπίζεται σε δομές που έχουν οργάνωση όμοια με εκείνη των άτυπων πολυμερών σωληνίνης. Το γεγονός υποστηρίζει ότι η MAP αυτή εμπλέκεται στη συγκρότηση ή σταθεροποίηση των μακροσωληνίσκων και των παρακρυστάλλων σωληνίνης. Επίσης, δεν αποκλείεται η AtMAP65-1 να ευθύνεται για την

αποσταθεροποίηση των ΜΣ, όταν μεταβάλλονται τα επίπεδα των ROS. Είναι γνωστό ότι η φωσφορυλίωση της AtMAP65-1, η οποία, εκτός των άλλων, εμπλέκεται στη δεσμίωση των ΜΣ, έχει ως αποτέλεσμα τον αποχωρισμό της από τους ΜΣ και την αποδιοργάνωση των τελευταίων (Smertenko και συν. 2006).

Είναι πιθανόν ότι, εκτός της AtMAP65-1, και άλλες πρωτεΐνες MAP65 συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης. Η επίδραση αυξημένης αλατότητας προκαλεί τη συγκρότηση ενός πληθυσμού ανθεκτικών ΜΣ με τη συμμετοχή της AtMAP65-6 (Mao και συν. 2005). Η ικανότητα πρόσδεσης των διαφορετικών ισοτύπων MAP65 στους ΜΣ εξαρτάται από μία επικράτεια που βρίσκεται στο αμινοτελικό τους άκρο (Smertenko και συν. 2008). Με δεδομένο ότι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορούν να μεταβάλλουν την ικανότητα πρόσδεσης των MAPs στους ΜΣ, είναι λογικό να υποστηριχθεί ότι στα επηρεασμένα κύτταρα στρατολογούνται MAPs που ευνοούν τη δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης.

Διάφορα δεδομένα, από πειράματα σε ζωικά κύτταρα, δείχνουν ότι οι μεταβολές των επιπέδων των ROS επιφέρουν αλλαγές στη δραστηριότητα των MAPs. Η επίδραση με H_2O_2 μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική κατάσταση των MAP2 και TAU (Landino και συν. 2004β). Επιπλέον, η παρουσία της MEN σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος ανθρώπου προκάλεσε αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης TAU (Ko και συν. 1997). Σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα ποντικού, η οξειδωτική καταπόνηση με H_2O_2 οδήγησε στην αποδέσμευση της πρωτεΐνης EB1 από το θετικό άκρο των ΜΣ (Smith και συν. 2010). Επίσης, σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπου που αναπτύσσονται σε καλλιέργειες, οι ROS που παράγονται στα μιτοχόνδρια επηρεάζουν την κατάσταση φωσφορυλίωσης της EB1 σε συγκεκριμένες θέσεις. Ανάλογα με τη θέση φωσφορυλίωσης της EB1, τροποποιούνται αφενός οι δυναμικές ιδιότητες των ΜΣ και αφετέρου ο χρόνος σύνδεσης της EB1 με τους ΜΣ (Le Grand και συν. 2014). Αντίστοιχα δεδομένα δεν έχουν δημοσιευτεί για τα φυτικά κύτταρα. Ωστόσο, γνωρίζοντας ότι οι MAPs ανταποκρίνονται σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Hamada 2013, Nakamura 2015), μπορεί να υποστηριχθεί ότι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, όταν διαταράσσεται η ομοιόσταση των ROS, επιτυγχάνεται και από τη δραστηριότητα και άλλων MAPs, εκτός από τη MAP65. Ο λόγος κινητοποίησης των MAPs, σε αυτή την περίπτωση, πιθανόν οφείλεται στη σχέση των ROS με τα επίπεδα ασβεστίου (Rentel και Knight 2004) ή στην ενεργοποίηση μηχανισμών μεταγωγής μηνύματος (Suarez Rodriguez και συν. 2010). Συχνά, η δραστηριότητα των MAPs ρυθμίζεται από ιόντα ασβεστίου και μέσω μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης (Hamada 2013).

Τέλος, αν θεωρήσουμε ότι οι διαδικασίες αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, όταν τα επίπεδα των ROS είναι υψηλά, είναι οι ίδιες με εκείνες που

ενεργοποιούνται όταν αυτά μειώνονται, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι στο κύτταρο θα πρέπει να λειτουργούν μηχανισμοί που αντιλαμβάνονται τις αλλαγές των επιπέδων των ROS.

IV.2.7 Μηχανισμοί μεταγωγής μηνύματος, αντίληψη των επιπέδων των ROS και δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης

IV.2.7.1 Ο ρόλος της p46-MAPK στην αντίληψη των επιπέδων των ROS

Στο πλαίσιο αναζήτησης μηχανισμών μεταγωγής μηνύματος, που πιθανόν δρομολογούν την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, λόγω της διαταραχής της ομοιόστασης των ROS, διερευνήθηκε ο ρόλος μίας κινάσης των φυτών με MB 46 kDa (p46-MAPK). Αυτή η κινάση παρουσιάζει ανοσολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες όμοιες με εκείνες της p38-MAPK των ζωικών οργανισμών (Komis και συν. 2004). Στα κύτταρα του ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum* η p46-MAPK εμπλέκεται στην αντίληψη της υπερωσμωτικής καταπόνησης και της επακόλουθης δημιουργίας μακροσωληνίσκων (Komis και συν. 2004). Εκτός αυτού, η p38-MAPK σχετίζεται με την απόκριση των ζωικών κυττάρων στην οξειδωτική καταπόνηση και σε άλλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Zarubin και Han 2005, Gaitanaki και συν. 2006).

Από την εξέταση της διαθέσιμης βιβλιογραφίας, συνάγεται ότι τα φυτά δεν διαθέτουν κινάσες ταυτόσημες με τις p38-MAPKs. Η άποψη αυτή προκύπτει από μελέτες που υποστηρίζουν ότι οι πρωτεϊνικές κινάσες των φυτών στερούνται του χαρακτηριστικού προτύπου φωσφορυλίωσης TGY (θρεονίνη-γλυκίνη-τυροσίνη) των p38-MAPKs (Suarez Rodriguez και συν. 2010). Ωστόσο, είναι γνωστό ότι στα φυτικά κύτταρα λειτουργούν MAPKs, όμοιες με την p38-MAPK των ζωικών κυττάρων. Η χρήση αντισώματος, το οποίο αναπτύχθηκε έναντι της φωσφορυλιωμένης p38-MAPK των θηλαστικών, αναγνωρίζει σε εκχυλίσματα κυττάρων των χλωροφυκών *Dunaliella viridis* και *Dunaliella tertiolecta*, πρωτεΐνες 57 kDa και 40 kDa, αντίστοιχα (Jiménez και συν. 2004, García-Gómez και συν. 2012). Στα ανώτερα φυτά, το ίδιο αντίσωμα αναγνωρίζει μία MAPK MB 46kDa στο φυτό *T. turgidum* (Komis και συν. 2004) και μία 38 kDa MAPK στο φυτό *Perilla frutescens* (Izumi και συν. 2012). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι Komis και συν. (2004) έδειξαν ότι το αντίσωμα αυτό δεν αντιδρά με phospho-ERKs (extracellular signal-regulated kinases). Στην παρούσα διατριβή, επιβεβαιώθηκε η παρουσία της p46-MAPK σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του φυτού *T. turgidum* και επιπλέον διαπιστώθηκε ότι στο φυτό *A. thaliana* υπάρχει μία MAPK όμοια με την p38-MAPK των θηλαστικών με MB, επίσης, 46 kDa.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα σειράς πειραμάτων, με τη χρησιμοποίηση του εξειδικευμένου αναστολέα SB203580 της p38-MAPK, ενισχύουν περαιτέρω την άποψη ότι στα φυτικά κύτταρα υπάρχουν κινάσες όμοιες με την p38-MAPK. Η χρήση του αναστολέα οδηγεί στην ανάσχεση διαδικασιών στις οποίες συμμετέχουν οι, όμοιες με την p-38, MAPKs.

Για παράδειγμα, ο SB203580 εμποδίζει τη ρύθμιση του όγκου του πρωτοπλάστη σε πλασμολυμένα κύτταρα ρίζας του φυτού *T. turgidum* (Komis και συν. 2004) και το κλείσιμο των στομάτων του φυτού *Vicia faba*, που επάγεται από την επίδραση με ABA ή H₂O₂ (Jiang και συν. 2008). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η χρήση του SB203580 αναστέλλει την απόκριση που επάγεται στο κύτταρο, όταν χρησιμοποιούνται ενώσεις που μεταβάλλουν τα επίπεδα των ROS (βλέπε παρακάτω).

Στο σημείο αυτό, πρέπει να διευκρινιστεί ότι ο SB203580 είναι εξειδικευμένος αναστολέας της καταλυτικής δραστηριότητας των p38-MAPKs και των όμοιων με αυτές κινασών. Θεωρητικά, επομένως, δεν είναι απαραίτητο η παρουσία του να μεταβάλλει τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης αυτών των κινασών, αλλά εκείνα των υποστρωμάτων τους. Στην παρούσα διατριβή, διαπιστώθηκε ότι η χρήση του SB203580 προκαλεί μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της p46 στα επηρεασμένα ακρόρριζα, όπως συμβαίνει και στα πλασμολυμένα κύτταρα του *T. turgidum* (Komis και συν. 2004). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του φυτού *P. frutescens* (Izumi και συν. 2012). Στα ζωικά κύτταρα υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα για το ζήτημα αυτό. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο SB203580 δεν αναμένεται να μεταβάλλει τα επίπεδα της phospho-p38 (Kumar και συν. 1999), ενώ άλλες το αντίθετο (Frantz και συν. 1998, Kurata 2000, Dolado και συν. 2007). Η σχέση του αναστολέα με την κατάσταση φωσφορυλίωσης της κινάσης αυτής φαίνεται ότι εξαρτάται από το εάν η πρόσδεσή του προκαλεί αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση της θέσης της p38-MAPK που δεσμεύει το ATP. Για το ενδεχόμενο αυτό έχουν διατυπωθεί δύο αντίθετες απόψεις (Wilson και συν. 1997, Frantz και συν. 1998). Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν ότι ο ρυθμός ενεργοποίησης της p46-MAPK μειώνεται παρουσία του SB203580, καθώς, όπως αναφέρθηκε και σε άλλες περιπτώσεις, στα φυτά ο SB203580 προκαλεί συνήθως μείωση της φωσφορυλίωσης των κινασών, των όμοιων με την p38-MAPK. Στα ζωικά κύτταρα, ορισμένα αμινοξικά κατάλοιπα είναι κρίσιμα για τη λειτουργία του SB203580 (Lisnock και συν. 1998). Επομένως, χωρίς να είμαστε βέβαιοι, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η μείωση των επιπέδων της phospho-p46, παρουσία SB203580, οφείλεται σε ενδεχόμενη ιδιαιτερότητα της θέσης δέσμευσης του SB203580 ή της θέσης πρόσδεσης του ATP στις φυτικές κινάσες, οι οποίες είναι όμοιες με την p38-MAPK.

Σε κάθε περίπτωση, είναι γνωστό ότι ο SB203580 αναστέλλει τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών που αποτελούν υποστρώματα των p38-MAPKs (Davies και συν. 2000). Η δράση αυτή συμφωνεί με τα δεδομένα μας που δείχνουν ότι, έπειτα από ταυτόχρονη επίδραση H₂O₂ με SB203580 αναστέλλεται, όχι μόνο η αύξηση των επιπέδων της phospho-p46, αλλά και η φωσφορυλίωση μίας κινάσης που παρουσιάζει ανοσολογικές ιδιότητες όμοιες με εκείνες της MAPKAPK2 των θηλαστικών. Η MAPKAPK2 είναι ένα από τα γνωστά υποστρώματα των p38-MAPKs (Yuan και συν. 2010). Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν περαιτέρω την άποψη για

την ύπαρξη κινασών, όμοιων με την p38-MAPK των ζωικών οργανισμών, στα φυτά, και επιβεβαιώνουν την ειδικότητα του αναστολέα SB203580.

Ένα από τα κυριότερα ευρήματα που αφορούν στην p46 είναι η ταχύτατη φωσφορυλίωσή της, όταν μεταβάλλονται τα επίπεδα των ROS. Η μείωση των επιπέδων των ROS, έπειτα από επίδραση με DPI και NAC, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της phospho-p46, ενώ η οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από τις ουσίες MEN και H₂O₂ επάγει επίσης, τη φωσφορυλίωσή της. Είναι ενδιαφέρον ότι, στα αρτίβλαστα *rhd2* του φυτού *A. thaliana*, διαπιστώθηκαν ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα phospho-p46, καθώς αυτά διαθέτουν αισθητά μειωμένα επίπεδα των ROS, χωρίς έχουν υποστεί κάποια επίδραση. Επομένως, φαίνεται ότι οποιαδήποτε σημαντική μεταβολή των επιπέδων των ROS ή/και της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου ενεργοποιεί την p46-MAPK.

Τα δεδομένα αυτά δεν ήταν αναμενόμενα, καθώς, στα ζωικά κύτταρα είναι γνωστό ότι μόνο η αύξηση των επιπέδων των ROS επάγει φωσφορυλίωση της p38-MAPK, ενώ η απόκριση αυτή αναστέλλεται παρουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων (Kurata 2000, Gaitanaki και συν. 2006). Ωστόσο, στα φυτά, τόσο η αύξηση όσο και η μείωση των επιπέδων των ROS ενεργοποιούν την p46. Το γεγονός ότι η φωσφορυλίωση αυτής της κινάσης εξαρτάται από τις μεταβολές των επιπέδων των ROS, υποστηρίζεται ισχυρά και από δεδομένα πειραμάτων, στα οποία χρησιμοποιήθηκε ένα οξειδωτικό μέσο ταυτόχρονα με μία ένωση που προκαλεί μείωση των επιπέδων των ROS. Σε αυτούς τους συνδυασμούς των επιδράσεων, τόσο τα επίπεδα των ROS στο ακρόρριζο όσο και της phospho-p46 είναι συγκρίσιμα με εκείνα των φυσιολογικών ακρόρριζων.

Είναι, επομένως, λογικό να συμπεράνουμε ότι η p46-MAPK διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ανίχνευση των επιπέδων των ROS στα φυτικά κύτταρα, ενώ ενεργοποιείται όταν αυτά μεταβάλλονται. Γνωρίζοντας, ότι οι μεταβολές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων δημιουργούν συνθήκες έντονης καταπόνησης (Foyer και Noctor 2005α, 2005β), η p46-MAPK πιθανόν συμμετέχει στους μηχανισμούς αντίληψης της καταπόνησης αυτής.

Ένα από τα ερωτήματα που τίθενται από τη συνολική θεώρηση των παραπάνω δεδομένων είναι, γιατί ενεργοποιείται η p46-MAPK, όταν μειώνονται τα επίπεδα των ROS. Αυτό μπορεί ενδεχομένως να απαντηθεί, εάν θεωρήσουμε ότι στα φυτικά κύτταρα, λειτουργεί ένας μηχανισμός, ο οποίος έχει περιγραφεί σε ορισμένους ζωικούς κυτταρικούς τύπους. Στα ουδετερόφιλα λευκά αιμοσφαίρια ανθρώπου, η ενεργοποίηση της p38-MAPK έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης και την παραγωγή ROS. Όταν τα κύτταρα υφίστανται επίδραση με SB203580, η ενεργοποίηση αναστέλλεται και οι ROS που παράγονται από την καταλυτική δραστηριότητα της NADPH-οξειδάσης, μειώνονται (Lal και συν. 1999, Bao και συν. 2007). Με δεδομένη τη σχέση της p38-MAPK με την ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι Rbohs είναι

ομόλογες της καταλυτικής υπομονάδας gp^{91} των ουδετερόφιλων λευκών αιμοσφαιρίων ανθρώπου, μπορεί να υποτεθεί ότι, όταν τα επίπεδα των ROS μειώνονται στα φυτικά κύτταρα, η ενεργοποίηση της p46-MAPK στοχεύει στην αποκατάσταση της ομοιόστασης των ROS μέσω της ενεργοποίησης της NADPH-οξειδάσης.

Άλλωστε οι Rbohs συγκαταλέγονται μεταξύ των κυριότερων ενζύμων που παράγουν ROS «σκόπιμα» (Marino και συν. 2012). Η υπόθεση ενισχύεται από τα αυξημένα επίπεδα phospho-p46, τα οποία διαπιστώθηκαν όχι μόνο σε αρτίβλαστα επηρεασμένα με DPI που αναστέλλει την καταλυτική δραστηριότητα της NADPH-οξειδάσης, αλλά ιδιαίτερα στα μεταλλάγματα *rh2*, τα οποία στερούνται της δράσης του ενός εξ αυτών των ένζυμων, της AtRbohC. Τα επίπεδα των ROS είναι χαμηλά και στις δύο περιπτώσεις (Foreman και συν. 2003). Θα πρέπει, επομένως, εάν η άποψη αυτή είναι σωστή, η p46-MAPK και οι NADPH-οξειδάσες να εμπλέκονται στον έλεγχο των επιπέδων των ROS και να συνδέονται μεταξύ τους με μονοπάτια μεταγωγής μηνύματος, μέσω μηχανισμών ανάδρασης. Επομένως, έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι σε ορισμένα συστήματα, η NADPH-οξειδάση συμμετέχει στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, αλλά και το αντίστροφο (βλέπε παρακάτω).

IV.2.7.2 Μεταγωγή μηνύματος και αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης

Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, φαίνεται ότι η p46-MAPK εμπλέκεται στην αντίληψη των επιπέδων των ROS. Στα φυτικά κύτταρα, τόσο οι ROS όσο και οι ΜΣ συμμετέχουν στην αντίληψη και στις αποκρίσεις που ενεργοποιούνται από την εφαρμογή διαφόρων καταπονήσεων (Nick 2013). Για το λόγο αυτό επιχειρήθηκε να διερευνηθεί, εάν η p46 σχετίζεται με την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, την οποία επιβάλλουν οι μεταβολές των επιπέδων των ROS.

Είναι γνωστό ότι, στα ζωικά κύτταρα η p38-MAPK, ενεργοποιείται σε συνθήκες καταπόνησης και εμπλέκεται στις μεταβολές που υφίσταται ο κυτταροσκελετός της σωληνίνης με διάφορους τρόπους. Σε κύτταρα μυοκαρδίου και σε κύτταρα HeLa, τα οποία βρίσκονται σε συνθήκες υποξίας, η p38 επάγει την αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Op18/stathmin (oncoprotein 18), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπλόκου αυτού και την αποδιοργάνωση των ΜΣ. Με τους ίδιους μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος, η MAP4 φωσφορυλιώνεται, γεγονός που οδηγεί στην απενεργοποίησή της (Hu και συν. 2010). Η χρήση του εξειδικευμένου αναστολέα SB203580 της p38-MAPK αναστρέφει τα φαινόμενα αυτά και εμποδίζει τον αποπολυμερισμό των ΜΣ (Hu και συν. 2010). Ο ρόλος της p38-MAPK στην αποσταθεροποίηση των ΜΣ ενισχύεται και από αντίστοιχα πειράματα σε κύτταρα ενδοθηλίου ανθρώπου, τα οποία έχουν υποστεί επίδραση με 2-methoxyestradiol (Bogatcheva και συν. 2007). Επιπλέον, η επαγωγή πολυμερισμού της σωληνίνης σε

επηρεασμένα με As_2O_3 κύτταρα HeLa και MCF-7 εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της p38-MAPK (Shen και συν. 2011).

Στα κύτταρα του ακρόρριζου η p46-MAPK φαίνεται να διαδραματίζει αντίστοιχο ρόλο στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, όταν μεταβάλλονται τα επίπεδα των ROS. Η οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από τις ουσίες MEN και H_2O_2 , η ανάσχεση της NADPH-οξειδάσης από το DPI και η αδρανοποίηση των ROS από τη NAC επάγουν, αφενός φωσφορυλίωση της p46-MAPK και αφετέρου αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης. Σε αυτές τις συνθήκες, η παρουσία του αναστολέα SB203580 αναστέλλει την αποδιοργάνωση των περιφερειακών ΜΣ των επηρεασμένων κυττάρων. Παράλληλα, η ανάσχεση της καταλυτικής δραστηριότητας της p46 αναστέλλει και τη δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης. Όταν το διάλυμα της επίδρασης περιέχει τον αναστολέα SB203580, τα πολυμερή σωληνίνης των επηρεασμένων κυττάρων έχουν εμφάνιση όμοια με εκείνα των φυσιολογικών ακρόρριζων. Το φαινόμενο αυτό επιβεβαιώθηκε και με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η καταμέτρηση των διαστάσεων των πολυμερών της σωληνίνης στα παραπάνω κύτταρα έδειξε ότι επικρατούν οι ΜΣ, ενώ το ποσοστό των μακροσωληνίσκων είναι εμφανώς μειωμένο. Στα κύτταρα που είχαν υποστεί επίδραση με MEN μαζί με SB203580 δεν παρατηρήθηκαν παρακρύσταλλοι.

Επισημαίνεται, ότι σε νευρώνες, οι οποίοι υπέστησαν την επίδραση κολχικίνης, διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα phospho-p38 (Yang και συν. 2007). Η p38-MAPK προωθεί, επίσης, την ακετυλίωση πρωτεϊνών (Zhao και συν. 2008, Corre και συν. 2009). Επομένως, μπορεί να υποτεθεί ότι η επαγωγή ακετυλίωσης της σωληνίνης στα επηρεασμένα κύτταρα του ακρόρριζου οφείλεται πιθανόν στην ενεργοποίηση της p46. Μια τέτοια αλληλουχία γεγονότων θα ευνοούσε τη συγκρότηση των άτυπων πολυμερών. Έχει αναφερθεί, όμως, και η αντίστροφη πορεία. Η επίδραση με βακτηριακές τοξίνες, επάγει την ακετυλίωση της σωληνίνης, η οποία, με τη σειρά της, ενισχύει την ενεργοποίηση της p38-MAPK (Wang και συν. 2014).

Η σχέση των επιπέδων της phospho-p46 με τα επίπεδα των ROS και τον κυτταροσκελετό της σωληνίνης ενισχύεται περαιτέρω και από τα δεδομένα συνδυασμού επιδράσεων. Σε ότι αφορά τις παραμέτρους αυτές, τα κύτταρα, επιδεικνύουν συμπεριφορά όμοια με εκείνη των φυσιολογικών κυττάρων. Επιπλέον, στα αρτίβλαστα *rhd2*, όπου οι ΜΣ συνυπάρχουν με μακροσωληνίσκους, ανιχνεύονται ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα phospho-p46 σε σύγκριση με τα αρτίβλαστα αγρίου τύπου. Σημειώνεται ότι, σε όλες τις περιπτώσεις, ο αναστολέας SB203580 δεν επηρεάζει τα επίπεδα των ROS στα ακρόρριζα. Η θεώρηση όσων εκτέθηκαν παραπάνω οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι η κατάσταση φωσφορυλίωσης της p46 συνδέεται ευθέως με τα επίπεδα των ROS και ότι διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης.

Τα παραπάνω βρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα που αφορούν στα πλασμολυμένα κύτταρα του φυτού *T. turgidum*. Στο σύστημα αυτό, η p46-MAPK συμμετέχει στους μηχανισμούς απώλειας των ΜΣ και αντικατάστασής τους από άτυπα πολυμερή σωληνίνης. Η δημιουργία των πολυμερών αυτών είναι προϋπόθεση για την απόκριση των κυττάρων στην υπερωσμωτική καταπόνηση και τη ρύθμιση του όγκου του πλασμολυμένου πρωτοπλάστη (Komis και συν. 2004).

Στα φυτικά κύτταρα μπορεί να υποστηριχθεί, με κάποια βεβαιότητα, ότι η p46 είναι μία κινάση όμοια με την p38-MAPK. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα σχετικά με τους μηχανισμούς στους οποίους εμπλέκεται και τις πρωτεΐνες που αποτελούν υπόστρωμά της. Ένα από τα πιθανά υποστρώματα είναι μία κινάση όμοια με την MAPKAPK2. Αυτή φωσφορυλιώνεται παρουσία H_2O_2 . Πρόκειται για απόκριση, η οποία αναστρέφεται παρουσία του αναστολέα SB203580 στο διάλυμα της επίδρασης. Σε ζωικά κύτταρα και συγκεκριμένα σε μειωτικά κύτταρα ποντικού η MAPKAPK2 εμπλέκεται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού των ΜΣ (Yuan και συν. 2010).

Με βάση τα όσα γνωρίζουμε για τις σχέσεις της p38-MAPK με άλλα μόρια, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η p46 αλληλεπιδρά απευθείας με MAPs ή ότι συμμετέχει σε μηχανισμούς που προκαλούν την ενεργοποίησή τους. Η phospho-p38 φωσφορυλιώνει απευθείας την MAP4 (Hu και συν. 2010) ενώ, τουλάχιστον *in vitro*, μπορεί ως ένα βαθμό να φωσφορυλιώσει και τη MAP2 (Björkblom και συν. 2005). Επισημαίνεται, ότι η δράση αυτών των πρωτεϊνών είναι παρόμοια με εκείνη της MAP65 (Ebneth και συν. 1999, Dehmelt και Halpain 2004, βλέπε επίσης Panteris και συν. 2010).

Στο φυτό *A. thaliana*, η MAP65-1 αποτελεί υπόστρωμα των MPK3, MPK4 και MPK6 (Smertenko και συν. 2006, Hoehenwarter και συν. 2013). Επομένως, παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι αυτές οι MAPKs σχετίζονται με τη μεταγωγή μηνυμάτων που εξαρτώνται από την παρουσία των ROS (Suarez Rodriguez 2010). Η διατάραξη της ομοιοστάσης των ROS έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της MPK4 από τη MEKK1/2 (Nakagami και συν. 2006), ενώ οι MPK3 και MPK6 ενεργοποιούνται από την ANP1, έπειτα από οξειδωτική καταπόνηση (Kontun και συν. 2000). Όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια, ορισμένες από αυτές τις κινάσες, αλλά και κάποιες άλλες, συμμετέχουν στους μηχανισμούς που ελέγχουν την οργάνωση των διαφόρων συστημάτων ΜΣ, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου των φυτικών κυττάρων.

Στους μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος της p46-MAPK είναι πιθανή η συμμετοχή φωσφολιπασών και φωσφοϊνσιτιδικών κινασών. Το PA, το οποίο παράγεται από την καταλυτική δραστηριότητα της PLD, μεταξύ άλλων, επάγει την παραγωγή ROS, μέσω της ενεργοποίησης της NADPH-οξειδάσης (Wang και συν. 2006). Επιπλέον, μέσω της κινάσης OXI1, το PA προωθεί τη φωσφορυλίωση των MPK3 και MPK6 (Rentel και συν. 2004,

Testerink και Munnik 2005, βλέπε επίσης Foyer και Noctor 2005β). Παράλληλα, στα πλασμολυμένα κύτταρα του ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum*, η δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης εξαρτάται από την παραγωγή PA (Komis και συν. 2006). Υποστηρίζεται, μάλιστα, ότι η παραγωγή του PA προηγείται της ενεργοποίησης της p46-MAPK. Αντίστοιχα, έχει βρεθεί ότι η MAP65-1 αποτελεί στόχο του PA, κατά την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, η οποία περιλαμβάνει τη δημιουργία ανθεκτικών πολυμερών σε κύτταρα υποκοτυλίου του φυτού *A. thaliana* που υφίστανται επίδραση υψηλής αλατότητας (Zhang και συν. 2012α). Με βάση τα παραπάνω, έχει ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν το PA είναι, με κάποιο τρόπο, απαραίτητο για την οργάνωση άτυπων πολυμερών σωληνίνης, όταν διαταράσσεται η ομοιόσταση των ROS.

Στην παρούσα διατριβή, διερευνήθηκε επίσης ο ρόλος της PI3K στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης. Τα ακρόρριζα, τα οποία υπέστησαν την επίδραση με τον αναστολέα της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου αυτού LY294002, διέθεταν χαμηλότερα επίπεδα ROS σε σύγκριση με τα αντίστοιχα του μάρτυρα. Ο κυτταροσκελετός της σωληνίνης των ως άνω επηρεασμένων κυττάρων αποτελείται από άτυπα σε εμφάνιση πολυμερή, τα οποία φαίνεται ότι είναι αντίστοιχα εκείνων που παρατηρήθηκαν, μετά από επίδραση με DPI. Πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι, στην ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης και την παραγωγή ROS στα φυτικά κύτταρα, εμπλέκονται η PI3K και το προϊόν της καταλυτικής δραστηριότητας η PI3P (Joo και συν. 2005). Ωστόσο, μέχρι σήμερα, δεν έχει βρεθεί το είδος της σχέσης της PI3K με την p46, ούτε έχει διερευνηθεί εάν οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν στα ίδια μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Στα ζωικά κύτταρα, ο ρόλος της PI3K έχει μελετηθεί σε βάθος, ενώ οι σχέσεις της PI3K με την p38-MAPK εμφανίζονται ιδιαίτερα πολύπλοκες (Lee και συν. 2006, Cuadrado και Nebreda 2010, Mercu και συν. 2014).

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι, αν και θεωρείται ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS δρομολογεί αλλαγές στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης, πρόσφατα δεδομένα τον συνδέουν με μηχανισμούς που οδηγούν στην παραγωγή ROS. Συγκεκριμένα, στο φυτό *Zea mays*, το H₂O₂ προκαλεί την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της ZmMAP65-1. Παράλληλα, όταν πραγματοποιείται επίδραση με μπρασισινοστεροειδή, η κίνηση ZmMPK5 αλληλεπιδρά με την ZmMAP65-1. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή του γονιδίου της NADPH-οξειδάσης και, επομένως, για την επακόλουθη παραγωγή H₂O₂, αλλά επίσης και για μετέπειτα αποκρίσεις, όπως η μεταγραφή αμυντικών γονιδίων (Zhu και συν. 2013). Στην ίδια κατεύθυνση, άλλα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η επαναιμάτωση κυττάρων μυοκαρδίου ποντικού, έπειτα από ισχαιμία, απαιτεί την παραγωγή O₂^{•-} από τις NADPH-οξειδάσες gp22. Η δραστηριότητα των

τελευταίων, όμως, προϋποθέτει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των ΜΣ (Devillard και συν. 2006).

Τα όσα αναφέρθηκαν μέχρι τώρα, υποστηρίζουν την άποψη ότι η ομοιοστάση των ROS είναι απαραίτητη για την ομαλή δημιουργία των ΜΣ. Αντίθετα, η διατάραξη των επιπέδων τους δρομολογεί, αφενός τη δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης και αφετέρου κινητοποιεί μηχανισμούς αποκατάστασης των ROS στα φυσιολογικά επίπεδα. Όμως, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης αποτελεί μέρος αυτών των μηχανισμών. Σε κάθε περίπτωση, έχει σημαντικό ενδιαφέρον ο μηχανισμός, με τον οποίο οι ROS επηρεάζουν την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης σε βασικές αναπτυξιακές πορείες των φυτών, όπως π.χ. της κυτταροδιαίρεσης.

IV.3 ROS ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ

Τα δεδομένα της παρούσας διατριβής αποκάλυψαν για πρώτη φορά ότι η σημαντική διατάραξη των επιπέδων των ROS οδηγεί στη δραματική μείωση των ΜΣ και τη δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης. Η παρουσία των τελευταίων έχει ως αποτέλεσμα τη διατάραξη της πορείας διαίρεσης των επηρεασμένων κυττάρων, προφανώς λόγω αδυναμίας των κυττάρων να σχηματίσουν λειτουργική μιτωτική και κυτοκινητική συσκευή. Πρέπει, όμως, να σημειωθεί ότι οι ατυπίες που παρατηρήθηκαν εξαρτώνται από τη φάση, στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα κατά την είσοδό τους στην επίδραση. Δεν πρέπει, επίσης, να αποκλειστεί η περίπτωση ότι, οι διαταραχές της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της σωληνίνης και της γενικότερης πορείας του κυτταρικού κύκλου, οφείλονται στη δυσλειτουργία ή την αδρανοποίηση και διάφορων άλλων μηχανισμών. Η πιθανότητα αυτή θα συζητηθεί παρακάτω.

IV.3.1 ROS και οργάνωση της μιτωτικής και κυτοκινητικής συσκευής

IV.3.1.1 Προ-προφασική ζώνη ΜΣ

Κατά τη φάση G₂ των βλαστητικών κυττάρων των ανωτέρων φυτών, σχηματίζεται η προ-προφασική ζώνη ΜΣ, δομή η οποία προσημειώνει με ακρίβεια το επίπεδο της μελλοντικής διαίρεσης (Mineyuki 1999). Η δημιουργία της συνοδεύεται από την πλήρη αποδιοργάνωση του συστήματος των περιφερειακών ΜΣ και του πολυμερισμού νέων, αποκλειστικά στη θέση της προ-προφασικής ζώνης (Apostolakos και Galatis 1992, Panteris και συν. 1995).

Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι η διαταραχή της ομοιοστάσης των ROS επηρεάζει την οργάνωση της προ-προφασικής ζώνης ΜΣ. Ένας μεγάλος αριθμός επηρεασμένων προ-προφασικών/προφασικών κυττάρων στερείτο προ-προφασικής ζώνης, παρά το γεγονός ότι έφεραν εμφανώς συμπτωνόμενη χρωματίνη. Στη θέση της προ-προφασικής ζώνης

εντοπίζονται συνήθως άτυπα πολυμερή σωληνίνης, τα οποία εμφανίζουν τυχαία κατανομή. Οι προ-προφασικές ζώνες των κυττάρων, η δημιουργία των οποίων είχε προηγηθεί της έναρξης της επίδρασης, χαρακτηρίζονται από άτυπη οργάνωση, αναστολή της πορείας ωρίμανσής τους και καθυστέρηση της αποδιοργάνωσής τους κατά το τέλος της πρόφασης. Παρόμοιες ατυπίες διαπιστώθηκαν στα μεταλλάγματα *rhd2* του φυτού *Arabidopsis*, αλλά και στα κύτταρα που είχαν υποστεί επίδραση με LY294002. Φαίνεται ότι οι ROS, με κάποιο τρόπο, εμπλέκονται στους μηχανισμούς δημιουργίας, ωρίμανσης και αποδιοργάνωσης της προ-προφασικής ζώνης ΜΣ. Πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι και η οξειδωτική καταπόνηση διαταράσσει την πορεία αυτή.

Η δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης είναι, λογικά, μία από τις αιτίες αποτυχίας σχηματισμού προ-προφασικής ζώνης ή της δημιουργίας άτυπων προ-προφασικών ζωνών στα επηρεασμένα κύτταρα. Τα κύτταρα, τα οποία διαθέτουν μακροσωληνίσκους ή παρακρυστάλλους σωληνίνης, φαίνεται ότι αδυνατούν να σχηματίσουν τυπικές προ-προφασικές ζώνες. Παρόμοια φαινόμενα χαρακτηρίζουν, επίσης, τα κύτταρα του φυτού *T. turgidum*, τα οποία δημιουργούν μακροσωληνίσκους, μετά από επίδραση αργιλίου (Frantzios και συν. 2000). Επιπλέον, άτυπες προ-προφασικές ζώνες έχουν παρατηρηθεί στα κύτταρα του φυτού *Pisum sativum*, μετά από επίδραση δισφαινόλης Α, τα οποία μάλιστα χαρακτηρίζονται από την παρουσία μακροσωληνίσκων (Adamakis και συν. 2013). Επίσης, η επίδραση εξασθενούς χρωμίου, η οποία αυξάνει τα επίπεδα των ROS στα κύτταρα του ακρόρριζου του φυτού *Lens culinaris*, αναστέλλει πλήρως την ωρίμανση της προ-προφασικής ζώνης (Eleftheriou και συν. 2013).

Είναι γνωστό, ότι κατά την οργάνωση της προ-προφασικής ζώνης αυξάνει η δυναμική αστάθεια των περιφερειακών ΜΣ του κυττάρου (Vos και συν. 2004). Επομένως, στην περίπτωση που οι μακροσωληνίσκοι περιέχουν ακετυλιωμένη σωληνίνη ή λιγότερη τυροσινωμένη σωληνίνη, θα έχουν μειωμένη δυναμικότητα και, ως εκ τούτου, διαφορετική συμπεριφορά κατά τη δημιουργία και την ωρίμανση της προ-προφασικής ζώνης. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι προ-προφασικές ζώνες, οι οποίες φέρουν ΜΣ που περιέχουν ακετυλιωμένη σωληνίνη, σχηματίζονται και σε φυσιολογικά κύτταρα αγγειοσπέρμων (Eleftheriou και συν. 2013, Giannoutsou και συν. 2012).

Η απουσία προ-προφασικής ζώνης από ορισμένα επηρεασμένα κύτταρα ενδεχομένως οφείλεται στη διατάραξη της ενεργοποίησης των περιφερειακών κέντρων οργάνωσης των πολυμερών σωληνίνης ή στη διατάραξη της κατανομής πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στην πυρήνωση της σωληνίνης. Ο ρόλος των ROS στον καθορισμό αυτών των θέσεων θα συζητηθεί σε επόμενη ενότητα. Στη θέση της προ-προφασικής ζώνης εντοπίζεται γ-σωληνίνη (Panteris και συν. 2000), όπως, επίσης, και η πρωτεΐνη TON1 (Azimzadeh και συν. 2008). Τα μεταλλάγματα *ton1* δεν συγκροτούν προ-προφασική ζώνη ΜΣ. Η TON1 εμφανίζει

ομοιότητες με πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα κεντροσωμάτια των ζωικών κυττάρων και μπορεί να αλληλεπιδρά με την κεντρίνη (Azimzadeh και συν. 2008). Στην παρούσα διατριβή διαπιστώθηκε ότι στα αρτίβλαστα *A. thaliana*, τα οποία υφίστανται επίδραση με DPI, NAC και MEN, μειώνεται η έκφραση του γονιδίου *TON1a*, ενώ τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αυτού αυξάνουν στα αρτίβλαστα εκείνα που υπέστησαν επίδραση H_2O_2 . Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι οι ROS συμμετέχουν στη δημιουργία περιφερειακών ΜΣ στη θέση της προ-προφασικής ζώνης, μεταξύ άλλων, επηρεάζοντας την έκφραση του γονιδίου ή και την κατανομή της TON1, ίσως και άλλων πρωτεϊνών. Η τελευταία άποψη ενισχύεται από την τάση ομαδοποίησης των περιφερειακών πολυμερών σωληνίνης στα *ton1* αρτίβλαστα του φυτού *A. thaliana* που έχουν υποστεί την επίδραση H_2O_2 . Εάν πράγματι οι ROS σχετίζονται με την πυρήνωση των ΜΣ, θα είχε ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν αλλάζει το πρότυπο κατανομής της γ-σωληνίνης των επηρεασμένων κυττάρων ή εκείνων του μεταλλάγματος *rhd2*. Οι πρωτεΐνες TON1 αποτελούν μέρος του συμπλόκου της PP2A (Spinner και συν. 2013). Επομένως, η παρουσία τους στη θέση της προ-προφασικής ζώνης πιθανόν σχετίζεται με διάφορα γεγονότα φωσφορυλίωσης (Duroc και συν. 2011). Κατά την πρόφαση, η AtMAP65-1 υπερφωσφορυλιώνεται, με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή της από τους ΜΣ (Smertenko και συν. 2006). Όμως, η MAP65-1 αποτελεί υπόστρωμα και των MAPKs MPK3, MPK4 και MPK6, οι οποίες ενεργοποιούνται από ROS (Smertenko και συν. 2006, Suarez Rodriguez και συν. 2010, Hoehenwarter και συν. 2013).

Με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι, όταν τα επίπεδα των ROS είναι χαμηλά, οι παραπάνω κινάσες δεν ενεργοποιούνται, με αποτέλεσμα η MAP65-1 να παραμένει συνδεδεμένη στους ΜΣ, επηρεάζοντας την πορεία ωρίμανσης της προ-προφασικής ζώνης (βλέπε επίσης Komis και συν. 2011). Σε αυτή την περίπτωση, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο, η διατάραξη της ομοιοστάσης των ROS να επηρεάζει τη φωσφορυλίωση ή την αποφωσφορυλίωση και άλλων MAPs που εμπλέκονται στην ωρίμανση ή και την αποδιοργάνωση της προ-προφασικής ζώνης. Είναι γνωστό ότι, εκτός από τη MAP65-1, φέρουν και διάφορες άλλες MAPs θέσεις φωσφορυλίωσης, κυρίως από MAPKs, (Duroc και συν. 2011).

IV.3.1.2 Προφασική άτρακτος

Σε αρκετές περιπτώσεις τα επηρεασμένα προφασικά κύτταρα διέθεταν ελάχιστα περιπυρηνικά πολυμερή σωληνίνης και σε ορισμένα, μάλιστα, αυτά απουσίαζαν πλήρως. Σημαντικός αριθμός άλλων προφασικών κυττάρων έφερε άτυπα πολυμερή σωληνίνης στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα, τα οποία όμως δεν σχημάτιζαν διπολικό σύστημα συγκρίσιμο με εκείνο της προφασικής ατράκτου των ΜΣ στα φυσιολογικά κύτταρα των ανωτέρων φυτών. Κατά τη διάρκεια της πρόφασης, στην επιφάνεια του προφασικού πυρήνα λειτουργούν ΚΟΜ, τα οποία σχηματίζουν μεγάλο αριθμό περιπυρηνικών ΜΣ. Αυτοί, στη συνέχεια, με

μηχανισμούς αυτο-οργάνωσης, διαμορφώνουν τη διπολική προφασική άτρακτο των ΜΣ (Vaughn και Harper 1998, Schmit 2002).

Θεωρείται πιθανό ότι, η απουσία περιπυρηνικών πολυμερών σωληνίνης από τα κύτταρα, στα οποία έχει διαταραχθεί η ομοιοσταση των ROS, συνδέεται, με κάποιο τρόπο, με την καθυστέρηση της αποδιοργάνωσης του πυρηνικού φακέλου, συμπεριφορά η οποία θα συζητηθεί σε επόμενη ενότητα. Τα ακρόρριζα του φυτού *T. turgidum* που υφίστανται επίδραση κυκλοπιαζονικού οξέος ή βρωμιούχου αιθιδίου, χαρακτηρίζονται από την απουσία περιπυρηνικών πολυμερών σωληνίνης και καθυστέρηση της αποδιοργάνωσης του πυρηνικού φακέλου, ή ακόμη και από πλήρη αναστολή της πορείας αυτής (Zachariadis και συν. 2000, 2004). Στην παρούσα διατριβή, παρατηρήθηκαν επηρεασμένα κύτταρα που διέθεταν πολυάριθμα περιπυρηνικά άτυπα πολυμερή σωληνίνης και στα οποία κύτταρα η αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου είχε καθυστερήσει. Ωστόσο, τα πολυμερή αυτά δεν σχημάτιζαν διπολικό σύστημα.

Υποστηρίζεται, ότι η ενεργοποίηση KOM στην επιφάνεια του πυρήνα επάγεται από παράγοντες οι οποίοι μετακινούνται από το πυρηνόπλασμα στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα (Meier και Brkljacic 2009). Ένας από τους παράγοντες αυτούς είναι η πρωτεΐνη TPX2. Αυτή, κατά τη μεσόφαση, εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα (Vos και συν. 2008). Στο τέλος της φάσης G₂, μετακινείται στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα, όπου φαίνεται ότι συμμετέχει στη δημιουργία της προφασικής ατράκτου (Vos και συν. 2008, Evrard και συν. 2009, Panteris και συν. 2013). Η πρωτεΐνη αυτή θεωρείται ότι λειτουργεί όπως και η ομόλογή της στους ζωικούς οργανισμούς. Είναι ενδιαφέρον ότι στα κύτταρα του *Xenopus*, τόσο η απουσία της όσο και η υπερπαραγωγή της συνοδεύονται από την αναστολή σχηματισμού της ατράκτου (Vos και συν. 2008).

Φυτικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το γονίδιο της TPX2, σχηματίζουν πολλά περιπυρηνικά άτυπα ανθεκτικά πολυμερή σωληνίνης. Η TPX2 συνεντοπίζεται με τα πολυμερή αυτά, γεγονός που υποδηλώνει ότι διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη δημιουργία περιπυρηνικών ΜΣ (Petrovská και συν. 2013). Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι ο πολυμερισμός της σωληνίνης προωθείται από τη Ran GTPάση, η οποία σχετίζεται, επίσης, με την έξοδο της TPX2 από τον πυρήνα (Petrovská και συν. 2013). Πρόσφατα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη ζωικών κυττάρων, έδειξαν ότι η οξειδωτική καταπόνηση συνδέεται με τη λειτουργία της Ran GTPάσης (Datta και συν. 2014). Επομένως, η απουσία περιπυρηνικών ΜΣ και η παρουσία άτυπων πολυμερών σωληνίνης, πιθανόν οφείλονται στη διατάραξη του κύκλου της Ran GTPάσης. Το γεγονός αυτό θα είχε ή απευθείας ή μέσω και της TPX2, αντίκτυπο στον πολυμερισμό της σωληνίνης στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα.

Είναι γνωστό ότι στα ζωικά κύτταρα, η κίνηση Aurora δεσμεύεται στην TPX2 και με τον τρόπο αυτό ενεργοποιείται. Στη συνέχεια, η Aurora φωσφορυλιώνει την TPX2

προωθώντας την πυρήνωση ΜΣ στα κεντροσωμάτια (Vos και συν. 2008). Στο φυτό *A. thaliana*, η AtTXP2 αλληλεπιδρά με τις κινάσες Aurora (Vos και συν. 2008, Petrovská και συν. 2012). Είναι ενδιαφέρον ότι, τα κεντροσωμάτια των ζωικών κυττάρων διαφόρων κυτταρικών σειρών, τα οποία υφίστανται επίδραση με DPI, στερούνται της κινάσης Aurora A. Στα κύτταρα αυτά αναστέλλεται η δημιουργία της μεταφασικής ατράκτου (Scaife 2004). Τα παραπάνω υποστηρίζουν την άποψη ότι πιθανόν οι ROS εμπλέκονται στους μηχανισμούς μεταφοράς ενδοπυρηνικών μορίων στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα, τα οποία επάγουν τη δημιουργία της προφασικής ατράκτου.

IV.3.1.3 Μιτωτική άτρακτος

Η μεταφασική άτρακτος αποτελείται από το σύστημα των δεσμίδων των ΜΣ των κινητοχώρων και από εκείνο των ΜΣ του σκελετού της ατράκτου, τα οποία διαμορφώνουν ένα καλά οργανωμένο διπολικό κυτταροσκελετικό σύστημα. Η δημιουργία δεσμίδων ΜΣ και η πρόσδεσή τους στους κινητοχώρους απαιτεί τη λειτουργία αρκετών MAPs. Κατά την ανάφαση, η μείωση του μήκους των δεσμίδων των ΜΣ των κινητοχώρων και η αμοιβαία ολίσθηση των αλληλεπικαλυπτομένων ΜΣ του σκελετού της ατράκτου, με τη βοήθεια κινησινών, θεωρούνται υπεύθυνες της μετακίνησης των θυγατρικών ομάδων χρωμοσωμάτων προς τους πόλους (Hamada 2014).

Οι μεταβολές των επιπέδων των ROS διαταράσσουν την οργάνωση της μεταφασικής και αναφασικής ατράκτου. Στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων συνδέονται άτυπα πολυμερή σωληνίνης με τυχαίες διευθετήσεις, τα οποία συχνά συγκλίνουν έντονα σε πολλά σημεία. Η αναφασική άτρακτος έχει άτυπη οργάνωση και στερείται διπολικότητας.

Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν προηγούμενες παρατηρήσεις που υποστηρίζουν ότι, παρότι οι μακροσωληνίσκοι και οι παρακρύσταλλοι σωληνίνης έχουν τη δυνατότητα συγκρότησης διπολικών συστημάτων, αυτά έχουν άτυπη οργάνωση και δεν είναι λειτουργικά (Frantzios και συν. 2000, Komis και συν. 2002). Η παρουσία δισφαινόλης A, η οποία οδηγεί στη συγκρότηση μακροσωληνίσκων, διαταράσσει, επίσης, την οργάνωση της μεταφασικής και της αναφασικής ατράκτου (Adamakis και συν. 2013). Εμφανώς διαταραγμένες άτρακτοι άτυπων πολυμερών σωληνίνης σχηματίζονται και στα κύτταρα του ακρόρριζου του φυτού *Lens culinaris*, μετά από έκθεση σε εξασθενές χρώμιο (Eleftheriou και συν. 2013).

Οι ατυπίες της οργάνωσης της ατράκτου επηρεάζουν τη διάταξη των κινητοχώρων των χρωμοσωμάτων στο ισημερινό επίπεδο της ατράκτου, το διαχωρισμό των θυγατρικών ομάδων των χρωμοσωμάτων, όπως και την αναφασική τους μετακίνηση προς τους πόλους. Οι παραπάνω ατυπίες θα μπορούσαν, επίσης, να οφείλονται και σε άλλες αιτίες, όπως στην καθυστέρηση αποδιοργάνωσης του πυρηνικού φακέλου, στην ανασχεση σύνδεσης των

δεσμίδων πολυμερών σωληνίνης με τους κινητοχώρους ή στην αδυναμία αποχωρισμού των θυγατρικών ομάδων χρωμοσωμάτων κατά την έναρξη της ανάφασης (βλέπε παρακάτω).

Οι ουσίες που προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση πιθανόν επηρεάζουν την άτρακτο με διάφορους τρόπους. Είναι γνωστό ότι η μιτωτική άτρακτος είναι ευαίσθητη στην αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου (Hepler 2005), και ότι η οξειδωτική καταπόνηση αυξάνει τη συγκέντρωσή τους στο κυτόπλασμα (Rentel και Knight 2004). Παράλληλα, η επίδραση της ουσίας curcumin, η οποία θεωρείται ότι επάγει την παραγωγή ROS (McNally και συν. 2007), σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπου, προκαλεί τη διατάραξη της οργάνωσης της ατράκτου και του προτύπου εμφάνισης της μιτωτικής κινησίνης Eg5 (Banerjee και συν. 2010). Το γεγονός αυτό οδηγεί στη δημιουργία μονοπολικής ατράκτου στα κύτταρα αυτά. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η curcumin μειώνει τη δυναμική αστάθεια των ΜΣ σε μεγάλο βαθμό (Banerjee και συν. 2010).

Η μείωση των επιπέδων των ROS στα κύτταρα του ακρόρριζου των φυτών *T. turgidum* και *A. thaliana* έχει παρόμοιες επιπτώσεις στη δομή και τη λειτουργία της ατράκτου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι, πιθανόν, σε ορισμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, τα επίπεδα των ROS αυξάνουν σκόπιμα. Σε κάποιες κατηγορίες ζωικών μεταφασικών κυττάρων η phospho-p38 εντοπίζεται στα κεντροσωμάτια μαζί με τη γ-σωληνίνη (Cha και συν. 2007). Με δεδομένο ότι, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η κατάσταση φωσφορυλίωσης της p46-MAPK εξαρτάται από τα επίπεδα των ROS, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η p46 συμμετέχει στους μηχανισμούς πυρήνωσης ΜΣ, οι οποίοι συγκροτούν τα διπολικά συστήματα της ατράκτου και ότι η ενεργοποίησή της εξαρτάται από τις ROS. Θα πρέπει, όμως, να διερευνηθεί εάν: (1) η p46 εμπλέκεται στους μηχανισμούς οργάνωσης της διπολικής ατράκτου, (2) η phospho-p46 βρίσκεται σε θέσεις πυρήνωσης ΜΣ, όπως η επιφάνεια του πυρήνα ή των κινητοχώρων (Cande 1990), και (3) η κατανομή της συμπίπτει με αυτή της γ-σωληνίνης, όπως συμβαίνει στα ζωικά κύτταρα (Cha και συν. 2007).

Στα διαιρούμενα κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *A. thaliana*, οι κινάσες MPK4 και MPK6 εντοπίζονται πλησίον των ΜΣ της ατράκτου (Beck και συν. 2010, Beck και συν. 2011, Komis και συν. 2011). Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούνται σε περιπτώσεις οξειδωτικής καταπόνησης, μπορεί να υποτεθεί ότι η κατανομή αυτών των MAPKs οφείλεται σε μεταβολές των επιπέδων των ROS. Το σκεπτικό αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι η φωσφορυλίωση των MAPs από τις MAPKs, κατά τη μετάφαση, επάγεται και από ROS. Επεκτείνοντας την παραπάνω υπόθεση, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η MAP65-1 αποτελεί στόχο των MAPKs. Η MAP65-1 απουσιάζει από τα μεταφασικά κύτταρα της ρίζας του φυτού *A. thaliana*, επειδή υπερφωσφορυλιώνεται (Smertenko και συν. 2006), ενώ η σχέση της με τις κινάσες MPK4 και MPK6 επιβεβαιώνεται και από πειράματα ανοσοκαθήλωσης (Beck και συν. 2010, Müller και συν. 2010).

Στα διπλά μεταλλάγματα *anp2anp3*, των MAPKKKs ANP2, ANP3 και στα μεταλλάγματα *mrk4* τα ποσοστά φωσφορυλίωσης της MAP65-1 εμφανίζονται μειωμένα (Beck και συν. 2010). Επίσης, είναι ενδιαφέρουσα η πρόσφατη παρατήρηση ότι τα επίπεδα των ROS στα μεταλλάγματα *anp2anp3* είναι ιδιαίτερα χαμηλά (Takáč και συν. 2014). Αυτό μπορεί να συνδυαστεί και με *in vivo* παρατηρήσεις διαιρούμενων κυττάρων *anp2anp3* και *mrk4*, οι οποίες αποκάλυψαν ποικιλία ατυπιών της ατράκτου (Beck και συν. 2011). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι στα πιθανά πρωτεϊνικά μόρια που φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες της οικογένειας MAP65 περιλαμβάνονται και οι κινάσες Aurora (Smertenko και συν. 2006). Συμπερασματικά, είναι εύλογο να υποστηριχθεί ότι η λειτουργία της ατράκτου απαιτεί τη συμμετοχή MAPKs ή άλλων κινασών, οι οποίες συμμετέχουν στην ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση των MAPs με μηχανισμούς, στους οποίους πιθανόν συμμετέχουν οι ROS. Για το λόγο αυτό, θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθούν οι επιπτώσεις της διατάραξης της ομοιόστασης των ROS στο πρότυπο κατανομής και φωσφορυλίωσης των διαφορετικών ισομορφών των MAP65, καθώς είναι γνωστό ότι ορισμένα μέλη της οικογένειας αυτής συμμετέχουν στην οργάνωση της ατράκτου (Hamada 2014).

IV.3.1.4 Φραγμοπλάστης

Στα φυσιολογικά κύτταρα, ο φραγμοπλάστης των ΜΣ αποτελείται από δύο διατάξεις παράλληλων ΜΣ με αντίθετο προσανατολισμό, οι οποίες εμφανίζονται μεταξύ των δύο ομάδων θυγατρικών χρωμοσωμάτων. Βαθμιαία, επεκτείνεται προς την περιφέρεια του κυττάρου με πολυμερισμό νέων ΜΣ στα περιθώριά του και ταυτόχρονο αποπολυμερισμό των ΜΣ από τις κεντρικές θέσεις. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι, όταν τα επίπεδα των ROS μεταβάλλονται, διαταράσσεται η πορεία της κυτοκίνησης. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα επηρεασμένα κυτοκινητικά κύτταρα, αλλά και τα αντίστοιχα κύτταρα του μεταλλάγματος *rhd2*, διέθεταν φραγμοπλάστες αποτελούμενους από άτυπα πολυμερή σωληνίνης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση ή την αναστολή της επέκτασής τους προς την περιφέρεια του κυττάρου, γεγονός το οποίο επηρέαζε σε σημαντικό βαθμό το σχηματισμό της κυτταρικής πλάκας (βλέπε παρακάτω).

Η αδυναμία συγκρότησης λειτουργικού φραγμοπλάστη μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι αυτός αποτελείται από άτυπα πολυμερή σωληνίνης. Όπως συζητήθηκε παραπάνω, τα άτυπα πολυμερή πιθανόν έχουν διαφορετικές δυναμικές ιδιότητες. Οι διαδικασίες συνεχούς πολυμερισμού και αποπολυμερισμού ΜΣ που απαιτούνται για την επέκταση του φραγμοπλάστη (Verma 2001) προϋποθέτουν τοπικές αυξομειώσεις των συγκεντρώσεων των κυτοπλασματικών ιόντων ασβεστίου (Hepler 1994). Επομένως, εάν η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει τις διαβαθμίσεις των ιόντων αυτών, είναι λογικό να αναστέλλεται η επέκταση του φραγμοπλάστη.

Πιθανόν, οι ROS συμμετέχουν και στους μηχανισμούς μεταγωγής μηνυμάτων που ελέγχουν την πορεία της κυτοκίνησης, με τρόπο όμοιο με εκείνον που προτάθηκε για τις άλλες φάσεις της κυτταροδιαίρεσης. Τα μεταλλάγματα *anp2anp3* που αναφέρθηκαν νωρίτερα, τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα ROS, εμφανίζουν πολύ έντονη παρουσία πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Takáč και συν. 2014). Στη ρίζα των φυτών αυτών διαταράσσεται η οργάνωση του φραγμοπλάστη και δημιουργούνται διπύρηνα ή και πολυπύρηνα κύτταρα (Beck και συν. 2011). Παρόμοιες ατυπίες διαπιστώθηκαν και στα μεταλλάγματα *mpk4* του φυτού *Arabidopsis* (Beck και συν. 2011).

Πρέπει να σημειωθεί ότι η παρατήρηση ζωντανών κυττάρων από κατάλληλα μετασηματισμένα αρτίβλαστα των μεταλλαγμάτων αυτών, τα οποία εξέφραζαν 35S::GFP:MBD, αποκάλυψε ότι η κυτοκίνηση έχει αρκετά μεγαλύτερη διάρκεια σε σύγκριση με εκείνη στα ακρόρριζα αγρίου τύπου (Beck και συν. 2011). Στα αρτίβλαστα του αγρίου τύπου, οι MPK4 και MPK6 εντοπίζονται, τόσο στα αρχικά στάδια της κυτοκίνησης, όσο και σε τελικά στάδια μεταξύ των ΜΣ του φραγμοπλάστη (Komis και συν. 2011). Οι πρωτεΐνες αυτές, όπως και οι ομόλογές τους στο φυτό *Nicotiana tabacum*, εμπλέκονται στη στρατολόγηση MAP65 και άλλων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, κατά τη διάρκεια της κυτοκίνησης (Komis και συν. 2011, Sasabe και Machida 2014). Επομένως, μπορεί να υποθεθεί ότι οι ROS ελέγχουν την οργάνωση και τη λειτουργία του φραγμοπλάστη, ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα των MAPs μέσω MAPKs.

IV.3.1.5 Επανεμφάνιση του περιφερειακού κυτταροσκελετού κατά την έξοδο του κυττάρου από την κυτταροδιαίρεση

Στα κυτοκινητικά και μετακυτοκινητικά κύτταρα, στα οποία είχαν διαταραχθεί τα επίπεδα των ROS, ήταν εμφανής η παρουσία άτυπων πολυμερών σωληνίνης σε τυχαίες κυτοπλασματικές θέσεις. Το γεγονός υποδηλώνει ότι, σε αυτή τη φάση του κυτταρικού κύκλου διαταράσσεται η κατανομή των πρωτεϊνών, οι οποίες ελέγχουν την πυρήνωση της σωληνίνης. Στα φυσιολογικά μετακυτοκινητικά κύτταρα, εμφανίζονται περιπυρηνικοί ΜΣ διατεταγμένοι ακτινωτά. Από ορισμένους ερευνητές έχει υποστηριχθεί ότι ευθύνονται για τη δημιουργία του περιφερειακού συστήματος ΜΣ, όταν τα θυγατρικά κύτταρα εισέρχονται στη μεσόφαση, μετά την ολοκλήρωση της κυτοκίνησης (Kumagai και συν. 2003). Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι, στα μετακυτοκινητικά κύτταρα, η πυρήνωση των ΜΣ διεξάγεται στο περιφερειακό κυτόπλασμα από σύμπλοκα που περιέχουν γ-σωληνίνη (Shaw 2013). Στην οργάνωση του περιφερειακού συστήματος των ΜΣ συμμετέχουν, επίσης, διάφορες MAPs (Shaw 2013).

Στη σύνδεση των περιφερειακών ΜΣ με το πλασμαλήμμα συμμετέχει η πρωτεΐνη CLASP (Ambrose και Wasteney 2008), ενώ η πρωτεΐνη EB1 σχετίζεται με τις θέσεις πυρήνωσης των περιφερειακών ΜΣ (Chan και συν. 2003). Σε κύτταρα HeLa, έχει βρεθεί ότι οι CLASPs, CLASP1 και CLASP2, συνδέονται στους ΜΣ και την EB1, ευνοώντας την πρόσδεση των ΜΣ στην περιφέρεια του κυττάρου (Mimori-Kiyosue και συν. 2005). Επιπλέον, κατά τη μετανάστευση των κυττάρων του ενδοθηλίου, η EB1 και η σχετιζόμενη με τις CLASPs, CLIP-170 επηρεάζουν την οργάνωση των περιφερειακών ΜΣ (Schuyler και Pellman, 2001, Gundersen, 2002, Ikeda και συν. 2005). Όμως, η κατανομή της CLIP-170 εξαρτάται από την παραγωγή ROS από την NADPH-οξειδάση (Ushio-Fukai 2009), ενώ η κατάσταση της φωσφορυλίωσης της EB1 επηρεάζεται από τις ROS (Le Grand και συν. 2014).

Βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι, μετά το τέλος της κυτταροδιαίρεσης, η παραγωγή ROS από τις NADPH-οξειδάσες στην περιφέρεια του κυττάρου, συμμετέχει στην οργάνωση του περιφερειακού συστήματος των ΜΣ. Σε πολλά επηρεασμένα μετακυτοκινητικά κύτταρα, διαταράσσεται η συγκρότηση του περιφερειακού συστήματος πολυμερών σωληνίνης. Φυσικά, δεν αποκλείεται ότι, όταν μεταβάλλονται τα επίπεδα των ROS, επηρεάζεται η δραστηριότητα κινασών, οι οποίες εμπλέκονται στην οργάνωση των συστημάτων των περιφερειακών ΜΣ, όπως είναι οι ANP2, ANP3, MPK4, MPK6 (βλέπε Komis και συν. 2011).

Τα δεδομένα μας, σε συνδυασμό με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, δείχνουν ότι τα επίπεδα των ROS αυξομειώνονται κατά την διάρκεια της κυτταροδιαίρεσης. Το γεγονός αυτό συμβάλλει στην αναδιοργάνωση των διαφόρων συστημάτων ΜΣ των διαιρούμενων κυττάρων, πορεία η οποία διακόπτεται, όταν τα επίπεδα των ROS μεταβάλλονται δραματικά. Επομένως, ο έλεγχος των επιπέδων των ROS φαίνεται ότι είναι απαραίτητος για την ομαλή διεξαγωγή της μίτωσης και της κυτοκίνησης. Ωστόσο, η ομοιόσταση των ROS δεν είναι σημαντική μόνο για τον κυτταροσκελετό της σωληνίνης. Όπως θα συζητηθεί παρακάτω, τα επίπεδά τους συνεχώς αυξομειώνονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου των φυτικών κυττάρων, με πιθανό αποτέλεσμα την εμπλοκή τους σε περισσότερα φαινόμενα της πορείας αυτής.

IV.3.2 ROS και έλεγχος του κυτταρικού κύκλου

Η θεώρηση των δεδομένων της διατριβής αποκαλύπτει ότι η διατάραξη των επιπέδων των ROS στο ακρόρριζο επηρεάζει την πορεία του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, καθυστερεί ή αναστέλλεται η είσοδος των μεσοφασικών κυττάρων σε διαίρεση, η μετάβαση των προφασικών κυττάρων στην προμετάφαση, επιβραδύνεται η πορεία της μετάφασης και της ανάφασης και τέλος, η έξοδος των κυττάρων από την κυτοκίνηση. Οι ατυπίες της

οργάνωσης της μιτωτικής και κυτοκινητικής συσκευής, οι οποίες συζητήθηκαν στην προηγούμενη ενότητα, είναι δυνατό να ερμηνεύσουν μερικά από τα παραπάνω φαινόμενα. Ωστόσο, η επιβράδυνση της πορείας διαφόρων γεγονότων του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένης της εναλλαγής των διαδοχικών συστημάτων ΜΣ, θα μπορούσε να αποδοθεί στην απορρύθμιση και άλλων μηχανισμών ελέγχου. Η επιβράδυνση της πορείας του κυτταρικού κύκλου είναι ενδεχομένως αποτέλεσμα της λειτουργίας προστατευτικών μηχανισμών, οι οποίοι ελαχιστοποιούν τις καταστροφικές επιπτώσεις των δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών στην ανάπτυξη των φυτών (βλέπε επίσης Frantzios και συν. 2000).

Ωστόσο, βιβλιογραφικά δεδομένα, αλλά και δεδομένα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, επιτρέπουν τη διατύπωση της άποψης ότι οι ROS δεν σχετίζονται μόνο με την πρόκληση καταπονήσεων, αλλά λειτουργούν και ως μόρια μεταγωγής μηνύματος, ρυθμίζοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών (Tsukagoshi 2012). Είναι γνωστό ότι τα επίπεδα των ROS μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, τόσο στα ζωικά όσο και στα φυτικά κύτταρα (Potters και συν. 2002, Burhans και Heintz 2009). Αντίστοιχες μεταβολές υφίστανται και οι αντιοξειδωτικές ενώσεις, πιθανόν, για να προστατευθούν τα διαιρούμενα κύτταρα από την αύξηση των επιπέδων ROS (Potters και συν. 2009, Vivancos και συν. 2010). Τα παραπάνω οδήγησαν στην υπόθεση, ότι υπάρχουν σημεία του κυτταρικού κύκλου, τα οποία ελέγχονται από τις ROS και ότι, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, πραγματοποιούνται κύκλοι οξειδωσης και αναγωγής (Menon και Goswami 2007, Vivancos και συν. 2010).

Στα ζωικά κύτταρα, η επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης από αναπτυξιακούς παράγοντες επιτυγχάνεται με τροποποίηση των μηχανισμών μεταγωγής μηνύματος, η οποία οφείλεται στη διέγερση παραγωγής χαμηλών ποσοτήτων H_2O_2 από την NADPH-οξειδάση (Burhans και Heintz 2009). Αντίστοιχα, η συσσώρευση $O_2^{\cdot-}$ στο μερίστωμα της ρίζας του φυτού *A. thaliana*, σχετίζεται με την ικανότητα διαίρεσης των κυττάρων (Tsukagoshi και συν. 2010). Πρέπει να σημειωθεί ότι στο φυτό *A. thaliana*, η επίδραση με 1 mM H_2O_2 , για 24 h, προκαλεί μείωση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με την πορεία του κυτταρικού κύκλου (Tsukagoshi 2012). Επιπλέον, η επίδραση 50 μ M MEN σε κύτταρα καλλιέργειας BY-2, καθυστέρησε τη μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G_1 στην φάση S και την είσοδό τους στη μίτωση (Reichheld και συν. 1999). Η μετάβαση από τη φάση G_2 στη μίτωση διακόπτεται και σε κύτταρα HeLa επηρεασμένα με MEN (Acharya και συν. 2009), ενώ η πρόοδος της μίτωσης διαταράσσεται σε κύτταρα MCF-7 που υφίστανται την επίδραση της curcumin (Banerjee και συν. 2010).

Η παρουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων ή η μείωση των επιπέδων των ROS δεν δρα κατ' ανάγκη προστατευτικά ή ενισχυτικά στην πορεία του κυτταρικού κύκλου. Η

υπερπαραγωγή της καταλάσης καθυστερεί τη μετάβαση στην S φάση σε ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικού (Onumah και συν. 2009). Σε ζωικά κύτταρα, η επίδραση με DPI διακόπτει την πορεία του κυτταρικού κύκλου σε διάφορα σημεία, ενώ, μεταξύ άλλων, προκαλεί συσσώρευση των κυττάρων στην προμετάφαση (Scaife 2005). Η παρουσία δεοξυασκορβικού και ασκορβικού οξέος σε κύτταρα καλλιέργειας του φυτού *Nicotiana tabacum*, τα οποία ήταν συγχρονισμένα στη φάση G₁, προκάλεσε καθυστέρηση της πορείας της μίτωσης (Potters και συν. 2000). Στην περίπτωση μας, διαπιστώθηκε ότι, στα ακρόρριζα των αγγειοσπέρμων, τόσο η επαγωγή οξειδωτικής καταπόνησης όσο και η μείωση των επιπέδων των ROS, διαταράσσουν την πορεία του κυτταρικού κύκλου.

Τα παραπάνω δεδομένα καθιστούν σαφές ότι ο ρόλος των ROS στη διεξαγωγή του κυτταρικού κύκλου είναι πολύπλοκος. Οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων φαίνεται ότι υπόκεινται στον έλεγχο κυτταρικών μηχανισμών, οι οποίοι αφενός προστατεύουν τα κύτταρα από τις οξειδωτικές βλάβες και αφετέρου επιτρέπουν στις ROS να δρουν ως μόρια μεταγωγής μηνύματος. Σε κύτταρα καλλιέργειας του φυτού *Medicago*, οι ROS ενεργοποιούν τη μετάβαση των κυττάρων από την φάση G₀ στη G₁ (Fehér και συν. 2008), ενώ, στο ακρόρριζο του φυτού *A. thaliana*, η επίδραση γλουταθειόνης οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των διαιρούμενων κυττάρων (Sánchez-Fernández και συν. 1997). Μάλιστα, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι διακυμάνσεις του ασκορβικού και δεοξυασκορβικού οξέος, οι οποίες εκδηλώνονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, συμβάλλουν στην ανίχνευση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων και εξασφαλίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (de Pinto και συν. 1999). Η πιο ενδιαφέρουσα περίπτωση ρύθμισης οξειδοαναγωγικής κατάστασης διαπιστώθηκε σε κύτταρα καλλιέργειας κυττάρων *A. thaliana*, στα οποία η συγκέντρωση της γλουταθειόνης υπόκειται σε δυναμική ρύθμιση (Vivancos και συν. 2010). Κατά τη φάση G₁, όπου τα επίπεδα των ROS ανεβαίνουν, η γλουταθειόνη μετακινείται στον πυρήνα. Το γεγονός αυτό, επιτρέπει αφενός την αύξηση των ROS στο κυτόπλασμα και αφετέρου προστατεύει τον πυρήνα από οξειδωτικές βλάβες (Vivancos και συν. 2010).

Τα κύτταρα, κατά τη μετάβασή τους από το ένα στάδιο του κυτταρικού κύκλου στο επόμενο, διέρχονται από συγκεκριμένα σημεία ελέγχου της κανονικότητας της πορείας. Τα σημεία αυτά καθορίζονται από τις CDKs, η δραστηριότητα των οποίων ρυθμίζεται, μεταξύ άλλων, από φωσφορυλίωση/αποφωσφορυλίωση, τη δέσμευση κυκλινών, και την πρόσδεση ανασταλτικών συμπαραγόντων (Kujit και Schnittger 2007). Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το εύρημα ότι, η επίδραση με DPI, NAC, MEN και H₂O₂ σε διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis* GUS:CyclinB1, προκαλεί μείωση ή και αναστολή της έκφρασης του γονιδίου της κυκλίνης αυτής. Επομένως, οι σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των ROS διαταράσσουν το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου της κυκλίνης B1. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται και από προηγούμενα

δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία το H_2O_2 προκαλεί μείωση της έκφρασης του γονιδίου της κυκλίνης B1 (Tsukagoshi και συν. 2012), ενώ η MEN μειώνει τα επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων των κυκλινών A (Reichheld και συν. 1999). Επιπλέον, σε ινοβλάστες ποντικού, το DPI επιφέρει μείωση των επιπέδων της κυκλίνης B (Scaife 2004).

Είναι γνωστό ότι, στα φυτικά κύτταρα, οι ROS εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των CDKA1 (Fehér και συν. 2008). Επίσης, μελέτες σε ζωικά κύτταρα δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση της p38-MAPK, κατά τη μετάβαση G_2/M , ευθύνεται για τη φωσφορυλίωση της φωσφατάσης Cdcc25B (Cha και συν. 2007, βλέπε επίσης Cuenda και Rousseau 2007). Επομένως, οι αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων μάλλον εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων ή της δραστηριότητας πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου.

Στο σημείο αυτό, πρέπει να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση των CDKs μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση διαφόρων στόχων. Μεταξύ αυτών είναι οι MAPs, κινάσες που εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση των MAPs ή μονοπάτια MAPKs, τα οποία ελέγχουν τη μετάβαση των κυττάρων από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην άλλη (Hamada 2007, Sasabe και συν. 2011β). Ως εκ τούτου, η ανάσχεση διαφόρων φαινομένων του κυτταρικού κύκλου, όταν τα επίπεδα των ROS μεταβάλλονται, μπορεί να οφείλεται σε περισσότερες από μία αιτίες.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανάσχεση του αποχωρισμού των θυγατρικών χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση, που διαπιστώθηκε σε αναφασικά κύτταρα ακρόρριζου, στα οποία είχαν διαταραχθεί τα επίπεδα των ROS. Εκ πρώτης όψεως, το φαινόμενο μπορεί να αποδοθεί στις διαταραχές οργάνωσης και λειτουργίας της αναφασικής ατράκτου. Ωστόσο, ο αποχωρισμός των χρωμοσωμάτων, τα οποία μέχρι το τέλος της μετάφασης βρίσκονται συνδεδεμένα με το σύμπλοκο της Cohesin, εξαρτάται από τη δραστηριότητα πρωτεασών που ονομάζονται σεπαράσες. Αυτές, πριν από την έναρξη της ανάφασης, συνδέονται σε μία μικρή πρωτεΐνη, η οποία ονομάζεται Securin. Η σύνδεση αναστέλλει τη δραστηριότητα της σεπαράσης. Το σύμπλοκο APC ευθύνεται για την αποικοδόμηση της Securin και την απελευθέρωση της σεπαράσης, η οποία, καταστρέφοντας το σύμπλοκο της Cohesin, επιτρέπει τον αποχωρισμό των θυγατρικών χρωμοσωμάτων (Chang και συν. 2004, Wu και συν. 2010, Moschou και συν. 2012). Στα ζωικά κύτταρα η επίδραση με H_2O_2 αναστέλλει τη λειτουργία του APC και την απελευθέρωση της σεπαράσης (Chang και συν. 2004). Επομένως, η διατάραξη του αποχωρισμού των θυγατρικών χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση πιθανόν επιτείνεται και από τη δυσλειτουργία άλλων μηχανισμών, που επηρεάζονται από τις ROS, και είναι ανεξάρτητοι από την κατάσταση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης. Πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο στα ζωικά όσο και τα φυτικά κύτταρα, ο αποχωρισμός των θυγατρικών χρωμοσωμάτων σχετίζεται και με την

ενεργοποίηση των κινασών Aurora (Kurihara και συν. 2008). Τουλάχιστον στα ζωικά κύτταρα, τα επίπεδα των κινασών αυτών επηρεάζονται, έπειτα από επίδραση με DPI (Scaife 2004, 2005). Εκτός, από την αποσύνδεση των θυγατρικών χρωμοσωμάτων, οι κινάσες Aurora σχετίζονται και με ένα άλλο φαινόμενο, το οποίο λαμβάνει χώρα κατά τη μετάβαση των κυττάρων από την πρόφαση στην προμετάφαση, την αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου στο τέλος της πρόφασης (Kurihara και συν. 2008).

Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι, στα επηρεασμένα ακρόρριζα, πολλά κύτταρα συσσωρεύονται στην πρόφαση και την κυτοκίνηση. Τα γεγονότα αυτά μπορούν να αποδοθούν στη συμπεριφορά του πυρηνικού φακέλου, εν μέρει. Η μελέτη των επηρεασμένων κυττάρων, έπειτα από ανοσοεντόπιση των πρωτεϊνών που φέρουν το πεπτίδιο HDEL, καθώς και από παρατηρήσεις με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν ότι, τόσο η αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου στο τέλος της πρόφασης, όσο και η επανασυγκρότησή του κατά την τελόφαση, διαταράσσονται σημαντικά, όταν μεταβάλλεται η ομοιόσταση των επιπέδων των ROS. Το πρώτο φαινόμενο θα μπορούσε να σχετίζεται με τη δραστηριότητα των περιπυρηνικών ΜΣ (Hepler και Hush 1996). Στην περίπτωση μας, όμως, η καθυστέρηση της αποδιοργάνωσης του πυρηνικού φακέλου εκδηλώνεται ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι πολυμερών σωληνίνης στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα. Επομένως, φαίνεται περισσότερο πιθανόν ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου.

Είναι γνωστό ότι η αποδιοργάνωση αυτή περιλαμβάνει την ταχύτατη απομάκρυνση των πρωτεϊνικών συμπλόκων των πυρηνικών πόρων, γεγονός που οδηγεί στην άμεση επικοινωνία με το κυτόπλασμα και επιτρέπει την είσοδο της κυκλίνης B1 και των CDKs στο πυρηνόπλασμα. Ακολουθεί σειρά γεγονότων φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης του πυρηνικού φακέλου και εκείνων που διαμορφώνουν ένα δίκτυο όμοιο με αυτό των λαμινών στα ζωικά κύτταρα. Οι φωσφορυλίώσεις έχουν ως αποτέλεσμα την κατάρρευση του πυρηνικού φακέλου (Evans και συν. 2011). Λαμβάνοντας υπόψη, ότι η διατάραξη των επιπέδων των ROS αλλοιώνει το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου της κυκλίνης B1, μπορούμε να υποθέσουμε, ότι με τον ίδιο τρόπο σχετίζεται η ομοιόσταση των ROS με τον έλεγχο της συμπεριφοράς του πυρηνικού φακέλου. Η σχέση των ROS με τις λαμίνες υποστηρίζεται και από δεδομένα μελετών σε ζωικά κύτταρα, τα οποία αποδεικνύουν ότι η οξειδωτική καταπόνηση προκαλεί τη συσσώρευση της λαμίνης B1 στην εσωτερική μεμβράνη του πυρηνικού φακέλου, η οποία μάλιστα εξαρτάται από την ενεργοποίηση της p38-MAPK (Barascu και συν. 2012).

Επιπλέον, είναι γνωστό ότι, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, η ήπια οξειδωτική καταπόνηση ελέγχει την ομοιόσταση των κυτοπλασματικών ιόντων ασβεστίου, μέσω των καναλιών ιόντων TPC (two-pore channel protein, Kadota και συν. 2005).

Υποστηρίζεται ότι η συμπεριφορά του πυρηνικού φακέλου κατά την προμετάφαση και την τελόφαση σχετίζεται με αύξηση των ιόντων ασβεστίου (Hepler 1994). Εάν αυτό είναι σωστό, είναι λογικό να διαταράσσεται η συμπεριφορά του πυρηνικού φακέλου, λαμβάνοντας υπόψη ότι, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, μεταβάλλεται η ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου, όταν αλλάζει το πρότυπο κατανομής των ROS.

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι οι ROS εμπλέκονται στους μηχανισμούς συγκρότησης και αποσυγκρότησης του πυρηνικού φακέλου κατά τη διάρκεια της κυτταροδιαίρεσης. Θα είχε ενδιαφέρον να διερευνηθεί, εάν οι ROS επηρεάζουν τη συμπεριφορά του πυρηνικού φακέλου και σε διαιρούμενα κύτταρα ορισμένων κατώτερων φυτών, στα οποία ο πυρηνικός φάκελος δεν αποδιοργανώνεται στο τέλος της πρόφασης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενδοπυρηνικής μιτωτικής ατράκτου (Evans και συν. 2011).

IV.3.3 ROS και ανάπτυξη της κυτταρικής πλάκας

Τα πειραματικά δεδομένα αυτής της εργασίας έδειξαν ότι, όταν μεταβάλλονται τα επίπεδα των ROS, αναστέλλεται η δημιουργία ή η ανάπτυξη της κυτταρικής πλάκας. Η αναστολή σχηματισμού και ο βαθμός διατάραξης της κυτοκινητικής αυτής δομής σχετίζονται με τη φάση, στην οποία βρίσκotan το κύτταρο κατά την έναρξη της επίδρασης. Προφανώς, οι ατυπίες της κυτταρικής πλάκας, έχουν άμεση σχέση με εκείνες του φραγμοπλάστη (βλέπε ενότητα III.4.5), είναι δε σε κάποιο βαθμό συγκρίσιμες με εκείνες που παρατηρήθηκαν σε κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *T. turgidum*, τα οποία είχαν υποστεί την επίδραση αργιλίου (Frantzios και συν. 2001). Επιπλέον, τα κυτοκινητικά κύτταρα των μεταλλαγμάτων *mor1* του φυτού *Arabidopsis* παρουσιάζουν σειρά ατυπιών της δομής της κυτταρικής πλάκας (Eleftheriou και συν. 2005).

Στα αρχικά στάδια σχηματισμού του φραγμοπλάστη των μακροσωληνίσκων των επηρεασμένων κυττάρων, απουσιάζουν οι συναθροίσεις κυστιδίων από την κεντρική περιοχή του, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές στα φυσιολογικά κυτοκινητικά κύτταρα. Παράλληλα αναστέλλεται η επέκταση των κυτταρικών πλακών, η έναρξη δημιουργίας των οποίων είχε προηγηθεί εκείνης της επίδρασης. Τόσο στην πρώτη όσο και στη δεύτερη περίπτωση, εκτός από την ανάσχεση της επέκτασης του φραγμοπλάστη των μακροσωληνίσκων, δεν αποκλείεται ότι οι μακροσωληνίσκοι στερούνται της ικανότητας καθοδήγησης των κυστιδίων των δικτυοσωματίων στο επίπεδο της κυτταρικής πλάκας. Η διατάραξη της μεταφοράς κυστιδίων, στα επηρεασμένα με MEN κυτοκινητικά κύτταρα, ίσως οφείλεται στον πολύ μικρό αριθμό ΜΣ που παρατηρούνται στα συγκεκριμένα κύτταρα.

Γνωρίζοντας ότι τα κυστίδια των δικτυοσωματίων οδηγούνται στο επίπεδο της κυτταρικής πλάκας από τους ΜΣ με τη συμμετοχή κινησινών (Jürgens 2005), μπορούμε να

υποθέσουμε ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS τροποποιεί τη λειτουργία των κινησινών ή ότι αυτή επηρεάζεται από την παρουσία πολυμερών που περιέχουν σωληνίνη, η οποία έχει υποστεί κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Τουλάχιστον στα ζωικά κύτταρα, οι τροποποιήσεις της σωληνίνης φαίνεται ότι επηρεάζουν τη μεταφορά κυστιδίων (βλέπε Hammond και συν. 2008).

Εκτός από τη διαταραχή της δραστηριότητας των MAPs, η αλλαγή της ομοιόστασης των ROS μπορεί να επηρεάζει και την ενεργοποίηση των MAPKs. Στα κύτταρα του ακρόρριζου των διπλών μεταλλαγμάτων *anp2anp3 Arabidopsis*, παρατηρήθηκαν ατελή θυγατρικά τοιχώματα (Beck και συν. 2011). Τα κυτοκίνητικά κύτταρα της ρίζας στα μεταλλάγματα *Arabidopsis mpk4* διέθεταν, επίσης, άτυπες κυτταρικές πλάκες. Αυτές, συχνά, είχαν τυχαίο προσανατολισμό, ενώ σε ορισμένα μεταλλάγματα διαπιστώθηκαν κυτταρικές πλάκες ασυνήθιστα διογκωμένες (Kosetsu και συν. 2010). Οι Kosetsu και συν. (2010) υποστήριξαν ότι η MPK4, η οποία εντοπίζεται και στις κυτταρικές πλάκες, συμμετέχει στην πορεία της κυτοκίνησης, ρυθμίζοντας ανεξάρτητους από τους ΜΣ μηχανισμούς. Εάν δεχθούμε ότι οι ROS εμπλέκονται στη δημιουργία της κυτταρικής πλάκας, παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι, στα μεταλλάγματα *anp2anp3*, τα επίπεδα των ROS είναι χαμηλότερα, σε σύγκριση με εκείνα των φυτών αγρίου τύπου (Takáč και συν. 2014), ενώ η MPK4 εμπλέκεται στην ομοιόσταση των ROS (Pitzschke και συν. 2009β).

Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι, οι επιδράσεις με ενώσεις που μεταβάλλουν τα επίπεδα των ROS, διαταράσσουν τη δομή και τη λειτουργία των δικτυοσωματίων. Μερικές φορές αυτά αποκτούν σχετικά μεγάλο μέγεθος και κυπελοειδές σχήμα, ενώ στο εσωτερικό τους εντοπίζονται κυτοπλασματικά στοιχεία. Λόγω του σχήματος αυτού, τα επηρεασμένα δικτυοσωμάτια εμφανίζονται σε λεπτές τομές ως δακτυλιοειδή. Είναι σαφές ότι διαταράσσεται δραματικά η παραγωγή των κυστιδίων των δικτυοσωματίων, αλλά και η μεταφορά τους. Παρόμοιες επιπτώσεις στη δομή των δικτυοσωματίων διαπιστώθηκαν σε κύτταρα BY-2 επηρεασμένα με 1-βουτανόλη, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι η παραγωγή κυστιδίων εξαρτάται από το PA (Langhans και Robinson 2007).

Η οξειδωτική καταπόνηση διαταράσσει σε μεγάλο βαθμό τη δομή των δικτυοσωματίων των ζωικών κυττάρων (Jiang και συν. 2011). Στο δικό μας υλικό διαταράσσεται η κατανομή των PLDs των επηρεασμένων κυτοκίνητικών κυττάρων, ενώ η ένταση του φθορισμού που εκπέμπουν εμφανίζεται μειωμένη. Επομένως, δεν αποκλείεται ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS αλλοιώνει τη δομή των δικτυοσωματίων, επηρεάζοντας τις PLDs. Για παράδειγμα, σε φυτικά κύτταρα καλλιεργειών, το H_2O_2 ενεργοποιεί την PLD (Yamaguchi και συν. 2004). Θα πρέπει να σημειωθεί, όμως, ότι, στην περίπτωση του αναστολέα LY294002, η διατάραξη της παραγωγής κυστιδίων από τα δικτυοσωμάτια πιθανόν σχετίζεται με την ανάσχεση της PI3P από την PI3K. Η 1-βουτανόλη (Langhans και Robinson 2007), αλλά και ο LY294002 επηρεάζουν τη συσσώρευση των

ARFs (ADP-Ribosylation Factors, παράγοντας ριβοζυλίωσης ADP), και των Rab GTPασών (Langhans και Robinson 2007, Takáč και συν. 2013).

Οι ARFs και οι Rab GTPάσες είναι μικρές GTPάσες, η δραστηριότητα των οποίων εμπλέκεται στην παραγωγή κυστιδίων από τη μεμβράνη «δότη» και στη σωστή στόχευσή τους στη μεμβράνη υποδοχής (Nielsen και συν. 2008). Εντοπίζονται στο TGN και στα ενδοσώματα και συμμετέχουν στη στόχευση των κυστιδίων στην κυτταρική πλάκα (Jürgens 2005, McMichael και Bednarek 2013). Οι GTPάσες προκαλούν μεν την παραγωγή ROS, υποστηρίζεται δε ότι η δραστηριότητά τους εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση (Wu και συν. 2011, Ferro και συν. 2012). Εάν όσα αναφέρονται παραπάνω συμβαίνουν και κατά την κυτοκίνηση των φυτικών κυττάρων, μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι σημαντικές μεταβολές των επιπέδων των ROS διαταράσσουν την παραγωγή κυστιδίων στα δικτυοσωμάτια και τα ενδοσώματα ή και τη στόχευσή τους στην κυτταρική πλάκα.

Πρόσφατα δεδομένα μελέτης ζωικών κυττάρων, αναφέρουν την ύπαρξη ROS στα ενδοσώματα, οι οποίες παράγονται κυρίως από τις NADPH-οξειδάσες, φαινόμενο το οποίο θεωρείται ότι συνδέεται και με μηχανισμούς σηματοδότησης (Davis Volk και Moreland 2014). Σύμφωνα με τους Dhonukshe και συν. (2006), ενδοκυττωτικά κυστίδια που παράγονται από το πλασμαλήμμα, μεταφέρουν στην κυτταρική πλάκα υλικά του μητρικού κυτταρικού τοιχώματος, όπως για παράδειγμα τις μερικώς εστεροποιημένες ομογαλακτουρονάνες, οι οποίες αναγνωρίζονται από το αντίσωμα JIM5. Η μεταφορά αυτών των πολυσακχαριτών στην κυτταρική πλάκα πραγματοποιείται μέσω των ενδοσωμάτων, ενώ αυτή των εστεροποιημένων πηκτινών μέσω κυστιδίων δικτυοσωματίων (Dhonukshe και συν. 2006). Η εφαρμογή του αντισώματος JIM5 στα επηρεασμένα κυτοκινητικά κύτταρα αποκάλυψε μεν πολυάριθμους φθορίζοντες σχηματισμούς στο κυτόπλασμα, ελάχιστους δε στην περιοχή της κυτταρικής πλάκας. Μάλιστα, σε ορισμένα κύτταρα υπήρχαν πλήρως σχηματισμένες κυτταρικές πλάκες, οι οποίες δεν περιείχαν μερικώς εστεροποιημένες ομογαλακτουρονάνες. Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολυάριθμων φθορίζόντων σφαιρικών κυτοπλασματικών σχηματισμών, γεγονός που υποστηρίζει ότι, ενώ δεν επηρεάζεται η πορεία ενδοκύτωσης των ως άνω πηκτινών, αναστέλλεται η μεταφορά τους από τα ενδοσώματα στην κυτταρική πλάκα. Η μεγαλύτερη ένταση του φαινομένου στα κύτταρα τα επηρεασμένα με DPI, υποδηλώνει ότι, και στα φυτικά κύτταρα, οι NADPH-οξειδάσες πιθανόν συμμετέχουν στους μηχανισμούς σηματοδότησης που λειτουργούν στα ενδοσώματα και στη στόχευση των κυστιδίων τους στην κυτταρική πλάκα (βλέπε επίσης Davis Volk και Moreland 2014).

Στα επηρεασμένα κύτταρα, ακόμη και όταν τα κυστίδια φθάνουν στην περιοχή της κυτταρικής πλάκας, η σύντηξή τους διαταράσσεται ή δεν πραγματοποιείται. Η μελέτη κυτοκινητικών κυττάρων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε πολυάριθμα κυστίδια, τα οποία φαίνεται ότι δεν συντήκονται μεταξύ τους. Στα κύτταρα, στα οποία είχε ξεκινήσει η διαδικασία σχηματισμού της κυτταρικής πλάκας στο ισημερινό επίπεδο, παρατηρούνται σε

κεντρικό επίπεδο του κυττάρου νησίδες μεμβρανικού υλικού ή διογκωμένοι σχηματισμοί. Η ανοσοσήμανση με αντίσωμα που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη KNOLLE, αποκάλυψε την ύπαρξη πιθανής διαταραχής στην πορεία σύντηξης των κυστιδίων. Φυσιολογικά, η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται στις κυτταρικές πλάκες και συμμετέχει στη σύντηξη των κυστιδίων (Lauber και συν. 1997). Στα επηρεασμένα κύτταρα, εντοπίζεται στις σταθεροποιημένες κυτταρικές πλάκες, η επέκταση των οποίων προς την περιφέρεια του κυττάρου έχει ανασταλεί. Συχνά, στα κύτταρα, τα οποία φέρουν διογκωμένους μεμβρανικούς σχηματισμούς στο επίπεδο της κυτταρικής πλάκας, το σήμα της πρωτεΐνης αυτής απουσιάζει ή εντοπίζεται στην περιφέρεια των σχηματισμών αυτών.

Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι ROS ελέγχουν τη σύντηξη των κυστιδίων στην κυτταρική πλάκα, λαμβάνοντας μέρος πιθανόν στη ρύθμιση της δραστηριότητας των συνταξινών. Στα κυτοκινητικά κύτταρα του φυτού *A. thaliana*, η συνταξίνη KNOLLE συνεντοπίζεται με την κινάση AtAurora1 (Petrovská και συν. 2012). Ωστόσο, τόσο τα αυξημένα, όσο και τα μειωμένα επίπεδα των ROS διαταράσσουν τη διαδικασία της σύντηξης των κυστιδίων. Πρέπει να σημειωθεί, ότι η έκφραση του γονιδίου *KNOLLE* μειώνεται σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης (Tsukagoshi 2012).

Φυσικά δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο, οι ROS να επηρεάζουν και τη λειτουργία της πρωτεΐνης δυνάμινης ή φραγμοπλαστίνης, η οποία προωθεί τη σταδιακή σταθεροποίηση της κυτταρικής πλάκας (Jürgens 2005, Verma και Hong 2005). Οι δυνάμινες συμμετέχουν επίσης στη δημιουργία κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη, με τα οποία απομακρύνεται η περίσσεια του μεμβρανικού υλικού από την περιοχή της κυτταρικής πλάκας. Τα κυστίδια αυτά, στη συνέχεια, συντήκονται με τα ενδοσώματα (Jürgens 2005). Έχει περιγραφεί ότι η διαδικασία ενδοκύτωσης, η οποία επάγεται από τον παθογόνο παράγοντα *cryptogein* και περιλαμβάνει τη δημιουργία κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη, εξαρτάται από την παραγωγή ROS, μέσω της NtRbohD (Leborgne-Castel και συν. 2008). Μπορούμε να υποθέσουμε, ότι η αναστολή της απομάκρυνσης της περίσσειας του μεμβρανικού υλικού από την κυτταρική πλάκα των επηρεασμένων κυττάρων, παρεμποδίζει τη διαδικασία «επιπεδοποίησής» της (Verma και Hong 2005).

Η αδυναμία σταθεροποίησης και επιπεδοποίησης της κυτταρικής πλάκας μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή των διογκωμένων μεμβρανικών νησίδων της κυτταρικής πλάκας. Αυτό μπορεί να συμβεί και σε κύτταρα στα οποία η κυτταρική πλάκα έχει συντηχθεί με το ένα ή και τα δύο μητρικά τοιχώματα. Ως αποτέλεσμα εντοπίζονται επηρεασμένα μετακυτοκινητικά κύτταρα, το θυγατρικό τοίχωμα των οποίων φέρει ασυνέχεια στο κέντρο του. Παρόμοιες ατυπίες έχουν περιγραφεί και σε διαιρούμενα κύτταρα στο πρωτόδερμα του φυτού *Z. mays*, τα οποία υφίστανται την επίδραση καφεΐνης (Apostolakos και Galatis 1987, Galatis και Apostolakos 1991). Η καφεΐνη προκαλεί διαταραχή στην ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου του κυτοπλάσματος και αναστέλλει τη δημιουργία της κυτταρικής πλάκας

(Bonsignore και Hepler 1985, Hepler και Bonsignore 1990, Galatis και Apostolakos 1991, Jürgens και συν. 1994, Samuels και Staehelin 1996).

Τα κυτοπλασματικά ιόντα ασβεστίου διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην πορεία συγκρότησης της κυτταρικής πλάκας. Τα αρχικά στάδια της δημιουργίας της, συμπεριλαμβανομένης και της σύντηξης των κυστιδίων, απαιτούν ρύθμιση των ιόντων ασβεστίου (Verma 2001). Επιπλέον, αυτά σχετίζονται με την παραγωγή και τη σύντηξη κυστιδίων, όπως και με τη δραστηριότητα της δυναμίνης, επάγουν δε τη σύνθεση καλλόξης στην περιοχή της κυτταρικής πλάκας. Στη συνέχεια, η μείωση της συγκέντρωσής τους, αρχικά περιορίζει τη σύνθεση της καλλόξης, ενώ τελικά οδηγεί στην αποικοδόμησή της, για να προχωρήσει η ωρίμανση της κυτταρικής πλάκας (Verma 2001). Σε όλες τις περιπτώσεις των επηρεασμένων κυττάρων, η παρουσία της καλλόξης στην περιοχή της κυτταρικής πλάκας ήταν ιδιαίτερα έντονη. Είναι ενδιαφέρον να διερευνηθεί, εάν η επίμονη παρουσία της καλλόξης στις κυτταρικές πλάκες επηρεάζει την ωρίμανσή τους.

Λαμβάνοντας υπόψη: (1) ότι οι ROS συμμετέχουν στην ομοιοστάση των ιόντων ασβεστίου (Steinhorst και Kudla 2013), (2) τη σημασία τους στην κυτοκίνηση, και (3) την ποικιλία των ατυπιών που προκαλούν οι επιδράσεις των ουσιών που διαταράσσουν την ομοιοστάσή τους, μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι ROS αλλοιώνουν τις τοπικά και χρονικά καθορισμένες διαβαθμίσεις των ιόντων ασβεστίου στην περιοχή της κυτταρικής πλάκας. Η αδυναμία καθιέρωσης των απαιτούμενων διαβαθμίσεων ιόντων ασβεστίου στο κυτόπλασμα, πιθανόν υποστηρίζεται και από τη διαταραγμένη κατανομή του ενδοπλασματικού δικτύου στα επηρεασμένα κυτοκινητικά κύτταρα. Συχνά, το κυτόπλασμα μεταξύ των δύο θυγατρικών πυρήνων στερείται ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ άλλες φορές περιέχει έντονες συναθροίσεις του. Είναι γνωστό ότι, οι διατάξεις ενδοπλασματικού δικτύου στην περιοχή της κυτταρικής πλάκας, συμμετέχουν στον έλεγχο των επιπέδων των ιόντων ασβεστίου (Hepler 1994). Πρέπει, επίσης, να σημειωθεί, ότι η οξειδοαναγωγική κατάσταση του ενδοπλασματικού δικτύου έχει ιδιαίτερη σημασία για τη λειτουργία του, συμπεριλαμβανομένης και της απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου από το οργανίδιο αυτό (Görlach και συν. 2006).

IV.3.4 ROS και καθορισμός του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης

Στα βλασθητικά κύτταρα των χερσαίων φυτών, η κυτταρική πλάκα στο τέλος της κυτοκίνησης συντήκεται με τα μητρικά τοιχώματα σε θέσεις, οι οποίες καθορίζονται κατά τη μεσόφαση. Οι θέσεις αυτές προσημειώνονται με ακρίβεια από την προ-προφασική ζώνη ΜΣ, η οποία δημιουργείται πριν από την έναρξη της πρόφασης και εξαφανίζεται στο τέλος της πρόφασης (Mineyuki 1999). Μεγάλος αριθμός επηρεασμένων προ-προφασικών και προφασικών κυττάρων, όπως και εκείνα του ακρόρριζου του μεταλλάγματος *rhd2* έφεραν

προ-προφασική ζώνη πολυμερών σωληνίνης με άτυπη οργάνωση. Πολλά άλλα επηρεασμένα προ-προφασικά/προφασικά κύτταρα εστερούντο προ-προφασικής ζώνης. Επομένως, τίθεται το ερώτημα εάν η ομοιόσταση των ROS είναι απαραίτητη για τον καθορισμό του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης.

Προς τούτο, επηρεασμένα ακρόρριζα αφέθηκαν να ανακάμψουν σε φυσιολογικές συνθήκες, για να διαπιστωθεί κατά πόσο η αδυναμία οργάνωσης της προ-προφασικής ζώνης που προκαλείται από τη διατάραξη των επιπέδων των ROS, συνοδεύεται από αποτυχία καθορισμού των θέσεων, στις οποίες πρέπει να καταλήξει η κυτταρική πλάκα κατά το τέλος της κυτοκίνησης. Τα δεδομένα μας έδειξαν ότι η ομοιόσταση των ROS είναι πιθανόν απαραίτητη για τον καθορισμό του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης στα κύτταρα της ρίζας των αγγειοσπέρμων, καθόσον σε ανακάμπτοντα ακρόρριζα, πολλά θυγατρικά τοιχώματα ακολουθούν διαγώνιο ή ακόμη και παράλληλο προσανατολισμό ως προς τον άξονα της ρίζας. Επιπλέον, συχνά, στα ανακάμπτοντα κύτταρα, οι θέσεις σύντηξης της κυτταρικής πλάκας με τα μητρικά τοιχώματα μεταβάλλεται στο χώρο. Στη συνέχεια, θα συζητηθούν οι απόψεις μας σχετικά με τους μηχανισμούς καθιέρωσης του επιπέδου της κυτταροδιαίρεσης και τον πιθανό ρόλο των ROS σε αυτούς.

Όπως επισημάνθηκε σε προηγούμενη ενότητα, με εξαίρεση το H_2O_2 , οι ενώσεις DPI, NAC και MEN προκαλούν μείωση της έκφρασης του γονιδίου *TON1a*. Επομένως, η προ-προφασική ζώνη απουσιάζει ή είναι άτυπη, όταν διαταράσσεται η ομοιόσταση των ROS, πιθανόν λόγω απουσίας των MAPs ή αποτυχίας ρύθμισης της δραστηριότητάς τους. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη TON1 αποτελεί ρυθμιστική υπομονάδα της PP2A, ενώ η MAP65-1 είναι ένα από τα υποστρώματά της (Smertenko και συν. 2006, Spinner και συν. 2013). Αντίστοιχα, η MPK6 στα κύτταρα του ακρόρριζου του φυτού *A. thaliana*, εντοπίζεται μαζί με τους ΜΣ της προ-προφασικής ζώνης. Στα μεταλλάγματά *mpk6* είναι εμφανής η αποτυχία καθορισμού του επιπέδου της κυτταροδιαίρεσης, ενώ MAPs, όπως η MAP65-1 και η MOR1 διαθέτουν μοτίβα φωσφορυλίωσης από MAPKs (Müller και συν. 2010). Επομένως, είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι, σε περιπτώσεις οξειδωτικής καταπόνησης η MPK6 συμμετέχει στους μηχανισμούς σηματοδότησης (Suarez Rodriguez και συν. 2010).

Άλλα μόρια, που δυνητικά εμπλέκονται στον καθορισμό του επιπέδου διαίρεσης είναι πιθανόν κυκλίνες, κάποιες από τις οποίες εντοπίζονται στη θέση της προ-προφασικής ζώνης (Duroc και συν. 2011), ή κινάσες, όπως οι Aurora α (Van Damme και συν. 2011). Οι τελευταίες μάλιστα, αν και σχετίζονται με τον καθορισμό του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης, δεν εντοπίζονται στην περιοχή της προ-προφασικής ζώνης κατά την πρόφαση (Van Damme και συν. 2011).

Με βάση τα όσα αναφέρονται παραπάνω, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αλλαγή της ομοιόστασης των ROS διαταράσσει τους μηχανισμούς που καθορίζουν το επίπεδο της

κυτταροδιαίρεσης, ή/και εκείνους που είναι υπεύθυνοι για το σχηματισμό της προ-προφασικής ζώνης. Στην περίπτωση μας, πολλά κύτταρα που ανακάμπτουν μετά από επίδραση με DPI και NAC, διαθέτουν τοιχώματα με τυχαίο προσανατολισμό. Οι Urbanek και συν. (2003) παρατήρησαν ότι, σε κύτταρα του φυτού *Picea abies* που υφίστανται την επίδραση της γλουταθειόνης, το επίπεδο διαίρεσης αλλάζει. Υπέθεσαν ότι η γλουταθειόνη, με κάποιο τρόπο, τροποποιεί τις θέσεις του πλασμαλήμματος στο επίπεδο καθορισμού του επιπέδου διαίρεσης (Urbanek και συν. 2003).

Επεκτείνοντας τα παραπάνω, μπορεί να υποτεθεί ότι, η διαταραχή της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει την παρουσία των μορίων που αποτελούν είτε θετικά ή αρνητικά μόρια-δείκτες της θέσης του επιπέδου της μελλοντικής διαίρεσης (βλέπε Wright και Smith 2007). Θεωρητικά, ένα από τα μόρια αυτά είναι η πρωτεΐνη RanGAP1, η οποία αποτελεί μόνιμο κάτοικο του επιπέδου της κυτταροδιαίρεσης, έπειτα από τη δημιουργία της προ-προφασικής ζώνης (Xu και συν. 2008). Είναι ενδιαφέρον, ότι στα ζωικά κύτταρα, αυτή συγκαταλέγεται μεταξύ των πρωτεϊνών, η αλλαγή στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των οποίων μπορεί να μεταβάλλει την κατανομή και τη δραστηριότητά τους στο κύτταρο (Kodiha και Stochaj 2012).

Ωστόσο, ο μηχανισμός καθορισμού της θέσης της προ-προφασικής ζώνης παραμένει άγνωστος (Rasmussen και συν. 2013). Μια άποψη είναι ότι αυτή καθορίζεται από τις μηχανικές καταπονήσεις που δέχεται το κύτταρο που πρόκειται να διαιρεθεί (βλέπε Rasmussen και συν. 2013). Είναι ενδιαφέρον, ότι οι ROS συμμετέχουν στην αντίληψη μηχανικών καταπονήσεων από τα κύτταρα, ελέγχοντας, μέσω των RhoGs, τα κανάλια ιόντων ασβεστίου του πλασμαλήμματος (Monshausen και Gilroy 2009). Επομένως, με τον τρόπο αυτό θα μπορούσαν να συμμετέχουν στο μηχανισμό καθορισμού του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης.

Όπως αναφέρθηκε, η προ-προφασική ζώνη προσημειώνει το επίπεδο της κυτταροδιαίρεσης. Αρκετά χρόνια πριν, διαπιστώθηκε σε MK του φυτού *Vigna sinensis* και άλλων ψυχανθών, ότι στις περιοχές του τοιχώματος που γειτνιάζουν με την προ-προφασική ζώνη, εναποτίθενται τοπικές παχύνσεις, ενώ στο πλασμαλήμμα της περιοχής αυτής εντοπίζεται συνήθως μεγάλος αριθμός καλυμμένων προεκβολών και κοντά σε αυτό μεγάλος αριθμός καλυμμένων κυστιδίων (Galatis και Mitrakos 1979, Galatis και συν. 1982). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι στη θέση της προ-προφασικής ζώνης στοχεύονται εκκριτικά κυστίδια, με τα οποία μεταφέρονται τα μόρια που αποτελούν θετικούς δείκτες του επιπέδου διαίρεσης (Galatis και Mitrakos 1979, Galatis και συν. 1982). Το ίδιο φαινόμενο διαπιστώθηκε στη συνέχεια στο φυτό *A. thaliana* (Zhao και Sack 1999). Αργότερα, βρέθηκε ότι στη θέση της προ-προφασικής ζώνης πραγματοποιείται εντοπισμένη ενδοκύτωση κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη, διατυπώθηκε δε η άποψη ότι αυτή

εμπλέκεται στην καθιέρωση και τη διατήρηση του επιπέδου διαίρεσης (Karahara και συν. 2009, 2010). Θα είχε ενδιαφέρον να διερευνηθεί, εάν στη θέση αυτή εντοπίζονται οι NADPH-οξειδάσες ή άλλα πρωτεϊνικά μόρια που εμπλέκονται στην παραγωγή ROS. Μία τέτοια υπόθεση υποστηρίζεται από πρόσφατα πειραματικά δεδομένα μελέτης της συμπεριφοράς της GFP-RbohD, τα οποία δείχνουν ότι αυτή εντοπίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές του πλασμαλήμματος. Με μία διαδικασία που εξαρτάται από την παραγωγή κυστιδίων κλαθρίνης, τα οποία στη μεμβράνη τους φέρουν την πρωτεΐνη GFP-Rboh, τα κυστίδια εισέρχονται στο κυτόπλασμα με ενδοκύτωση (Hao και συν. 2014). Με αυτό τον τρόπο, «διαμερισματοποιείται» και ελέγχεται η κατανομή της RbohD σε φυσιολογικά κύτταρα ή σε αυτά που υφίστανται την επίδραση αυξημένης αλατότητας και εξασφαλίζεται η συμμετοχή της σε μηχανισμούς σηματοδότησης που περιλαμβάνουν παραγωγή ROS (Hao και συν. 2014).

Τέλος, έχει ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν οι ROS συμμετέχουν στην καθιέρωση του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης, ως απόκριση σε ορμονικά ερεθίσματα. Στο φυτό *A. thaliana* βρέθηκε ότι η MAPKKK YODA εμπλέκεται στον καθορισμό του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης. Τα μεταλλάγματα της πρωτεΐνης αυτής εμφανίζουν διαταραγμένο φαινότυπο, ο οποίος είναι ηπιότερος, όταν τα μεταλλαγμένα αρτίβλαστα υφίστανται την επίδραση IAA (Smékalová και συν. 2014β). Στις ρίζες των μεταλλαγμάτων, ο προσανατολισμός των θυγατρικών κυτταρικών τοιχωμάτων είναι τυχαίος, ενώ συγχρόνως τα επίπεδα των πρωτεϊνών POK1, TAN1 και GCP4 εμφανίζονται μειωμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα των φυτών αγρίου τύπου (Smékalová και συν. 2014β). Η YODA λειτουργεί στο ίδιο μονοπάτι με την MPK6, η οποία αναφέρθηκε νωρίτερα. Οι Smékalová και συν. (2014β) προτείνουν ότι το μονοπάτι YODA/MPK6 εμπλέκεται στον έλεγχο του επιπέδου διαίρεσης και γενικότερα στην ανάπτυξη της ρίζας, η οποία καθοδηγείται από αυξίνη. Γνωρίζοντας ότι η αυξίνη επάγει την παραγωγή ROS, μέσω της PI3K και των Rbohs (Joo και συν. 2005), αλλά και ότι η MPK6 αποκρίνεται στις ROS (Suarez Rodriguez 2010), είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η αυξίνη καθορίζει το επίπεδο διαίρεσης των κυττάρων της ρίζας, με μηχανισμούς σηματοδότησης που εξαρτώνται από την παραγωγή ROS. Ωστόσο, στα αναπτυσσόμενα στοματικά σύμπλοκα του φυτού *Z. mays*, η αναστολή της μεταφοράς της αυξίνης δεν επηρεάζει τη δημιουργία της προ-προφασικής ζώνης (Livanos και συν. 2015).

IV.4 ROS, ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΑΣΥΜΜΕΤΡΗΣ ΔΙΑΙΡΕΣΗΣ

IV.4.1 Πολική κατανομή των ROS στα ΜΠ του φυτού *Z. mays*

Ένα από τα σημαντικά ευρήματα της διατριβής είναι, η σχεδόν αποκλειστική, εντόπιση ROS στο κοινό κυτταρικό τοίχωμα, μεταξύ των πολωμένων ΜΠ και των επαγόντων MK, όπως

επίσης, στον πολωμένο πυρήνα και στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα των ΜΠ του φυτού *Z. mays*. Επιπλέον, στα ΜΠ που βρίσκονται σε επαφή με ώριμα ΜΚ, και στα οποία ο πυρήνας είναι σε φάση μετανάστευσης για να λάβει την πολική του θέση, ROS εντοπίζονται στην πολική περιοχή των ΜΠ, καθώς και στην περιπυρηνική περιοχή.

Η τοπική συσσώρευση ROS στο πολωμένο άκρο του κυττάρου είναι βασικό χαρακτηριστικό των κυττάρων με κορυφαία αύξηση, όπως τα ριζικά τριχίδια (Foreman και συν. 2003, Liskay και συν. 2004, Carol και συν. 2005) και οι γυρεοσωλήνες (Potocký και συν. 2007). Το ίδιο φαινόμενο χαρακτηρίζει τα ριζοειδή αλλά και τους ζυγώτες του φαιοφύκους *Fucus*, τα οποία είναι κύτταρα έντονα πολωμένα (Coelho και συν. 2002, 2008). Τα δεδομένα μας, στα αναπτυσσόμενα στοματικά σύμπλοκα του φυτού *Z. mays* αποκάλυψαν την καθιέρωση ειδικών εντοπίσεων ROS και στις περιπτώσεις που επάγεται καθιέρωση πόλωσης μέσω διακυτταρικών μορφογενετικών ερεθισμάτων. Επομένως, η παραγωγή ROS στις περιοχές των φυτικών κυττάρων, στις οποίες εγκαθιδρύεται πολικότητα, συνιστά ένα γενικότερο χαρακτηριστικό των αναπτυξιακών διαδικασιών των φυτών (βλέπε Carol και Dolan 2006, Swanson και Gilroy 2010, Considine και Foyer 2014).

Στα κύτταρα με κορυφαία αύξηση, η τοπική συγκέντρωση ROS στην πολωμένη επάκρια περιοχή τους σχετίζεται με την τοπική παραγωγή μορίων H_2O_2 , μέσω της NADPH οξειδάσης, στον αποπλάστη της κορυφαίας περιοχής. Η παραγωγή ROS στην πολική περιοχή των ΜΠ πιθανόν πραγματοποιείται με παρόμοιο τρόπο. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται από την εκλεκτική παρουσία H_2O_2 στον αποπλάστη μεταξύ ΜΚ και ΜΠ, η οποία διαπιστώθηκε μετά από επίδραση με $CeCl_3$ και παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Επιπλέον, η πολική κατανομή ROS στο πολικό άκρο του ΜΠ διαταράσσεται, έπειτα από επίδραση με DPI που αναστέλλει την καταλυτική δραστηριότητα της NADPH-οξειδάσης.

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι το μορφογενετικό ερέθισμα που επάγει την πόλωση και την ασύμμετρη διαίρεση στα ΜΠ του φυτού *Z. mays* βασίζεται στην κατευθυνόμενη μεταφορά της αυξίνης από το ΜΚ στο ΜΠ (Livanos και συν. 2015). Είναι γνωστό ότι η αυξίνη, μέσω της PI3K, προκαλεί την ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης (Joo και συν. 2005). Επομένως, μπορεί να υποτεθεί ότι το μορφογενετικό ερέθισμα που εκπέμπει το ΜΚ επάγει τη συσσώρευση ROS στον αποπλάστη της πολωμένης περιοχής του ΜΠ, μέσω της NADPH-οξειδάσης. Στη συνέχεια, τα μόρια αυτά, και κυρίως το H_2O_2 , εισέρχονται στο ΜΠ και καθιερώνουν πολική διαβάθμιση ROS σε αυτό. Η συμμετοχή της PI3K στην παραπάνω διαδικασία ενισχύεται και από δεδομένα που δείχνουν ότι αναστέλλεται η προώθηση της καθιέρωσης πόλωσης στα ΜΠ, μετά από εξωγενή παροχή αυξίνης, όταν στο διάλυμα της επώασης υπάρχει ο αναστολέας της PI3K, LY294002 (Livanos και συν. 2015).

IV.4.2 ROS και επαγωγή διαίρεσης των ΜΠ

Η θεώρηση των δεδομένων, τα οποία προέκυψαν από τις επιδράσεις ουσιών που διαταράσσουν τα επίπεδα των ROS σε αναπτυσσόμενα στοματικά σύμπλοκα του φυτού *Z. mays*, δείχνει σαφώς ότι οι ROS αποτελούν βασικό στοιχείο του μηχανισμού επαγωγής της ασύμμετρης διαίρεσης των ΜΠ. Η επίδραση αρτιβλάστων με την ουσία DPI που αναστέλλει τη δραστηριότητα της NADPH-οξειδάσης, και τη NAC, η οποία εξουδετερώνει τις ROS, αναστέλλει τη δημιουργία παραστοματικών κυττάρων. Ωστόσο, το ίδιο αποτέλεσμα έχει και η οξειδωτική καταπόνηση που προκαλεί η επίδραση με την ουσία MEN, η οποία επιφέρει ενδοκυτταρική υπερπαραγωγή ROS. Τα δεδομένα συνηγορούν στο ότι, η ομοιόσταση των ROS είναι καθοριστικός παράγοντας που επάγει την είσοδο των ΜΠ σε ασύμμετρη διαίρεση.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η είσοδος των κυττάρων σε διαίρεση και, γενικότερα, η πορεία της κυτταροδιαίρεσης ελέγχονται από μηχανισμούς που εξαρτώνται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου και τις ROS (Reicheld και συν. 1999, Fehér και συν. 2008, Considine και Foyer 2014). Ειδικότερα, στα φυτικά κύτταρα, οι ROS σε συνεργασία με την αυξίνη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου (Fehér και συν. 2008). Η αυξίνη, ενεργοποιεί την παραγωγή ROS, μέσω της NADPH-οξειδάσης και αυτές, στη συνέχεια, πυροδοτούν μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Fehér και συν. 2008, Considine και Foyer 2014). Με βάση τα παραπάνω, θεωρούμε πιθανόν ότι η αυξίνη, μέσω της παραγωγής ROS, επάγει τη διαίρεση των ΜΠ. Είναι γνωστό ότι η αυξίνη αποτελεί στοιχείο του μορφογενετικού μηνύματος που εκπέμπει το ΜΚ και ότι η επαγωγή διαίρεσης που πυροδοτείται από την αυξίνη αναστρέφεται από την αναστολή της PI3K (Livanos και συν. 2015). Η ανάσχεση της PI3K αναστέλλει τη δημιουργία παραστοματικών κυττάρων (Livanos και συν. 2015). Επομένως, με δεδομένο ότι η αυξίνη προκαλεί την ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης, μέσω της PI3K (Joo και συν. 2005), είναι ενδιαφέρον ότι η επίδραση με H_2O_2 , όπως και η αυξίνη, όχι μόνο δεν αναστέλλει, αλλά, αντίθετα επεκτείνει τη δημιουργία παραστοματικών κυττάρων ακόμη και σε περιοχές πλησιέστερες στη βάση του φύλλου, όπου διαιρούνται ΜΠ που γειτνιάζουν με νεαρά ΜΚ. Επιπλέον, το H_2O_2 επάγει την ασύμμετρη διαίρεση των ενδιάμεσων κυττάρων της στοματικής σειράς, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κορυφαίων παραστοματικών κυττάρων.

IV.4.3 ROS και καθιέρωση πόλωσης στα ΜΠ

Ένα από τα βασικά μορφολογικά στοιχεία της καθιέρωσης πόλωσης στα ΜΠ είναι η μετανάστευση του πυρήνα πλησίον του επάγοντος ΜΚ, διαδικασία η οποία διεξάγεται μέσω του συστήματος της ακτομυοσίνης (Picket-Heaps και συν. 1999, Cleary 2000, Smith 2001, Galatis και Apostolakis 2004). Τα δεδομένα μας έδειξαν ότι οι επιδράσεις με LY294002, DPI, NAC και MEN αναστέλλουν την πολική μετακίνηση του πυρήνα του ΜΠ. Αντίθετα, η

επίδραση με H_2O_2 επάγει τη μετανάστευση του πυρήνα, ακόμη και σε ΜΠ που βρίσκονται σε επαφή με νεαρά ΜΚ. Το φαινόμενο αυτό έχει διαπιστωθεί στα αρτίβλαστα *Z. mays* και έπειτα από τη χορήγηση αυξίνης εξωγενώς (Livanos και συν. 2015). Είναι ενδιαφέρον ότι, σε αρτίβλαστα επηρεασμένα με H_2O_2 , οι πυρήνες αρκετών ενδιάμεσων κυττάρων των στοματικών σειρών είχαν λάβει πολική τοποθέτηση πλησίον των ΜΚ. Τα παραπάνω υποστηρίζουν ότι η ομοιόσταση των ROS είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του μηχανισμού μετανάστευσης του πυρήνα και, επιπλέον, ότι η παρουσία του H_2O_2 πυροδοτεί τη λειτουργία του μηχανισμού αυτού. Πρέπει να σημειωθεί ότι το σύστημα της ακτομυοσίνης είναι ευαίσθητο στην οξειδωτική καταπόνηση. Η λειτουργία του σε εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους, όπως τα μυϊκά κύτταρα, απαιτεί την ύπαρξη οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (Tiago και συν. 2008).

Ένα άλλο βασικό δομικό στοιχείο της καθιέρωσης πόλωσης στα ΜΠ είναι η πολική οργάνωση του κυτταροσκελετού και, συγκεκριμένα, η συγκρότηση πλάκας-MA στο πολικό άκρο του κυττάρου, η απουσία περιφερειακών ΜΣ από την περιοχή αυτή και η οργάνωση της ιδιόμορφης προ-προφασικής ζώνης ΜΣ πλευρικά του επάγοντος ΜΚ (Panteris και συν. 2006, 2007, βλέπε επίσης Facette και Smith 2012, Pilliteri και Torii 2012). Γενικά, τα επηρεασμένα ΜΠ σχηματίζουν πλάκες-MA, αν και όχι πάντοτε καλά οργανωμένες. Επιπλέον, τα επηρεασμένα με H_2O_2 ΜΠ διαθέτουν καλά οργανωμένες πλάκες-MA ακόμα και όταν βρίσκονται σε επαφή με νεαρά ΜΚ.

Υποστηρίζεται ότι η δημιουργία της πλάκας-MA δεν μπορεί να θεωρηθεί πρωταρχικός παράγοντας πόλωσης (Galatis και Apostolakis 2004). Ο λόγος είναι ότι απουσιάζει από τα πολωμένα μεσοφασικά ΜΠ του φυτού *T. turgidum* (Panteris και συν. 2006, 2007) και από τα «τελικά» ΜΠ του μονοκοτυλήδονου φυτού *Tradescantia virginiana*, ενώ είναι παρούσα στα πλευρικά ΜΠ του τελευταίου (Cleary 1995, Cleary και Mathesius 1996, Cleary 2000). Η πλάκα-MA πιθανόν σχετίζεται με μηχανισμούς προστασίας του πλασμαλήμματος από τις μηχανικές καταπονήσεις που υφίσταται το ΜΠ, καθώς προεκβάλλει προς το επάγον ΜΚ, επειδή ότι το πλάτος του τελευταίου μειώνεται (Galatis και Apostolakis 2004, Panteris και συν. 2007). Τα δεδομένα μας ενισχύουν την άποψη αυτή διότι, όταν διαταράσσεται η ομοιόσταση των ROS, δεν επηρεάζεται η διόγκωση του ΜΠ προς το επάγον ΜΚ, η οποία συνοδεύεται από τη δημιουργία πλάκας-MA, αν και στις περισσότερες επιδράσεις αναστέλλεται η πολική τοποθέτηση του πυρήνα και η δημιουργία παραστοματικών κυττάρων. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει και από άλλους πειραματικούς χειρισμούς των ΜΠ του φυτού *Z. mays* (Apostolakis και συν. 2008, Livanos και συν. 2015).

Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι δεν σχηματίζεται πλάκα-MA στα μητρικά κύτταρα των κορυφαίων παραστοματικών κυττάρων, τα οποία δημιουργούνται μετά από την

επίδραση H_2O_2 . Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι, όταν τα αρτίβλαστα υφίστανται επίδραση με H_2O_2 , δημιουργείται πλάκα-MA και σε ΜΠ, τα οποία βρίσκονται σε επαφή με νεαρά ΜΚ. Αυτά τα ΜΠ δεν προεκβάλλουν προς τα γειτονικά τους ΜΚ. Επομένως, είναι πιθανόν στα κύτταρα αυτά να επικρατούν συνθήκες που επιτρέπουν την απαρχή δημιουργίας πλάκας-MA, γεγονός το οποίο ενδεχομένως συνδέεται με την ανάγκη προστασίας του πλασμαλήμματος των νεαρών επηρεασμένων ΜΠ. Μία πιθανή αιτία δημιουργίας τέτοιων συνθηκών είναι η τοπική μεταβολή των ιδιοτήτων του κυτταρικού τοιχώματος από την παρουσία H_2O_2 , η οποία συνοδεύεται από μεταβολές στο πλασμαλήμμα του ΜΠ. Οι ROS, είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τις ιδιότητες του κυτταρικού τοιχώματος (Schopfer 2001, Monhausen και συν. 2007, Swanson και Gilroy 2010, Considine και Foyer 2014). Με ανάλογο τρόπο, ίσως μπορεί να δικαιολογηθεί το γεγονός ότι σε ορισμένα επηρεασμένα ΜΠ, τα οποία βρίσκονται σε επαφή με ώριμα ΜΚ, η πλάκα-MA έχει μεγαλύτερη επιφάνεια από τα φυσιολογικά ΜΠ, καθώς επεκτείνεται και πέρα από την επαφή ΜΠ και ΜΚ. Παρόμοιο φαινόμενο έχει διαπιστωθεί και σε ΜΠ του φυτού *Z. mays* επηρεασμένα με PA (Apostolakos και συν. 2008). Το PA, είναι γνωστό ότι, εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο παραγωγή ROS στον αποπλάστη (Wang και συν. 2006). Αυτό το φαινόμενο πιθανόν τροποποιεί τις ιδιότητες του τοιχώματος, με αποτέλεσμα την επέκταση της πλάκας-MA. Επομένως, τα δεδομένα μας συμφωνούν με την άποψη ότι η πλάκα-MA δεν σχετίζεται με την καθιέρωση πόλωσης στα ΜΠ (βλέπε Galatis και Apostolakos 2004, Panteris και συν. 2007, Apostolakos και συν. 2008, Livanos και συν. 2015). Θεωρείται πιο πιθανό ότι η δημιουργία της πλάκας-MA συνιστά απόκριση του ΜΠ στις τοπικές μεταβολές των ιδιοτήτων του κυτταρικού τοιχώματος, οι οποίες επηρεάζουν και το πλασμαλήμμα, ενώ, ενδεχομένως, οι ROS έχουν ενεργό ρόλο στην καθιέρωση των μεταβολών αυτών.

Όπως έχει ήδη περιγραφεί, η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS στα κύτταρα του ακρόρριζου των αγγειοσπέρμων φυτών προκαλεί εκτεταμένες μεταβολές στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης. Οι ΜΣ καταστρέφονται και αντικαθίστανται από μακροσωληνίσκους ή παρακρυστάλλους σωληνίνης. Τα πολυμερή αυτά είναι ανθεκτικά στις συνθήκες που δημιουργούνται στα κύτταρα και περιέχουν ή αποτελούνται από ακετυλιωμένη σωληνίνη. Οι μεταβολές αυτές επηρεάζουν, εκτός των άλλων, και πολλά γεγονότα του κυτταρικού κύκλου, όπως την οργάνωση ή δημιουργία της προ-προφασικής ζώνης και την οργάνωση και λειτουργία της μιτωτικής και κυτοκινητικής συσκευής. Αντίθετα, στο πρωτόδερμα του φυτού *Z. mays* η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS δεν φαίνεται να επιφέρει δραματικές μεταβολές στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης. Στα επηρεασμένα με LY294002, DPI, NAC και H_2O_2 πρωτοδερμικά κύτταρα η ανοσοσήμανση της σωληνίνης αποκάλυψε ότι η οργάνωση των πολυμερών αυτής δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές από

τα πολυμερή που παρατηρούνται στα πρωτοδερμικά κύτταρα, των φυσιολογικών αρτιβλάστων. Ωστόσο, ο κυτταροσκελετός της σωληνίνης των πρωτοδερμικών κυττάρων που υφίστανται την επίδραση MEN, διαταράσσεται σε σημαντικό βαθμό.

Η διαφορά των επιπτώσεων στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης, μεταξύ ρίζας και φύλλου, είναι πιθανό ότι σχετίζεται με τον τρόπο με τον οποίο πραγματοποιείται η επίδραση των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν, ή ακόμα, και με τη συγκέντρωση των ουσιών που φθάνει τελικά στα κύτταρα στο πρωτόδερμα. Δεν πρέπει επίσης να αποκλειστεί η περίπτωση, η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των πολυμερών της σωληνίνης του πρωτοδέρματος του φύλλου του φυτού *Z. mays* να οφείλεται στο ότι αυτά περιέχουν ή αποτελούνται από ακετυλιωμένη σωληνίνη (Giannoutsou και συν. 2012). Ένα τέτοιο ενδεχόμενο δικαιολογεί την παρατήρηση ατράκτων και φραγμοπλαστών, σχεδόν τυπικής οργάνωσης, σε διαιρούμενα πρωτοδερμικά κύτταρα επηρεασμένων αρτιβλάστων.

Έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι, αν και αναστέλλεται η διαίρεση των ΜΠ που έχουν υποστεί επίδραση με LY294002, DPI και NAC, το επίπεδο της κυτταροδιαίρεσης σε αυτά καθορίζεται. Τα επηρεασμένα ΜΠ διαθέτουν προ-προφασική ζώνη πολυμερών σωληνίνης όμοια σε οργάνωση με εκείνη των φυσιολογικών ΜΠ. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την άποψη ότι, στα ΜΠ των Poaceae, η διαίρεση του πυρήνα και ο καθορισμός του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης ελέγχονται από διαφορετικούς μηχανισμούς (Apostolakis και συν. 2008, Livanos και συν. 2015). Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS, αν και επηρεάζει το πρώτο φαινόμενο, δεν φαίνεται να επηρεάζει το δεύτερο. Η απουσία προ-προφασικής ζώνης από τα επηρεασμένα με MEN ΜΠ μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι η οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης στα κύτταρα αυτά είναι εμφανώς διαταραγμένη, ενώ δεν αποκλείεται να συγκροτούνται και παρακρύσταλλοι σωληνίνης, οι οποίοι δεν ανταποκρίνονται στους μηχανισμούς που επιβάλλουν την οργάνωση της προ-προφασικής ζώνης.

Έχει υποτεθεί ότι, η θέση δημιουργίας της προ-προφασικής ζώνης στα ΜΠ καθορίζεται από τοπικές μηχανικές καταπονήσεις, οι οποίες εφαρμόζονται στα ΜΠ από τα ΜΚ, καθώς τα τελευταία αποκτούν το τετράγωνο, σε κατ' επιφάνεια παρατήρηση, σχήμα τους (Green και συν. 1970, Kennard και Cleary 1997, Galatis και Apostolakis 2004, Panteris και συν. 2007, Giannoutsou και συν. 2012). Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ROS επηρεάζουν τις μηχανικές ιδιότητες των κυτταρικών τοιχωμάτων (Swanson και Gilroy 2010, Considine και Foyer 2014), είναι πιθανόν ότι και τα νεαρά ΜΚ των επηρεασμένων με H_2O_2 αρτιβλάστων ασκούν μηχανικές καταπονήσεις στα γειτονικά ΜΠ, με αποτέλεσμα την οργάνωση προ-προφασικής ζώνης και σε ΜΠ που βρίσκονται πλησίον της βάσης του φύλλου.

IV.4.4 Δημιουργία άτυπων παραστοματικών κυττάρων στα επηρεασμένα αρτίβλαστα

Πολλά από τα επηρεασμένα ΜΠ, τα οποία κατορθώνουν να διαιρεθούν κατά τη διάρκεια της επίδρασης, δίνουν γένεση σε άτυπα παραστοματικά κύτταρα. Αυτά, σε κατ' επιφάνεια παρατήρηση, στερούνται του φακοειδούς σχήματος των τυπικών παραστοματικών κυττάρων, είναι δε συνήθως τριγωνικά και σε μέγεθος μεγαλύτερα από τα τυπικά παραστοματικά κύτταρα. Η δημιουργία των άτυπων αυτών κυττάρων οφείλεται στο γεγονός ότι, το ένα αντικλινές άκρο του θυγατρικού τοιχώματος που διαχωρίζει το παραστοματικό κύτταρο συντήκεται με τα μητρικά τοιχώματα του ΜΠ στην περιοχή της προ-προφασικής ζώνης, ενώ το άλλο αποκλίνει και συντήκεται με τα τοιχώματα του ΜΠ σε τυχαίες θέσεις εκτός της περιοχής της προ-προφασικής ζώνης. Στο ίδιο ΜΠ, η θέση σύντηξης του αποκλίνοντος άκρου μπορεί να «μετακινείται» στο χώρο. Σε κεντρικά επίπεδα, η απόκλιση της θέσης σύντηξης από την περιοχή της προ-προφασικής ζώνης είναι πιο έντονη, ενώ σε εξωτερικά επίπεδα το αποκλίνον άκρο πλησιάζει προς την περιοχή της ζώνης και τελικά συντήκεται με το μητρικό τοίχωμα στις θέσεις αυτές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το άτυπο παραστοματικό κύτταρο, σε εξωτερικά επίπεδα, να εμφανίζει φακοειδές σχήμα, ενώ σε κεντρικές τομές να έχει εντελώς διαφορετικό σχήμα. Άτυπα παραστοματικά, παρόμοια με τα παραπάνω, δημιουργούνται από φυσιολογικά ΜΠ του φυτού *Triticum*, τα οποία δέχονται συγχρόνως περισσότερα του ενός μορφογενετικά ερεθίσματα (Galatis και συν. 1983, 1984α). Σε αυτά τα ΜΠ, διαταράσσεται σημαντικά η πολική οργάνωση του προ-μιτωτικού και μιτωτικού πρωτοπλάστη. Το ίδιο συμβαίνει και σε ΜΠ, στα οποία έχει διαταραχθεί πειραματικά η δραστηριότητα του συστήματος της ακτομυοσίνης (Cho και Wick 1990, 1991, Gallagher και Smith 1999, Pickett-Heaps και συν. 1999), καθώς και σε εκείνα των μεταλλαγμάτων *discordia*, *brick*, *pan* και *rop* του φυτού *Z. mays* (Gallagher και Smith 1999, 2000, Wright και συν. 2009, Cartwright και συν. 2009, Humphries και συν. 2011, Zhang και συν. 2012β, Sutimantanapi και συν. 2014, Facette και συν. 2015).

Θα μπορούσε να υποστηριχθεί, ότι η δημιουργία αυτών των άτυπων παραστοματικών οφείλεται σε διατάραξη της λειτουργικότητας της προ-προφασικής ζώνης. Ωστόσο, η μία αντικλινής πλευρά του θυγατρικού τοιχώματος που διαχωρίζει τα άτυπα παραστοματικά κύτταρα συντήκεται με τα τοιχώματα του ΜΠ στην περιοχή της προ-προφασικής ζώνης, ενώ η αποκλίνουσα πλευρά, σε εξωτερικά επίπεδα, συχνά επανέρχεται για να συντηχθεί με το μητρικό τοίχωμα στην περιοχή της προ-προφασικής ζώνης. Επειδή το φαινόμενο εκδηλώνεται και σε φυσιολογικά διαιρούμενα ΜΠ, τα οποία δέχονται περισσότερα του ενός μορφογενετικά ερεθίσματα από το μικροπεριβάλλον τους (Galatis και συν. 1984α), μπορεί να υποτεθεί ότι ακόμα και στις περιπτώσεις που προκαλείται πειραματική απόκλιση της κυτταρικής πλάκας, η περιοχή της προ-προφασικής ζώνης είναι λειτουργική.

Σε ορισμένα από τα μεταλλάγματα του φυτού *Z. mays*, που αναφέρθηκαν παραπάνω, ο σχηματισμός των άτυπων παραστοματικών κυττάρων έχει αποδοθεί στη διατάραξη της πολικής τοποθέτησης του πυρήνα του ΜΠ, γεγονός το οποίο συσχετίζεται με την απουσία ή τη δυσλειτουργία της πλάκας-ΜΑ (Cartwright και συν. 2009, Humphries και συν. 2011, Zhang και συν. 2012β). Κάτι τέτοιο δεν φαίνεται να ισχύει, καθώς τα δεδομένα μας δείχνουν ότι δεν αναστέλλεται ο σχηματισμός της πλάκας-ΜΑ, όταν διαταράσσεται η ομοιόσταση των ROS.

Για το σχηματισμό τυπικών φακοειδών παραστοματικών κυττάρων στα Poaceae έχει υποστηριχθεί ότι πρέπει να πληρούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις: 1. Ο σχηματισμός προ-προφασικής ζώνης στα ΜΠ, πλευρικά του επάγοντος ΜΚ, και 2. Η κατάλληλη οργάνωση του κυτοκινητικού πρωτοπλάστη, ώστε, όταν τα αναπτυσσόμενα άκρα της κυτταρικής πλάκας εξέρχονται από το χώρο μεταξύ των δύο θυγατρικών πυρήνων να μπορούν να προσεγγίσουν το «πεδίο έλξης ή προώθησης της αύξησης» της προ-προφασικής ζώνης. Στην περίπτωση αυτή, τα άκρα της κυτταρικής πλάκας ακολουθούν καμπύλη πορεία αύξησης και συντήκονται με τα μητρικά τοιχώματα στις προκαθορισμένες θέσεις, δημιουργώντας το φακοειδές τοίχωμα του παραστοματικού κυττάρου. Για να συμβεί αυτό, θα πρέπει η περιοχή της προ-προφασικής ζώνης να μην καλύπτεται από μεγάλα οργανίδια ή άλλα κυτταρικά στοιχεία που εμποδίζουν την είσοδο των περιθωρίων της κυτταρικής πλάκας στο πεδίο δράσης της προ-προφασικής ζώνης (Galatis και Apostolakos 1984α, Apostolakos και Galatis 1987). Αυτές οι κυτταρικές συνθήκες διασφαλίζονται, όταν ο πυρήνας έχει λάβει την κανονική πολική του θέση και ο άξονας της ατράκτου έχει περίπου κάθετο προσανατολισμό προς το επάγον ΜΚ. Στην περίπτωση διαγώνιου προσανατολισμού του άξονα της ατράκτου, ο ένας θυγατρικός πυρήνας καλύπτει τμήμα της προ-προφασικής ζώνης, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία άτυπων παραστοματικών κυττάρων (Galatis και συν. 1984α, 1984β, Galatis και Apostolakos 2004). Η διατάραξη στον προσανατολισμό του άξονα της ατράκτου είναι συνήθης στα διαιρούμενα ΜΠ που δέχονται συγχρόνως επαγωγικά ερεθίσματα από διάφορες κατευθύνσεις. Αυτό είναι κοινό φαινόμενο, όταν οι στοματικές σειρές είναι σε επαφή ή όταν μία στοματική σειρά είναι σε επαφή με μία σειρά που δημιουργεί τρίχες, ή ακόμα όταν τα ΜΠ έχουν μικρό μέγεθος, με αποτέλεσμα το διαγώνιο προσανατολισμό της ατράκτου λόγω έλλειψης χώρου (Galatis και συν. 1984α).

Στην παρούσα διατριβή, διαπιστώθηκε ότι το μέγεθος των ΜΠ και το μέγεθος των ενδιαμέσων κυττάρων της στοματικής σειράς των επηρεασμένων αρτιβλάστων είναι μικρότερο σε σύγκριση με εκείνο των αντίστοιχων κυττάρων των φυσιολογικών αρτιβλάστων. Αυτό πιθανόν σχετίζεται με την τροποποίηση της εκτασιμότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων, λόγω διατάραξης της ομοιόστασης των ROS (Swanson και Gilroy 2010, Considine και Foyer 2014). Ειδικά στην περίπτωση του H_2O_2 , η ασύμμετρη διαίρεση

των ΜΠ εκδηλώνεται σε περιοχές του πρωτοδέρματος που βρίσκονται πλησίον της βάσης του φύλλου, όπου το μέγεθος των ΜΠ είναι ακόμα μικρό. Επομένως, είναι πιθανόν ότι, λόγω γεωμετρίας, επιβάλλεται ο διαγώνιος προσανατολισμός του άξονα της ατράκτου, ο οποίος τελικά οδηγεί στο σχηματισμό των άτυπων παραστοματικών κυττάρων.

IV.4.5 Μηχανισμοί μεταγωγής μηνύματος κατά τη δημιουργία των παραστοματικών κυττάρων

Η δημιουργία των παραστοματικών κυττάρων των Poaceae αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα «συνομιλίας» μεταξύ γειτονικών κυττάρων. Αυτό προϋποθέτει ότι στα ΜΠ και τα ΜΚ λειτουργούν μηχανισμοί που ελέγχουν την εκπομπή του ερεθίσματος και άλλοι, οι οποίοι εμπλέκονται στην αντίληψή του.

Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι το ερέθισμα, το οποίο εκπέμπεται από το ΜΚ είναι η αυξίνη, γεγονός που υποστηρίζεται, μεταξύ άλλων, και από την παρατήρηση ότι οι μεταφορείς εκροής της αυξίνης PIN1 των ΜΚ, τα οποία είναι σε φάση επαγωγής, εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στην πλευρά του κυττάρου που γειτνιάζει με τα ΜΠ (Livanos και συν. 2015). Η ενεργοποίηση των μεταφορέων PIN1 επιτυγχάνεται με φωσφορυλίωσή τους από τις κινάσες PINOID, οι οποίες, με τη σειρά τους, ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση από τις PDKs (Zegzouti και συν. 2006). Οι κινάσες αυτές δεσμεύουν, μεταξύ άλλων, το προϊόν της καταλυτικής δραστηριότητας της PI3K (Lee και συν. 2010). Επομένως, η συμμετοχή της PI3K μπορεί να σχετίζεται με τις αλληλομετατροπές των φωσφοϊνοσιτιδίων που καθορίζουν την ενεργοποίηση των PIN1. Όμως, η PI3K μπορεί να εμπλέκεται και στη διαδικασία ανακύκλωσης των PIN1, καθώς, αφενός η πορεία αυτή εξαρτάται από την ακτίνη και αφετέρου διότι η PI3K επηρεάζει την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Lee και συν. 2008, Li και συν. 2008, Oliva και συν. 2013). Επιπλέον, η κατανομή των μεταφορέων PIN1 ελέγχεται και από φωσφοϊνοσιτιδικές κινάσες, αλλά και από τα προϊόντα των PLCs και PLDs (Li και συν. 2007γ, Testerink και Munnik 2011, Tejos και συν. 2014). Λαμβάνοντας υπόψη τη συμμετοχή των PLCs και PLDs (Apostolakos και συν. 2008), καθώς και της PI3K στη μεταγωγή του ερεθίσματος που επάγει τη δημιουργία παραστοματικών κυττάρων στο φυτό *Z. mays*, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι ο μεταβολισμός των φωσφοϊνοσιτιδίων ελέγχει την κατανομή των μεταφορέων PIN1.

Ωστόσο, διάφορα δεδομένα δείχνουν ότι οι ROS εμπλέκονται στην πολική μεταφορά της αυξίνης, μέσω του ελέγχου της κατανομής των PIN1. Για παράδειγμα, η κινάση PDK1 αποτελεί υπόστρωμα της OX11, η οποία ενεργοποιείται από τις ROS (Lee και συν. 2010). Εκτός από τις κινάσες PINOID, οι φωσφατάσες PP2A επίσης συνεντοπίζονται με τις PIN1 και ρυθμίζουν την ασύμμετρη κατανομή της ορμόνης κατά την ανάπτυξη του εμβρύου του φυτού *A. thaliana* (Michniewicz και συν. 2007). Στα μεταλλάγματα των PP2A,

διαταράσσεται το πρότυπο κατανομής της αυξίνης. Επιπλέον, η TON1 αποτελεί υπομονάδα της PP2A (Spinner και συν. 2013), ενώ τα δεδομένα μας δείχνουν ότι η έκφραση του γονιδίου *TON1a*, στα ακρόρριζα του φυτού *A. thaliana*, αναστέλλεται από τις ουσίες DPI, NAC και MEN, ενώ επάγεται από το H_2O_2 . Επομένως, μπορεί να υποθεθεί ότι η ανασχεση της ασύμμετρης διαίρεσης των ΜΠ στα αρτίβλαστα, τα οποία υφίστανται επίδραση με DPI, NAC και MEN, σχετίζεται με τη διατάραξη της κατανομής της αυξίνης στα κύτταρα αυτά. Αντίστοιχα, δεν αποκλείεται, η επαγωγή της ασύμμετρης διαίρεσης στην περίπτωση της επίδρασης με H_2O_2 σε πιο βασικές περιοχές του φύλλου, αλλά και στα ενδιάμεσα κύτταρα της στοματικής σειράς, να είναι αποτέλεσμα τροποποίησης του προτύπου κατανομής της αυξίνης. Εάν μία τέτοια υπόθεση είναι ορθή, θα είχε ενδιαφέρον να διερευνηθεί κατά πόσο στα επηρεασμένα αρτίβλαστα μεταβάλλεται το πρότυπο κατανομής των PIN1, αλλά και των άλλων ομάδων μεταφορέων αυξίνης, όπως οι μεταφορείς εισροής της αυξίνης AUX1 (Balzan και συν. 2014).

Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS θα μπορούσε να μεταβάλλει την αντίληψη του επαγωγικού ερεθίσματος από τα ΜΠ, π.χ. επηρεάζοντας την κατανομή των πρωτεϊνών AUX1. Η επίδραση με As_2O_3 , αυξάνει τα επίπεδα του H_2O_2 στις ρίζες του φυτού *A. thaliana* και διευκολύνει τη μεταφορά της αυξίνης, μέσω των μεταφορέων AUX1. Η είσοδος της αυξίνης, στα κύτταρα των φυτών αγρίου τύπου, προσδίδει ανθεκτικότητα στην επίδραση, η οποία, όμως, δεν παρατηρείται στα μεταλλάγματα *aux1*, στα οποία αναστέλλεται η είσοδος της αυξίνης που επάγεται από το H_2O_2 (Krishnamurthy και Rathinasabapathi 2013).

Σχετικά με τον τρόπο αντίληψης από τα ΜΠ του ερεθίσματος που εκπέμπει το MK, τα τελευταία χρόνια στο πολικό άκρο των ΜΠ του φυτού *Z. mays*, έχουν εντοπισθεί αρκετά μόρια, τα οποία θεωρούνται ότι συμμετέχουν στο μηχανισμό μεταγωγής του ερεθίσματος που καθιερώνει την πόλωση σε αυτά. Αυτά τα μόρια είναι οι RLKs PANGLOSS1 και 2 (PAN1, PAN2), οι ROP GTPάσες, αλλά και πρωτεΐνες του συμπλόκου SCAR/WAVE (Cartwright και συν. 2009, Humphries και συν. 2011, Zhang και συν. 2012β, Facette και συν. 2015). Εχει προταθεί ένας μηχανισμός μεταγωγής του επαγωγικού ερεθίσματος, ο οποίος περιλαμβάνει σειρά βημάτων και αρχίζει με την εκπομπή του επαγωγικού ερεθίσματος από το MK (Facette και συν. 2015). Το επαγωγικό ερέθισμα προκαλεί αρχικά τη στρατολόγηση του συμπλόκου SCAR/WAVE στο πολικό άκρο του ΜΠ, το οποίο στρατολογεί σε αυτή τη θέση την RLK PAN2 και αυτή, με τη σειρά της, την PAN1. Η PAN1 αλληλεπιδρά με ROPs, συμβάλλοντας στην πολική τοποθέτησή τους αλλά και την ενεργοποίησή τους. Οι ενεργοποιημένες ROP αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο SCAR και ενεργοποιούν το σύμπλοκο Agp2/3, μέσω του οποίου δημιουργείται η πλάκα-MA. Στη συνέχεια, ο πυρήνας, με μία διαδικασία που ελέγχεται από την πλάκα-MA, μεταναστεύει στο πολικό άκρο του ΜΠ (Facette και συν. 2015).

Ωστόσο, τα δεδομένα μας αποδεσμεύουν τη συγκρότηση της πλάκας-MA από την πολική μετανάστευση του πυρήνα του ΜΠ (βλέπε επίσης Livanos και συν. 2015). Επιπλέον, η PAN1 δεν φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη μεταγωγή του ερεθίσματος που προκαλεί τη διαίρεση των ΜΠ, δεδομένου ότι τοπικές συγκεντρώσεις αυτής της πρωτεΐνης έχουν βρεθεί στα παραστοματικά κύτταρα, τα ενδιάμεσα κύτταρα της στοματικής σειράς του φυτού *Z. mays* (Παντερής και συν. 2013, Sutimantanapi και συν. 2014), αλλά και σε ΜΠ, στα οποία είχε ανασχεθεί πειραματικά η διαίρεσή τους (Παντερής και συν. 2013). Είναι περισσότερο πιθανό, η PAN1 να συμμετέχει στη διαμόρφωση τοπικών συναθροίσεων MA στο περιφερειακό κυτόπλασμα (Παντερής και συν. 2013, Sutimantanapi και συν. 2014).

Παράλληλα, οι Facette και συν. (2015) δεν αποκλείουν το ενδεχόμενο, το σύμπλοκο SCAR/WAVE να στρατολογεί την PAN2. Η υπόθεση αυτή βασίζεται σε μελέτες κυττάρων θηλαστικών, οι οποίες υποστηρίζουν ότι το σύμπλοκο SCAR/WAVE αλληλεπιδρά με διάφορους υποδοχείς και άλλα πρωτεϊνικά μόρια, στρατολογώντας αυτά σε συγκεκριμένες θέσεις (Chen και συν. 2014). Πρέπει να σημειωθεί ότι, στα λοβωτά κύτταρα του φύλλου και τις τρίχες του φυτού *A. thaliana*, το ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελεί απαραίτητο οργάνο για τη λειτουργία του συμπλόκου SCAR/WAVE (Zhang και συν. 2013). Επομένως, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι, στο φυτό *Z. mays*, το ενδοπλασματικό δίκτυο συσσωρεύεται στο πολικό άκρο των ΜΠ (Giannoutsou και συν. 2011), αλλά και ότι η ίδια περιοχή χαρακτηρίζεται από έντονη συσσώρευση ROS. Εφόσον η οργάνωση του συμπλόκου SCAR/WAVE είναι αναγκαία για την καθιέρωση πόλωσης στα ΜΠ, τότε μπορεί να υποτεθεί ότι η παρουσία ROS στο πολικό άκρο είναι απαραίτητη για τη δημιουργία του συμπλόκου SCAR/WAVE ή είναι ένα από τα φαινόμενα που συνοδεύουν τη λειτουργία του σε αυτή τη θέση.

Σε κάθε περίπτωση, είναι λογικό να θεωρήσουμε ότι, η παρουσία των ROS στο πολικό άκρο των ΜΠ είναι αποτέλεσμα της δράσης του υποψήφιου μορφογενετικού ερεθίσματος, δηλαδή της αυξίνης. Είναι γνωστό ότι η παρουσία της που οδηγεί στη βαρυντροπική απόκριση της ρίζας, επάγει την παραγωγή ROS, μέσω της ενεργοποίησης της NADPH οξειδάσης από την PI3K (Joo και συν. 2005). Στους αναπτυσσόμενους γυρεοκόκκους, η αυξίνη πυροδοτεί αλληλουχία βημάτων που περιλαμβάνουν διαδοχικά την ενεργοποίηση της RLK FERONIA, ROP GTPασών και παραγωγή ROS από την NADPH-οξειδάση (Wu και συν. 2011). Στα κύτταρα των θηλαστικών, η PI3K σχετίζεται με τη στρατολόγηση της GTPάσης Rac-1, η οποία, με τη σειρά της, ενεργοποιεί την NADPH-οξειδάση. Όμως, δεν έχουν δημοσιευτεί μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα που να αφορούν στη σχέση της PI3K με τις ROPs των φυτικών κυττάρων (Liu και συν. 2012α). Πάντως, στα μεταναστεύοντα κύτταρα του ενδοθηλίου, η ενεργοποίηση του συμπλόκου WAVE3 έπεται της δραστηριότητας της PI3K (Sossey-Alaoui και συν. 2005).

Η αναστολή της δραστηριότητας της PI3K και των NADPH-οξειδωσών αναστέλλει την εκδήλωση των ασυμμέτρων διαιρέσεων στα ΜΠ του φυτού *Z. mays*. Το ίδιο συμβαίνει και στα μεταλλάγματα, τα οποία στερούνται της δράσης της RLK PAN2 ή στα μεταλλάγματα *rop2* (Facette και συν. 2015). Τα παραπάνω υποστηρίζουν ότι η αυξίνη, η PI3K και οι ROS μαζί με τις ROP και την PAN2, συμμετέχουν σε έναν πολύπλοκο μηχανισμό, ο οποίος καθιερώνει την πόλωση και επάγει την ασύμμετρη διαίρεση των ΜΠ. Το πρώτο βήμα αυτού του μηχανισμού πρέπει να είναι η είσοδος της αυξίνης στον αποπλάστη, μεταξύ MK και ΜΠ (Livanos και συν. 2015), γεγονός το οποίο συνοδεύεται από παραγωγή ROS, μέσω της NADPH-οξειδάσης, σε αυτή τη θέση.

Η παραγωγή ROS στο πολικό άκρο του ΜΠ πρέπει να έχει σημαντική συμβολή στην καθιέρωση πόλωσης και την επαγωγή της ασύμμετρης διαίρεσης. Αυτό υποστηρίζεται, εκτός από την παρουσία ROS στο πολικό άκρο του ΜΠ, και από την επίδραση με H_2O_2 , το οποίο προωθεί τη δημιουργία των παραστοματικών κυττάρων και επιπλέον ευνοεί την ασύμμετρη διαίρεση των ενδιάμεσων κυττάρων της στοματικής σειράς. Γνωρίζοντας ότι η αυξίνη επάγει την παραγωγή ROS (Wu και συν. 2011), μπορεί να υποτεθεί ότι η συσσώρευση H_2O_2 στον αποπλάστη μιμείται/ή πολλαπλασιάζει τη δράση της αυξίνης. Ωστόσο, η επίδραση με MEN δεν έχει το ίδιο αποτέλεσμα. Η αυξίνη, παρουσία των ROS, μπορεί να μετατραπεί στην ανενεργή μορφή 2-oxindole-3-acetic-acid (ox-IAA). Σε αυτή τη μορφή, η αυξίνη δεν μπορεί να μεταφερθεί ούτε να εκδηλώσει τη δράση της (Considine και Foyer 2014). Γνωρίζοντας ότι η MEN αυξάνει τις συγκεντρώσεις των ROS εντός των κυττάρων, μπορούμε να υποθέσουμε ότι, η αυξίνη στα επηρεασμένα με MEN MK, είναι στην αδρανή μορφή της και επομένως δεν μεταφέρεται στα ΜΠ, ή ότι στα ΜΠ η ox-IAA δεν μπορεί να δρομολογήσει τις αποκρίσεις που είναι απαραίτητες για την εκδήλωση της ασύμμετρης διαίρεσης. Βέβαια, ένα τέτοιο σενάριο έρχεται σε αντίφαση με τα δεδομένα που έχουν προκύψει από το H_2O_2 , καθώς αυτό ανήκει στις ROS, οι οποίες, τουλάχιστον εν μέρει, είναι σε θέση να συμμετέχουν στη μετατροπή της IAA σε ox-IAA (Peer και συν. 2013).

Με βάση τα παραπάνω, υποστηρίζεται ότι, αν και η παραγωγή ROS είναι απαραίτητη για την εκδήλωση των ασυμμέτρων διαιρέσεων στα ΜΠ, η σχέση των ROS με την αυξίνη είναι πολύπλοκη και επιπλέον ρυθμίζεται αυστηρά κατά τη διάρκεια του χρόνου. Η παραδοχή αυτή, ενδεχομένως, μπορεί να ερμηνεύσει και το γεγονός ότι η εξωγενής χορήγηση H_2O_2 επάγει την ασύμμετρη διαίρεση των ενδιάμεσων κυττάρων της στοματικής σειράς, κυρίως εκείνων που γειτνιάζουν με ώριμα MK ή νεαρά στόματα. Η παρουσία των ROS και της αυξίνης, στο πολικό άκρο του ΜΠ, θα πρέπει επίσης να προκαλεί, στη συνέχεια, τη μετανάστευση του πυρήνα στην πολική του θέση και να επάγει την ασύμμετρη διαίρεση του ΜΠ, μέσω μονοπατιών MAPKs ή μέσω άλλων μηχανισμών σηματοδότησης (βλέπε Hirt 2000, Oliva και συν. 2013). Επειδή τα δεδομένα μας υποστηρίζουν ότι η p46-MAPK

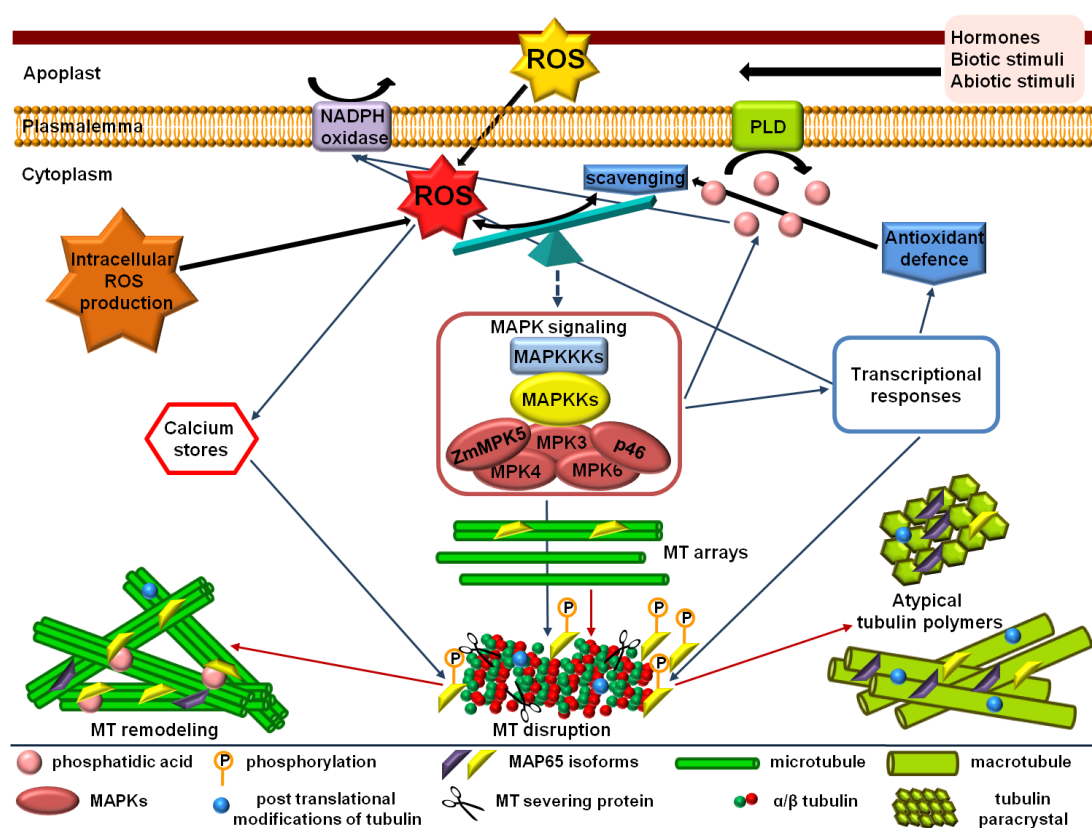
συμμετέχει στους μηχανισμούς αντίληψης των μεταβολών των επιπέδων ROS στο ακρόρριζο, θα είχε ενδιαφέρον να διερευνηθεί το ενδεχόμενο να συμμετέχει η συγκεκριμένη κίνηση και στην αντίληψη του ερεθίσματος που επάγει την ασύμμετρη διαίρεση στα ΜΠ.

IV. 5 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

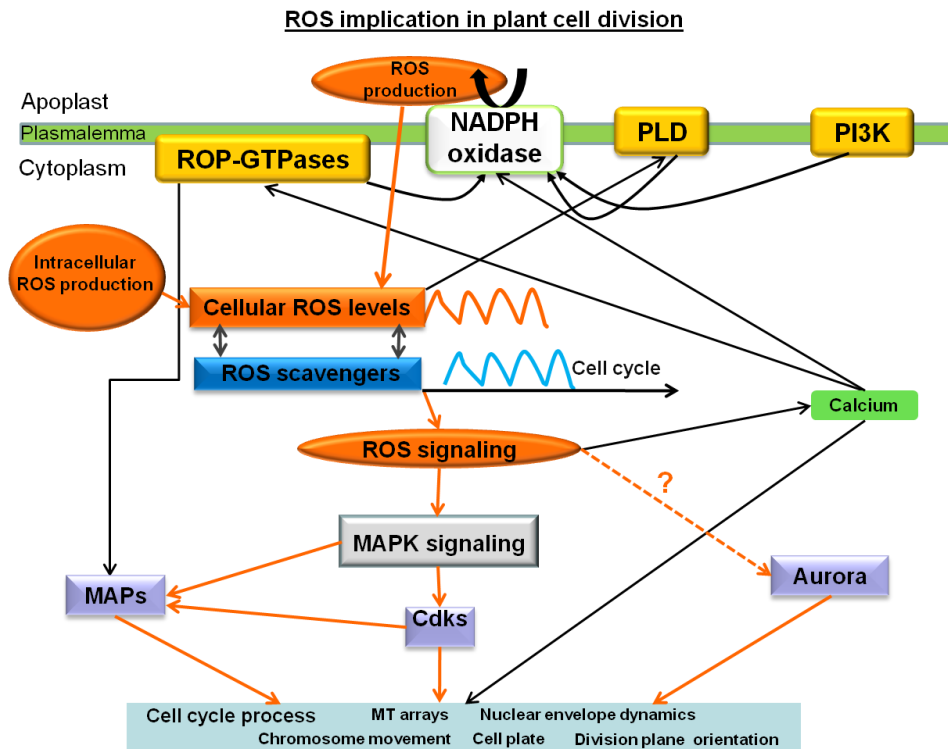
Συνοψίζοντας τα δεδομένα της παρούσας διατριβής μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι ROS συμμετέχουν ενεργά στις παρακάτω κυτταρικές διαδικασίες των ανωτέρων φυτών που μελετήθηκαν: α) την οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης, β) την πορεία της κυτταροδιαίρεσης, γ) τον καθορισμό του επιπέδου της κυτταροδιαίρεσης, και δ) τη μεταγωγή διακυτταρικών ερεθισμάτων που οδηγούν στη διαμόρφωση κυτταρικών προτύπων. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε για πρώτη φορά ότι:

1. Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS οδηγεί στην καταστροφή των ΜΣ και την αντικατάστασή τους με άτυπα πολυμερή σωληνίνης (μακροσωληνίσκους ή παρακρυστάλλους σωληνίνης, Livanos και συν. 2012α, 2012β). Η οργάνωση των άτυπων πολυμερών είναι πιθανόν αποτέλεσμα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της σωληνίνης και επιτυγχάνεται με τη βοήθεια MAP πρωτεϊνών. Οι αλλαγές αυτές δρομολογούνται από μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος με τη συμμετοχή MAPKs, οι οποίοι μηχανισμοί αποκρίνονται στις αλλαγές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων (Εικ. 84, Livanos και συν. 2014α, 2014β). Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι αποκρίσεις των κυττάρων σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις περιλαμβάνουν αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και αύξηση των επιπέδων των ROS, διατυπώνεται η υπόθεση ότι οι αλλαγές στα επίπεδα των ROS και η κατάσταση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης έχουν αμφίδρομη σχέση, γεγονός που υπογραμμίζει το ρόλο τους στην αντίληψη των καταπονήσεων και την απόκριση των κυττάρων σε αυτές (βλέπε Livanos και συν. 2014β).
2. Οι ROS έχουν ρυθμιστικό ρόλο σε σειρά διαδικασιών του κυτταρικού κύκλου (Εικ. 85). Η διατάραξη της ομοιόστασής τους επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την οργάνωση της μιτωτικής και κυτοκινητικής συσκευής, τη συμπεριφορά του πυρηνικού φακέλου, το διαχωρισμό και τη μετακίνηση των θυγατρικών ομάδων χρωμοσωμάτων και τη δημιουργία της κυτταρικής πλάκας (Livanos και συν. 2012α, 2012β). Η συμμετοχή των ROS στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου εκδηλώνεται και μέσω της δράσης κυκλινών. Ο ρυθμιστικός ρόλος τους υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, οι ROS και οι αντιοξειδωτικές ενώσεις αυξομειώνονται.
3. Οι ROS πιθανόν συμμετέχουν στον καθορισμό του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης. Η αλλαγή της ομοιόστασης των ROS διαταράσσει τους μηχανισμούς που καθορίζουν το επίπεδο της κυτταροδιαίρεσης, ή/και εκείνους που είναι υπεύθυνοι για το σχηματισμό της προ-προφασικής ζώνης.

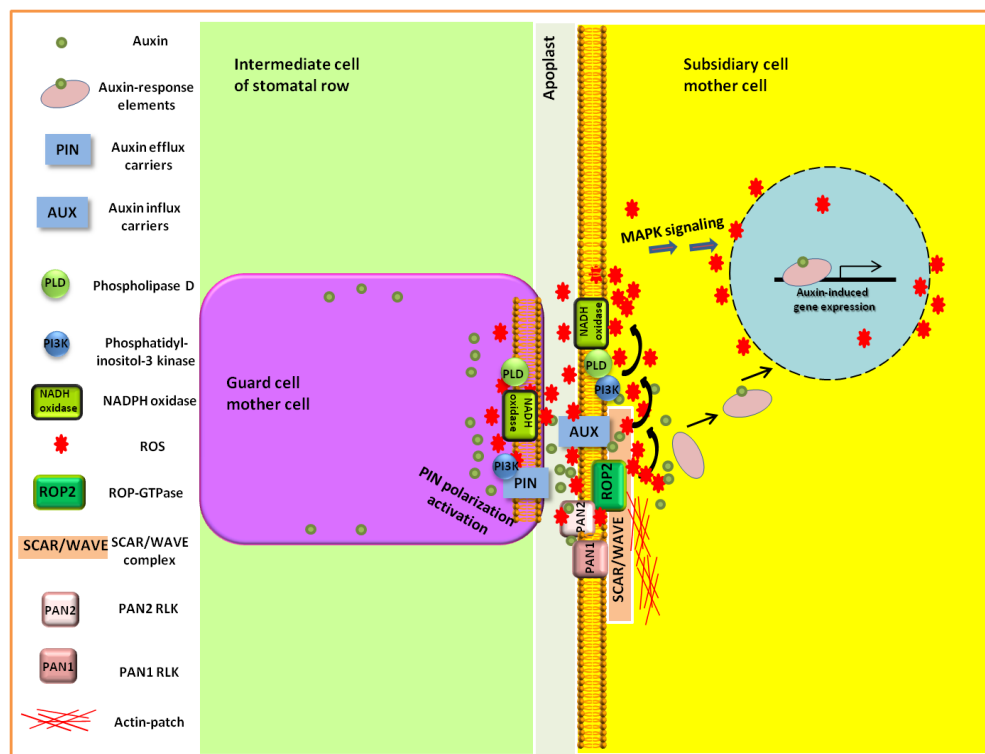
4. Οι ROS συμμετέχουν στη μεταγωγή διακυτταρικών μορφογενετικών ερεθισμάτων κατά την ανάπτυξη των στοματικών συμπλόκων του φυτού *Z. mays*. Διαπιστώθηκε ότι η ελεγχόμενη, τοπικά και χρονικά, παραγωγή ROS συμμετέχει καθοριστικά στη δρομολόγηση της αλληλουχίας των γεγονότων, μέσω των οποίων το MK επάγει την ασύμμετρη διαίρεση του ΜΠ, που δίδει γένεση στα παραστοματικά κύτταρα. Γνωρίζοντας ότι στο σύστημα αυτό το επαγωγικό ερέθισμα είναι η αυξίνη, διατυπώνεται η υπόθεση ότι οι ROS, οι οποίες εντοπίζονται στη θέση επαφής ΜΚ και ΜΠ, παράγονται ως απόκριση στο ορμονικό ερέθισμα και συμμετέχουν, μέσω πολύπλοκων μηχανισμών μεταγωγής μηνύματος, στην καθιέρωση πόλωσης και την εκδήλωση της ασύμμετρης διαίρεσης στα ΜΠ. Στην Εικ. 86, παρουσιάζεται συνοπτικά η πιθανή πορεία του μηχανισμού μεταγωγής του επαγωγικού ερεθίσματος.



Εικόνα 84. Σχηματική απεικόνιση πιθανών μηχανισμών αντίληψης των μεταβολών στα επίπεδα των ROS και της σχέσης τους με την οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης (από Livanos και συν. 2014β).



Εικόνα 85. Σχηματική απεικόνιση υποθετικών μηχανισμών, μέσω των οποίων οι ROS συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου των φυτών (από Livanos και συν. 2012β).



Εικόνα 86. Πιθανός μηχανισμός μεταγωγής του ερεθίσματος που εκπέμπεται από το ΜΚ και επάγει την ασύμμετρη διαίρεση του ΜΠ. Στο σχήμα αυτό, λαμβάνονται υπόψη τα ευρήματα της παρούσας διατριβής, όπως και δεδομένα προηγούμενων δημοσιεύσεων (Apostolakos και συν. 2008, Livanos και συν. 2015, Facette και συν. 2015).

Τα δεδομένα της εργασίας αυτής ενισχύουν περαιτέρω την κρατούσα άποψη ότι οι ROS διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη βιολογία των οργανισμών, παρότι μπορούν να καταστούν βλαβερά μόρια για τα κύτταρα. Οι οργανισμοί, για να αποφύγουν τις οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από την τελευταία τους ιδιότητα, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ομοιόστασης, οι οποίοι διατηρούν την ισορροπία των ROS με τις αντιοξειδωτικές ενώσεις. Τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα της ταχείας και «σκόπιμης» παραγωγής, αλλά και της εξουδετέρωσης των διαφόρων ROS, οι οποίες επιδεικνύουν διαφορετικά χαρακτηριστικά. Αν και η παραγωγή τους είναι τοπική, εμπλέκονται και στη μεταφορά σημάτων σε μεγάλες αποστάσεις κατά μήκος του φυτικού σώματος, δρώντας απευθείας ως μόρια μηνύματα ή κινητοποιώντας μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά τις καθιστούν εξαιρετικά σημαντικές για την αντίληψη διαφόρων περιβαλλοντικών και ορμονικών ερεθισμάτων και την εκτέλεση αναπτυξιακών διεργασιών των φυτών, επιτρέποντάς τους να λειτουργούν ουσιαστικά ως δευτερογενή μηνύματα (secondary messages). Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, η περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών, με τους οποίους τα κύτταρα διαχειρίζονται τις ROS, αλλά και ο τρόπος, με τον οποίο επιτυγχάνεται η εξειδίκευση στους μηχανισμούς σηματοδότησης που αυτές εμπλέκονται (βλέπε Mittler και συν. 2011).

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdrakhamanova A., Wang Q.Y., Khokhlova L., Nick P. 2003.** Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? *Plant & Cell Physiology* 44:676-686.
- Acharya B.R., Choudhury D., Das A., ChakrArti G. 2009.** Vitamin K3 disrupts the microtubule networks by binding to tubulin: a novel mechanism of its antiproliferative activity. *Biochemisty* 48:6963-6974.
- Acharya B.R., Chatterjee A., Ganguli A., Bhattacharya S., Chakrabarti G. 2014.** Thymoquinone inhibits microtubule polymerization by tubulin binding and causes mitotic arrest following apoptosis in A549 cells. *Biochimie* 97:78-91.
- Adamakis I.-D.S., Panteris E., Eleftheriou E.P. 2010.** Tungsten affects the cortical microtubules of *Pisum sativum* root cells: experiments on tungsten–molybdenum antagonism. *Plant Biology* 12:114-124.
- Adamakis I.-D.S., Panteris E., Cherianidou A., Eleftheriou E.P. 2013.** Effects of bisphenol A on the microtubule arrays in root meristematic cells of *Pisum sativum* L. *Mutation Research* 750:111-120.
- Ahmad P., Jaleel C.A., Salem M.A., Nabi G., Sharma S. 2010.** Roles of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical reviews in Biotechnology* 30:161-175.
- Akhmanova A., Hoogenraad C.C., Drabek K., Stepanova T., Dortland B., Verkerk T., Vermeulen W., Burgering B.M., De Zeeuw C.I., Grosveld F., Galjart N. 2001.** CLASPs are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* 104:923-935.
- Al-Bassam J., Chang F. 2011.** Regulation of microtubule dynamics by TOG-domain proteins XMAP215/Dis1 and CLASP. *Trends in Cell Biology* 21:604-614.
- Allani P.K., Sum T., Bhansali S.G., Mukherjee S.K., Sonee M. 2004.** A comparative study of the effect of oxidative stress on the cytoskeleton in human cortical neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196:29-36.
- Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. 2002.** Role of superoxide dismutases (SOD) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53:1331-1341.
- Ambrose J.C., Cyr R. 2007.** The kinesin ATK5 functions in early spindle assembly in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19:226-236.
- Ambrose J.C., Li W.X., Marcus A., Ma H., Cyr R. 2005.** A minus-end-directed kinesin with plus-end trackin protein activity is involved in spindle morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell* 16:1584-1592.
- Ambrose J.C., Shoji T., Kotzer A.M., Pighin J.A., Wasteneys G.O. 2007.** The *Arabidopsis* CLASP gene encodes a microtubule-associated protein involved in cell expansion and division. *The Plant Cell* 19:2763-2775.
- Ambrose J.C., Wasteneys G.O. 2008.** CLASP modulates microtubule-cortex interaction during self-organization of acentrosomal microtubules. *Molecular Biology of the Cell* 19:4730-4737.
- Ambrose C., Allard J.F., Cytrynbaum E.N., Wasteneys G.O. 2011.** A CLASP-modulated cell edge barrier mechanism drives cell-wide cortical microtubule organization in *Arabidopsis*. *Nature Communication* 2:430.
- Ambrose C., Cyr R. 2007.** Mitotic spindle assembly and function. In: *Cell Division Control in Plants*. Verma D.P.S., Hong S. (eds.), Plant Cell Monographs 9, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 125-140.

- Amos L.A. 2004.** Microtubule structure and its stabilization. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2:2153-2160.
- Amos L.A., Schlieper D. 2005.** Microtubules and maps. *Advances in Protein Chemistry* 71:257-298.
- Anderhag P., Hepler P.K., Lazzaro M.D. 2000.** Microtubules and microfilaments are both responsible for pollen tube elongation in the conifer *Picea abies* (Norway spruce). *Protoplasma* 214:141-157.
- Andreasson E., Ellis B. 2010.** Convergence and specificity in the *Arabidopsis* MAPK nexus. *Trends in Plant Science* 15:106-113.
- Andreeva Z., Barton D., Armour W.J., Li M.Y., Liao L.F., McKellar H.L., Pethybridge K.A., Marc J. 2010.** Inhibition of phospholipase C disrupts cytoskeletal organization and gravitropic growth in *Arabidopsis* roots. *Planta* 232:1263-1279.
- Angelini R., Cona A., Federico R., Fincato P., Tavladoraki P., Tisi A. 2010.** Plant amine oxidases “on the move”: An update. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:560-564.
- Apel K., Hirt H. 2004.** Reactive oxygen species: metabolism oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- Apostolakos P., Galatis B. 1985.** Studies on the development of the air pores and air chambers of *Marchantia paleacea*. III. Microtubule organization in preprophase-prophase initial aperture cells-formation of incomplete preprophase microtubule bands. *Protoplasma* 128:120-135.
- Apostolakos P., Galatis B. 1987.** Induction, polarity and spatial control of cytokinesis in some abnormal subsidiary cell mother cells of *Zea mays*. *Protoplasma* 140:26-42.
- Apostolakos P., Galatis B. 1992.** Patterns of microtubule organization in two polyhedral cell types in the gametophyte of the liverwort of *Marchantia paleacea* Bert. *New Phytologist* 122:165-178.
- Apostolakos P., Galatis B. 1998.** Microtubules and gametophyte morphogenesis in the liverwort *Marchantia paleacea*. In: *Bryology for the twenty-first century*. Bates J.W., Ashton N.W., Duckett J.G. (eds.), Maney & Son Ltd, Leeds, UK, pp. 205-221.
- Apostolakos P., Galatis B., Katsaros C., Schnepf E. 1990.** Tubulin conformation in microtubule-free cells of *Vigna sinensis*. An immunofluorescence and electron microscope study. *Protoplasma* 154:132-143.
- Apostolakos P., Panteris E., Galatis B. 2008.** The involvement of phospholipases C and D in the asymmetric division of subsidiary cell mother cells of *Zea mays*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 65:863-75.
- Aruoma O.I., Halliwell B., Hoey B.M., Butler J. 1989.** The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* 6:593-597.
- Asada K. 2006.** Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141:391-396.
- Ashtamker C., Kiss V., Sagi M., Davydov O., Fluhr R. 2007.** Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiology* 143:1817-1826.
- Atkinson N.J., Urwin P.E. 2012.** The interaction of plant biotic and abiotic stress: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* 63:3523-3544.
- Azimzadeh J., Nacry P., Christodoulidou A., Drevensek S., Camilleri C., Amieur N., Parcy F., Pastuglia M., Bouchez D. 2008.** *Arabidopsis* TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *The Plant Cell* 20:2146-2159.

- Azzi A., Davies K.J.A., Kelly F. 2004.** Free radical biology-terminology and critical thinking. *FEBS Letters* 558:3-6.
- Babior B.M. 2002.** The leucocyte NADPH oxidase. *Israel Medical Association Journal* 4:1023-1024.
- Babior B.M., Curnutte J.T., Kipnes B.S. 1975.** Pyridine nucleotide-dependent superoxide production by a cell-free system from human granulocytes. *Journal of Clinical Investigation* 56:1035-1042.
- Baluška F., Liners A., Hlavacka A., Schlicht M., van Custem P., McCurdy D.W., Menzel D. 2005.** Cell wall pectins and xyloglucans are internalized into dividing root cells and accumulate within cell plates during cytokinesis. *Protoplasma* 225:141-155.
- Balzan S., Gurmukh S.J., Carraro N. 2014.** The role of auxin transporters in monocots development. *Frontiers in Plant Science* 5:393.
- Ban Y., Kobayashi Y., Hara T., Hamada T., Hashimoto T., Takeda S., Hattori T. 2013.** α -tubulin is rapidly phosphorylated in response to hyperosmotic stress in rice and *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* 54:848-858.
- Banerjee M., Singh P., Panda D. 2010.** Curcumin suppresses the dynamic instability of microtubules, activates the mitotic checkpoint and induces apoptosis in MCF-7 cells. *FEBS Journal* 277:3437-3448.
- Bao W., Behm D.J., Nerurkar S.S., Ao Z., Bentley R., Mirabile R.C., Johns D.G., Woods T.N., Doe C.P.A., Coatney R.W., Ohlstein J.F., Douglas S.A., Willette R.N., Yue T.-L. 2007.** Effects of p38 MAPK inhibitor on angiotensin II-dependent hypertension, organ damage, and superoxide anion production. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 49:362-368.
- Barascu A., Le Chalony C., Pennarun G., Genet D., Imam N., Lopez B., Bertrand P. 2012.** Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO Journal* 31:1080-1094.
- Barba-Espin G., Diaz-Vivancos P., Clemente-Moreno M.J., Albacete A., Faize L., Faize M. 2010.** Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. *Plant, Cell & Environment* 33:981-994.
- Barra, H.S., Arce, C.A., Rodrviguez, J.A., Caputto, R. 1974.** Some common properties of the protein that incorporates tyrosine as a single unit and the microtubule proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 60:1384-1390.
- Bartlett J.M.S., Stirling D. 2003.** A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology* 226:3-6.
- Bartels S., González Besteiro M.A., Lang D., Ulm R. 2010.** Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends in Plant Sciences* 15:322-329.
- Bartosz G. 2009.** Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochemical Pharmacology* 77:1303-1315.
- Baskin T.I., Wilson J.E., Cork A., Williamson R.E. 1994.** Morphology and microtubule organization in *Arabidopsis* roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant & Cell Physiology* 35:935-942.
- Baskin T.I., Wilson J.E. 1997.** Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. *Plant Physiology* 113:493-502.
- Baxter A., Mittler R., Suzuki N. 2014.** ROS as key players in plant stress signaling. *Journal of Experimental Botany* 65:1229-1240.
- Beck M., Komis G., Müller J., Menzel D., Šamaj J. 2010.** *Arabidopsis* homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *The Plant Cell* 22:755-771.

- Beck M., Komis G., Ziemann A., Menzel D., Šamaj J. 2011.** Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 189:1069-1083.
- Bedard K., Krause K.-H. 2007.** The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* 87:245-313.
- Bell E., Takeda S., Dolan L. 2009.** Reactive oxygen species in growth and development. In: *Reactive oxygen species in plant signaling*. Signaling and Communication in Plants. del Rio L.A., Puppo A. (eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 43-54.
- Bellomo C., Mirabelli F., Vairetti M., Iosi F., Malorni W. 1990.** Cytoskeleton as a target in Menadione-induced oxidative stress in cultured mammalian cells. I. Biochemical and immunocytochemical features. *Journal of Cellular Physiology* 143:118-128.
- Benrahmoune M., Thérond P., Abedinzadeh Z. 2000.** The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine. *Free Radical Biology and Medicine* 29:775-782.
- Bensch K.G., Malawista S.E. 1968.** Microtubule crystals: A new biophysical phenomenon induced by *Vinca* alkaloids. *Nature* 218:1176-1177.
- Bergendi L., Beneš L., Duračková Z., Ferencik M. 1999.** Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences* 65:1865-1874.
- Bestwick C.S., Brown I.R., Bennett M.H., Mansfield J.W. 1997.** Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. *The Plant Cell* 9:209-221.
- Bethke P.C., Jones R.L. 2001.** Cell death in barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *The Plant Journal* 45:25-29.
- Bhalerao R.P., Eklöf J., Ljung K., Marchant A., Bennett M., Sandberg G. 2002.** Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* 29:325-332.
- Bhattacharjee S. 2005.** Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science* 89:1113-1121.
- Bhattacharjee S. 2012.** The language of reactive oxygen species signaling in plants. *Journal of Botany* 98:298.
- Björkblom B., Östman N., Hongisto V., Komarovski V., Filén J.-J., Nyman T.A., Kallunki T., Courtney M.J., Coffey E.T. 2005.** Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector. *Journal of Neuroscience* 25:6350-6361.
- Biń A.K. 2006.** Ozone solubility in liquids. *Ozone: Science & Engineering* 28:67-75.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. 2003.** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91:179-194.
- Blume Y.B., Krasylenko Y.A., Yemets A.I. 2012.** Effects of phytohormones on the cytoskeleton of the plant cell. *Russian Journal of Plant Physiology* 59:515-529.
- Blume Y.B., Lloyd C.W., Yemets A.I. 2008.** Plant tubulin phosphorylation and its role in cell cycle progression. In: *The plant cytoskeleton: a key tool for agro-biotechnology*. Blume Y.B., Vance Baird W., Yemets A.I., Breviario G. (eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 145-159.
- Bogatcheva N.V., Djanybek A., Mambetsariev B., Moldobaeva N., Verin A. 2007.** Involvement of microtubules, p38, and Rho kinases pathway in 2-methoxyestradiol-induced lung vascular barrier dysfunction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 292:487-499.

- Boguszewska D., Zagdańska B. 2012.** ROS as signaling molecules and enzymes of plant response to unfavorable environmental conditions. In: *Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects*. Lushchak V. (ed.), In Tech, Rijeka Croatia.
- Bolwell G.P., Wojtaszek P. 1997.** Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51:347-366.
- Bonsignore C.L., Hepler P.K. 1985.** Caffeine inhibition of cytokinesis: dynamics of cell plate formation-deformation *in vivo*. *Protoplasma* 129:28-35.
- Boxer L.A., Vanderbilt B., Bonsib S., Jersild R., Yang H.-H., Baehner R.L. 1979.** Enhancement of chemotactic response and microtubule assembly in human leukocytes by ascorbic acid. *Journal of Cellular Physiology* 100:119-126.
- Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Breviario D. 2008.** Plant tubulin genes: regulatory and evolutionary aspects. In: *Plant microtubules*. Plant Cell Monographs 11. Nick P. (ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 207-232.
- Breviario D., Gianì S., Morello L. 2013.** Multiple tubulins: evolutionary aspects and biological implications. *The Plant Journal* 75:202-218.
- Briat J.F., Lobréaux S., Grignon N., Vansuyt G. 1999.** Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *Cell and Molecular Life Sciences* 56:155-166.
- Briat J.F., Duc C., Ravet K., Gaymard F. 2010.** Ferritins and iron storage in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1800:806-814.
- Brigelius-Flohé R., Flohé L. 2011.** Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxidants & Redox Signaling* 15:2335-2381.
- Brosché M., Overmyer K., Wrzaczek M., Kangasjärvi J., Kangasjärvi S. 2010.** Stress signaling III: reactive oxygen species (ROS). In: *Abiotic stress adaptation in plants: physiological, molecular and genomic foundation*. Pareek A., Sopory S.K., Bohnert H.J., Govindjee (eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp.91-102.
- Brown R.C., Lemmon B.E. 2007.** The pleiomorphic plant MTOC: an evolutionary perspective. *Journal of Integrative Plant Biology* 49:1142-1153.
- Buchert F., Forreiter C. 2010.** Singlet oxygen inhibits ATPase and proton translocation activity of the thylakoid ATP synthase CF1CFo. *FEBS Letters* 584:147-152.
- Buchanan B.B., Balmer Y. 2005.** Redox regulation: a broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology* 56:187-220.
- Burhans W.C., Heintz N. 2009.** The cell cycle is a redox cycle: Linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radical Biology & Medicine* 47:1282-1293.
- Burk D.H., Zhong R., Ye Z.-H. 2007.** The katanin microtubule severing protein in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 49:1174-1182.
- Buschmann H., Chan J., Sanchez-Pulido L., Andrade-Navarro M.A., Doonan J.H., Lloyd C.W. 2006.** Microtubule-associated AIR9 recognizes the cortical division site at preprophase and cell-plate insertion. *Current Biology* 16:1938-1943.
- Cabreiro F., Picot C.R., Friguet B., Petropoulos I. 2006.** Methionine sulfoxide reductases relevance to aging and protection against oxidative stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1067:37-44.
- Cai G. 2010.** Assembly and disassembly of plant microtubules: tubulin modifications and binding to MAPs. *Journal of Experimental Botany* 61:623-626.

- Cai G., Cresti M. 2010.** Microtubule motors and pollen tube growth-still an open question. *Protoplasma* 247:131-143.
- Camilleri C., Azimzadeh J., Pastuglia M., Bellini C., Grandjean O., Bouchez D. 2002.** The *Arabidopsis* TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *The Plant Cell* 14:833-845.
- Cande W.Z. 1990.** Centrosomes: composition and reproduction. *Current Opinion in Cell Biology* 2:301-305.
- Carletti B., Passarelli C., Sparaco M., Tozzi G., Pastore A., Bertini E., Piemonte F. 2011.** Effect of protein glutathionylation on neuronal cytoskeleton: a potential link to neurodegeneration. *Neuroscience* 192:285-294.
- Carol R.J., Dolan L. 2006.** The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *Journal of Experimental Botany* 57:1829-1834.
- Carol R.J., Takeda S., Linstead P., Durrant M.C., Kakesova H., Derbyshire P., Drea S., Zarsky V., Dolan L. 2005.** A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature* 438:1013-1016.
- Cartwright H.N., Humphries J.A., Smith L.G. 2009.** PAN1: A receptor-like protein that promotes polarization of an asymmetric cell division in maize. *Science* 323:649-651.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P.J., Bennett M. 2001.** Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell* 13:843-852.
- Caverzan A., Passaia G., Rosa S.B., Ribeiro C.W., Lazzarotto F., Margis-Pinheiro M. 2012.** Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* 35:1011-1019.
- Cha H., Wang X., Li W., Fornace Jr. A.J. 2007.** A functional role for p38 MAPK in modulating mitotic transit in the absence of stress. *The Journal of Biological Chemistry* 282:22984-22992.
- Chalfie M., Thomson J.N. 1982.** Structural and functional diversity in the neuron microtubules of *Caenorabditis elegans*. *The Journal of Cell Biology* 93:15-23.
- Chan J., Calder G.M., Doonan J.H., Lloyd, C.W. 2003.** EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. *Nature Cell Biology* 5:967-971.
- Chang H.Y., Smertenko A.P., Igarashi H., Dixon D.P., Hussey P.J. 2005.** Dynamic interaction of NtMAP65-1a with microtubules in vivo. *Journal of Cell Science* 118:3195-3201.
- Chang T.-S., Jeong W., Lee D.-Y., Cho C.-S., Rhee S.G. 2004.** The RING-H2-finger protein APC11 as a target of hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine* 37:521-530.
- Chang X., Nick P. 2012.** Defence signalling triggered by Flg22 and Harpin is integrated into a different stilbene output in *Vitis* cells. *PLoS ONE* 7:e40446.
- Chang-Jie J., Sonobe S. 1993.** Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher-plant microtubule-associated protein. *Journal of Cell Science* 105:891-901.
- Chaudhuri A.R., Khan I.A., Ludueña R.F. 2001.** Detection of disulfide bonds in bovine brain tubulin and their role in protein folding and microtubule assembly *in vitro*: a novel disulfide detection approach. *Biochemistry* 40:8834-8841.
- Chen B., Brinkmann K., Chen Z., Pak C.W., Liao Y., Shi S., Henry L., Grishin N.V., Bogdan S., Rosen M.K. 2014.** The WAVE regulatory complex links diverse receptors to the actin cytoskeleton. *Cell* 156:195-207.

- Chen C., Dickman M.B. 2005.** Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102:3459-3464.
- Chen W., Seefeldt T., Young A., Zhang X., Zhao Y., Ruffolo J., Kaushik R.S., Guan X. 2012.** Microtubule S-glutathionylation as a potential approach for antimitotic agents. *BMC Cancer* 12:245.
- Cho S.-O., Wick S.M. 1990.** Distribution and function of actin in the developing stomatal complex of winter rye (*Secale cereale* cv. Puma). *Protoplasma* 157:154-164.
- Cho S.-O., Wick S.M. 1991.** Actin in the developing stomatal complex of winter rye: a comparison of actin antibodies and Rh-phalloidin labeling of control and CB-treated tissues. *Cell Motility and Cytoskeleton* 19:25-36.
- Chu B., Snustad P., Carter J.V. 1993.** Alteration of β -tubulin gene expression during low-temperature exposure in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 103:371-377.
- Chu C.-W., Hou F., Zhang J., Phu L., Loktev A.V., Kirkpatrick D.S., Jackson P.K., Zhao Y., Zou H. 2011.** A novel acetylation of β -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Molecular Biology of the Cell* 22:448-456.
- Clark H.M., Hagedorn T.D., Landino L.M. 2014.** Hypothiocyanous acid oxidation of tubulin cysteines inhibits microtubule polymerization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 541:67-73.
- Cleary A.L. 1995.** F-actin redistributions at the division site in living *Tradescantia* stomatal complexes as revealed by microinjection of rhodamine-phalloidin. *Protoplasma* 185:152-165.
- Cleary A.L. 2000.** Actin in formation of stomatal complexes. In: *Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions*. Staiger C.J., Baluška F., Volkmann D., Barlow P.W. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp.411-26.
- Cleary A.L., Mathesius U. 1996.** Rearrangements of F-actin during stomatogenesis visualised by confocal microscopy in fixed and permeabilised *Tradescantia* leaf epidermis. *Botanica Acta* 109:15-24.
- Coelho S.M.B., Brownlee C., Bothwell J.H.F. 2008.** A tip-high, Ca^{2+} interdependent, reactive oxygen species gradient is associated with polarized growth in *Fucus serratus* zygotes *Planta* 227:1037-1046.
- Coelho S.M., Taylor A.R., Ryan K.P., Sousa-Pinto I., Brown M.T., Brownlee C. 2002.** Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca^{2+} wave propagation in fucus rhizoid cells. *The Plant Cell*. 14:2369-2381.
- Colcombet J., Hirt H. 2008.** *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* 413:217-226.
- Colón-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T., Doerner P. 1999.** Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *The Plant Journal* 20:503-508.
- Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. 2006.** Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* 11:80-88.
- Considine M.J., Foyer C.H. 2014.** Redox regulation of plant development. *Antioxidants & Redox Signaling* 21:1305-1326.
- Contento A.L., Bassham D.C. 2012.** Structure and function of endosomes in plant cells. *Journal of Cell Science* 125:3511-3518.
- Corre S., Primot A., Baron Y., Le Seyec J., Goding C., Galibert M.-D. 2009.** Target gene specificity of USF-1 is directed via p38-mediated phosphorylation-dependent acetylation. *Journal of Biological Chemistry* 284:18851-18862.

- Corpas F.J., Barroso J.B., del Río L.A. 2001.** Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* 6:145-150.
- Cuadrado A., Nebreda A.R. 2010.** Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal* 429:403-417.
- Cuenda A., Rousseau S. 2007.** p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773:1358-1375.
- Cueva J.G., Hsin J., Huang K.C., Goodman M.B. 2012.** Posttranslational acetylation of α -tubulin constrains protofilament number in native microtubules. *Current Biology* 22:1066-1074.
- Cyr R.J. 1994.** Microtubules in plant morphogenesis: role of the cortical array. *Annual Review of Cell Biology* 10:153-180.
- Dalle-Donne I., Rossi R., Milzani A., di Simplicio P., Colombo R. 2001.** The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radical Biology & Medicine* 31:1624-1632.
- Dalle-Donne I., Giustarini D., Colombo R., Rossi R., Milzani A. 2003.** Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine* 9:169-176.
- Dalle-Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R., Milzani A. 2006.** Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10:389-406.
- Darzynkiewicz Z., Li X., Gong J. 1994.** Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods in Cell Biology* 41:15-38.
- Das Sarma A., Mallick A.R., Ghosh A.K. 2010.** Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research* 1:185-192.
- Datta S., Snow C.J., Pascha B.M. 2014.** A pathway linking oxidative stress and the Ran GTPase system in progeria. *Molecular Biology of the Cell*
- Davies S.P., Reddy H., Caivano M., Cohen P. 2000.** Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal* 351:95-105.
- Davis Molk A.P., Moreland J.G. 2014.** ROS-containing endosomal compartments: implications for signaling. *Methods in Enzymology* 535:201-224.
- Davletova S., Schlauch K., Coutu J., Mittler R. 2005.** The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139:847-856.
- Deak K.I., Malami J. 2005.** Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal* 43:17-28.
- Deinum E.E., Mulder B.M. 2013.** Modelling the role of microtubules in plant cell morphology. *Current Opinion in Plant Biology* 16:688-692.
- Dehmelt L., Halpain S. 2004.** The MAP2/Tau family of microtubule associated proteins. *Genome Biology* 6:204.
- del Duca S., Serafini-Fracassini D., Bonner P.L., Cresti M., Cai G. 2009.** Effects of post-translational modifications catalyzed by pollen transglutaminase on the functional properties of microtubules and actin filaments. *Biochemical Journal* 418:651-664.
- de Pinto M.C., Francis D., De Gara L. 1999.** The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* 209:90-97.
- de Pinto M.C., Locato V., De Gara L. 2012.** Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, Cell & Environment* 35:234-244.

- del Río L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M., Barroso J.B. 2006.** Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 141:330-335.
- del Río L.A., Puppo A. 2009.** *Reactive oxygen species in plant signaling*. Signaling and Communication in Plants. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, 245p.
- Deller S., Macheroux P., Sollner S. 2008.** Flavin-dependent quinone reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65:141-160.
- Desai A., Mitchison T.J. 1997.** Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13:83-117.
- Devasagayam T.P.A., Tilac J.C., Boloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele R.D. 2004.** Free radicals and antioxidants in human health. *Journal of the Association of Physicians in India* 52:794-804.
- Devillard L., Vandroux D., Tissier C., Brochot A., Voisin S., Rochette L., Athias P. 2006.** Tubulin ligands suggest a microtubule-NADPH oxidase relationship in postischemic cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology* 548:64-73.
- Dewitte W., Murray J.A.H. 2003.** The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* 54:235-64.
- Dhonukshe P., Baluška F., Schlicht M., Hlavacka A., Samaj J., Friml J., Gadella T.W. Jr. 2006.** Endocytosis of cell surface material mediates cell plate formation during plant cytokinesis. *Developmental Cell* 10:137-10150.
- Dickinson B.C., Chang C.J. 2011.** Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling stress responses. *Nature Chemical Biology* 7:504-511.
- Ditengou F.A., Teale W.D., Kochersperger P., Flittner K.A., Kneuper I., van der Graaff E., Nziengui H., Pinosa F., Li X., Nitschke R., Laux T., Palme K. 2008.** Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105:18818-18823.
- Dixit R., Cyr R. 2003.** Cell damage and reactive oxygen species production induced by fluorescence microscopy: effect on mitosis and guidelines for non-invasive fluorescence microscopy. *The Plant Journal* 36:280-290.
- Dixit R., Cyr R. 2004.** The cortical microtubule array: from dynamics to organization. *The Plant Cell* 16:2546-2552.
- Dixon D.P., Skipsey M., Grundy N.M., Edwards R. 2005.** Stress-induced protein S-glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138:2233-2244.
- Doczi R., Brader G., Pettko-Szandtner A., Rajh I., Djamei A., Pitzschke A., Teige M., Hirt H. 2007.** The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *The Plant Cell* 19:3266-3279.
- Dolado I., Swat A., Ajenjo N., De Vita G., Cuadrado A., Nebreda A.R. 2007.** p38 α MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* 11:191-205.
- Dominguez R., Holmes K.C. 2011.** Actin structure and function. *Annual Review of Biophysics* 40:169-186.
- Dorléans A., Gigant B., Ravelli R.B.G., Mailliet P., Mikol V., Knossow M. 2009.** Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106:13775-13779
- Dos Santos C.V., Rey P. 2006.** Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in Plant Science* 11:329-334.
- Dowing K.H., Nogales E. 1998.** Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. *Current Opinion in Structural Biology* 8:785-791.

- Drøbak B.K., Franklin-Tong V.E., Staiger C.J. 2004.** The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling. *New Phytologist* 163:13-30.
- Duan Q., Kita D., Johnson E.A., Aggarwai M., Gates L., Wu H.-M., Cheung A.Y. 2014.** Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in *Arabidopsis*. *Nature Communications* 5:3129.
- Duroc Y., Bouchez D., Pastuglia M. 2011.** The preprophase band and division site determination in land plants. In: *The Plant Cytoskeleton*. Advances in Plant Biology 2. Liu B. (ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 145-185.
- Dynowski M., Schaaf G., Loque D., Moran O., Ludewig U. 2008.** Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. *Biochemical Journal* 414:53-61.
- Ebneth A., Drewes G., Mandelkow E.-M., Mandelkow E. 1999.** Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 44:209-224.
- Ehrhardt D.W. 2008.** Straighten up and fly right-microtubule dynamics and organization of non-centrosomal arrays in higher plants. *Current Opinion in Cell Biology* 20:107-116.
- El-Agamey A., Lowe G.M., McGarvey D.J., Mortensen A., Phillip D.M., Truscott T.G., Young A.J. 2004.** Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 430:37-48.
- El-Maarouf-Bouteau H., Bailly C. 2008.** Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling & Behavior* 3:175-182.
- Eleftheriou E.P., Adamakis I.-D.S., Fatsiou M., Panteris E. 2013.** Hexavalent chromium disrupts mitosis by stabilizing microtubules in *Lens culinaris* root tip cells. *Physiologia Plantarum* 147:169-180.
- Eleftheriou E.P., Baskin T.I., Hepler P.K. 2005.** Aberrant cell plate formation in the *Arabidopsis thaliana* microtubule organization 1 mutant. *Plant Physiology* 46:671-675.
- Escobar-Restrepo J.M., Huck N., Kessler S., Gagliardini V., Gheyselinck J., Yang W.C., Grossniklaus U. 2007.** The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. *Science* 317:656-660.
- Eulgem T., Rushton P.J., Robatzek S., Somssich I.E. 2000.** The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Sciences* 5:199-206.
- Euglem T., Somssich I.E. 2007.** Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 10:366-371.
- Evans D.E., Shvedunova M., Graumann K. 2011.** The nuclear envelope in the plant cell cycle: structure, function and regulation. *Annals of Botany* 107:1111-1118.
- Evrard J.-L., Pieuchot L., Vos J.W., Vernos I., Schmit A.-C. 2009.** Plant TPX2 and related proteins. *Plant Signaling & Behavior* 4:69-72.
- Facette M.R., Park Y., Sutimantanapi D., Luo A., Cartwright H.N., Yang B., Bennett E.J., Sylvester A.W., Smith L.G. 2015.** The SCAR/WAVE complex polarizes PAN receptors and promotes division asymmetry in maize. *Nature Plants* 14024.
- Facette M.R., Smith L.G. 2012.** Division polarity in developing stomata. *Current Opinion in Plant Biology* 15:585-592.
- Fath A., Bethke P.C., Jones R.L. 2001.** Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant Physiology* 126:156-166.
- Fehér A., Ötvös K., Pasternak T.P., Szandtner A.P. 2008.** The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G₀-to-G₁ transition) of plant cells. *Plant Signaling & Behavior* 3:823-826.

- Ferro E., Goitre L., Retta S.F., Trabalzini L. 2012.** The interplay between ROS and Ras GTPases: physiological and pathological implications *Journal of Signal Transduction* 365769.
- Filonova L.H., von Arnold S., Daniel G., Bozhkov P.V. 2002.** Programmed cell death eliminates all but one embryo in a polyembryonic plant seed. *Cell Death and Differentiation* 9:1057-1062.
- Finkel T. 2011.** Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology* 194:7-15.
- Finkelstein R., Reeves W., Ariizumi T., Steber C. 2008.** Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* 59:387-415.
- Fluhr R. 2009.** Reactive oxygen-generating NADPH oxidases in plants. In: *Reactive oxygen species in plant signaling*. Signaling and Communication in Plants. del Rio L.A., Puppo A. (eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 1-23.
- Foissner I., Grolig F., Obermeyer G. 2002.** Reversible protein phosphorylation regulates the dynamic organization of the pollen tube cytoskeleton: effects of calyculin A and okadaic acid. *Protoplasma* 220:1-15.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.F., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D.G., Davies J.M., Dolan L. 2003.** Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422:442-446.
- Fosket D.E., Morejohn L.C. 1992.** Structural and functional organization of tubulin. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43:201-240.
- Fowler J.E., Vejlupekova Z., Goodner B.W., Lu G., Quatrano R.S. 2004.** Localization to the rhizoid tip implicates a *Fucus distichus* Rho family GTPase in a conserved cell polarity pathway. *Planta* 219:856-866.
- Foyer C.H., Harbinson J. 1994.** Oxygen metabolism and regulation of photosynthetic electron transport. In: *Causes of Photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. Foyer C.H., Mullineaux P.M. (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp.1-13.
- Foyer C.H., Noctor G. 2003.** Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119:355-364.
- Foyer C.H., Noctor G. 2005a.** Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* 28:1056-1071.
- Foyer C.H., Noctor G. 2005b.** Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* 17:1866-1875.
- Foyer C.H., Noctor G. 2009.** Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidant & Redox Signaling* 11:861-905.
- Frantz B., Klatt T., Pang M., Parsons J., Rolando A., Williams H., Tocci M.J., O'Keefe S.J., O'Neill E.A. 1998.** The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding. *Biochemistry* 37:13846-13853.
- Frantzios G., Galatis B., Apostolakis P. 2000.** Aluminium effects on microtubule organization in dividing root-tip cells of *Triticum turgidum*. I. Mitotic cells. *New Phytologist* 145:211-224.
- Frantzios G., Galatis B., Apostolakis P. 2001.** Aluminium effects on microtubule organization in dividing root-tip cells of *Triticum turgidum*. II. Cytokinetic cells. *Journal of Plant Research* 114:157-170.

- Frantzios G., Galatis B., Apostolakis P. 2005.** Aluminium causes variable responses in actin filament cytoskeleton of the root tip cells of *Triticum turgidum*. *Protoplasma* 225:129-140.
- Freyberg Z., Siddhanta A., Shields D. 2003.** ‘Slip, sliding away’: phospholipase D and the Golgi apparatus. *Trends in Cell Science* 10:540-546.
- Fu Y., Gu Y., Zheng Z., Wasteney G., Yang Z. 2005.** *Arabidopsis* interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell* 120:687-700.
- Fu Y., Xu T., Zhu L., Wen M., Yang Z., 2009.** A ROP GTPase signaling pathway controls cortical microtubule ordering and cell expansion in *Arabidopsis*. *Current Biology* 19:1827-1832.
- Fu Y., Yang Z. 2011.** Signaling to the cytoskeleton in diffuse cell growth. In: *The Plant Cytoskeleton*. Liu B. (ed.), Advances in Plant Biology 2, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 229-243.
- Fukushige T., Siddiqui Z.K., Chou M., Culotti J.G., Gogonea C.B., Siddiqui S.S., Hamelin M. 1999.** MEC-12, an α -tubulin required for touch sensitivity in *C. elegans*. *Journal of Cell Science* 112:395-403.
- Furutani I., Watanabe Y., Prieto R., Masukawa M., Suzuki K., Naoi K., Thitamadee S., Shikanai T., Hashimoto T. 2000.** The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 127:4443-4453.
- Fujita S., Pytela J., Hotta T., Kato T., Hamada T., Akamatsu R., Ishida Y., Kutsuna N., Hasezawa S., Nomura Y., Nakagami H., Hashimoto T. 2013.** An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in *Arabidopsis*. *Current Biology* 23:1969-1978.
- Gadjev I., Stone J.M., Gechev T.S. 2008.** Programmed cell death in plants: New insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *International Review of Cell and Molecular Biology* 270:87-144.
- Gadjev I., Vanderauwera S., Gechev T.S., Laloi C., Minkov I.N., Shulaev V., Apel, K., Inzé D., Mittler, R., van Breusegem F. 2006.** Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 141:436-445.
- Gaertig J., Wloga D. 2012.** Microtubules: MEC-17 moonlights in the lumen. *Current Biology* 22:R483-R485.
- Gaitanaki C., Papatriantafyllou M., Stathopoulou K., Beis I. 2006.** Effects of various oxidants and antioxidants on the p38-MAPK signalling pathway in the perfused amphibian heart. *Molecular and Cellular Biochemistry* 291:107-117.
- Gallagher K., Smith L.G. 1999.** Discordia mutations specifically misorient asymmetric cell divisions during development of maize leaf epidermis. *Development* 126:4623-4633.
- Gallagher K., Smith L.G. 2000.** Roles for polarity and nuclear determinants in specifying daughter cell fates after asymmetric cell division in the maize leaf. *Current Biology* 10:1229-1232.
- Galaris D., Pantopoulos K. 2008.** Oxidative stress and iron homeostasis: Mechanistic and Health Aspects. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 45:1-23.
- Γαλάτης Β. 1974.** Η οντογένεσις των στομάτων ενίων φυτών επί υπομικροσκοπικού επιπέδου. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα. Διδακτορική Διατριβή.
- Galatis B. 1977.** Differentiation of stomatal meristemoids and guard cell mother cells into guard-like cells in *Vigna sinensis* leaves after colchicine treatment. An ultrastructural and experimental approach. *Planta* 136:103-114.

- Galatis B. 1982.** The organization of microtubules in guard cell mother cells of *Zea mays*. *Canadian Journal of Botany* 60:1148-1166.
- Galatis B., Apostolakos P. 1976.** Associations between microbodies and a system of cytoplasmic tubules in oil-body cells of *Marchantia*. *Planta* 131:217-221.
- Galatis B., Apostolakos P. 1991.** Microtubule organization and morphogenesis of stomata in caffeine-affected seedlings of *Zea mays*. *Protoplasma* 165:11-26.
- Galatis B., Apostolakos P., Katsaros C., Loukari H. 1982.** Pre-prophase microtubule band and local wall thickening in guard cell mother cells of some leguminosae. *Annals of Botany* 50:779-791.
- Galatis B., Apostolakos P., Katsaros C. 1983.** Synchronous organization of two preprophase microtubule bands and final cell plate arrangement in subsidiary cell mother cells of some *Triticum* species. *Protoplasma* 117:24-39.
- Galatis B., Apostolakos P., Katsaros C. 1984a.** Positional inconsistency between preprophase microtubule band and final cell plate arrangement during triangular subsidiary cell and atypical hair cell formation in two *Triticum* species. *Canadian Journal of Botany* 62:343-359.
- Galatis B., Apostolakos P., Katsaros C. 1984b.** Experimental studies on the function of the cortical cytoplasmic zone of the preprophase microtubule band. *Protoplasma* 122:11-26.
- Galatis B., Apostolakos P. 2004.** The role of the cytoskeleton in the morphogenesis and function of stomatal complexes. *New Phytologist* 161:613-639.
- Galatis B., Mitrakos K. 1979.** On the differential divisions and preprophase microtubule bands involved in the development of stomata of *Vigna sinensis*. *Journal of Cell Science* 37:11-37.
- García-Gómez C., Parages M.L., Jiménez C., Palma A., Mata M.T., Segovia M. 2012.** Cell survival after UV radiation stress in the unicellular chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* is mediated by DNA repair and MAPK phosphorylation. *Journal of Experimental Botany* 63:5259-5274.
- Garcia-Mata C., Wang J., Gajdanowicz P., Gonzalez W., Hills A., Donald N., Riedelsberger J., Amtmann A., Dreyer I., Blatt M.R. 2010.** A minimal cysteine motif required to activate the SKOR K⁺ channel of Arabidopsis by the reactive oxygen species H₂O₂. *Journal of Biological Chemistry* 285:29286-29294.
- Gardiner J., Marc J. 2011.** *Arabidopsis thaliana*, a plant model organism for the neuronal microtubule cytoskeleton? *Journal of Experimental Botany* 62:89-97.
- Garnier L., Simon-Plas F., Thuleau P., Agnel J.P., Blein J.P., Ranjeva R., Montillet J.L. 2006.** Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant, Cell & Environment* 29:1956-1969.
- Ghezi P., Bonetto V. 2003.** Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* 3:1145-1153.
- Giani S, Qin X, Faoro F, Breviario D. 1998.** In rice, oryzalin and abscisic acid differentially affect tubulin mRNA and protein levels. *Planta* 205:334-341.
- Giannoutsou E., Apostolakos P., Galatis B. 2011.** Actin filament-organized local cortical endoplasmic reticulum aggregations in developing stomatal complexes of grasses. *Protoplasma* 248:373-390.
- Giannoutsou E., Galatis B., Zachariadis M., Apostolakos P. 2012.** Formation of an endoplasmic reticulum ring associated with acetylated microtubules in the angiosperm preprophase band. *Cytoskeleton* 69:252-265.

- Gibson S.W., Conway A.J., Zheng Z., Uchacz T.M., Taylor J.L., Todd C.D. 2012.** *Brassica carinata* CIL1 mediates extracellular ROS production during auxin- and ABA-regulated lateral root development. *Journal of Plant Biology* 55:361-372.
- Gill S.S., Tuteja N. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909-930.
- Gomes A., Fernandes E., Lima J.L.F.C. 2005.** Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65:45-80.
- Gomes M.P., Garcia Q.S. 2013.** Reactive oxygen species and seed germination. *Biologia* 68:351-357.
- Görlach A., Klappa P., Kietzmann T. 2006.** The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxidants & Redox Signaling* 8:1391-1418.
- Goshima G., Wollman R., Goodwin S.S., Zhang N., Scholey J.M., Vale R.D., Stuurman N. 2007.** Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science* 316:417-421.
- Green P.B., Erickson R.O., Richmond P.A. 1970.** On the physical basis of cell morphogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 175:712-731.
- Gundersen G.G. 2002.** Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3:296-304.
- Gutteridge J.M.C. 1994.** Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions* 91:133-140.
- Halliwell B. 2001.** Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group, London, UK.
- Halliwell B. 2005.** Free radicals and other reactive species in disease. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken NJ, USA.
- Halliwell B. 2006.** Reactive oxygen species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141:312-322.
- Halliwell B. 2011.** Free radicals and antioxidants-*quo vadis?* *Trends in Pharmacological Sciences* 32:125-130.
- Halliwell B. 2012.** The antioxidant paradox: less paradoxical now? *British Journal of Clinical Pharmacology* 75:637-644.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2006.** Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Halliwell B., Whiteman M. 2004.** Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* 142:231-255.
- Hamada T. 2007.** Microtubule-associated proteins in higher plants. *Journal of Plant Research* 120:79-98.
- Hamada T. 2014.** Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells. *International Review of Cell and Molecular Biology* 312:1-52.
- Hamada T., Nagasaki-Takeuchi N., Kato T., Fujiwara M., Sonobe S., Fukao Y., Hashimoto T. 2013.** Purification and characterization of novel microtubule-associated proteins from *Arabidopsis* cell suspension cultures. *Plant Physiology* 163: 1804-1816.
- Hamilton R.J., Kalu C., Prisk E., Padley F.B., Pierce H. 1997.** Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chemistry* 60:193-199.
- Hammond J.W., Cai D., Verhey K.J. 2008.** Tubulin modifications and their cellular functions. *Current Opinion in Cell Biology* 20:71-76.
- Han X., Kumar D., Chen H., Wu S., Kim J.-Y. 2014.** Transcription factor-mediated cell-to-cell signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 65:1737-1749.

- Hancock J.T., Desikan R., Neill S.J. 2001.** Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions* 29:345-350.
- Hao H., Fan L., Chen T., Li R., Li X., He Q., Botella M.A., Lin J. 2014.** Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RBOHD dynamics and activity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26:1729-1745.
- Hardham A.R. 2013.** Microtubules and biotic interactions. *The Plant Journal* 75:278-289.
- Hardin S.C., Larue C.T., Oh M.-H., Jain V., Huber S.C. 2009.** Coupling oxidative signals to protein phosphorylation via methionine oxidation in *Arabidopsis*. *Biochemical Journal* 422:305-312.
- Hashimoto T. 2011.** Microtubule and cell shape determination. In: *The Plant Cytoskeleton*. Advances in Plant Biology 2. Liu B. (ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 245-257.
- Hashimoto T. 2013.** A ring for all: γ -tubulin-containing nucleation complexes in acentrosomal plant microtubule arrays. *Current Opinion in Plant Biology* 16:698-703.
- Hashimoto T., Kato T. 2006.** Cortical control of plant microtubules. *Current Opinion in Plant Biology* 9:5-11.
- Hepler P.K. 1994.** The role of calcium in cell division. *Cell Calcium* 16:322-330.
- Hepler P.K. 2005.** Calcium: a central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell* 17:2142-2155.
- Hepler P.K., Bonsignore C.T. 1990.** Caffeine inhibition of cytokinesis: ultrastructure of cell plate formation/degradation. *Protoplasma* 157:182-192.
- Hepler P.K., Hush J.M. 1996.** Behavior of microtubules in living plant cells. *Plant Physiology* 112:455-461.
- Heyno E., Alkan M., Fluhr R. 2013.** A dual role for plant quinone reductases in host–fungus interaction. *Physiologia Plantarum* 149:340-353.
- Himanen K., Vuylsteke M., Vanneste S., Vercruysse S., Boucheron E., Alard P., Chriqui D., Van Montagu M., Inzé D., Beeckman T. 2004.** Transcript profiling of early lateral root initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101:5146-5151.
- Hinkley R.E. 1978.** Macrotubules induced by halothane: in vitro assembly. *Journal of Cell Science* 32:99-108.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi W., Matsui H. 2001.** A large family of plant III peroxidases. *Plant & Cell Physiology* 42:462-468.
- Hirt H. 2000.** Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:2405-2407.
- Ho C.M.K., Lee Y.R.J., Kiyama L.D., Dinesh-Kumar S.P., Liu B. 2012.** *Arabidopsis* microtubule-associated protein MAP65-3 cross-links antiparallel microtubules toward their plus ends in the phragmoplast via its distinct C-terminal microtubule binding domain. *The Plant Cell* 24:2071-2085.
- Hoehenwarter W., Thomas M., Nukarinen E., Egelhofer V., Röhrig H., Weckwerth W., Conrath U., Beckers G.J.M. 2013.** Identification of novel in vivo MAP kinase substrates in *Arabidopsis thaliana* through use of tandem metal oxide affinity chromatography. *Molecular & Cellular Proteomics* 12:369-380.
- Holuigue L., Salinas P., Blanco F., Garretón V. 2007.** Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defense genes. In: *Salicylic acid-a plant hormone*. Hayat S., Ahmad A. (eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 197-246.

- Hong-bo S., Li-ye C., Ming-an S., Abdul Jaleel., Hong-mei.** 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies* 331:433-441.
- Horio T., Murata T.** 2014. The role of dynamic instability in microtubule organization. *Frontiers in Plant Science* 5:511.
- Hotta T., Kong Z.S., Ho C.M.K., Zeng C.J.T., Horio T., Fong S., Vuong T., Lee Y.R.J., Liu B.** 2012. Characterization of the *Arabidopsis* augmin complex uncovers its critical function in the assembly of the acentrosomal spindle and phragmoplast microtubule arrays. *The Plant Cell* 24:1494-1509.
- Hu J.-Y., Chu Z.-G., Han J., Dang Y.-M., Yan H., Zhang Q., Liang G.-p., Huang Y.-S.** 2010. The p38/MAPK pathway regulates microtubule polymerization through phosphorylation of MAP4 and Op18 in hypoxic cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67:321-333.
- Hu X., Li W., Chen Q., Yang Y.** 2009. Early signal transduction linking the synthesis of jasmonic acid in plant. *Plant Signaling & Behavior* 4:696-697.
- Huang R.F., Lloyd C.W.** 1999. Gibberellic acid stabilizes microtubules in maize suspension cells to cold and stimulates acetylation of alpha-tubulin. *FEBS Letters* 443:317-320.
- Humphries J.A., Vejlupekova Z., Luo A., Meeley R.B., Sylvester A.W., Fowler J.E., Smith L.G.** 2011. ROP GTPases act with the receptor-like protein PAN1 to polarize asymmetric cell division in maize. *The Plant Cell* 23:2273-2284.
- Hush J.M., Wadsworth P., Callaham D.A., Hepler P.K.** 1994. Quantification of microtubule dynamics in living plant cells using fluorescence redistribution after photobleaching. *Journal of Cell Science* 107:775-784.
- Ikeda S., Yamaoka-Tojo M., Hilenski L., Patrushev N.A., Anwar G.M., Quinn M.T., Ushio-Fuka M.** 2005. IQGAP1 regulates reactive oxygen species-dependent endothelial cell migration through interacting with Nox2. *Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology* 25:2295-2300.
- Ikegami K., Setou M.** 2010. Unique post-translational modifications in specialized microtubule architecture. *Cell Structure and Function* 35:15-22.
- Iriti M., Faoro F.** 2008. Oxidative stress, the paradigm of ozone toxicity in plants and animals. *Water, Air, & Soil Pollution* 187:285-301.
- Ito M., Kabir A.M.R., Inoue D., Torisawa T., Toyoshima Y., Sada K., Kakugo A.** 2014. Formation of ring-shaped microtubule assemblies through active self-organization on dynein. *Polymer Journal* 46:220-225.
- Ivakov A., Persson S.** 2013. Plant cell shape: modulators and measurements. *Frontiers in Plant Science* 4:439.
- Izumi Y., Matsumura A., Wakita S., Akagi K.-i., Fukuda H., Kume T., Irie K., Takada-Takatori Y., Sugimoto H., Hashimoto T., Akaike A.** 2012. Isolation, identification, and biological evaluation of Nrf2-ARE activator from the leaves of green perilla (*Perilla frutescens* var. *crispaf. viridis*). *Free Radical Biology & Medicine* 53:669-679.
- Janke C., Bulinski J.C.** 2011. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12:773-786.
- Jaspers P., Kangasjärvi J.** 2010. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum* 138:405-413.
- Jiang J., Song C.-P.** 2008. MEK1/2 and p38-like MAP kinase successively mediate H₂O₂ signaling in *Vicia* guard cell. *Plant Signaling & Behavior* 3:996-998.
- Jiang K., Meng Y.L., Feldman L.J.** 2003. Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin regulated oxidizing environment. *Development* 130:1429-1438.

- Jiang Y., Wu K., Lin F., Qu Y., Liu X., Zhang Q. 2014.** Phosphatidic acid integrates calcium signaling and microtubule dynamics into regulating ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Planta* 239:565-575.
- Jiang Z., Hu Z., Zeng L., Lu W., Zhang H., Li T., Xiao H. 2011.** The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria? *Free Radicals Biology & Medicine* 50:907-917.
- Jiménez C., Berl T., Rivard C.J., Edelstein C.L., Capasso J.M. 2004.** Phosphorylation of MAP kinase-like proteins mediate the response of the halotolerant alga *Dunaliella viridis* to hypertonic shock. *Biochimica et Biophysica Acta* 1664:61-69.
- Joo J.H., Bae Y.S., Lee J.S. 2001.** Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology* 126:1055-1060.
- Joo J.H., Yoo H.J., Hwang I., Lee J.S., Nam K.H., Bae Y.S. 2005.** Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Letters* 579:1243-1248.
- Jordan M.A., Wilson L. 2004.** Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* 4:253-265.
- Jordan M.A., Wilson L. 2004.** Microtubule dynamics: mechanisms and regulation by microtubule-associated proteins and drugs in vitro and in cells. In: *Cancer drug discovery and development: the role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology*. Fojo T. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp. 47-81.
- Jürgens G. 2005.** Cytokinesis in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 56:281-299.
- Jürgens M., Hepler L.H., Rivers B.A., Hepler P.K. 1994.** BAPTA-calcium buffers modulate cell plate formation in stamen hair cells of *Tradescantia*: evidence for calcium gradients. *Protoplasma* 183:86-99.
- Kadota Y., Furuichi T., Sano T., Kaya H., Gunji W., Murakami Y., Muto S., Hasezawa S., Kuchitsu K. 2005.** Cell-cycle-dependent regulation of oxidative stress responses and Ca^{2+} permeable channels NtTPC1A/B in tobacco BY-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336:1259-1267.
- Kagale S., Divi U.K., Krochko J.E., Keller W.A., Krishna P. 2007.** Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* 225:353-364.
- Kangasjärvi S., Kangasjärvi J. 2014.** Towards understanding extracellular ROS sensory and signaling systems in plants. *Advances in Botany* 538946.
- Karagiannidou Th., Eleftheriou E.P., Tsekos I., Galatis B., Apostolakis P. 1995.** Colchicine-induced paracrystals in root cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of Botany* 76:23-30.
- Karahara I., Suda J., Tahara H., Yokota E., Shimmen T., Misaki K., Yonemura S., Staehelin L.A., Mineyuki Y. 2009.** The preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis in late prophase cells of the onion cotyledon epidermis. *The Plant Journal* 57:819-831.
- Karahara I., Staehelin L.A., Mineyuki Y. 2010.** A role of endocytosis in plant cytokinesis. *Communicative & Integrative Plant Biology* 3:36-38.
- Karuppanapandian T., Moon J.-C., Kim C., Manoharan K., Kim W. 2011.** Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* 5:709-725.
- Katzman L.S., Taylor A.G., Langhans R.W. 2001.** Seed enhancements to improve spinach germination. *HortScience* 36:979-981.

- Kaur G., Sharma A., Guruprasad K., Pati P.K. 2014.** Versatile roles of plant NADPH oxidases and emerging concepts. *Biotechnology Advances* 32:551-563.
- Kawahara T., Quinn M.T., Lambeth J.D. 2007.** Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evolutionary Biology* 7:109.
- Kawamura E., Himmelsbach R., Rashbrooke M.C., Whittington A.T., Gale K.R., Collings D.A., Wasteneys G.O. 2006a.** MICROTUBULE ORGANIZATION 1 regulates structure and function of microtubule arrays during mitosis and cytokinesis in the *Arabidopsis* root. *Plant Physiology* 140:102-114.
- Kawamura F., Hirashima N., Furuno T., Nakanishi M. 2006b.** Effects of 2-Methyl-1,4-naphthoquinone (Menadione) on cellular signaling in RBL-2H3 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29:605-607.
- Kawamura E., Wasteneys G.O. 2008.** MOR1, the *Arabidopsis thaliana* homologue of Xenopus MAP215, promotes rapid growth and shrinkage, and suppresses the pausing of microtubules *in vivo*. *Journal of Cell Science* 121:4114-4123.
- Kennard J.L., Cleary A.L. 1997.** Pre-mitotic nuclear migration in subsidiary mother cells of *Tradescantia* occurs in G1 of the cell cycle and requires F-actin. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 36:55-67.
- Kerk N.M., Jiang K., Feldman L.J. 2000.** Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiology* 122:925-932.
- Kiffin R., Bandyopadhyay U., Cuervo A.M. 2006.** Oxidative stress and autophagy. *Antioxidant & Redox Signaling* 8:152-162.
- Kim C., Meskauskiene R., Apel K., Laloi C. 2008.** No single way to understand siglet oxygen signaling in plants. *EMBO Reports* 9:435-439.
- Kim H.-S., Kim Y.-S., Hahn K.-W., Joung H., Jeon J.-H. 2009.** Reactive oxygen species: regulation of plant growth and development. *Advances in Botanical Research* 52:25-46.
- Kimura S., Kaya H., Kawarazaki T., Hiraoka G., Senzaki E., Michikawa M., Kuchitsu K. 2012.** Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca²⁺-dependent activation of *Arabidopsis* NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca²⁺ and reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823:398-405.
- Kirik A., Ehrhardt D.W., Kirik V. 2012.** TONNEAU2/FASS regulates the geometry of microtubule nucleation and cortical array organization in interphase *Arabidopsis* cells. *The Plant Cell* 24:1158-1170.
- Klein P., Seidel T., Stöcker B., Dietz K.-J. 2012.** The membrane-tethered transcription factor ANAC089 serves as redox-dependent suppressor of stromal ascorbate peroxidase gene expression. *Frontiers in Plant Science* 3:247.
- Kline-Smith S.L., Walczak C.E. 2004.** Mitotic spindle assembly and review chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. *Molecular Cell* 15:317-327.
- Ko L.-w., Odawara T., Yen S.-H.C. 1997.** Menadione-induced tau dephosphorylation in cultured human neuroblastoma cells. *Brain Research* 760:118-128
- Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K., Doke N., Yoshioka H. 2007.** Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *The Plant Cell* 19:1065-1080.
- Kocsy C., Tari I., Vanková R., Zechmann B., Gulgás Z., Poór P., Galiba G. 2013.** Redox control of plant growth and development. *Plant Science* 211:77-91.
- Kodiha M., Stochaj U. 2012.** Nuclear transport: a switch for the oxidative stress-signaling circuit? *Journal of Signal Transduction* 208650.

- Köhler B., Hills A., Blatt M.R. 2003.** Control of guard cell ion channels by hydrogen peroxide and abscisic acid indicates their action through alternate signaling pathways. *Plant Physiology* 131:385-388.
- Kollman J.M., Merdes A., Mourey L., Agard D.A. 2011.** Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12:709-721.
- Komaki S., Abe T., Coutuer S., Inze D., Russinova E., Hashimoto T., 2010.** Nuclearlocalized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in *Arabidopsis*. *Journal of Cell Science* 123:451-459.
- Komis G., Apostolakos P., Galatis B. 2001.** Altered patterns of tubulin polymerization in dividing leaf cells of *Chlorophytum comosum* after a hyperosmotic treatment. *New Phytologist* 149:193-207.
- Komis G., Apostolakos P., Galatis B. 2002.** Hyperosmotic stress formation of tubulin macrotubules in root-tip cells of *Triticum turgidum*: their probable involvement in protoplast volume control. *Plant & Cell Physiology* 43:911-922.
- Komis G., Apostolakos P., Gaitanaki C., Galatis B. 2004.** Hyperosmotically induced accumulation of a phosphorylated p38-like MAPK involved in protoplast volume regulation of plasmolyzed wheat root cells. *FEBS Letters* 573:168-174.
- Komis G., Galatis B., Quader H., Galanopoulou D., Apostolakos P. 2008.** Phospholipase C signaling involvement in macrotubule assembly and activation of the mechanism regulating protoplast volume in plasmolyzed root cells of *Triticum turgidum*. *New Phytologist* 178:267-282.
- Komis G., Illés P., Beck M., Šamaj J. 2011.** Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 14:650-657.
- Komis G., Quader H., Galatis B., Apostolakos P. 2006.** Macrotubule-dependent protoplast volume regulation in plasmolysed root-tip cells of *Triticum turgidum*: involvement of phospholipase D. *New Phytologist* 171:737-750.
- Korolev A.V., Buschmann H., Doonan J.H., Lloyd C.W., 2007.** AtMAP70-5, a divergent member of the MAP70 family of microtubule-associated proteins, is required for anisotropic cell growth in *Arabidopsis*. *Journal of Cell Science* 120:2241-2247.
- Korolev A.V., Chan J., Naldrett M.J., Doonan J.H., Lloyd C.W., 2005.** Identification of a novel family of 70 kDa microtubule-associated proteins in *Arabidopsis* cells. *The Plant Journal* 42:547-555.
- Kosetsu K., Matsunaga S., Nakagami H., Colcombet J., Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Hirt H., Machida Y. 2010.** The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 22:778-790.
- Kost B., Chua N.-H. 2002.** The plant cytoskeleton: vacuoles and cell walls make the difference. *Cell* 108:9-12.
- Kost B., Mathur J., Chua N.-H. 1999.** Cytoskeleton in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 2:462-470.
- Kovtun Y., Ghu W.-L., Tena G., Sheen J. 2000.** Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:2940-2945.
- Krieger-Liszkay A., Fufezan C., Trebst A. 2008.** Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research* 98:551-564.
- Krishnamurthy A., Rathinasabapathi B. 2013.** Auxin and its transport play a role in plant tolerance to arsenite-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. 36:1838-1849.

- Krtková J., Zimmermann A., Schwarzerová K., Nick P. 2012.** Hsp90 binds microtubules and is involved in the reorganization of the microtubular network in angiosperms. *Journal of Plant Physiology* 169:1329-1339.
- Kuijt S., Schnittger A. 2007.** The plant cell cycle and its control. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken NJ, USA.
- Kumagai F., Nagata T., Yahara N., Moriyama Y., Horio T., Naoi K., Hashimoto T., Murata T., Hasezawa S. 2003.** γ -tubulin distribution during cortical microtubule reorganization at the M/G1 interface in tobacco BY-2 cells. *European Journal of Cell Biology* 82:43-51
- Kumar Ghosh D., Dasgupta G., Guha A. 2012.** Models, regulations, and functions of microtubule severing by katanin. *ISRN Molecular Biology* 596289.
- Kumar N., Flavin M. 1981.** Preferential action of a brain de tyrosinolytic carboxypeptidase on polymerized tubulin. *Journal of Biological Chemistry* 256:7678-7686.
- Kumar P., Wittmann T. 2012.** +TIPs: SxIPping along microtubule ends. *Trends in Cell Biology* 22:418-428.
- Kumar S., Jiang M.S., Adams J.L., Lee J.C. 1999.** Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263:825-831.
- Kurata S.-I. 2000.** Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 275:23413-23416.
- Kurihara D., Matsunaga S., Uchiyama S., Fukui K. 2008.** Live cell imaging reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant & Cell Physiology* 49:1256-1261.
- Kuriyama R., Sakai H. 1974.** Role of tubulin-SH groups in polymerization to microtubules. *Journal of Biochemistry* 76:651-654.
- Kwak J.M., Nguyen V., Schroeder J.I. 2006.** The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiology* 141:323-329.
- Kwiatkowska M., Popłońska K., Stępiński D., Hejnowicz Z. 2006.** Microtubules with different diameter, protofilament number and protofilament spacing in *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 44:133-138.
- Kwiatkowska M., Stępiński D., Popłońska K. 2009.** Diameters of microtubules change during rotation of the lipotubuloids of *Ornithogalum umbellatum* stipule epidermis as a result of varying protofilament monomers size and distance between them. *Cell Biology International* 33:1245-1252.
- Kwiatkowska M., Polit J.T., Popłońska K., Stępiński D., Wojtczak A. 2013.** Immunogold method evidences that kinesin and myosin bind to and couple microtubules and actin filaments in lipotubuloids of *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis. *Acta Physiologia Plantarum* 35:1967-1977.
- Laemmli U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lal A.S., Clifton A.D., Rouse J., Segal A.W., Cohen P. 1999.** Activation of the neutrophil NADPH oxidase is inhibited by SB 203580, a specific inhibitor of SAPK2/p38. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259:465-470.
- Lam E. 2004.** Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology* 5:305-315.
- Landrein B., Hamant O. 2013.** How mechanical stress controls microtubule behavior and morphogenesis in plants: history, experiments and revisited theories. *The Plant Journal* 75:324-338.

- Landino L.M., Hasan R., McGaw A., Cooley S., Smith A.W., Masselam K., Kim G. 2002.** Peroxynitrite oxidation of tubulin sulfhydryls inhibits microtubule polymerization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 398:213-220.
- Landino L.M., Moynihan K.L., Todd J.V., Kennett K.L. 2004a.** Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314:555-560.
- Landino L.M., Robinson S.H., Skreslet T.E., Cabral D.M. 2004b.** Redox modulation of tau and microtubule-associated protein-2 by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323:112-117.
- Landino L.M., Koumas M.T., Mason C.E., Alston J.A. 2006.** Ascorbic acid reduction of microtubule protein disulfides and its relevance to protein S-nitrosylation assays. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340:347-352.
- Landino L.M., Hagedorn T.D., Kim S.B., Hogan K.M. 2011.** Inhibition of tubulin polymerization by hypochlorous acid and chloramines. *Free Radical Biology & Medicine* 50:1000-1008.
- Lane B.G. 2002.** Oxalate, germins and higher-plant pathogens. *IUBMB Life* 53:67-75.
- Langhans M., Robinson D.G. 2007.** 1-Butanol targets the Golgi apparatus in tobacco BY-2 cells, but in a different way to Brefeldin A. *Journal of Experimental Botany* 58:3439-3447.
- Lassing I., Schmitzberger F., Bjornstedt M., Holmgren A., Nordlund P., Schutt C.E., Lindberg U. 2007.** Molecular and structural basis for redox regulation of beta-actin. *Journal of Molecular Biology* 370:331-348.
- Lauber M.H., Waizenegger I., Steinmann T., Schwarz H., Mayer U., Hwang I., Lukowitz W., Jürgens G. 1997.** The *Arabidopsis* KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *The Journal of Cell Biology* 139:1485-1493.
- Lazareva E.M., Polyakov V.Y., Chentsov Y.S., Smirnova E.A. 2003.** Time and cell cycle dependent formation of heterogeneous tubulin arrays induced by colchicine in *Triticum aestivum* root meristem. *Cell Biology International* 27:633-646.
- Leborgne-Castel N., Lherminier J., Der C., Fromentin J., Houot V., Simon-Plas F. 2008.** The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiology* 146:1255-1266.
- LeDizet M., Piperno G. 1986.** Cytoplasmic microtubules containing acetylated alpha-tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*: spatial arrangement and properties. *The Journal of Cell Biology* 103:13-22.
- Lee A.H.Y., Hurley B., Felsensteiner C. 2012.** A bacterial acetyltransferase destroys plant microtubule networks and blocks secretion. *PLoS Pathogens* 8:e1002523.
- Lee E.-R., Kim J.-Y., Kang Y.-J., Ahn J.-Y., Kim J.-H., Kim B.-W., Choi H.-Y., Jeong M.-Y., Cho S.-G. 2006.** Interplay between PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in DNA-damaging drug-induced apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763:958-968.
- Lee Y., Bak G., Choi Y., Chuang W.-I., Cho H.-T., Lee Y. 2008.** Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in root hair growth. *Plant Physiology* 147:624-635.
- Lee Y., Munnik T., Lee Y. 2010.** Plant phosphatidylinositol 3-kinase. In: *Lipid Signaling in Plants*. Plant Cell Monographs 16. Munnik T. (ed.), Springer-Verlag Heidelberg, Germany. pp.95-106.
- Le Grand M., Rovini A., Bourgarel-Rey V., Honore S., Bastonero S., Braguer D., Carre M. 2014.** ROS-mediated EB1 phosphorylation through Akt/GSK3 β pathway: implication in cancer cell response to microtubule-targeting agents. *Oncotarget* 5:3408-3423.

- Li G., Xue H.-W. 2007γ.** Arabidopsis PLDz2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response. *The Plant Cell* 19:281-295.
- Li H., Mao T., Zhang Z., Yuan M. 2007α.** The AtMAP65-1 cross-bridge between microtubules is formed by one dimer. *Plant & Cell Physiology* 48:866-874.
- Li H., Yuan M., Mao T.-L. 2007β.** AtMAP65-1 binds to tubulin dimers to promote tubulin assembly. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40:218-225.
- Li J., Arieti R., Staiger C.J. 2015.** Actin filament dynamics and their role in plant cell expansion. In: *Plant cell wall patterning and cell shape*. Fukuda H. (ed.), John Wiley & Sons, Hoboken NJ, USA, pp.127-162.
- Li J., Wang X., Qin T., Zhang Y., Liu X., Sun J., Zhou Y., Zhu L., Zhang Z., Yuan M., Mao T. 2011.** MDP25, a novel calcium regulatory protein, mediates hypocotyls cell elongation by destabilizing cortical microtubules in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23:4411-4427.
- Li L., Saga N., Mikami K. 2008.** Phosphatidylinositol 3-kinase activity and asymmetrical accumulation of F-actin are necessary for establishment of cell polarity in the early development of monospores from the marine red alga *Porphyra yezoensis*. *Journal of Experimental Botany* 59:3575-3586.
- Li X., Li J.-H., Wang W., Chen N.-Z., Ma T.-S., Xi Y.-N., Zhang X.-L., Lin H.-F., Bai Y., Huang S.-J., Chen Y.-L. 2014.** ARP2/3 complex-mediated actin dynamics is required for hydrogen peroxide-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 37:1548-1560.
- Li Y., Shen Y., Cai C., Zhong C., Zhu L., Yuan M., Ren H. 2010.** The type II *Arabidopsis* formin14 interacts with microtubules and microfilaments to regulate cell division. *The Plant Cell* 22:2710-2726.
- Libik-Konieczny M., Kozieradzka-Kiszkurno M., Desel C., Michalec-Warzecha Z., Miszalski Z., Konieczny R. 2014.** The localization of NADPH oxidase and reactive oxygen species in *in vitro*-cultured *Mesembryanthemum crystallinum* L. hypocotyls discloses their differing roles in rhizogenesis. *Protoplasma* 252:477-487.
- Lin C.-M., Chen C.-S., Chen C.-T., Liang Y.-C., Lina J.-K. 2002.** Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294:167-172.
- Lin D., Cao L., Zhou Z., Zhu L., Ehrhardt D., Yang Z., Fu Y. 2013.** Rho GTPase signaling activates microtubule severing to promote microtubule ordering in *Arabidopsis*. *Current Biology* 23:290-297.
- Lindemayer C., Sell S., Müller B., Leister D., Durner J. 2010.** Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *The Plant Cell* 22:2894-2907.
- Liochev S.I., Fridovich I. 2002.** The Haber-Weiss cycle-70 years later: an alternative view. *Redox Report* 7:55-57.
- Lisnock J., Tebben A., Frantz B., O'Neill E.A., Croft G., O'Keefe S.J., Li B., Hacker C., de Laszlo S., Smith A., Libby B., Liverton N., Hermes J., LoGrasso P. 1998.** Molecular basis for p38 protein kinase inhibitor specificity. *Biochemistry* 37:16573-16581.
- Liszkay A., van der Zalm E., Schopfer P. 2004.** Production of Reactive Oxygen Intermediates ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , and $\cdot OH$) by Maize Roots and Their Role in Wall Loosening and Elongation Growth. *Plant Physiology* 136:3114-3123.
- Liu J., Zhou J., Xing D. 2012α.** Phosphatidylinositol 3-kinase plays a vital role in regulation of rice seed vigor via altering NADPH oxidase activity. *PLoS ONE* 7(3): e33817.

- Liu S.G., Zhu D.Z., Chen G.H., Gao X.-Q., Zhang X.S. 2012β.** Disrupted actin dynamics trigger an increment in the reactive oxygen species levels in the *Arabidopsis* root under salt stress. *Plant Cell Reports* 31:1219-1226
- Liu Y., Zhang C., Chen J., Guo L., Li X., Li W., Yu Z., Deng J., Zhang P., Zhang K., Zhang L. 2013.** *Arabidopsis* heat shock factor HsfA1a directly senses heat stress, pH changes, and hydrogen peroxide via the engagement of redox state. *Plant Physiology and Biochemistry* 64:92-98.
- Livanos P., Apostolakis P., Galatis B. 2012β.** Plant cell division: ROS homeostasis is required. *Plant Signaling & Behavior* 7:771-778.
- Livanos P., Galatis B., Quader H., Apostolakis P. 2012α.** Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces atypical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*. *Cytoskeleton* 69:1-21.
- Livanos P., Galatis B., Apostolakis P. 2014α.** The interplay between ROS and tubulin cytoskeleton in plants. *Plant Signaling & Behavior* 9:e28069.
- Livanos P., Galatis B., Gaitanaki C., Apostolakis P. 2014β.** Phosphorylation of a p38-like MAPK is involved in sensing cellular redox state and drives atypical tubulin polymer assembly in angiosperms. *Plant, Cell & Environment* 37:1130-1143.
- Livanos P., Giannoutsou E., Apostolakis P., Galatis B. 2015.** Auxin as an inducer of asymmetrical division generating the subsidiary cells in stomatal complexes of *Zea mays*. *Plant Signaling & Behavior* 10:e984531.
- Lloyd C., Hussey P. 2001.** Microtubule-associated proteins in plants-why we need a MAP. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:40-47.
- Lobert S., Graichen M.E. 2013.** Regulation of tubulin expression by micro-RNAs: implications for drug resistance. *Methods in Molecular Biology* 115:63-74.
- Logemann J., Schell J., Willmitzer L. 1987.** Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Annals of Biochemistry* 163:16-20.
- Lu L., Lee Y.R., Pan R., Maloof J.N., Liu B. 2005.** An internal motor kinesin is associated with the Golgi apparatus and plays a role in trichome morphogenesis in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell* 16:811-823.
- Lucas M., Godin C., Jay-Allemand C.J., Laplaze L. 2008.** Auxin fluxes in the root apex co-regulate gravitropism and lateral root initiation. *Journal of Experimental Botany* 59:55-66.
- Ludueña R.F. 2013.** A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *International Review of Cell and Molecular Biology* 302:41-185.
- Ludueña R.F., Banerjee A. 2008.** The isotypes of tubulin: distribution and functional significance. In: *Cancer drug discovery and development: the role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology*. Fojo T. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp. 123-175.
- Lumbreras V., Vilela B., Irar S., Solé M., Capellades M., Valls M., Coca M., Pagès M. 2010.** MAPK phosphatase MKP2 mediates disease responses in *Arabidopsis* and functionally interacts with MPK3 and MPK6. *The Plant Journal* 63:1017-1030.
- Lushchak V.I. 2011.** Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology* 153:175-190.
- Ma F., Wang L., Li J., Samma K.M., Xie Y., Wang R., Wang J., Zhang J., Shen W. 2014.** Interaction between HY1 and H₂O₂ in auxin-induced lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 85:49-61.
- Mackeh R., Lorin S., Ratier A., Mejdoubi-Charef N., Baillet A., Bruneel A., Hamaï A., Codogno P., Poüs C., Perdiz D. 2014.** Reactive oxygen species, AMP-activated protein kinase, and the transcription cofactor p300 regulate-tubulin acetyltransferase-1 (TAT-1/MEC-

17)-dependent microtubule hyperacetylation during cell stress. *The Journal of Biological Chemistry* 289:11816-11828.

Magiera M.M., Janke C. 2014. Post-translational modifications of tubulin. *Current Biology* 24:R351-R354.

Manzano C., Pallero-Baena M., Casimiro I., De Rybel B., Orman-Ligeza B., Van Isterdael G., Beeckman T., Draye X., Casero P., Del Pozo J.C. 2014. The emerging role of reactive oxygen species signaling during lateral root development. *Plant Physiology* 165:1105-1119.

Mao T., Jin L., Li H., Liu B., Yuan M. 2005. Two microtubule-associated proteins of the *Arabidopsis* MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiology* 138:654-662.

MAPK Group, Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B.E., Morris P.C., Innes R.W., Ecker J.R., Scheel D., Klessig D.F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J.C. 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* 7:301-308.

Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N. 2012. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in Plant Science* 17:9-15.

Martin M.V., Fiol D.F., Sundaresan V., Zabaleta E.J., Pagnussat G.C. 2013 α . *oiwa*, a female gametophytic mutant impaired in a mitochondrial manganese-superoxide dismutase, reveals crucial roles for reactive oxygen species during embryo sac development and fertilization in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25:1573-1571.

Martin M.V., Distéfano A.M., Zabaleta E.J., Pagnussat G.C. 2013 β . New insights into the functional roles of reactive oxygen species during embryo sac development and fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 8:e25714.

Martin M.V., Distéfano A.M., Bellido A., Córdoba J.P., Soto D., Pagnussat G.C., Zabaleta E.J. 2014. Role of mitochondria during female gametophyte development and fertilization in *A. thaliana*. *Mitochondrion* 19:350-356.

Martyn K.D., Frederick L.M., von Loehneysen K., Dinauer M.C., Knaus U.G. 2006. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cellular Signalling* 18:69-82.

Mathur J., Hülskamp M. 2002. Microtubules and microfilaments in cell morphogenesis in higher plants. *Current Biology* 12:R669-R676.

Matsumoto S., Saito Y., Kumasaki S., Soga K., Wakabayashi K., Hoson T. 2007. Up-regulation of expression of tubulin genes and roles of microtubules in hypergravity-induced growth modification in *Arabidopsis* hypocotyls. *Advances in Space Research* 39:1176-1181.

Maxwell D.P., Wang Y., McIntosh L. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96:8271-8276.

Mayer U., Herzog U., Berger F., Inzé D., Jürgens G. 1999. Mutations in the PILZ group genes disrupt the microtubule cytoskeleton and uncouple cell cycle progression from cell division in *Arabidopsis* embryo and endosperm. *European Journal of Cell Biology* 78:100-108.

McClinton R.S., Chandler J.S., Callis J. 2001. cDNA isolation, characterization, and protein intracellular localization of a katanin-like p60 subunit from *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 216:181-190.

McCurdy D.W., Kovar D.R., Staiger C.J. 2001. Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma* 215:89-104.

- McCurdy D.W., Gunning B.E.S. 1990.** Reorganization of cortical actin microfilaments and microtubules at preprophase and mitosis in wheat root-tip cells: A double label immunofluorescence study. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 15:76-87.
- McDonagh B., Sheehan D. 2006.** Redox proteomics in the blue mussel *Mytilus edulis*: Carbonylation is not a pre-requisite for ubiquitination in acute free radical-mediated oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 79:325-333.
- McDowell J.M., Huang S., McKinney E.C., An Y.-Q., Meagher R.B. 1996.** Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 142:587-602.
- McMichael C.M., Bednarek S.Y. 2013.** Cytoskeletal and membrane dynamics during higher plant cytokinesis. *New Phytologist* 197: 1039-1057.
- McNally S.J., Harrison E.M., Ross J.A., Garden O.J., Wigmore S.J. 2007.** Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *International Journal of Molecular Medicine* 19:165-172.
- Meagher R.B., Fechheimer M. 2003.** The *Arabidopsis* cytoskeletal genome. *The Arabidopsis Book* 2:e0096.
- Meagher R.B., Kandasamy M.K., King L. 2011.** Actin functions in the cytoplasmic and nuclear compartments. In: *The Plant Cytoskeleton*. Liu B. (ed.), Advances in Plant Biology 2, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 3-32.
- Meier I., Brkljacic J. 2009.** Adding pieces to the puzzling plant nuclear envelope. *Current Opinion in Plant Biology* 12:752-759.
- Menéndez M., Rivas G., Díaz F., Andreu J.M. 1998.** Control of the structural stability of the tubulin dimer by one high affinity bound magnesium ion at nucleotide N-site. *Journal of Biological Chemistry* 273:167-176.
- Menon S.G., Goswami P.C. 2007.** A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* 26:1101-1109.
- Metwally A., Finkemeier I., Georgi M., Dietz K.-J. 2003.** Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology* 132:272-281.
- Mercau M.E., Astort F., Giordanino E.F., Martinez Calejman C., Sanchez R., Caldarelli L., Repetto E.M., Coso O.A., Cymeryng C.B. 2014.** Involvement of PI3K/Akt and p38 MAPK in the induction of COX-2 expression by bacterial lipopolysaccharide in murine adrenocortical cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 384:43-51.
- Miao Y., Laun T., Zimmermann P., Zentgraf U. 2004.** Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 55:853-867.
- Miao Y., Laun T.M., Smykowski A., Zentgraf U. 2007.** *Arabidopsis* MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter. *Plant Molecular Biology* 65:63-76.
- Michniewicz M., Zago M.K., Abas L., Weijers D., Schweighofer A., Meskiene I., Heisler M.G., Ohno C., Zhang J., Huang F., Schwab R., Weigel D., Meyerowitz E.M., Luschig C., Offrigna R., Friml J. 2007.** Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* 130:1044-1056.
- Mimori-Kiyosue Y., Grigoriev I., Lansbergen G., Sasaki H., Matsui C., Severin F., Galjart N., Grosveld F., Vorobjev I., Tsukita S., Akhmanova A. 2005.** CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *The Journal of Cell Biology* 168:141-153.
- Mineyuki Y. 1999.** The preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *International Review of Cytology* 187:1-49.

- Mizuno K., Suzaki T. 1990.** Effects of anti-microtubule drugs on in vitro polymerization of tubulin from mung bean. *The Botanical Magazine, Tokyo* 103:435-448.
- Millar A.H., Mittova V., Kiddle G., Heazlewood J.L., Bartoli C.G., Theodoulou F.L., Foyer C.H. 2003.** Control of ascorbate synthesis by respiration and its implication for stress responses. *Plant Physiology* 133:443-447.
- Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M.A., Shulaev V., Dangel G.L., Mittler R. 2009.** The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science signaling* 2:ra45.
- Miller G., Shulaev V., Mittler R. 2008.** Reactive oxygen species signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* 133:481-489.
- Miller G., Suzuki N., Cifti-Yilmaz S., Mittler R. 2010.** Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stress. *Plant, Cell & Environment* 33:453-467.
- Mitchison T.J., Kirschner M. 1984.** Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237-242.
- Mittler R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. 2004.** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9:490-498.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. 2011.** ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* 16:300-309.
- Møller I.M. 2001.** Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:561-591.
- Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. 2007.** Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 51:459-481.
- Møller I.M., Sweetlove L.J. 2010.** ROS signaling - specificity is required. *Trends in Plant Science* 15:370-374.
- Monshausen G.B., Bibikova T.N., Messerli M.A., Shi C., Gilroy S. 2007.** Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104:20996-211001.
- Monshausen G.B., Gilroy S. 2009.** Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends in Cell Biology* 19:228-235.
- Moon H., Lee B., Choi G., Shin D., Prasad D.T., Lee O., Kwak S.S., Kim D.H., Nam J., Bahk J., Hong J.C., Lee S.Y., Cho M.J., Lim C.O., Yun D.J. 2003.** NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 100:358-363.
- Morel J., Fromentin J., Blein J.P., Simon-Plas F., Elmayan T. 2004.** Rac regulation of NtrbohD, the oxidase responsible for the oxidative burst in elicited tobacco cell. *The Plant Journal* 37:282-293.
- Mori I.C., Murata Y., Uraji M. 2009.** Integration of ROS and hormone signaling. In: *Reactive oxygen species in plant signaling, Signaling and Communication in Plants*. del Rio L.A., Puppo A. (eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 1-23.
- Moschou P.N., Bozhkov P.V. 2012.** Separases: biochemistry and function. *Physiologia Plantarum* 145:67-76.

- Moschou P.N., Paschalidis K.A., Roubelakis-Angelakis K.A. 2008.** Plant polyamine catabolism. The state of the art. *Plant Signaling & Behavior* 3:1061-1066.
- Motose M., Hamada T., Yoshimoto K., Murata T., Hasebe M., Watanabe Y., Hashimoto T., Sakai T., Takahashi T. 2011.** NIMA-related kinases 6, 4, and 5 interact with each other to regulate microtubule organization during epidermal cell expansion in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 67:993-1005.
- Mucha E., Fricke I., Schaefer A., Wittinghofer A., Berken A. 2011.** Rho proteins of plants-Functional cycle and regulation of cytoskeletal dynamics. *European Journal of Cell Biology* 90:934-943.
- Mucha E., Hoefle C., Huckelhoven R., Berken A. 2010.** RIP3 and AtKinesin-13A - a novel interaction linking Rho proteins of plants to microtubules. *European Journal of Cell Biology* 89:906-916.
- Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D., Šamaj J. 2010.** *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant Journal* 61:234-248.
- Murashige T., Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Murata T., Sasabe M. 2011.** Microtubule nucleation and organization in plant cells. In: *The Plant Cytoskeleton*. Liu B. (ed.), *Advances in Plant Biology* 2, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 81-94.
- Murphy M.P., Holmgren A., Larsson N.-G., Halliwell B., Chang C.J., Kalyanaraman B., Rhee S.G., Thornalley P.J., Partridge L., Gems D., Nyström T., Belousov V., Schumacker P.T., Winterbourn C.C. 2011.** Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metabolism* 13:361-366.
- Mylona P.V., Polidoros A.N. 2010.** ROS Regulation of Antioxidant Genes. In: S. Dutta Gupta S. (ed.), *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Science Publishers, New Hampshire, USA, pp.101-127.
- Nakagami H., Soukupova H., Schikora A., Zarsky V., Hirt H. 2006.** A mitogen-activated kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 281:38967-38704.
- Nakamura M. 2015.** Microtubule nucleating and severing enzymes for modifying microtubule array organization and cell morphogenesis in response to environmental cues. *New Phytologist* 205:1022-1027.
- Nanda A.K., Andrio E., Marino D., Pauly N., Dunand C. 2010.** Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *Journal of Integrative Plant Biology* 52:195-204.
- Napier R.M., Fowke L.C., Hawes C., Lewis M., Pelham H.R. 1992.** Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 102:261-271.
- Narasimhulu S.B., Reddy A.S.N. 1998.** Characterization of microtubule binding domains in the *Arabidopsis* kinesin-like calmodulin-binding protein. *The Plant Cell* 10:957-965.
- Navas P., Villalba J.M., Cordoba F. 1994.** Ascorbate function at the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1197:1-13.
- Neill S., Desikan R., Hancock J. 2002.** Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 5:388-395.
- Nick P. 2008.** Control of cell axis. In: *Plant microtubules*. Plant Cell Monographs 11. Nick P. (ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 3-46.

- Nick P. 2011.** Microtubules and the tax payer. *Protoplasma* 249:S81-S94.
- Nick P. 2013.** Microtubules, signalling and abiotic stress. *The Plant Journal* 75:309-323.
- Nick P. 2014.** Why to spend tax money on plant microtubules. In: *Applied plant cell biology*. Plant Cell Monographs 22. Nick P., Opatrný Z. (eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 39-67.
- Nick P., Heuing A., Ehmann B. 2000.** Plant chaperonins: a role in microtubule-dependent wall formation? *Protoplasma* 211:234-244.
- Niehl A., Pena E.J., Amari K., Heinlein M. 2013.** Microtubules in viral replication and transport. *The Plant Journal* 75:290-308.
- Nielsen E., Cheung A.Y., Ueda T. 2008.** The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiology* 147:1516-1526.
- Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C.H. 2002.** Interactions between biosynthesis, compartmentation, and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *Journal of Experimental Botany* 53:1283-1304.
- Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C.H. 2012.** Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment* 35:454-484.
- Nogales E. 2000.** Structural insights into microtubule function. *Annual Review of Biochemistry* 69:277-302.
- Nogales E. 2004.** Tubulin and its isoforms. *Encyclopedia of Biological Chemistry* 4:272-276.
- Nogales E., Downing K.H. 2008.** Tubulin and microtubule microstructures. In: *Cancer drug discovery and development: the role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology*. Fojo T. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp. 211-226.
- O'Brien T.P., McCully M.E. 1981.** The study of plant structure. Principles and selected methods. Termarcaphi Pty Melbourne p.352.
- O'Brien E.T., Salmon E.D., Erickson H.P. 1997.** How calcium causes microtubule depolymerization. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 36:125-135.
- O'Brien J.A., Daudi A., Butt V.S., Bolwell G.P. 2012.** Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236:765-779.
- Oda T., Hashimoto H., Kuwabara N., Hayashi K., Kojima C., Kawasaki T., Shimamoto K., Sato M., Shimizu T. 2008.** Crystallographic characterization of the N-terminal domain of a plant NADPH oxidase. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications* 64:867-869.
- Oda Y., Fukuda H. 2013.** Rho of plant GTPase signaling regulates the behavior of *Arabidopsis* kinesin-13A to establish secondary cell wall patterns. *The Plant Cell* 25:4439-4450.
- Oda Y., Mimura T., Hasezawa S. 2005.** Regulation of secondary cell wall development by cortical microtubules during tracheary element differentiation in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiology* 137:1027-1036.
- Oliva M., Vernoux T., Traas J. 2013.** From auxin transport to patterning. In: *Polar auxin transport*. Chen R., Baluška F. (eds.), Springer-Verlag Heidelberg, Germany, pp.259-279.
- Oliver J.M., Albertini D.F., Berlin R.D. 1976.** Effects of glutathione-oxidizing agents on microtubule assembly and microtubule-dependent surface properties of human neutrophils. *The Journal of Cell Biology* 71:921-932.
- Onumah O.E., Jules G.E., Zhao Y., Zhou L., Yang H., Guo Z. 2009.** Overexpression of catalase delays G0/G1 to S phase transition during cell cycle progression in mouse aortic endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 46:1658-1667.

- Opdenakker K., Remans T., Vangronsveld J., Cuypers A. 2012.** Mitogen-activated protein (MAP) kinases in plant metal stress: regulation and responses in comparison to other abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 13:7828-7853.
- Oracz K., El-Maarouf-Bouteau H., Kranner I., Bogatek R., Corbineau F., Bailly C. 2009.** The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology* 150:494-505.
- Otegui M.S., Verbrugghe K.J., Skop A.R. 2005.** Midbodies and phragmoplasts: analogous structures involved in cytokinesis. *Trends in Plant Science* 15:404-413.
- Overmyer K., Brosche M., Pellinen R., Kuittinen T., Tuominen H., Ahlfors R., Keinänen M., Saarma M., Scheel D., Kangasjarvi J. 2005.** Ozone-induced programmed cell death in the *Arabidopsis radical-induced cell death1* mutant. *Plant Physiology* 137:1092-1104.
- Panda D., Miller H.P., Banerjee A., Ludueña R.F., Wilson L. 1994.** Microtubule dynamics *in vitro* are regulated by the tubulin isotype composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:11358-11362.
- Παντερής Ε., Αποστολάκος Ρ., Γαλάτης Β. 2013.** Διερεύνηση του ρόλου της πρωτεΐνης PAN1 στην οντογένεση των στοματικών συμπλόκων του φυτού *Zea mays*. Πρόγραμμα και Περίληψεις. 13^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνική Βοτανική Εταιρεία. Γκέλης Σ., Καρούσου Ρ., Κοκκίνη Σ., Παντερής Ε. (επιμέλεια έκδοσης), Θεσσαλονίκη, σ.118.
- Panteris E., Adamakis I.-D.S., Chanoumidou K. 2013.** The distribution of TPX2 in dividing leaf cells of the fern *Asplenium nidus*. *Plant Biology* 15:203-209.
- Panteris E., Adamakis I.-D.S., Voulgari G., Papadopoulou G. 2011.** A role for katanin in plant cell division: microtubule organization in dividing root cells of *fra2* and *lue1* *Arabidopsis thaliana* mutants. *Cytoskeleton* 68:401-413.
- Panteris E., Apostolakis P., Galatis B. 1995.** The effect of taxol on *Triticum* preprophase root cells: preprophase microtubule band organization seems to depend on new microtubule assembly. *Protoplasma* 186:72-78.
- Panteris E., Apostolakis P., Gräf R., Galatis B. 2000.** Gamma-tubulin colocalizes with microtubule arrays and tubulin paracrystals in dividing vegetative cells of higher plants. *Protoplasma* 210:179-187.
- Panteris E., Apostolakis P., Galatis B. 2006.** Cytoskeletal asymmetry in *Zea mays* subsidiary cell mother cells: a monopolar prophase microtubule half-spindle anchors the nucleus to its polar position. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 63:696-709.
- Panteris E., Galatis B. 2005.** The morphogenesis of lobed plant cells in the mesophyll and epidermis: organization and distinct roles of cortical microtubules and actin filaments. *New Phytologist* 167:721-732.
- Panteris E., Galatis B., Quader H., Apostolakis P. 2007.** Cortical actin filament organization in developing and functioning stomatal complexes of *Zea mays* and *Triticum turgidum*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 64:531-548.
- Panteris E., Komis G., Adamakis I.D.S., Šamaj J., Bosabalidis A.M. 2010.** MAP65 in tubulin/colchicine paracrystals of *Vigna sinensis* root cells: possible role in the assembly and stabilization of atypical tubulin polymers. *Cytoskeleton* 67:152-160.
- Paredez A.R., Somerville C.R., Ehrhardt D.W. 2006.** Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312:1491-1495.
- Park K.-Y., Yung J.-Y., Park J., Hwang J.-U., Kim Y.-W., Hwang I., Lee Y. 2003.** A role for phosphatidylinositol 3-phosphate in abscisic acid-induced reactive oxygen species generation in guard cells. *Plant Physiology* 132:92-98.

- Parker A.L., Kavallaris M., McCarroll J.A. 2014.** Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Frontiers in Oncology* 4:153.
- Parrotta L., Cresti M., Cai G. 2014.** Accumulation and post-translational modifications of plant tubulins. *Plant Biology* 16:521-527.
- Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C. 2005.** Peroxidases have more function than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24:255-265.
- Pasternak T., Potters G., Gaubergs R., Jansen M.A.K. 2005.** Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany* 56:1991-2001.
- Peer W.A., Cheng Y., Murphy A.S. 2013.** Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. *Journal of Experimental Botany* 64:2629-2639.
- Pei Z.-M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klüsener B., Allen G.J., Grill E., Schroeder J.I. 2000.** Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406:731-734.
- Peleg Z., Blumwald E. 2011.** Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14:290-295.
- Pellinen R.I., Korhonen M.S., Tauriainen A.A., Palva E.T., Kangasjarvi J. 2002.** Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. *Plant Physiology* 130:549-560.
- Peng M., Kuc J. 1992.** Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82:696-699.
- Perdiz D., Mackeh R., Poüs C., Baillet A. 2011.** The ins and outs of tubulin acetylation: More than just a post-translational modification? *Cellular Signalling* 23:763-771.
- Peris L., Wagenbach M., Lafanechère L., Brocard J., Moore A.T., Kozielski F., Job D., Wordeman L., Andrieux A. 2009.** Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *The Journal of Cell Biology* 185:1159-1166.
- Pesquet E., Lloyd C. 2011.** Microtubules, MAPs and xylem formation. In: *The Plant Cytoskeleton*. Advances in Plant Biology 2. Liu B. (ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 277-306.
- Pesquet E., Tuominen H. 2011.** Ethylene stimulates tracheary element differentiation in *Zinnia elegans* cell cultures. *New Phytologist* 190:138-149.
- Petit J.M., Briat J.F., Lobréaux S. 2001.** Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *Biochemical Journal* 359:575-782.
- Petrov V.D., Van Breusegem F. 2012.** Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants* pls014.
- Petrovská B., Cenklová V., Pochylová Ž., Kourová H., Doskočilová A., Plíhal O., Binarová L., Binarová P. 2012.** Plant Aurora kinases play a role in maintenance of primary meristems and control of endoreduplication. *New Phytologist* 193:590-604.
- Petrovská B., Jerabková H., Kohoutová L., Cenklová V., Pochylová Z., Gelová Z., Kocarová G., Váchová L., Kurejová M., Tomastiková E., Binarová P., 2013.** Overexpressed TPX2 causes ectopic formation of microtubular arrays in the nuclei of acentrosomal plant cells. *Journal of Experimental Botany* 64:4575-4587.
- Pickett-Heaps J.D., Gunning B.E.S., Brown R.C., Lemmon B.E., Cleary A.L. 1999.** The cytoplasm concept in plant cells: cytoplasmic domains and the evolution of spatially organised cell division. *American Journal Botany* 86:153-172.
- Pierson G.B., Burton P.R., Himes R.H. 1978.** Alterations in number of protofilaments in microtubules assembled *in vitro*. *The Journal of Cell Biology* 76:223-228.

- Pignocchi C., Minns G.E., Nesi N., Koumproglou R., Kitsios G., Benning C., Lloyd C.W., Doonan J.H., Hills M.J. 2009.** ENDOSPERM DEFECTIVE1 is a novel microtubule-associated protein essential for seed development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21:90-105.
- Pillitteri L.J., Torii K.U. 2012.** Mechanisms of stomatal development. *Annual Review of Plant Biology* 63:591-614.
- Piperno G., LeDizet M., Chang X.J. 1987.** Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *The Journal of Cell Biology* 104:289-302.
- Pitzschke A., Djamel A., Bitton F., Hirt H. 2009 β .** A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signaling. *Molecular Plant* 2:120-137.
- Pitzschke A., Schikora A., Hirt H. 2009 α .** MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 12:421-426.
- Pleskot R., Li J., Žárský V., Potocký M., Staiger C.J. 2013.** Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid. *Current Opinion in Plant Biology* 18:496-504.
- Pogson B.J., Woo N.S., Foster B., Small I.D. 2008.** Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends in Plant Science* 13:602-609.
- Polidoros A.N., Mylona P.V., Arnholdt-Schmittc B. 2009.** Aox gene structure, transcript variation and expression in plants. *Physiologia Plantarum* 137:342-353.
- Pollard T.D. 2000.** Reflections on a quarter century of research on contractile systems. *Trends in Biochemical Science* 25:607-611.
- Porta H., Rocha-Sosa M. 2002.** Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology* 130:15-21.
- Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M., Greenwood M.T. 2011.** Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813:238-259.
- Potocký M., Jones M.A., Bezvoda R., Smirnoff N., Žárský V. 2007.** Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytologist* 174:742-751.
- Potters G., Horemans N., Caubergs R.J., Asard H. 2000.** Ascorbate and dehydroascorbate influence cell cycle progression in a tobacco cell suspension. *Plant Physiology* 124:17-20.
- Potters G., De Gara L., Asard H., Horemans N. 2002.** Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry* 40:537-548.
- Potters G., Pasternak T.P., Guisez Y., Jansen M.A.K. 2009.** Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant, Cell & Environment* 32:158-169.
- Potters G., Horemans N., Jansen M.A.K. 2010.** The cellular redox state in plant cell biology - A charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:292-300.
- Poulter N.S., Vátovec S., Franklin-Tong V.E. 2008.** Microtubules are a target for self-incompatibility signaling in *Papaver* pollen. *Plant Physiology* 146:1358-1367.
- Qiao F., Chang X.L., Nick P. 2010.** The cytoskeleton enhances gene expression in the response to the Harpin elicitor in grapevine. *Journal of Experimental Botany* 61:4021-4031.
- Rasmussen C.G., Humphries J.A., Smith L.G. 2011.** Determination of symmetric and asymmetric division planes in plant cells. *Annual Review of Plant Biology* 62:387-409.
- Rasmussen C.G., Wright A.J., Müller S. 2013.** The role of the cytoskeleton and associated proteins in determination of the plant cell division plane. *The Plant Journal* 75:258-269.
- Raspaglio G., Filippetti F., Prislei S., Penci R., De Maria I., Cicchillitti L., Mozzetti S., Scambia G., Ferlini C. 2008.** Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1 binding to its 3' flanking region. *Gene* 409:100-108.

- Ravet K., Touraine B., Boucherez J., Briat J.F., Gaymard F., Cellier F. 2009.** Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 57:400-412.
- Ravet K., Pilon M. 2012.** Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 19:919-932.
- Reddy A.S.N., Day I.S. 2001.** Kinesins in the *Arabidopsis* genome: a comparative analysis among eukaryotes. *BMC Genomics* 2:2.
- Reddy A.S.N., Day I.S. 2011.** Microtubule motor proteins in the eukaryotic green lineage: functions and regulation. In: *The Plant Cytoskeleton*. Liu B. (ed.), Advances in Plant Biology 2, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 119-142.
- Reed N.A., Cai D., Blasius T.L., Jih G.T., Meyhofer E., Gaertig J., Verhey K.J. 2006.** Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Current Biology* 16:2166-2172.
- Reichheld J.-P., Vernoux T., Lardon F., Montagu M.V., Inzé D. 1999.** Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *The Plant Journal* 17:647-656.
- Ren D., Yang H., Zhand S. 2002.** Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277:559-565.
- Rentel M.C., Knight H. 2004.** Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135:1471-1479.
- Rentel M.C., Lecourieux D., Ouaked F., Usher S.L., Petersen L., Okamoto H., Knight H., Peck S.C., Grierson C.S., Hirt H., Knight M.R. 2004.** OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 427:858-861.
- Reymond J., Segrè D. 2006.** The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. *Science* 311:1764-1767.
- Reynolds E.S. 1963.** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 17:208-212.
- Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C., Siedow J.N. 2006.** Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiology* 141:357-366.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1997.** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2:152-159.
- Richter G.L., Monshausen G.B., Krol A., Gilroy S. 2009.** Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis. *Plant Physiology* 151:1855-1866.
- Rinalducci S., Murgiano L., Zolla L. 2008.** Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany* 59:3781-3801.
- Rizhsky L., Davletova S., Liang H., Mittler R. 2004.** The zing finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 279:11736-11743.
- Rodríguez A.A., Grunberg K.A., Taleisnik E.L. 2002.** Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. *Plant Physiology* 129:1627-1632.
- Rogers H.J. 2005.** Cytoskeletal regulation of the plane of cell division: an essential component of plant development and reproduction. *Advances in Botanical Research* 42:69-111.
- Roll-Mecak A., McNally F.J. 2010.** Microtubule-severing enzymes. *Current Opinion in Cell Biology* 22:96-103.

- Rosado J.A., González A., Salido G.M., Pariente J.A. 2002.** Effects of reactive oxygen species on actin filament polymerisation and amylase secretion in mouse pancreatic acinar cells. *Cellular Signalling* 14:547-556.
- Rouchier N., Lemaire S.D., Jacquot J.-P. 2008.** The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annual Review of Plant Biology* 59:143-166.
- Roy P., Roy S.K., Mitra A., Kulkarni A.P. 1994.** Superoxide generation by lipoxygenase in the presence of NADH and NADPH. *Biochimica et Biophysica Acta* 1214:171-179.
- Ryder L.S., Dagdas Y.F., Mentlak T.A., Kershaw M.J., Thornton C.R., Schuster M., Chen J., Wang Z., Talbot N.J. 2013.** NADPH oxidases regulate septin-mediated cytoskeletal remodeling during plant infection by the rice blast fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110:3179-3184.
- Sagi M., Fluhr R. 2001.** Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase: modulation of activity by calcium and by tobacco virus infection. *Plant Physiology* 126:1281-1290.
- Sagi M., Fluhr R. 2006.** Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* 141:336-340.
- Sakai T., Honing H.V.D., Nishioka M., Uehara Y., Takahashi M., Fujisawa N., Saji K., Seki M., Shinozaki K., Jones M.A., Smirnov N., Okada K., Wasteneys G.O. 2008.** Armadillo repeat-containing kinesins and a NIMA-related kinase are required for epidermal cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 53:157-171.
- Samuels A.L., Giddings T.H.Jr., Staehelin L.A. 1995.** Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. *The Journal of Cell Biology* 130:1345-1357.
- Samuels A.L., Staehelin A.L. 1996.** Caffeine inhibits cell plate formation by disrupting membrane reorganization just after the vesicle fusion step. *Protoplasma* 195:144-155.
- Sánchez-Fernández R., Fricker M., Corben L.B., White N.S., Sheard N., Leaver C.J., Van Montagu M., Inzé D., May M.J. 1997.** Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94:2745-2750.
- Sandalio L.M., Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., del Río L.A. 2008.** Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide in vivo in plant tissues. *Methods in Enzymology* 440:397-409.
- Sano T., Kutsuna N., Higaki T., Oda Y., Yoneda A., Kumagai-Sano F., Hasezawa S. 2007.** Cytoskeletal and vacuolar dynamics during plant cell division: approaches using structure-visualized cells. In: *Cell Division Control in Plants*. Verma D.P.S., Hong S. (eds.), Plant Cell Monographs 9, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 125-140.
- Santa-María I., Smith M.A., Perry G., Hernández F., Avila J., Moreno F.J. 2005.** Effect of quinones on microtubule polymerization: a link between oxidative stress and cytoskeletal alterations in Alzheimer's disease. *Biochemical et Biophysical Acta* 1740:472-480.
- Sasabe M., Machida Y. 2014.** Signaling pathway that controls plant cytokinesis. *The Enzymes* 35:145-165.
- Sasabe M., Kosetsu K., Hidaka M., Murase A., Machida Y. 2011.** *Arabidopsis thaliana* MAP65-1 and MAP65-2 function redundantly with MAP65-3/PLEIADE in cytokinesis downstream of MPK4. *Plant Signaling & Behavior* 26:743-747.
- Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Sonobe S., Igarashi H., Itoh T.J., Hidaka M., Machida Y. 2006.** Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its

activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes & Development* 20:1004-1014.

Sasabe M., Boudolf V., De Veylder L., Inzé D., Genschik P., Machida Y. 2011. Phosphorylation of a mitotic kinesin-like protein and a MAPKKK by cyclin-dependent kinases (CDKs) is involved in the transition to cytokinesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108:17844-17849.

Sassi M., Ali O., Boudon F., Cloarec G., Abad U., Cellier C., Chen X., Gilles B., Milani P., Friml J., Vernoux T., Godin C., Hamant O., Traas J. 2014. An auxin-mediated shift toward growth isotropy promotes organ formation at the shoot meristem in *Arabidopsis*. *Current Biology* 24:2335-2342.

Sattelmacher B. 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist* 149:167-192.

Savage C., Hamelin M., Culotti J.G. 1989. *mec-7* is a β -tubulin gene required for the production of 15-protofilament microtubules in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development* 3:870-881.

Scaife R.M. 2004. G2 cell cycle arrest, down-regulation of cyclin B and induction of mitotic catastrophe by the flavoprotein inhibitor diphenyleneiodonium. *Molecular Cancer Therapeutics* 3:1229-1237.

Scaife R.M. 2005. Selective and irreversible cell cycle inhibition by diphenyleneiodonium. *Molecular Cancer Therapeutics* 4:876-884.

Scaife R.M. 2006. Microtubule disassembly and inhibition of mitosis by a novel synthetic pharmacophore. *Journal of Cellular Biochemistry* 98:102-114.

Schippers J.H.M., Nguynen H.M., Lu D., Schmidt R., Mueller-Roeber B. 2012. ROS homeostasis during development: an evolutionary conserved strategy. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69:3245-3257.

Schopfer P. 2001. Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening *in vitro* and *in vivo*: implications for the control of elongation growth. *The Plant Journal* 28:679-688.

Schuyler S.C., Pellman D. 2001. Search, capture and signal: games microtubules and centrosomes play. *Journal of Cell Science* 114:247-255.

Schmit A.-C. 2002. Acentrosomal microtubule nucleation in higher plants. *International Review of Cytology* 220:257-289.

Schopfer P., Heyno E., Drepper F., Krieger-Liszkay A. 2008. Naphthoquinone-dependent generation of superoxide radicals by quinone reductase isolated from the plasma membrane of soybean. *Plant Physiology* 147:864-878.

Sedbrook J.C., Ehrhardt D.W., Fisher S.E., Scheible W.R., Somerville C.R. 2004. The *Arabidopsis* SKU6/SPIRAL1 gene encodes a plus end-localized microtubule-interacting protein involved in directional cell expansion. *The Plant Cell* 16:1506-1520.

Segal A.W., West I., Wientjes F., Nugent J.H.A., Chavan A.J., Haley B., Garcia R.C., Rosen H., Scrace G. 1992. Cytochrome b₂₄₅ is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochemical Journal* 284:781-788.

Segui-Simarro J.M., Austin J.R., White E.A., Staehelin L.A. 2004. Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of *Arabidopsis* preserved by high-pressure freezing. *The Plant Cell* 16:836-856.

Seltzer V., Pawlowski T., Evrard J., Canaday J., Herzog E., Schmit A.-C. 2008. Plant gamma-tusc-like components: their role in microtubule nucleation. In: *The plant cytoskeleton: a key tool for agro-biotechnology*. Blume Y.B., Vance Baird W., Yemets A.I., Breviario G. (eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 3-22.

- Serrander L., Cartier L., Bedard K., Banfi B., Lardy B., Plastre O., Sienkiewicz A., Fórró L., Schlegel W., Krause K.-H. 2007.** NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochemical Journal* 406:105-114.
- Seung D., Webster M.W., Wang R., Andreeva Z., Marc J. 2013.** Dissecting the mechanism of abscisic acid-induced dynamic microtubule reorientation using live cell imaging. *Functional Plant Biology* 40:224-236.
- Shaikhali J., Heiber I., Seidel T., Ströher E., Hiltcher H., Birkmann S., Dietz K.-J., Baier M. 2008.** The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes. *BMC Plant Biology* 8:48.
- Shao H.-b., Chu L.-y., Shao M.-a., Cheruth A.J., Mi H.-m. 2008a.** Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies* 331:433-441.
- Shao H.-B., Chu L.Y., Lu Z.H., Kang C.-M. 2008b.** Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences* 4:8-14.
- Shapiguzov A., Vainonen J.P., Wrzaczek M., Kangasjärvi. 2012.** ROS-talk-how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through. *Frontiers in Plant Science* 3:292.
- Sharma N., Bryant J., Wloga D., Donaldson R., Davis R.C., Jerka-Dziadosz M., Gaertig J. 2007.** Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia. *The Journal of Cell Biology* 178:1065-1079.
- Shaw S.L. 2013.** Reorganization of the plant cortical microtubule array. *Current Opinion in Plant Biology* 16:1-5.
- Shen L., Xu W., Li A., Ye J., Zhou J. 2011.** JWA enhances As₂O₃-induced tubulin polymerization and apoptosis via p38 in HeLa and MCF-7 cells. *Apoptosis* 16: 1177-1193.
- Sheremet Y., Yemets A.I., Vissenberg K., Verbelen J.P., Blume Y. 2010.** Effects of inhibitors of serine/threonine protein kinases on *Arabidopsis thaliana* root morphology and microtubule organization in its cells. *Cell and Tissue Biology* 4:399-409.
- Sieberer B.J., Ketelaar T., Esseling J.J., Emons A.M.C. 2005a.** Microtubules guide root hair tip growth. *New Phytologist* 167:711-719.
- Sieberer B.J., Timmers A.C.J., Emons A.M.C. 2005b.** Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair reorientation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:1195-1204.
- Sirajuddin M., Rice L.M., Vale R.D. 2014.** Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications. *Nature Cell Biology* 16:335-344.
- Sirichandra C., Gu D., Hu H.-C., Davanture M., Lee S., Djaoui M., Valot B., Zivy M., Leung J., Merlot S., Kwak J.M. 2009.** Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtRbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Letters* 583:2982-2986.
- Šlajcheroová K., Fišerová J., Fischer L., Schwarzerová K. 2012.** Multiple actin isoforms in plants: diverse genes for diverse roles? *Frontiers in Plant Science* 3:226.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. 2014a.** Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* 32:2-11.
- Smékalová V., Luptovčíak I., Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Doskočilová A., Takáč T., Vadovič P., Novák O., Pechan T., Ziemann A., Košútová P., Šamaj J. 2014b.** Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in *Arabidopsis* post-

embryogenic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytologist* 203:1175-1193.

Smerjac S.M., Bizzozero O.A. 2008. Cytoskeletal protein carbonylation and degradation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neurochemistry* 105:763-772.

Smertenko A.P., Blume Y., Viklicky V., Opatrny Z., Draber P. 1997. Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in *Nicotiana tabacum* L. cells. *Planta* 201:349-358.

Smertenko A.P., Bozhkov V., Filonova L.H., von Arnold S., Hussey P.J. 2003. Re-organisation of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos. *The Plant Journal* 33:813-824.

Smertenko A.P., Chang H.Y., Wagner V., Kaloriti D., Fenyk S., Sonobe S., Lloyd C., Hauser M.T., Hussey P.J. 2004. The *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *The Plant Cell* 16:2035-2047.

Smertenko A.P., Franklin-Tong V.E. 2011. Organization and regulation of the cytoskeleton in plant programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* 18:1263-1270.

Smertenko A.P., Kaloriti D., Chang H.Y., Fiserova J., Opatrny Z., Hussey P.J. 2008. The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of *Arabidopsis* microtubule-associated protein MAP65 isoforms. *The Plant Cell* 20:3346-3358.

Smertenko AP, Chang HY, Sonobe S, Fenyk SI, Weingartner M, Bögre L, Hussey PJ. 2004. Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *Journal of Cell Science*. 119:3227-3237.

Smirnoff N., Wheeler G.L. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35:291-314.

Smith J.W., Hong T.T., Gao D., Vogan J.M., Jensen B.C., Fong T.S., Simpson P.C., Stainier D.Y., Chi N.C., Shaw R.M. 2010. Limited forward trafficking of connexin 43 reduces cell-cell coupling in stressed human and mouse myocardium. *Journal of Clinical Investigation* 120:266-279.

Smith L.G. 2001. Plant cell division: building walls in the right places. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:33-39.

Smith L.G., Gerttula S.M., Han S., Levy J. 2001. TANGLED1: a microtubule binding protein required for the spatial control of cytokinesis in maize. *The Journal of Cell Biology* 152:231-236.

Sossey-Alaoui K., Li X., Ranalli T.A., Cowel J.K. 2005. WAVE3-mediated cell migration and lamellipodia formation are regulated downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 280:21748-21755.

Spinner L., Gadeyne A., Belcram K., Goussot M., Moison M., Duroc Y., Eeckhout D., De Winne N., Schaefer E., Van De Slijke E., Persiau G., Witters E., Gevaert K., De Jaeger G., Bouchez D., Van Damme D., Pastuglia M. 2013. A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division. *Nature Communications* 4:1863.

Stadtman E.R. 2006. Protein oxidation and aging. *Free Radical Research* 40:1250-1258.

Stachelin L.A., Hepler P.K. 1996. Cytokinesis in higher plants. *Cell* 84:821-824.

Staiger C.J., Blanchoin L. 2006. Actin dynamics: old friends with new stories. *Current Opinion in Plant Biology* 9:554-562.

Steffens B., Kovalev A., Gorb S.N., Sauter M. 2012. Emerging roots alter epidermal cell fate through mechanical and reactive oxygen species signaling. *The Plant Cell* 24:3296-3306.

Steinhorst L., Kudla J. 2013. Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiology* 163:471-485.

- Stoppin-Mellet V., Fache V., Portran D., Martiel J.-L., Vantard M. 2013.** MAP65 coordinate microtubule growth during bundle formation. *PLoS ONE* 8:e56808.
- Stoppin-Mellet V., Gaillard J., Vantard M. 2006.** Katanin's severing activity favors bundling of cortical microtubules in plants. *The Plant Journal* 46:1009-1017.
- Struk S., Dhonukshe P. 2014.** MAPs: cellular navigators for microtubule array orientations in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 33:1-21.
- Suarez Rodriguez M.C., Petersen M., Mundy J. 2010.** Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61:621-649.
- Suetsugu N., Yamada N., Kagawa T., Yonekura H., Uyeda T.Q., Kadota A., Wada M. 2010.** Two kinesin-like proteins mediate actinbased chloroplast movement in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107:8860-8865.
- Sundaravelpandian K., Chandrika N.N.P., Schmidt W. 2013.** PFT1, a transcriptional Mediator complex subunit, controls root hair differentiation through reactive oxygen species (ROS) distribution in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 197:151-161.
- Sutimantanapi D., Pater D., Smith L.G. 2014.** Divergent roles for maize PAN1 and PAN2 receptor-like proteins in cytokinesis and cell morphogenesis. *Plant Physiology* 164:1905-1917.
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. 2012.** ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* 35:259-270.
- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., Mittler R. 2011.** Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 14:1-9.
- Swanson S.J., Choi W.-G., Alexandra Chanoca A., Gilroy S. 2011.** In vivo imaging of Ca^{2+} , pH, and reactive oxygen species using fluorescent probes in plants. *Annual Review of Plant Biology* 62:273-297.
- Swanson S., Gilroy S. 2010.** ROS in plant development. *Physiologia Plantarum* 138:384-392.
- Swidzinski J.A., Sweetlove L.J., Leaver C.J. 2002.** A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 30:431-446.
- Szabados L., Savaouré A. 2010.** Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15:89-97.
- Svedružić D., Jónsson S., Toyota C.G., Reinhardt L.A., Ricagno S., Lindqvist Y., Richards N.G.J. 2005.** The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433:176-192.
- Takáč T., Pechan T., Samajová O., Samaj J. 2013.** Vesicular trafficking and stress response coupled to PI3K inhibition by LY294002 as revealed by proteomic and cell biological analysis. *Journal of Proteome* 12:4435-4448.
- Takáč T., Šamajoná O., Vadoviš P., Pechan T., Košútová P., Ovečka M., Husičková A., Komis G., Šamaj J. 2014.** Proteomic and biochemical analyses show a functional network of proteins involved in antioxidant defense of the *Arabidopsis anp2anp3* double mutant. *Journal of Proteome* 13:5347-5361.
- Takeda S., Gapper C., Kaya H., Bell E., Kuchitsu K., Dolan L. 2008.** Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* 319:1241-1244.
- Takemoto D., Tanaka A., Scott B. 2007.** NADPH oxidases in fungi: Diverse role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genetics and Biology* 44:1065-1076.
- Tang J.C., Janmey P.A., Stossel T.P., Ito T. 1999.** Thiol oxidation of actin produces dimers that enhance the elasticity of the F-actin network. *Biophysical Journal* 76:2208-2215.

- Tejos R., Sauer M., Vanneste S., Palacios-Gomez M., Li H., Heilmann M., van Wijk R., Vermeer J.E.M., Heilmann I., Munnik T., Friml J. 2014.** Bipolar plasma membrane distribution of phosphoinositides and their requirement for auxin-mediated cell polarity and patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26:2114-2128.
- Testerink C., Munnik T. 2005.** Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends in Plant Science* 10:368-375.
- Testerink C., Munnik T. 2011.** Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *Journal of Experimental Botany* 62:2349-2361.
- Tiago T., Aureliano M., Gutiérrez-Merino C. 2008.** Effects of reactive oxygen and nitrogen species on actomyosin and their implications for muscle contractility. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Gutiérrez-Merino C., Leeuwenburgh C. (eds.), Research Signpost, Kerala, India. pp.131-149.
- Thomas C. 2012.** Bundling actin filaments from membranes: some novel players. *Frontiers in Plant Science* 3:188.
- Thomas C., Tholl S., le Moes D., Dieterle M., Papuga J., Moreau F., Steinmetz A. 2009.** Actin bundling in plants. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 66:940-957.
- Thomas S.G., Franklin-Tong V.E. 2004.** Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature* 429:305-309.
- Timasheff S.N., Grisham L.M. 1980.** *In vitro* assembly of cytoplasmic microtubules. *Annual Review of Biochemistry* 49:565-591.
- Tognetti V.B., Mühlenbock P., Van Breusegem F. 2012.** Stress homeostasis-the redox and auxin perspective. *Plant, Cell & Environment* 35:321-333.
- Tognolli M., Penel C., Greppin H., Simon P. 2002.** Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288:129-138.
- Tominaga-Wada R., Ishida T., Wada T. 2011.** New insights into the mechanism of development of *Arabidopsis* root hairs and trichomes. *International Review of Cell and Molecular Biology* 286:67-106.
- Topalidou I., Keller C., Kalebic N., Nguyen K.C., Somhegyi H., Politi K.A., Heppenstall P., Hall D.H., Chalfie M. 2012.** Genetically separable functions of the MEC-17 tubulin acetyltransferase affect microtubule organization. *Current Biology* 22:1057-1065.
- Torres M.A. 2010.** ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* 138:414-429.
- Torres M.A., Dangl J.L. 2005.** Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* 8:397-403.
- Torres M.A., Jones J.D., Dangl J.L. 2005.** Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141:373-378.
- Townsend D.M. 2007.** S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. *Molecular Interventions* 7:313-324.
- Tran H.T., Nimick M., Uhrig R.G., Templeton G., Morrice N., Gourlay R., Delong A., Moorhead G.B. 2012.** *Arabidopsis thaliana* histone deacetylase 14 (HDA14) is an alpha-tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3. *The Plant Journal* 71:263-272.
- Tsakagoshi H. 2012.** Defective root growth triggered by oxidative stress is controlled through the expression of cell cycle-related genes. *Plant Science* 197:30-39.
- Tsakagoshi H., Busch W., Benfey P.N. 2010.** Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143:606-616.
- Tulin A., McClerklin S., Huang Y., Dixit R. 2012.** Single-molecule analysis of the microtubule cross-linking protein MAP65-1 reveals a molecular mechanism for contact-angle-dependent microtubule bundling. *Biophysical Journal* 102:802-809.

- Tuszynski J.A., Carpenter E.J., Huzil J.T., Malinski W., Luchko T., Ludueña R.F. 2006.** The evolution and structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *International Journal of Developmental Biology* 50:341-358.
- Tyson G.E., Bulger R.E. 1973.** Vinblastine-induced paracrystals and unusually large microtubules (macrotubules) in rat renal cells. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 141:443-458.
- Ueda K., Matsuyama T., Hashimoto T. 1999.** Visualization of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 206:201-206.
- Unger E., Böhm K.J., Vater W. 1990.** Structural diversity and dynamics of microtubules and polymorphic tubulin assemblies. *Electron Microscopy Reviews* 3:355-395.
- Urbanek A., Zechmann B., Zellnig G., Müller M. 2003.** Aspects of glutathione treatment on the cytoskeleton in different cells of *Picea abies*. *Phyton* 43:319-333.
- Ushio-Fukai M. 2009.** Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxidants & Redox Signaling* 11:1289-1299.
- Vale R.D. 2003.** The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112:467-480.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazura M., Telser J. 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39:44-84.
- Van Bruaene N., Joss G., Van Oostveldt P. 2004.** Reorganization and *in vivo* dynamics of microtubules during *Arabidopsis* root hair development. *Plant Physiology* 136:3905-3919.
- Van Damme D., De Rybel B., Gudesblat G., Demidov D., Grunewald W., De Smet I., Houben A., Beeckman T., Russinova E. 2011.** *Arabidopsis* α Aurora kinases function in formative cell division plane orientation. *The Plant Cell* 23:4013-4024.
- Vatén A., Dettmer J., Wu S., Stierhof Y.D., Miyashima S., Yadav S.R., Roberts C.J., Campilho A., Bulone V., Lichtenberger R., Lehesranta S., Mähönen A.P., Kim J.Y., Jokitalo E., Sauer N., Scheres B., Nakajima K., Carlsbecker A., Gallagher K.L., Helariutta Y. 2011.** Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development. *Developmental Cell* 21:1144-1155.
- Vater W., Böhm K.J., Unger E. 1997.** Tubulin assembly in the presence of calcium ions and taxol: Microtubule bundling and formation of macrotubule-ring complexes. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 36:76-83.
- Vaughn K.C., Harper J.D. 1998.** Microtubule-organizing centers and nucleating sites in land plants. *International Review of Cytology* 181:75-149.
- Verma D.P.S. 2001.** Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:751-784.
- Verma D.P.S., Hong Z. 2005.** The ins and outs in membrane dynamics: tubulation and vesiculation. *Trends in Plant Science* 10:159-165.
- Vivancos P.D., Dong Y., Ziegler K., Markovic J., Pallardó F.V., Pellny T.K., Verrier P.J., Foyer C.H. 2010.** Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole-cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. *The Plant Journal* 64:825-838.
- Vlahos C.J., Matter W.F., Hui K.Y., Brown R.F. 1994.** A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *Journal of Biological Chemistry* 269:5241-5248.
- Vos J.W., Dogterom M., Emons A.M. 2004.** Microtubules become more dynamic but not shorter during preprophase band formation: a possible “search-and- capture” mechanism for microtubule translocation. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 57:246-258.

- Vos J.W., Pieuchot L., Evrard J.L., Janski N., Bergdoll M., de Ronde D., Perez L.H., Sardon T., Vernos I., Schmit A.C. 2008.** The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. *The Plant Cell* 20:2783-2797.
- Wade R.H. 2009.** On and around microtubules: an overview. *Molecular Biotechnology* 43:177-191.
- Walczak C.E., Shaw S.L. 2010.** A MAP for bundling microtubules. *Cell* 142:364-367.
- Walia A., Lee J.S., Wasteneys G., Ellis B. 2009.** *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase MPK18 mediates cortical microtubule functions in plant cells. *The Plant Journal* 59:565-575.
- Walker K.L., Müller S., Moss D., Ehrhardt D.W., Laurie G. 2007.** *Arabidopsis* Tangled identifies the division plane throughout mitosis and cytokinesis. *Current Biology* 17:1827-1836.
- Wang B., Rao Y.-H., Inoue M., Hao R., Lai C.-H., Chen D., McDonald S.L., Choi M.-C., Wang Q., Shinohara M.L., Yao T.P. 2014.** Microtubule acetylation amplifies p38 kinase signalling and anti-inflammatory IL-10 production. *Nature Communications* 5:3479.
- Wang C., Li J., Yuan M. 2007.** Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* 48:1534-1547.
- Wang C., Zhang L., Chen W. 2011β.** Plant cortical microtubules are putative sensors under abiotic stress. *Biochemistry (Moscow)* 76:320-326.
- Wang C.L., Wu J., Xu G.H., Gao Y.B., Chen G., Wu J.Y., Wu H.-q., Zhang S.L. 2010.** S-RNase disrupts tip-localized reactive oxygen species and induces nuclear DNA degradation in incompatible pollen tubes of *Pyrus pyrifolia*. *Journal of Cell Science* 123: 4301-4309.
- Wang H., Wang S., Lu Y., Alvarez S., Hicks L.M., Ge X., Xia Y. 2012β.** Proteomic analysis of early-responsive redox-sensitive proteins in *Arabidopsis*. *Journal of Proteome Research* 11:412-424.
- Wang J., Zhang Y., Wu J., Meng L., Ren H. 2013.** AtFH16, an *Arabidopsis* type II formin, binds and bundles both microfilaments and microtubules, and preferentially binds to microtubules. *Journal of Integrative Plant Biology* 55:1002-1015.
- Wang M., Hoekstra S., van Bergen S., Lamers G.E.M., Oppedijk B.J., van der Heijden M.W., de Priester W., Schilperoort R.A. 1999.** Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Molecular Biology* 39:489-501.
- Wang M., van der Meulen R.M., Visser K., Van Schaik H.P., Van Duijn B., de Boer A.H. 1998.** Effects of dormancy-breaking chemicals on ABA levels in barley grain embryos. *Seed Science and Research* 8:129-137.
- Wang S., Kurepa J., Hashimoto T., Smalle J.A. 2011α.** Salt stress induced disassembly of *Arabidopsis* cortical microtubule arrays involves 26S proteasome dependent degradation of spiral1. *The Plant Cell* 23:3412-3427.
- Wang S., Kurepa J., Smalle J.A. 2011γ.** Ultra-small TiO₂ nanoparticles disrupt microtubular networks in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* 34:811-820.
- Wang W., Vignani R., Scali M., Sensi E., Cresti M. 2004.** Post-translational modifications of α-tubulin in *Zea mays* L. are highly tissue specific. *Planta* 218:460-465.
- Wang X., Devaiah S.P., Zhang W., Welti R. 2006.** Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in Lipid Research* 45:250-278.
- Wang X., Zhu L., Liu B., Wang C., Jin L., Zhao Q., Yuan M. 2007.** *Arabidopsis* MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN18 functions in directional cell growth by destabilizing cortical microtubules. *The Plant Cell* 19:877-889.

- Wang X.L., Zhang J., Yuan M., Ehrhardt D.W., Wang Z.Y., Mao T.L. 2012a.** *Arabidopsis* MICROTUBULE DESTABILIZING PROTEIN40 is involved in brassinosteroid regulation of hypocotyl elongation. *The Plant Cell* 24:4012-4025.
- Wasteneys G., Yang Z. 2004.** The cytoskeleton becomes multidisciplinary. *Plant Physiology* 136:3853-3854.
- White P.J. 2000.** Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740: 472- 480.
- Whittington A.T., Vugrek O., Wei K.J., Hasenbein N.G., Sugimoto K., Rashbrooke M.C., Wasteneys G.O. 2001.** MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* 411:610-613.
- Whittman R., Chomicki G., Kumar M., Carr P., Turner S.R. 2013.** SPIRAL2 determines plant microtubule organization by modulating microtubule severing. *Current Biology* 23:1902-1907.
- Wickstead B., Gull K. 2007.** Dyneins across eukaryotes: a comparative genomic analysis. *Traffic* 8:1708-1721.
- Wightman R., Turner S.R. 2008.** The roles of the cytoskeleton during cellulose deposition at the secondary cell wall. *The Plant Journal* 54:794-805.
- Wilkins K.A., Bancroft J., Bosch M., Ings J., Smirnoff N., Franklin-Tong V.E. 2011.** ROS and NO are involved in the self-incompatibility response of *Papaver*. *Plant Physiology* 156:404-416.
- Willats W.G.T., Limberg G., Buchholt H.C., van Alebeek G.J., Benen J., Christensen T.M.I.E., Visser J., Voragen A., Mikkelsen J.D., Knox J.P. 2000.** Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate Research* 327:309-320.
- Wilson K.P., McCaffrey P.G., Hsiao K., Pazhanisamy S., Gallulo V., Bemis G.W., Fitzgibbon M.J., Caron P.R., Murcko M.A., Su M.S.S. 1997.** The structural basis for the specificity of pyridinylimidazole inhibitors of p38 MAP kinase. *Chemistry and Biology* 4:423-431.
- Wong C.M, Cheema A.K., Zhang L., Suzuki Y.J. 2008.** Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. *Circulation Research* 102:310-318.
- Wong H.L., Pinontoan R., Hayashi K., Tabata R., Yaeno T., Hasegawa K., Kojima C., Yoshioka H., Iba K., Kawasaki T., Shimamoto K. 2007.** Regulation of rice NADPH oxidase by binding Rac-GTPase to its N-terminal extension. *The Plant Cell* 19:4022-4034.
- Wong H.L., Shimamoto K. 2009.** Sending ROS on a bullet train. *Science Signaling* 2:pe60.
- Wright A.J., Gallagher K., Smith L.G. 2009.** discordia1 and alternative discordia1 function redundantly at the cortical division site to promote preprophase band formation and orient division planes in maize. *The Plant Cell* 21:234-247.
- Wright A.J., Smith L.G. 2007.** Mitotic spindle assembly and function. In: *Cell Division Control in Plants*. Verma D.P.S., Hong S. (eds.), Plant Cell Monographs 9, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 33-58.
- Wrzaczek M., Brosché M., Kangasjärvi J. 2013.** ROS signaling loops-production, perception, regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 16:575-582.
- Wrzaczek M., Brosché M., Salojärvi J., Kangasjärvi S., Idanheimo N., Mersmann S., Robatzek S., Karpiński S., Karpińska B., Kangasjärvi J. 2010.** Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 10:95.

- Wu G., Wei Z.K., Shao H.-B. 2007.** The mutual responses of higher plants to environment: physiological and microbiological aspects. *Biointerfaces* 59:113-119.
- Wu H.-m., Hazak O., Cheung A.Y., Yalovsky S. 2011.** RAC/ROP GTPases and auxin signaling. *The Plant Cell* 23:1208-1218.
- Wu S., Gallagher K.L. 2013.** Intact microtubules are required for the intercellular movement of the SHORT-ROOT transcription factor. *The Plant Journal* 74:148-159.
- Wu S., Scheible W.-R., Schindelasch D., Van Den Daele H., De Veylder L., Baskin T.I. 2010.** A conditional mutation in *Arabidopsis thaliana* separase induces chromosome non-disjunction, aberrant morphogenesis and cyclin B1;1 stability. *Development* 137:953-961.
- Xing Y., Jia W., Zhang J. 2008.** AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 54:440-451.
- Xiong X., Xu D., Yang Z., Huang H., Cui X. 2013.** A single amino-acid substitution at lysine 40 of an *Arabidopsis thaliana* α -tubulin causes extensive cell proliferation and expansion defects. *Journal of Integrative Plant Biology* 55:209-220.
- Xu J., Zhang S. 2015.** Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* 20:56-64.
- Xu X.M., Zhao Q., Rodrigo-Peiris T., Brkljacic J., He C.S., Müller S., Meier I. 2008.** RanGAP1 is a continuous marker of the *Arabidopsis* cell division plane. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105:18637-18642.
- Yamaguchi T., Tanabe S., Minami E., Shibuya N. 2004.** Activation of phospholipase D induced by hydrogen peroxide in suspension-cultured rice cells. *Plant & Cell Physiology* 45:1261-1270.
- Yang Y., Zhu X., Chen Y., Wang X., Chen R. 2007.** p38 and JNK MAPK, but not ERK1/2 MAPK, play important role in colchicine-induced cortical neurons apoptosis. *European Journal of Pharmacology* 576:26-33.
- Yao L.L., Zhou Q., Pei B.-L., Li Y.-Z. 2011.** Hydrogen peroxide modulates the dynamic microtubule cytoskeleton during the defence responses to *Verticillium dahliae* toxins in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 34:1586-1598.
- Yemets A., Sheremet Y., Vissenberg K., Van Orden J., Verbelen J.-P., Blume Y.B. 2008.** Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells. *Cell Biology International* 32:630-637.
- Yi B., Kasai H., Lee H.-S., Kang Y., Park J.Y., Yang M. 2011.** Inhibition by wheat sprout (*Triticum aestivum*) juice of bisphenol A-induced oxidative stress in young women. *Mutation Research* 724:64-68.
- Yildiz A., Selvin P.R. 2005.** Kinesin: walking, crawling or sliding along? *Trends in Cell Biology* 15:112-120.
- Yoshiike Y., Yamashita S., Mizoroki T., Maeda S., Murayama M., Kimura T., Sahara N., Soeda Y., Takashima A. 2012.** Adaptive responses to alloxan-induced mild oxidative stress ameliorate certain tauopathy phenotypes. *Aging Cell* 11:51-62.
- Young P.R., McLaughlin M.M., Kumar S., Kassis S., Doyle M.L., McNulty D., Gallagher T.F., Fischer S., McDonnell P.C., Carr S.A., Huddleston M.J., Seibel G., Porter T.G., Livi G.P., Adams J.L., Lee J.C. 1997.** Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *Journal of Biological Chemistry* 272:12116-12121.
- Yuan J., Xu B.-Z., Qi S.-T., Tong J.-S., Wei L., Li M., Ouyang Y.C., Hou Y., Schatten H., Sun Q.-Y. 2010.** MAPK-activated protein kinase 2 is required for mouse meiotic spindle assembly and kinetochore-microtubule attachment. *PLoS ONE* 5:e11247.

- Zachariadis M., Galatis B., Apostolakos P. 2000.** Study of mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* treated with the DNA-intercalating agent ethidium bromide. *Protoplasma* 211:151-164.
- Zachariadis M., Quader H., Galatis B., Apostolakos P. 2001.** Endoplasmic reticulum preprophase band in dividing root-tip cells of *Pinus brutia*. *Planta* 213:824-827.
- Zachariadis M., Quader H., Galatis B., Apostolakos P. 2003.** Organization of the endoplasmic reticulum in dividing cells of the gymnosperms *Pinus brutia* and *Pinus nigra*, and of the pterophyte *Asplenium nidus*. *Cell Biology International* 27:31-40.
- Zachariadis M., Quader H., Galatis B., Apostolakos P. 2004.** An inhibitor of the ATP-dependent endoplasmic reticulum Ca^{+2} -pump affects spindle organization in dividing cells of the angiosperm *Triticum turgidum* but not in species of gymnosperms and pteridophytes. *Journal of Biological Research* 2:3-19.
- Zarubin T., Han J. 2005.** Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research* 15:11-18.
- Zechmann B., Stumpe M., Mauch F. 2011.** Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta* 233:1-12.
- Zegzouti H., Anthony R.G., Jahchan N., Bögre L., Christensen S.K. 2006.** Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103:6404-6409.
- Zeng C.J., Lee Y.R., Liu B. 2009.** The WD40 repeat protein NEDD1 functions in microtubule organization during cell division in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 21:1129-1140.
- Zhang A., Zhang J., Ye N., Cao J., Tan M., Zhang J., Jiang M. 2010.** ZmMPK5 is required for the NADPH oxidase-mediated self-propagation of apoplastic H_2O_2 in brassinosteroid-induced antioxidant defence in leaves of maize. *Journal of Experimental Botany* 61:4399-4411.
- Zhang C., Mallery E., Reagan S., Boyko V.P., Kotchoni S.O., Szymanski D.B. 2013.** The endoplasmic reticulum is a reservoir for WAVE/SCAR regulatory complex signaling in the *Arabidopsis* leaf. *Plant Physiology* 162:689-706.
- Zhang Q., Lin F., Mao T., Nie J., Yan M., Yuan M., Zhang W. 2012a.** Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24:4555-4576.
- Zhang Y., Zhu H., Zhang Q., Li M., Yan M., Wang R., Wang L., Welti R., Zhang W., Wang X. 2009.** Phospholipase D α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21:2357-77.
- Zhang X., Facette M., Humphries J.A., Shen Z., Park Y., Sutimantanapi D., Sylvester A.W., Briggs S.P., Smith L.G. 2012b.** Identification of PAN2 by quantitative proteomics as a leucine-rich repeat- receptor-like kinase acting upstream of PAN1 to polarize cell division in maize. *The Plant Cell* 24:4577-4589.
- Zhao Q., Barakat B.M., Qin S., Ray A., El-Mahdy M.A., Wani G., Arafa el-S., Mir S.N., Wang Q.E., Wani A.A. 2008.** The p38 mitogen-activated protein kinase augments nucleotide excision repair by mediating DDB2 degradation and chromatin relaxation. *Journal of Biological Chemistry* 283:32553-32561.
- Zhao L., Sack F.D. 1999.** Ultrastructure of stomatal development in *Arabidopsis* (Brassicaceae) leaves. *American Journal of Botany* 86:929-939.

- Zhou X., Jiang Y.J., Yu D.Q. 2011.** WRKY22 transcription factor mediates dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Molecules and Cells* 31:303-313.
- Zhu C., Dixit R. 2012.** Functions of the *Arabidopsis* kinesin superfamily of microtubule-based motor proteins. *Protoplasma* 247:887-899.
- Zhu Y., Zuo M., Liang Y., Jiang M., Zhang J., Vibe Scheller H., Tan M., Zhang A. 2013.** MAP65-1a positively regulates H₂O₂ amplification and enhances brassinosteroid-induced antioxidant defence in maize. *Journal of Experimental Botany* 64:3787-3802.

VI. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

VI.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μηχανισμοί μεταγωγής σήματος και οργάνωση του φυτικού κυτταροσκελετού: Ο ρόλος των δραστικών μορφών οξυγόνου

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, ενώσεις όπως τα ιόντα υπεροξειδίου, τις ρίζες υδροξυλίου, το μονήρες οξυγόνο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Οι ROS είναι δραστικές ενώσεις, οι οποίες προκαλούν ιδιαίτερα σοβαρές αλλοιώσεις στα κύτταρα, αλλά συγχρόνως δρουν και ως μόρια εξαιρετικής σημασίας για την ανάπτυξη και τη λειτουργία των φυτικών οργανισμών. Ειδικότερα, έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος και να συμμετέχουν στην αντίληψη ορμονικών ερεθισμάτων και διαφόρων τύπων καταπόνησης, ενώ παράλληλα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε σειρά φυσιολογικών διεργασιών σε κυτταρικό και διακυτταρικό επίπεδο.

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε για πρώτη φορά η συμμετοχή των ROS στους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος, οι οποίοι συμμετέχουν στην οργάνωση του φυτικού κυτταροσκελετού. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της διατάραξης της ομοιόστασης των ROS στην οργάνωση του κυτταροσκελετού νεαρών αρτιβλάστων των φυτών *Triticum turgidum*, *Arabidopsis thaliana* και *Zea mays*. Συγκεκριμένα, αρτίβλαστα των παραπάνω φυτών υπέστησαν την επίδραση των ενώσεων n-acetyl cysteine (NAC), η οποία μειώνει τα επίπεδα των ROS και του dibenziodolium chloride (diphenylene iodonium, DPI), ενός αναστολέα του ενζύμου NADPH-οξειδάση, το οποίο είναι ένα από τα κυριότερα ένζυμα που καταλύουν την παραγωγή των ROS. Για τη μελέτη της επίδρασης των αυξημένων επιπέδων των ROS και την πρόκληση οξειδωτικής καταπόνησης, πραγματοποιήθηκαν επιδράσεις με την κινόνη 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione, MEN) και με H_2O_2 . Το τελευταίο, λόγω της σταθερότητας και της δραστικότητάς του, θεωρείται ότι επιδεικνύει χαρακτηριστικά μορίου μεταγωγής μηνύματος, ενώ διαχέεται εύκολα μέσω του πλασμαλήμματος. Η αποτελεσματικότητα των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να μεταβάλλουν τα επίπεδα των ROS εκτιμήθηκε σε μορφολογικό επίπεδο, με χρώση των επηρεασμένων ιστών με ουσίες, οι οποίες αντιδρώντας με τις ROS φθορίζουν.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε διαιρούμενα κύτταρα ρίζας, στα οποία διεξάγεται εκτεταμένη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού με το σχηματισμό διαδοχικών συστημάτων μικροσωληνίσκων (ΜΣ). Επιπλέον, διερευνήθηκε ο ρόλος των ROS στην οντογένεση των στοματικών συμπλόκων του φυτού *Z. mays*, τα οποία αποτελούν πρότυπο κυτταρικό σύστημα. Κατά την ανάπτυξή τους, κατευθυνόμενα τοπικά επαγωγικά ερεθίσματα, τα οποία εκπέμπονται από τα μητρικά κύτταρα των καταφρακτικών κυττάρων, καθιερώνουν έντονη κυτταρική πολικότητα στα γειτονικά τους κύτταρα, αποτέλεσμα της οποίας είναι η

εκδήλωση ασυμμέτρων κυτταροδιαίρεσεων. Στις διαδικασίες αυτές ο κυτταροσκελετός της σωληνίνης και εκείνος της ακτίνης διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο.

Τα κυριότερα ευρήματα της διατριβής περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω:

1. Οι ROS συμμετέχουν στους μηχανισμούς που ελέγχουν την κυτταροδιαίρεση

Η εφαρμογή μεθόδων ανοσοσήμανσης της σωληνίνης αποκάλυψε ότι, η πειραματική διατάραξη της ομοιόστασης των ROS στα διαιρούμενα κύτταρα της ρίζας των φυτών *T. turgidum* και *A. thaliana*, διαταράσσει ή αναστέλλει την οργάνωση των διαφόρων συστημάτων ΜΣ. Παρόμοιες ατυπίες διαπιστώθηκαν στα κύτταρα της ρίζας των μεταλλαγμάτων *rhd2* του φυτού *Arabidopsis*, τα οποία στερούνται τη δράσης μιας NADPH-οξειδάσης.

Επιπλέον, τα επηρεασμένα κύτταρα καθυστερούν να εισέλθουν σε νέο κύκλο διαίρεσης ή να μεταβούν από τη μια φάση του στην επόμενη. Η καθυστέρηση αυτή οφείλεται, εν μέρει, στη διατάραξη της οργάνωσης και λειτουργίας της μιτωτικής και κυτοκινητικής συσκευής. Η μεταβολή της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει τις περισσότερες διεργασίες της κυτταρικής διαίρεσης, όπως είναι η αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου στο τέλος της πρόφασης, η ανασύστασή του κατά την τελόφαση, η διευθέτηση των χρωμοσωμάτων στο ισημερινό επίπεδο της ατράκτου, ο διαχωρισμός και η μετακίνηση των θυγατρικών ομάδων χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση, αλλά και η δημιουργία της κυτταρικής πλάκας κατά την κυτοκίνηση. Η μελέτη φυτών *Arabidopsis* GUS:Cyclin B1 αποκάλυψε τη μεταβολή του προτύπου έκφρασης του γονιδίου της κυκλίνης B1, μορίου με κομβική σημασία για πολλά σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

Παράλληλα, διαπιστώθηκε για πρώτη φορά ότι οι ROS συμμετέχουν στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στον καθορισμό του επιπέδου κυτταροδιαίρεσης, επηρεάζοντας, μεταξύ άλλων, την οργάνωση της προ-προφασικής ζώνης ΜΣ.

2. Η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS προκαλεί την οργάνωση άτυπων πολυμερών σωληνίνης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η μείωση αλλά και η αύξηση των επιπέδων των ROS διαταράσσει την οργάνωση της μιτωτικής και κυτοκινητικής συσκευής. Η μελέτη διαιρούμενων επηρεασμένων κυττάρων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης αποκάλυψε την παρουσία σε αυτά σωληνοειδών δομών με διάμετρο μεγαλύτερη από εκείνη των ΜΣ. Οι δομές αυτές σχηματίζονται μετά από επίδραση με NAC, DPI και H_2O_2 . Η εντόπιση της σωληνίνης με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού σε συνδυασμό με μελέτη με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, έδειξε ότι αυτές περιέχουν ή αποτελούνται από σωληνίνη και αντιστοιχούν σε μακροσωληνίσκους. Οι σχηματισμοί αυτοί αντιπροσωπεύουν κυλινδρικά πολυμερή σωληνίνης, με διάμετρο μεγαλύτερη εκείνης των ΜΣ. Μετά την επίδραση με MEN δεν

δημιουργούνται μακροσωληνίσκοι, αλλά διαπιστώθηκε η συνύπαρξη ΜΣ με παρακρυστάλλους σωληνίνης, δηλαδή παρακρυσταλλικές δομές σωληνίνης. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι μακροσωληνίσκοι σχηματίζονται και στα μεταλλάγματα *rhb2* *A. thaliana*. Επομένως, η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS προκαλεί, αφενός μεν την καταστροφή των ΜΣ, αφετέρου δε τη δημιουργία ανθεκτικών άτυπων πολυμερών σωληνίνης. Το φαινόμενο αυτό επιβεβαιώθηκε και *in vivo* σε επηρεασμένα αρτίβλαστα μετασχηματισμένων φυτών *Arabidopsis*, που εκφράζουν ένα από τα γονίδια της σωληνίνης, το οποίο έχει συντηχθεί με εκείνο της φθορίζουσας πράσινης πρωτεΐνης (GFP).

3. Μηχανισμοί οργάνωσης των άτυπων πολυμερών σωληνίνης

Με τη βοήθεια μεθόδων ανοσοεντόπισης διαπιστώθηκε ότι η MAP65-1 συνεντοπίζεται με τα άτυπα πολυμερή σωληνίνης που σχηματίζονται στα επηρεασμένα κύτταρα, γεγονός που υπονοεί την εμπλοκή της στη οργάνωσή τους. Η ανοσοεντόπιση σε συνδυασμό με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έδειξε ότι τα επίπεδα της α -σωληνίνης μεταβάλλονται στα επηρεασμένα αρτίβλαστα, ενώ διαφοροποιείται και το πρότυπο των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της. Η ακετυλιωμένη μορφή της α -σωληνίνης, αν και απουσιάζει από τις φυσιολογικές ρίζες, εμφανίζεται σε εκείνα των επηρεασμένων ριζών, ενώ συγχρόνως μεταβάλλονται στις επηρεασμένες ρίζες και τα επίπεδα της τυροσινιωμένης α -σωληνίνης.

Η χρήση του εξειδικευμένου αναστολέα LY294002, ο οποίος αναστέλλει την καταλυτική δραστηριότητα της PI3K και μειώνει τα επίπεδα των ROS στο ακρόρριζο, διαταράσσει την οργάνωση του κυτταροσκελετού της σωληνίνης και οδηγεί στη δημιουργία άτυπων πολυμερών. Τα δεδομένα μας δείχνουν επίσης ότι μία πρωτεϊνική κινάση 46 kDa, όμοια της p38-MAPK των θηλαστικών, συμμετέχει στους μηχανισμούς αντίληψης της μεταβολής των επιπέδων των ROS και σε εκείνους που δρομολογούν τις αλλαγές στον κυτταροσκελετό της σωληνίνης. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων της phospho-p46 MAPK, μετά από επίδραση με ουσίες που μειώνουν τα επίπεδα των ROS, αλλά και μετά από επαγωγή οξειδωτικής καταπόνησης. Επιπλέον, τα *rhb2* αρτίβλαστα του φυτού *A. thaliana* διαθέτουν υψηλά επίπεδα της ενεργοποιημένης p46-MAPK. Παράλληλα, η επίδραση αρτιβλάστων με τον αναστολέα της p38-MAPK SB203580 αναστέλλει την καταστροφή των ΜΣ, αλλά και την εμφάνιση άτυπων πολυμερών σωληνίνης. Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS προκαλεί την ενεργοποίηση της p46-MAPK, η οποία ακολουθείται από καταστροφή των ΜΣ, αλλαγή του προτύπου των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της σωληνίνης και τελικά από το σχηματισμό άτυπων πολυμερών σωληνίνης, με τη συμμετοχή της πρωτεΐνης MAP65-1.

4. Οι ROS συμμετέχουν στους μηχανισμούς που επάγουν την καθιέρωση κυτταρικής πόλωσης και την εκδήλωση ασύμμετρων κυτταροδιαίρεσεων

Διερευνήθηκε η συμμετοχή των ROS στη μεταγωγή των μορφογενετικών ερεθισμάτων τα οποία οδηγούν στη δημιουργία των παραστοματικών κυττάρων στα στοματικά σύμπλοκα του φυτού *Z. mays*. Η μελέτη της κατανομής των ROS στο αναπτυσσόμενο πρωτόδερμα έδειξε ότι αυτές «συσσωρεύονται» στη θέση επαφής του πολωμένου μητρικού κυττάρου των παραστοματικών κυττάρων με το μητρικό κύτταρο των καταφρακτικών κυττάρων. Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις των επιδράσεων με DPI, NAC, MEN, H₂O₂ και LY294002 στην ανάπτυξη των στοματικών συμπλόκων. Σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από εκείνη της επίδρασης με H₂O₂, αναστέλλεται η καθιέρωση πόλωσης στα μητρικά κύτταρα των παραστοματικών και η ασύμμετρη διαίρεσή τους, η οποία οδηγεί στη δημιουργία παραστοματικών κυττάρων. Ως αποτέλεσμα, μεγάλος αριθμός στοματικών συμπλόκων στερείται παραστοματικών κυττάρων. Αντίθετα, στην περίπτωση επίδρασης με H₂O₂ η εγκαθίδρυση κυτταρικής πολικότητας δεν αναστέλλεται και τα παραστοματικά κύτταρα δημιουργούνται κανονικά. Επιπλέον, σχηματίζονται και υπεράριθμα παραστοματικά κύτταρα, από την ασύμμετρη διαίρεση των ενδιάμεσων κυττάρων της στοματικής σειράς.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα της παρούσας διατριβής αποκαλύπτουν ότι τα φυτικά κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ρύθμισης των επιπέδων των ROS ώστε, όχι μόνο να αποφεύγουν τις οξειδωτικές βλάβες, αλλά να τις χρησιμοποιούν ως μόρια μεταγωγής μηνύματος. Διαπιστώθηκε, για πρώτη φορά, ότι η διατάραξη της ομοιόστασης των ROS επηρεάζει σημαντικά την οργάνωση των διαφόρων συστημάτων ΜΣ και γενικότερα τον κυτταρικό κύκλο των αγγειοσπέρμων φυτών. Τα δεδομένα δείχνουν, επίσης, ότι οι ROS συμμετέχουν στον καθορισμό του επιπέδου διαίρεσης του φυτικού κυττάρου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι πρωτεϊνικές κινάσες, MAP πρωτεΐνες και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της σωληνίνης συμμετέχουν στους μηχανισμούς, με τους οποίους τα κύτταρα αντιλαμβάνονται τις αλλαγές των επιπέδων των ROS και αποκρίνονται επάγοντας την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των ΜΣ. Τέλος, διαπιστώθηκε για πρώτη φορά ότι η παραγωγή ROS, η οποία ελέγχεται αυστηρά στο χώρο και στο χρόνο, συμμετέχει στην αλληλουχία των γεγονότων, τα οποία επάγουν την κυτταρική πόλωση και την επακόλουθη ασύμμετρη κυτταροδιαίρεση που οδηγεί στη δημιουργία των παραστοματικών κυττάρων των στοματικών συμπλόκων της οικογένειας Poaceae.

VI.2 SUMMARY

Mechanisms of signal transduction and organization of the plant cytoskeleton: The role of reactive oxygen species

Reactive oxygen species collectively comprise a group of radical derivatives of oxygen, including superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$) and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), or non radicals such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). They are extremely reactive molecules capable of inducing severe damages in cellular components. However, due to their unique chemical features, ROS have evolved as essential regulators in various biological processes at cellular and intercellular level.

In the present study, ROS implication in the signal transduction mechanisms participating in the organization of the plant cytoskeleton was examined. Thus, the effects of ROS disturbance in the organization of the plant cytoskeleton were monitored in the angiosperms *Triticum turgidum*, *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays*. In particular, young seedlings were treated with n-acetyl cysteine (NAC), a ROS scavenger and dibenziodolium chloride (diphenylene iodonium, DPI), an inhibitor of NADPH oxidase, which is one of the main ROS-producing enzymes. Elevated ROS levels were created using 2-Methyl-1,4-naphthoquinone (menadione, MEN) and H_2O_2 . The latter, is considered as an important signaling molecule due to its stability and reactive capability. Besides, it can be freely diffused across biological membranes. In order to ensure their effectiveness, treatments with the various substances were followed by specific vital stains.

In the present work, dividing root cell types were mainly studied, considering the extensive cytoskeleton reorganization occurring in them. Besides, ROS implication in the formation of stomatal complexes in *Z. mays* leaves was investigated. The stomatal complexes of Poaceae are important model cell systems. During their development, intercellular signals emanating from the guard cell mother cells stimulate protoplast polarization in their lateral neighboring cells, which lead to the asymmetrical divisions that generate the subsidiary cells. In these processes, the cytoskeleton plays key roles.

Major findings of the present thesis are summarized as follows:

1. ROS homeostasis is critical for plant cell division

Tubulin immunolabeling revealed that the disturbance of ROS homeostasis interferes with the organization of microtubule (MT) arrays in the dividing root cells of *T. turgidum* and *A. thaliana*. Similar effects were observed in root cells of *rhb2 A. thaliana* seedlings. These mutant plants lack one of the ten *A. thaliana* NADPH oxidases.

Treatments delay the entry of cells into mitosis, as well as, their transition through the successive cell division stages. Using an *Arabidopsis* GUS:Cyclin B1 marker line it was found that ROS disturbance interferes with the expression pattern of Cyclin B1, which is

implicated in several cell cycle control checkpoints. Besides, several cell division processes were affected. Prometaphase disintegration and telophase reconstitution of the nuclear envelope, chromosome alignment on the equatorial plane of the mitotic spindle, segregation and anaphase movement of the daughter chromosome groups, as well as, the phragmoplast/cell plate system assembly and development were disturbed or inhibited. In addition, ROS seems to be involved in the mechanisms directing pre-prophase band assembly and cell division plane determination.

2. The disturbance of ROS homeostasis induce the assembly of atypical tubulin polymers

Experimentally-induced low or elevated ROS levels disturb the organization of mitotic and cytokinetic apparatus. Transmission electron microscopy examination of treated cells revealed the presence of tubular structures exhibiting larger diameter than MTs, so called macrotubules. Macrotubules were assembled in root cells treated with DPI, NAC and H₂O₂. Tubulin immunogold labeling confirmed that these structures contained or consisted of tubulin. On the contrary, MEN treatment resulted in the formation of tubulin paracrystals. It is worth noting that macrotubules were also found in *rhd2* plants. These data, collectively suggest that ROS disturbance induces MT disappearance and promotes the assembly of resistant atypical tubulin polymers. The latter was confirmed *in vivo* using *Arabidopsis* marker line seedlings expressing GFP-TUB.

3. Mechanisms of atypical tubulin polymer assembly

Our data also revealed the co-localization of MAP65-1 with the atypical polymers, implying that this protein is involved in their assembly. Altered levels of total α -tubulin and modified pattern of post-translational α -tubulin modifications in treated cells were demonstrated by immunofluorescence and Western immunoblotting techniques. Unlike control roots, which lack acetylated tubulin, the treated ones contained acetylated α -tubulin. Besides, the levels of tyrosinated α -tubulin were decreased in treated roots.

Inhibition of PI3K using the specific inhibitor LY294002 caused a considerable decrease in ROS levels. Simultaneously, the organization of the tubulin cytoskeleton was deteriorated and atypical tubulin polymers were found in treated root cells.

Our data suggest that alterations in ROS levels directly interfere with the phosphorylation state of a p38-like MAPK. The activation of this protein drives the assembly of the atypical tubulin polymers. Both oxidative stress generators and chemicals inducing ROS scavenging or decreasing ROS production resulted in the accumulation of a phospho-p46 protein similar to p38-MAPK. Importantly, the *rhd2 A. thaliana* mutants exhibited a remarkable increase in levels of phospho-p46. The presence of the p38-MAPK inhibitor SB203580 attenuated the response to ROS disturbance, prevented microtubule disappearance

and resulted in a dramatic decrease in the number of atypical tubulin polymers. Collectively, these results suggest, for the first time in plants, that p46 functions as a putative sensor of cellular redox state, the activation of which initiates downstream signalling events leading to microtubule disruption and subsequently to the assembly of atypical tubulin polymers. Microtubular responses to redox imbalance include alterations in tubulin post-translational modifications and seem to be mediated by MAPs like MAP65-1.

4. ROS mediate the induction of polarization and asymmetrical division generating the subsidiary cells in stomatal complexes of *Z. mays*

ROS involvement in the induction of stimuli that direct subsidiary cell formation was investigated. ROS were preferentially accumulated at the cell wall shared by the guard cell mother cell and the polarized subsidiary cell mother cell, as well as, at the cortical cytoplasm of the latter cell. Afterwards, young seedlings of *Z. mays* were treated with LY294002, DPI, NAC, MEN and H₂O₂. In leaves treated with LY294002, DPI, NAC, MEN the establishment of subsidiary cell mother cell polarity and its subsequent asymmetric division were attenuated. However, H₂O₂ promoted subsidiary cell generation. It is interesting that this treatment also induced asymmetrical divisions in the intervening cells of the stomatal rows forming supernumerary subsidiary cells.

Collectively, the data presented in this thesis confirm that plants are able to adjust ROS levels, managing not only to avoid oxidative damage but also to use ROS as signal molecules. It was found, for the first time that ROS interfere with the organization of tubulin cytoskeleton and the progress of plant cell division. Moreover, our results, suggest that ROS, somehow, participate in the establishment of the future division plane. Sensing of ROS levels and the subsequent reorganization of the tubulin cytoskeleton, including post-translational modifications, is accomplished by protein kinases and MAPs. In addition, the spatially and temporally controlled ROS production is involved in the mechanism that induces cell polarization and asymmetrical division generating the subsidiary cells in stomatal complexes of Poaceae.

VII. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

VII.1 ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. Livanos P., Galatis B., Quader H., Apostolakos P. 2012. Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces atypical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*. *Cytoskeleton* 69:1-21.
2. Livanos P., Apostolakos P., Galatis B. 2012. Plant cell division: ROS homeostasis is required. *Plant Signaling & Behavior* 7:771-778.
3. Livanos P., Galatis B., Gaitanaki C., Apostolakos P. 2014. Phosphorylation of a p38-like MAPK is involved in sensing cellular redox state and drives atypical tubulin polymer assembly in angiosperms. *Plant, Cell & Environment* 37:1130-1143.
4. Livanos P., Galatis B., Apostolakos P. 2014. The interplay between ROS and tubulin cytoskeleton in plants. *Plant Signaling & Behavior* 9:e28069.
5. Livanos P., Giannoutsou E., Apostolakos P., Galatis B. 2015. Auxin as an inducer of asymmetrical division generating the subsidiary cells in stomatal complexes of *Zea mays*. *Plant Signaling & Behavior* 10:e984531.

VII.2 ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ



Disturbance of Reactive Oxygen Species Homeostasis Induces Atypical Tubulin Polymer Formation and Affects Mitosis in Root-Tip Cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*

Pantelis Livanos,¹ Basil Galatis,^{1*} Hartmut Quader,² and Panagiotis Apostolakos¹

¹Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Athens, Greece

²Division of Cell Biology/Phycology, Biocenter Klein Flottbek, Department of Biology, University of Hamburg, Hamburg, Germany

Received 18 March 2011; Revised 26 September 2011; Accepted 29 September 2011

Monitoring Editor: Joseph Sanger

In this study, the effects of disturbance of the reactive oxygen species (ROS) homeostasis on the organization of tubulin cytoskeleton in interphase and mitotic root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana* were investigated. Reduced ROS levels were obtained by treatment with diphenylene iodonium (DPI) and *N*-acetyl-cysteine, whereas menadione was applied to achieve ROS overproduction. Both increased and low ROS levels induced: (a) Macrotubule formation in cells with low ROS levels and tubulin paracrystals under oxidative stress. The protein MAP65-1 was detected in treated cells, exhibiting a conformation comparable to that of the atypical tubulin polymers. (b) Disappearance of microtubules (MTs). (c) Inhibition of preprophase band formation. (d) Delay of the nuclear envelope breakdown at prometaphase. (e) Prevention of perinuclear tubulin polymer assembly in prophase cells. (f) Loss of bipolarity of prophase, metaphase and anaphase spindles. Interestingly, examination of the *A. thaliana rhd2/At* respiratory burst oxidase homolog C (*rbhc*) NADPH oxidase mutant, lacking RHD2/AtRBOHC, gave comparable results. Similarly to DPI, the decreased ROS levels in *rhd2* root-tip cells, interfered with MT organization and induced macrotubule assembly. These data indicate, for first time in plants, that ROS are definitely implicated in: (a) mechanisms controlling the assembly/disassembly of interphase, preprophase and mitotic MT systems and (b) mitotic spindle function. The probable mechanisms, by which ROS affect these processes, are discussed. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

Key Words: macrotubules, microtubules, tubulin paracrystals, NADPH oxidase, oxidative stress, *rhd2* mutant

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

*Address correspondence to: Basil Galatis, Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Athens 15784, Greece. E-mail: bgalatis@biol.uoa.gr

Published online 4 October 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are toxic byproducts of aerobic metabolism, which are produced under various stimuli. The cells have developed scavenging mechanisms to overcome their toxicity [Bailey-Serres and Mittler, 2006]. However, there is now convincing evidence that ROS function as signaling molecules. They behave as key regulators of plant growth [Liszkay et al., 2004; Mittler et al., 2004; Gapper and Dolan, 2006], triggering signal transduction. Among others, they are involved in hormone signaling pathways [Kwak et al., 2006] and influence mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades [Pitzschke and Hirt, 2006], mediate root hair growth [Carol and Dolan, 2006] and calcium channel activation [Foreman et al., 2003], environmental stresses [Miller et al., 2010], and F-actin dynamics [Lee and Yang, 2008].

Recent data revealed that the signaling pathways activated by phospholipase C or D (PLC or PLD) are involved in tubulin polymer organization [Komis et al., 2006, 2008; Andreeva et al., 2010]. Besides, it is known that: (a) the phosphatidic acid produced by PLD is implicated in ROS generation [Sang et al., 2001], (b) ROS production in some cases is PLC depended [Coelho et al., 2008] and (c) PLD activation in stress responses can be ROS mediated [Zhang et al., 2003]. Although, evidence accumulated so far suggests the existence of cross-talk between ROS and phospholipases, there is no information concerning ROS involvement in microtubule (MT) organization, in plant cells.

The present work attempts to investigate, for the first time in plants, whether ROS signaling pathways are implicated in MT organization in higher plant cells. In this direction, the effects of chemical substances, influencing ROS production, on the assembly and organization of MT arrays in mitotic root-tip cells of the monocotyledon

Triticum turgidum and the dicotyledon *Arabidopsis thaliana*, were examined in detail. In particular, ROS implication in the above processes was investigated by treatment of root-tip cells with: (a) diphenylene iodonium (DPI), an inhibitor of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase [Bolwell and Wojtaszek, 1997], causing decrease in ROS production [Foreman et al., 2003], (b) *N*-acetyl-cysteine (NAC), a ROS scavenger [Joo et al., 2001], and (c) menadione (MEN), a substance that induces ROS generation [Reichheld et al., 1999].

In addition, MT organization in interphase and mitotic root-tip cells of the *A. thaliana* *rhd2* (*root hair defective 2*) mutants was studied. The *rhd2* mutants lack RHD2/AtRBOHC (RHD2/*A. thaliana* respiratory burst oxidase homolog C) resulting in reduction of ROS derived by NADPH oxidase [Takeda et al., 2008]. RBOHs are plasmalemma enzymes that supply ROS and exhibit diverse transcription patterns [Sagi and Fluhr, 2006]. The RHD2/AtRBOHC is differentially expressed in the various root cell types and is critical for root hair development [Foreman et al., 2003].

Materials and Methods

Plant Material

Caryopses of *T. turgidum* L. var Athos were germinated on moist filter papers in Petri dishes, in darkness for 48–72 h, at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Wild type ecotype Columbia and *rhd2* *A. thaliana* L. seeds, after imbibition in distilled water for 48 h, at 4°C , were placed in Petri dishes as above, or in Petri dishes containing MS [Murashige and Skoog, 1962] medium in agar and germinated in darkness or light (16 h photoperiod) for 48–72 h, at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ or 18°C respectively. Prior to germination, *A. thaliana* seeds were quickly sterilized with 25% (v/v) HOCl for 4 min and 70% (v/v) ethanol for 2 min followed by several washes with sterilized water. The *rhd2* *A. thaliana* seeds, *rhd2-5* and *rhd2-6* mutants, were generously gifted by Prof. Liam Dolan (John Innes Centre, Norwich, UK). Both of them exhibited short root hair phenotype [Takeda et al., 2008].

Treatments

Two to three days old *T. turgidum* and *A. thaliana* seedlings were treated with: (1) 25 or 50 μM DPI (Sigma, St Louis, MO) for 30 min–4 h. DPI inhibits NADPH oxidase and other flavin containing enzymes [Bolwell and Wojtaszek, 1997] and results in reduced ROS production [Foreman et al., 2003]. (2) 250 or 500 μM NAC (Sigma) for 30 min–4 h. NAC is a scavenger of free radicals, since it interacts with ROS [Auroma et al., 1989; Yao et al., 2002]. (3) 25 or 50 μM MEN (2-methyl-1,4-naphthoquinone; Sigma) for 30 min–4 h. MEN cannot conjugate with glutathione or other compounds and causes ROS

generation creating oxidative stress in the cells [Halliwell and Gutteridge, 1989; Reichheld et al., 1999]. Each experiment was repeated for more than three times.

The concentrations of each inhibitor applied in this study were selected after a series of experiments with different concentrations, taking into consideration those previously applied in plant cells by other authors [Reichheld et al., 1999, Yao et al., 2002, Foreman et al., 2003]. The essential criteria for selection were the ability of plants to recover rapidly and to give consistent effects. In fact, the concentrations finally applied were the same or lower than those used in previous works. In order to find out whether the effects of the disturbance of the ROS homeostasis on MT cytoskeleton are time depended, 2–3 days old *T. turgidum* seedlings were treated with the selected concentrations in different incubation times.

The above substances were applied as water solutions, prepared from stock solutions in dimethyl sulfoxide. The final dimethyl sulfoxide concentration in drug solutions was less than 0.5% (v/v). Roots were immersed in treatment solutions, or alternatively seedlings were placed in cotton moistened with them. Treatments were carried out in darkness, at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Roots or seedlings, treated with distilled water containing 0.5% (v/v) dimethyl sulfoxide, were used as controls. To find out whether the dimethyl sulfoxide concentration used affects MT cytoskeleton, control root-tips were processed for tubulin immunolabeling as it is described below. It was found that MT organization in the control root-tips was identical to that of the untreated root-tips.

To check whether treatment with DPI, NAC or MEN cause necrotic symptoms in the root-tip, *T. turgidum* treated roots were stained with a mixture of propidium iodide/fluorescein diacetate (both from Sigma) as previously described [Komis et al., 2006, 2008]. Examination of stained root-tips using confocal laser scanning microscope (CLSM) or epifluorescence microscope allows the distinction between living and dead cells. Living cells exhibit a bright green cytoplasmic fluorescence, while the dead ones emit a red one. Besides, some *T. turgidum* seedlings were placed, after treatment, in cotton moistened with distilled water for 2–4 h in order to ascertain whether they are able to recover.

Immunofluorescence Microscopy

Immunofluorescence in Root-Tip Squashes

For tubulin and endoplasmic reticulum immunolocalization *T. turgidum* root-tips and *A. thaliana* whole seedlings were fixed in 8% (w/v) paraformaldehyde in PEM buffer [50 mM piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid, 5 mM ethyleneglycol-*O,O'*-bis(2-aminoethyl)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, 5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$] pH 6.8, for 45 min. After washing with PEM for three times for 15 min, the cell walls of *T. turgidum* root-tips were digested with 2% (w/v) cellulase (Onozuka, Honshua, Tokyo, Japan), 1% (w/v)

macerozyme (Onozuka) and 1% (w/v) driselase (Sigma) in PEM pH 5.6, for 45 min. In intact *A. thaliana* seedlings or isolated root-tips, cell wall digestion was achieved by 0.5% (w/v) cellulase and 1% (w/v) macerozyme in PEM pH 5.6, for 30 min. Following rinsing with PEM, the root-tips were squashed on coverslips coated with 1 mg/mL poly-L-lysine (Sigma) and left to allow the separated cells to dry. *T. turgidum* cells were then permeabilized with 3% (v/v) Triton X-100 and 5% (v/v) dimethyl sulfoxide plus 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA; Fluka, Buchs, Switzerland) in phosphate buffered saline (PBS) for 30 min. Permeabilization of *A. thaliana* cells was performed using 0.5% (v/v) Triton X-100 and 1% (v/v) dimethyl sulfoxide. After washing with PBS, the cells were incubated overnight with anti- α -tubulin, clone YOL 1/34 (Serotec, Oxford, UK), DM1A (Sigma) or 6-11B-1 anti-acetylated tubulin (Sigma) monoclonal antibodies diluted 1:40 in PBS containing 2% (w/v) BSA. Following rinsing with PBS, the cells were incubated for 1 h at 37°C with anti-rat or anti-mouse fluorescein isothiocyanate conjugated IgGs (Sigma), diluted 1:40 in PBS containing 2% (w/v) BSA. Washing with PBS, followed by DNA staining with 10 μ g/mL Hoechst 33258 (Sigma) or 2.5 μ g/mL propidium iodide (Sigma). Then the cells were mounted in an anti-fade solution containing *p*-phenyl-diamine (Sigma) or in Dabco mounting medium (Sigma). The cells were examined with either a Leica TCS 4D CLSM (Leica Microsystems, Bensheim, Germany) or a Zeiss Axioplan microscope equipped with an ultraviolet source, proper filters and a Zeiss Axiocam MRc5 digital camera.

Endoplasmic reticulum immunolocalization in *T. turgidum* root-tip cells performed with the 2E7 monoclonal antibody that recognizes residential luminal endoplasmic reticulum proteins, containing the C-terminal HDEL sequences. This antibody is a specific marker of endoplasmic reticulum and nuclear envelope in plant cells [Napier et al., 1992] and has been successively used previously [Giannoutsou et al., 2011 and references therein]. For endoplasmic reticulum immunolocalization the procedure described by Zachariadis et al. [2001] was followed. Briefly, the root-tips were fixed with 8% (w/v) paraformaldehyde in PEM for 45 min, the cell walls were digested with 2% (w/v) cellulase, 1% (w/v) macerozyme, 1% (w/v) driselase diluted in PEM pH 5.6, for 1 h, squashed in coverslips and extracted with Triton X-100 and dimethyl sulfoxide in PBS. Finally, the material was incubated at first with 2E7 antibody (Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA) overnight and secondly with anti-mouse fluorescein isothiocyanate conjugated IgGs for 2 h. DNA staining, using 10 μ g/mL Hoechst 33258 followed.

Whole Mount Immunofluorescence

Control and treated *A. thaliana* seedlings were processed for tubulin and MAP65-1 immunolabeling. They were

fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde in PEM for 1 h containing 0.05% (v/v) Triton X-100. Fixation was followed by incubation with 1 mg/mL NaBH₄ in PEM and the cell wall digestion was achieved using 1% (w/v) macerozyme in PEM pH 5.6 for 30 min. Afterward, the seedlings were treated with -20°C methanol for 10 min and subsequently with PBS containing 0.05% (v/v) Triton X-100 and 0.1% (v/v) dimethyl sulfoxide for 1 h. Incubation with the primary antibodies was performed overnight at room temperature. The rat anti-tubulin YOL, clone 1/34 and the rabbit anti-MAP65-1 (kindly offered by Dr. A. Smertenko) antibodies were diluted 1:100 and 1:200 respectively in PBS containing 1% (w/v) BSA. The seedlings were then incubated with anti-rat and anti-rabbit (Sigma) fluorescein isothiocyanate conjugated IgGs for 2 h at 37°C. Then intact seedlings were mounted in the anti-fade solution and were visualized with a Leica TCS SP5II CLSM or with the Zeiss Axioplan microscope.

ROS Staining

ROS were detected in living control *T. turgidum* and *A. thaliana* seedlings by incubation with 25 μ M 2,7-dichlorofluorescein diacetate (Sigma) for 30 min and then washed in distilled water [Sandalo et al., 2008]. 2,7-Dichlorofluorescein is commonly used as a marker of oxidants and is thought to exhibit selectivity for H₂O₂ over the free radicals [Sandalo et al., 2008]. The staining solution prepared from a 25 mM stock solution in dimethyl sulfoxide. The roots were examined with CLSM or an epifluorescence microscope. Seedlings treated with DPI, NAC and MEN were transferred, 30 min before the end of the treatment, in treating solutions containing 25 μ M 2,7-dichlorofluorescein diacetate. Then, they were processed as the control ones. After washing, the photographs of each sample were taken at the same exposure time. The photographing process was completed within 2–3 min to avoid necrotic symptoms caused by the continuous ultraviolet radiation. The differences in the relative root fluorescence intensity between control and treated seedlings were assessed in digital images of fluorescently labeled roots, as has been previously described [Komis et al., 2002], using an algorithm designed for Image Color Gauge version 0.1 (N. Apostolakis, Laboratoire d'Astrophysique de Marseille, France).

Transmission Electron Microscopy—Immunogold Staining

Control and treated *T. turgidum* root-tips and *A. thaliana* whole seedlings were processed for transmission electron microscopy (TEM) examination according to standard protocols. The samples were double-fixed with 3% (v/v) glutaraldehyde and 1% (w/v) OsO₄ in sodium cacodylate buffer, dehydrated in an acetone series, infiltrated in a graded series of Spurr's resin (Serva, Heidelberg,

Germany) in propylene oxide and embedded in small plastic dishes filled with pure Spurr's resin. Thin sections prepared with an LKB ultratome III (LKB Produkter AB, Stockholm-Bromma 1, Sweden), were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Philips 300 TEM.

For tubulin immunogold localization treated *T. turgidum* and *A. thaliana* root-tips were fixed in 2% (w/v) paraformaldehyde and 0.1% (v/v) glutaraldehyde in PEM at 4°C, for 1.5 h. Then, the specimens were washed in the same buffer and dehydrated in a graded ethanol series diluted in distilled water and in absolute ethanol three times for 30 min (each step) at 0°C. The material was postfixed overnight with 0.25% (w/v) OsO₄ added in the 30% ethanol step. Afterward, the root-tips were infiltrated with London Resin (LR) White acrylic resin (LRW, Sigma), diluted in ethanol, in 10% steps to 100% (1 h each), at 4°C and finally with pure resin for 16 h. The samples were embedded in gelatin capsules filled with LRW resin and polymerized at 60°C, for 48 h.

Then, thin sections mounted on gold grids were treated with PBS for 30 min, blocked with 5% (w/v) BSA in PBS for 3 h and incubated firstly with the rat anti- α -tubulin, clone YOL 1/34 monoclonal antibody, diluted 1:40 in PBS for 4 h at 37°C and finally overnight with 10 nm monodisperse colloidal gold conjugated anti-rat IgGs (Sigma), diluted 1:10 in PBS. The sections were counterstained with 2% (w/v) aqueous uranyl acetate and examined with the Philips 300 TEM.

Tubulin Polymer Diameter Measurement on TEM Micrographs

Tubulin polymer diameter was measured on digitalized TEM micrographs, using the CorelDraw Graphics Suite X4 (Corel Suite, Pantone) dimension tool calibrated with a grated replica grid [Komis et al., 2002, 2008].

Results

ROS Detection in Control and Treated Roots

Stereoscope examination of *A. thaliana* mutant seedlings confirmed that *rhd2-5* and *rhd2-6* roots exhibit short root hairs compared to those of *A. thaliana* wild type [Supporting Information, Fig. 1; see also Takeda et al., 2008]. Not only the length, but also the number of the root hairs was reduced in these *rhd2* mutants (Supporting Information, Fig. 1).

Staining of *A. thaliana* wild type roots with 2,7-dichlorofluorescein diacetate revealed that ROS accumulate mainly at the root-tip (Fig. 1a). Root-cap and meristem region displayed the most intense fluorescence. NAC-treatment prevented ROS accumulation in root-tips (Fig. 1c; cf. Fig. 1a), while DPI-treatment led to even greater fluorescence reduction (Fig. 1b; cf. Fig. 1a). Increased

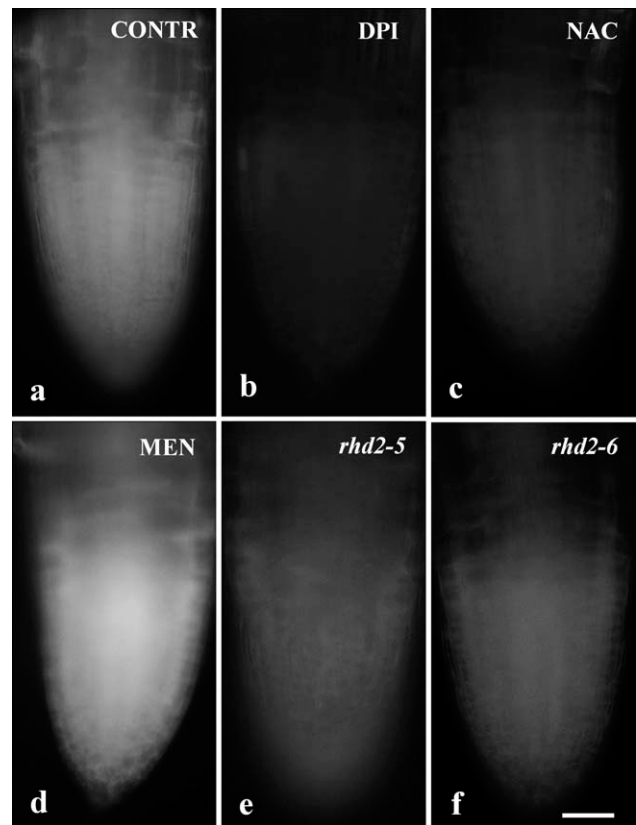


Fig. 1. Control (a), treated (b–d) and *rhd2* (e, f) *A. thaliana* root-tips after 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF) staining. The optical sections in (a–f) pass through rhizodermis. Note the differences in the relative fluorescence. Images were taken at the same exposure time. Treatments: (a, e, f) distilled water, 30 min + 25 μ M DCF, 30 min; (b) 50 μ M DPI, 30 min + 50 μ M DPI plus 25 μ M DCF, 30 min; (c) 500 μ M NAC, 30 min + 500 μ M NAC plus 25 μ M DCF, 30 min; (d) 50 μ M MEN, 30 min + 50 μ M MEN plus 25 μ M DCF, 30 min. Bar for all figures: 25 μ m.

root-tip fluorescence was detected in MEN-treated roots (Fig. 1d; cf. Fig. 1a).

In *rhd2-5* and *rhd2-6* roots, the decrease of ROS accumulation compared to the wild type roots was obvious (Figs. 1e and 1f; cf. Fig. 1a). Besides, the *rhd2-5* root-tips displayed lower ROS levels than those of the *rhd2-6* mutants (Fig. 1e; cf. Fig. 1f). Although fluorescence intensity is higher in *rhd2-6* roots the ROS distribution pattern is almost the same. *A. thaliana* root-tips examined under the same filter did not show any autofluorescence (Supporting Information, Fig. 2; the exposure time of this figure is the same with that of Fig. 1). Supporting Information, Fig. 3 shows the relative ROS fluorescence intensity in control, treated and mutant *A. thaliana* roots shown in Fig. 1. Control root ROS fluorescence intensity was set as 100%. Compared to this percentage, ROS fluorescence intensity in MEN-treated roots was 114%, while in DPI- and NAC-treated roots was 16% and 35% respectively. ROS levels in *rhd2* mutants were 47% for *rhd2-5* and 70% for *rhd2-6* of the control root ROS

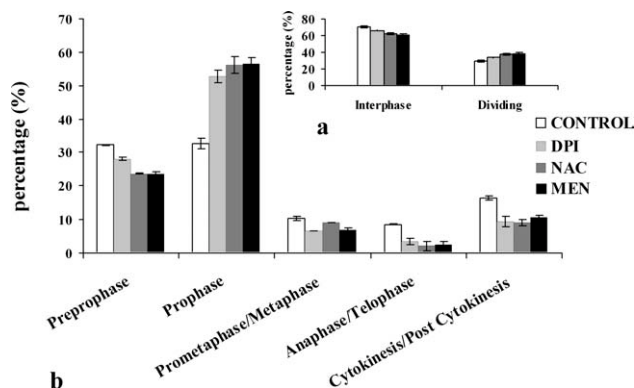


Fig. 2. (a) The frequencies of the interphase and dividing root-tip cells in control and treated root-tips of *T. turgidum*. (b) The frequencies of root-tip cells at different stages of cell division in control and treated root-tips of *T. turgidum* in relation to the total number of dividing cells counted. Treatments: Control distilled water, 1 h; 50 μ M DPI, 1 h; 500 μ M NAC, 1 h; 50 μ M MEN, 1 h.

intensity (Supporting Information, Fig. 3). These data show clearly that treatment with ROS modulators alters significantly ROS levels in *A. thaliana* roots.

ROS levels were also examined in control and treated *T. turgidum* roots and the results were very similar to those of *A. thaliana* roots. CLSM images in Supporting Information, Fig. 4 show portions of 2,7 dichlorofluorescein diacetate stained control, NAC- and MEN-treated *T. turgidum* root-tips. The fluorescence attributed to oxygen species in the control root-tip cells (Supporting Information, Fig. 4a) was higher compared to the NAC-treated root-tip cells (Supporting Information, Fig. 4b). Furthermore, the root-tip cells shown in Supporting Information, Fig. 4c exhibited intense fluorescence implying the elevation of ROS levels after MEN-treatment. In all cases, most of the ROS species detected with 2,7-dichlorofluorescein diacetate were intracellular.

ROS modulators, at the concentrations and the duration of the treatments applied in this study did not cause necrotic symptoms in the treated roots. Supporting Information, Fig. 5 shows treated *T. turgidum* root-tips after fluorescein diacetate and propidium iodide double staining. After the different treatments almost all the root-tip cells remained alive, as they exhibit bright green cytoplasmic fluorescence. The red fluorescence was limited to a few dead cells and to cell walls only.

The Disturbance of ROS Homeostasis in the Root-Tips Affects Cell Cycle Progress

To find out whether ROS participate in cell cycle control, the percentage of each cell division stage was estimated in DPI-, NAC- and MEN-treated *T. turgidum* root-tips. The percentages found were compared to respective percentages obtained from the control root-tips. Only *T. turgidum* cells were counted because the small number of the dividing

cells in *A. thaliana* root-tips did not give statistically significant results. The individual cell cycle stages were determined by chromatin and tubulin polymer organization.

Figure 2a shows the percentage of interphase and dividing root-tip cells in *T. turgidum* control and treated seedlings. 3306 control, 1812 DPI-, 1421 NAC- and 1636 MEN-treated root-tip cells were counted. The results were derived from two individual experiments. Treatment, with the ROS modulators used, increased the percentage of dividing cells (Fig. 2a). The difference between control and treated root-tips was higher in seedlings treated with MEN. These data show that under both high and low ROS levels, cell division and the subsequent exit from it were delayed.

The individual mitotic and cytokinetic stages and the percentages out of the total number of the dividing cells were also calculated in control and treated root-tips (Fig. 2b). The data were obtained from 963 control, 610 DPI-, 537 NAC- and 634 MEN-treated dividing cells. The percentage of treated cells that were at prophase was much higher than that of the prophase cells in control root-tips (Fig. 2b). Therefore, mitosis seems to be mainly arrested at prophase, and that under both high and low ROS levels the dividing treated cells seemed unable to progress from prophase to prometaphase. The small number of cells found in the next cell division stages (Fig. 2b) implies that only few treated cells escaped prophase and that the rest treated dividing cells were also prevented to pass from one stage to another. In particular, considering that in treated root-tips the amount of prometaphase/metaphase cells is higher than that of the anaphase/telophase cells (Fig. 2b) it may be concluded that the metaphase/anaphase transition is also strongly delayed.

To further investigate the accumulation of the cells in prophase, control and treated prophase/prometaphase root-tip cells of *T. turgidum* immunolabeled for HDEL proteins using 2E7 antibody. Control prophase cells showed an intact nuclear envelope (Fig. 3a) that breaks down during prometaphase (Fig. 3b; cf. Fig. 3a). In contrast, in DPI-, NAC- and MEN-treated roots, the prophase and prometaphase nuclei were surrounded by an intact nuclear envelope (Figs. 3c and 3d; cf. Figs. 3a and 3b), a finding indicating that in treated cells the nuclear envelope breakdown was delayed. This was also confirmed by TEM examination. The prometaphase DPI-treated cell shown in Fig. 3e exhibits an intact nuclear envelope and a nucleolus at an advanced disorganization stage, despite the presence of well organized prometaphase chromosomes that appear locally connected to the nuclear envelope (Fig. 3e, e inset).

Altered ROS Levels Affect Tubulin Polymer Organization in Interphase and Mitotic Cells

Interphase Cells

Control *T. turgidum* and *A. thaliana* interphase root-tip cells displayed well organized cortical MT arrays, usually

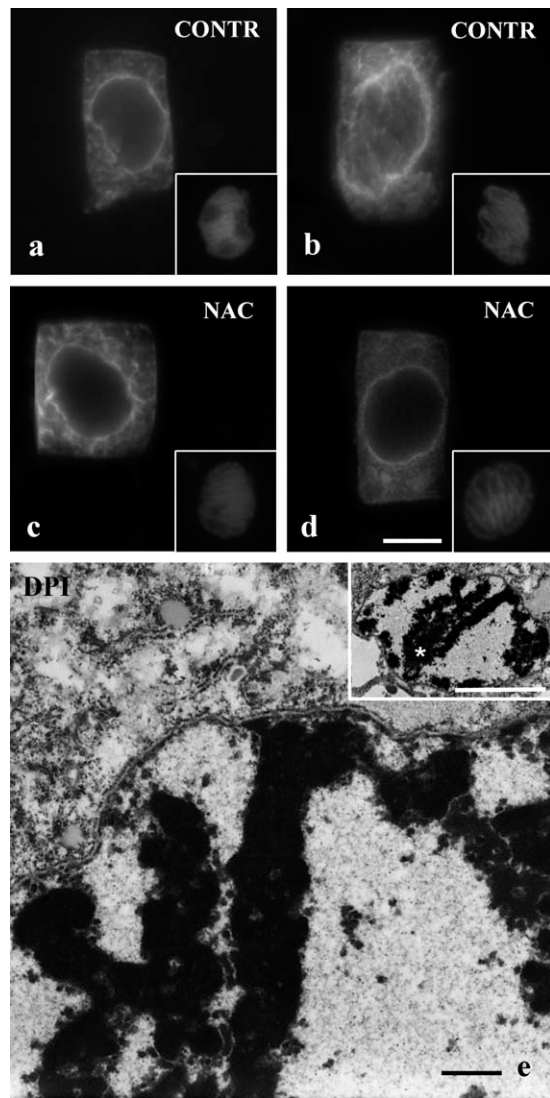


Fig. 3. (a–d) *T. turgidum* control (a, b) and NAC-treated (c, d) prophase (a, c) and prometaphase (b, d) root-tip cells after endoplasmic reticulum and nuclear envelope immunodetection with 2E7 antibody. Insets: The prophase (a, c) and prometaphase (b, d) nuclei after DNA staining with Hoechst 33258. Treatment: (c, d) 500 μ M NAC, 1.5 h. Bar for a–d: 10 μ m. (e) TEM micrograph of a DPI-treated cell showing portion of the nucleus displaying an intact nuclear envelope despite the prometaphase chromosome condensation (see inset). Inset: The prometaphase nucleus. The asterisk marks the nucleolus remnants. Treatment: 50 μ M DPI, 2 h. Bars: (e) 500 nm; (inset) 5 μ m.

aligned transversely to the longitudinal cell axis (Figs. 4a and 4e) and endoplasmic MTs mainly in the perinuclear cytoplasm.

DPI- and NAC-treated interphase cells of both plants lacked typical MT arrays (Figs. 4b, 4c, 4f and 4g; cf. Figs. 4a and 4e). They exhibited in the cortical cytoplasm and in the endoplasm, linear or even circular tubulin strands randomly oriented (Figs. 4b, 4c, 4f and 4g). MEN-treated interphase cells were completely devoid of typical MT systems (Figs. 4d and 4h; cf. Figs. 4a and 4e). In contrast,

these cells displayed rod-like and wavy tubulin structures at various cytoplasmic sites (Figs. 4d and 4h). Often, these atypical tubulin conformations formed networks in the cortical cytoplasm and/or the endoplasm (Fig. 4d). All the above tubulin polymers were observed in root-tip cells of treated seedlings processed for whole mount tubulin immunolabeling. Figures 4i and 4j are CLSM images of *A. thaliana* DPI-treated rhizodermal (Fig. 4i) and cortex (Fig. 4j) cells that present linear or circular tubulin strands. Figure 4k shows rhizodermal cells of an *A. thaliana* MEN-treated root-tip exhibiting atypical tubulin conformations.

The presence of the atypical tubulin polymers was more intense in prolonged treatments with ROS modulators and depended on their concentration. Examination of interphase root-tip cells of *T. turgidum* treated with 25 μ M DPI for 15 min, 30 min, 1 h, 2 h and 4 h (Supporting Information, Figs. 6b–6f) gave the following results: (a) Cortical MT array disorganization was visible from the first 15 min of treatment, while the formation of the linear tubulin strands was initiated (Supporting Information, Fig. 6b; cf. Supporting Information, Fig. 6a). (b) After 30 min of treatment, the linear tubulin strands were proliferated (Supporting Information, Fig. 6c). (c) 1 h of treatment resulted in the assembly of circular tubulin strands, while linear strands still existed (Supporting Information, Fig. 6d). (d) The number of the atypical tubulin polymers was increased after 2 h of treatment (Supporting Information, Fig. 6e). (e) Cells treated for 4 h exhibited a weak tubulin fluorescent signal (Supporting Information, Fig. 6f). It is probably due to the necrotic symptoms that appeared after the 4 h of treatment with 25 μ M DPI (data not shown). Therefore, DPI effects on tubulin cytoskeleton follow a characteristic consistent pattern. Moreover, *T. turgidum* seedlings were treated for 2 h with 10 μ M, 25 μ M, and 50 μ M DPI (Supporting Information, Figs. 6g–6i). The presence of the atypical tubulin polymers was more intense in 25 and 50 μ M DPI-treated cells (Supporting Information, Figs. 6h and 6i; cf. Supporting Information, Fig. 6g). Thus, DPI effects were dose depended.

To find out whether the tubulin of the atypical tubulin polymers is acetylated, *T. turgidum* root-tip cells were processed for immunolabeling using the 6-11B-1 antibody that specifically recognizes acetylated tubulin [Perdiz et al., 2011]. Acetylated tubulin was found only in MEN-treated root-tip cells (Figs. 5b and 5c). MT arrays of untreated cells did not contain acetylated tubulin (Fig. 5a).

Notably, in treated *A. thaliana* root-tip cells the protein MAP65-1 was localized (Figs. 5e–5i). The MAP65-1 conformation in treated cells resembled that of the atypical tubulin polymers. Therefore, it might be suggested that MAP65-1 decorates not only the MT arrays [Fig. 5d; see also Smertenko et al., 2006], but also the atypical tubulin polymers observed in this study (Figs. 5e–5i).

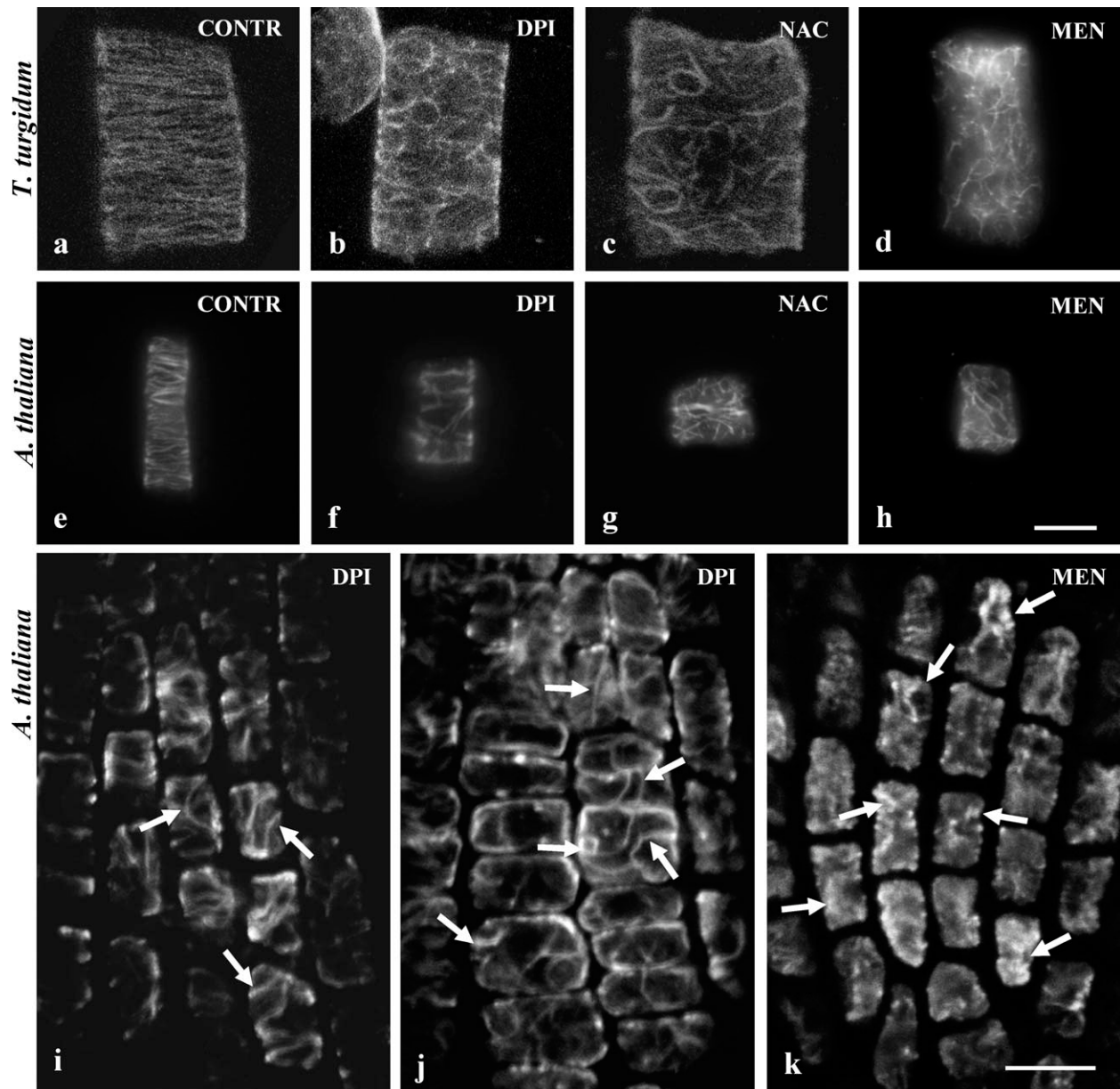


Fig. 4. (a–h) *T. turgidum* (a–d) and *A. thaliana* (e–h) control and treated interphase root-tip cells after tubulin immunolabeling. (a), (b) and (c) are CLSM images resulted from projection of all the optical sections. (a, e) Cortical MTs in control cells. (b, f) DPI-treated cells exhibiting atypical tubulin strands at the cortical cytoplasm. Treatment: 25 μ M DPI, 2 h. (c, g) NAC-treated cells exhibiting linear or circular atypical tubulin strands. Treatment: 500 μ M NAC, 2 h. (d, h) MEN-treated cells showing atypical tubulin conformations that form in (d) a dense network at the cortical cytoplasm. Treatment: 25 μ M MEN, 1 h. Bar for (a–h): 10 μ m. (i–k) CLSM images of rhizodermal (j, k) and cortex cells (i) from DPI- (i, j) and MEN-treated (k) seedlings processed for whole mount tubulin immunofluorescence. The arrows point to atypical tubulin strands or conformations comparable to those observed in squashed root-tip cells in each case. (i) projection of four CLSM optical sections, (j) projection of two CLSM optical sections, (k) projection of seven CLSM optical sections. Treatments (i, j) 25 μ M DPI, 2 h; (k) 25 μ M MEN, 2 h. Bar for (j–k): 10 μ m.

After transfer of treated seedlings in distilled water for at least 2 h, the tubulin cytoskeleton in root-tip cells recovered and typical MT arrays reappeared. Supporting Information, Figs. 6j and 6k illustrate an interphase and a metaphase *T. turgidum* root-tip cell recovered from NAC-treatment exhibiting typical MT arrays (Supporting Information, Fig. 6j; cf. Fig. 4c and Supporting Information, Fig. 6k; cf. Fig. 8k).

Preprophase/Prophase Cells

The dominant MT systems in preprophase/prophase control root-tip cells of *T. turgidum* and *A. thaliana* were the MT preprophase band (MT-PPB) and the prophase MT-spindle. As prophase progressed, the wide immature MT-PPBs of preprophase cells (Figs. 6a and 7a) gradually matured, becoming narrow (Figs. 6b and 7b) and finally disappeared before prometaphase (Figs. 6c, 6d and 7c).

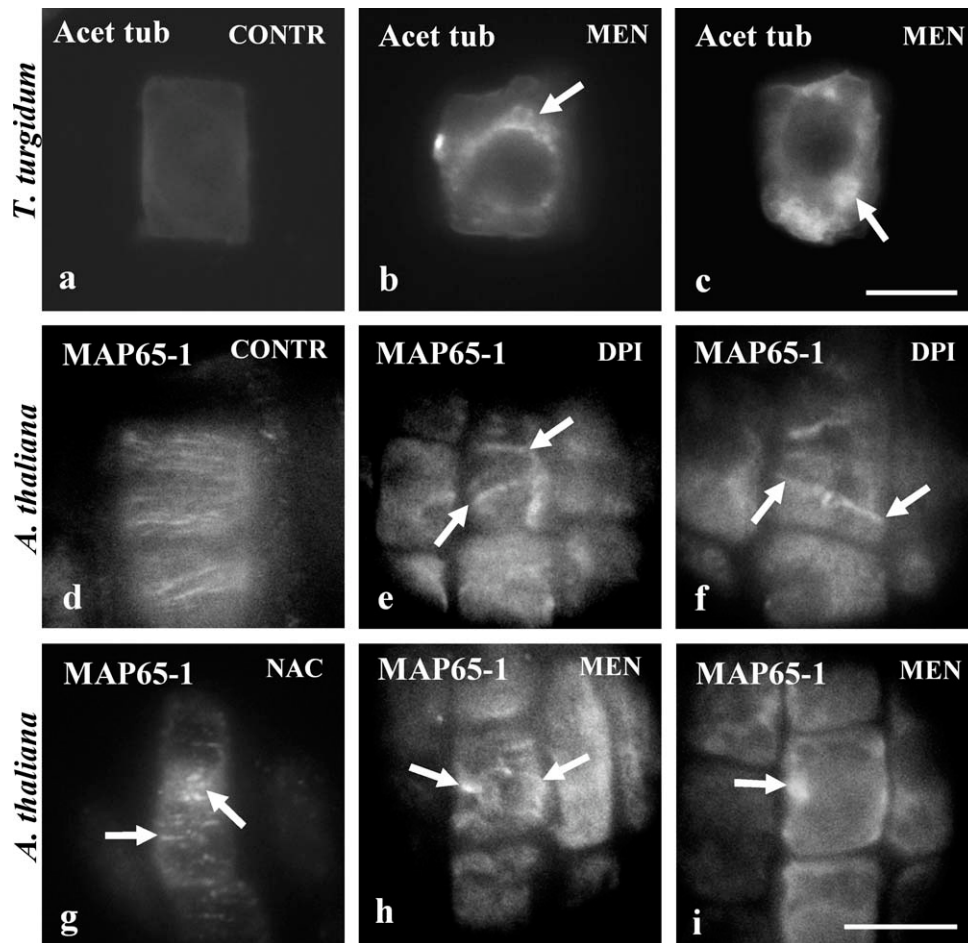


Fig. 5. (a–c) Control (a) and MEN-treated (b, c) *T. turgidum* root-tip cells as they appear after immunolabeling with the 6-11B-1 antibody, that specifically recognizes acetylated tubulin. Note the absence of acetylated tubulin in the control cell (a). MEN-treated cells exhibit tubulin polymers that contain or consist of acetylated tubulin (arrows) and are localized either in the perinuclear cytoplasm (b) or in other cytoplasmic positions (c). Treatments: MEN 50 μ M, 2 h. Bar for (a–c) 10 μ m. (d–i) MAP65-1 immunolocalization in *A. thaliana* control (d), DPI- (e, f), NAC- (g) and MEN-treated (h, i) root-tips. The aggregations of MAP65-1 in control cells resemble the cortical MTs, while the respective aggregations in treated cells (arrows) resemble the appearance of the atypical tubulin polymers (cf. Fig. 4). Treatments (e) 25 μ M DPI, 2 h; (g) 250 μ M NAC, 2 h; (h, i) 25 μ M MEN, 2 h. Bar for (d–i): 10 μ m.

Parallel to MT-PPB maturation numerous perinuclear MTs appeared (Figs. 6b and 7b), which were transformed into a bipolar prophase spindle (Figs. 6c, 6d and 7c). As a rule, prophase cells did not display MTs in other cytoplasmic sites (Figs. 6c and 7c).

Many *T. turgidum* and *A. thaliana* DPI- and NAC-treated preprophase/prophase root-tip cells lacked MT-PPB (Figs. 6e, 6f, 6i and 7d). Often, the PPB zone or the rest cortical cytoplasm was traversed by tubulin strands aligned in different directions (Figs. 6e, 6i and 7d). When a MT-PPB was found in treated cells it was abnormal made of short curly or variously oriented linear atypical tubulin polymers (Figs. 6j, 6k and 7h). Frequently, the maturation and disorganization PPB processes were inconsistent with the state of chromatin condensation (Figs. 6g, 6j, 6k, 7e, 7f, 7h and 7i). Perinuclear tubulin polymers were rarely seen in preprophase/

prophase DPI- and NAC-treated cells. In case of their presence, they appeared as amorphous tubulin deposits near the nuclear envelope (Figs. 6g, 6h, 6l, 7e and 7f). Bipolar prophase spindles did not form in treated cells (Figs. 6g, 6h, 6l, 7e, 7f and 7i). Nuclei, possessing distinct chromosomes, were surrounded by atypical tubulin polymers, some of which rarely penetrated the locally broken nuclear envelope (Figs. 6g, 6h, 6l and 7f). The rest cytoplasmic regions were traversed by a dense network made of wavy and rod like tubulin polymers (Figs. 6f, 6l and 7g). Between the PPB region and the nucleus interconnected tubulin polymers were frequently found (Fig. 6l).

Most of MEN-treated *T. turgidum* and *A. thaliana* preprophase/prophase cells lacked MT-PPB (Figs. 6m–6o, 7k and 7l), were unable to form prophase spindles and presented numerous aberrant tubulin polymers in various

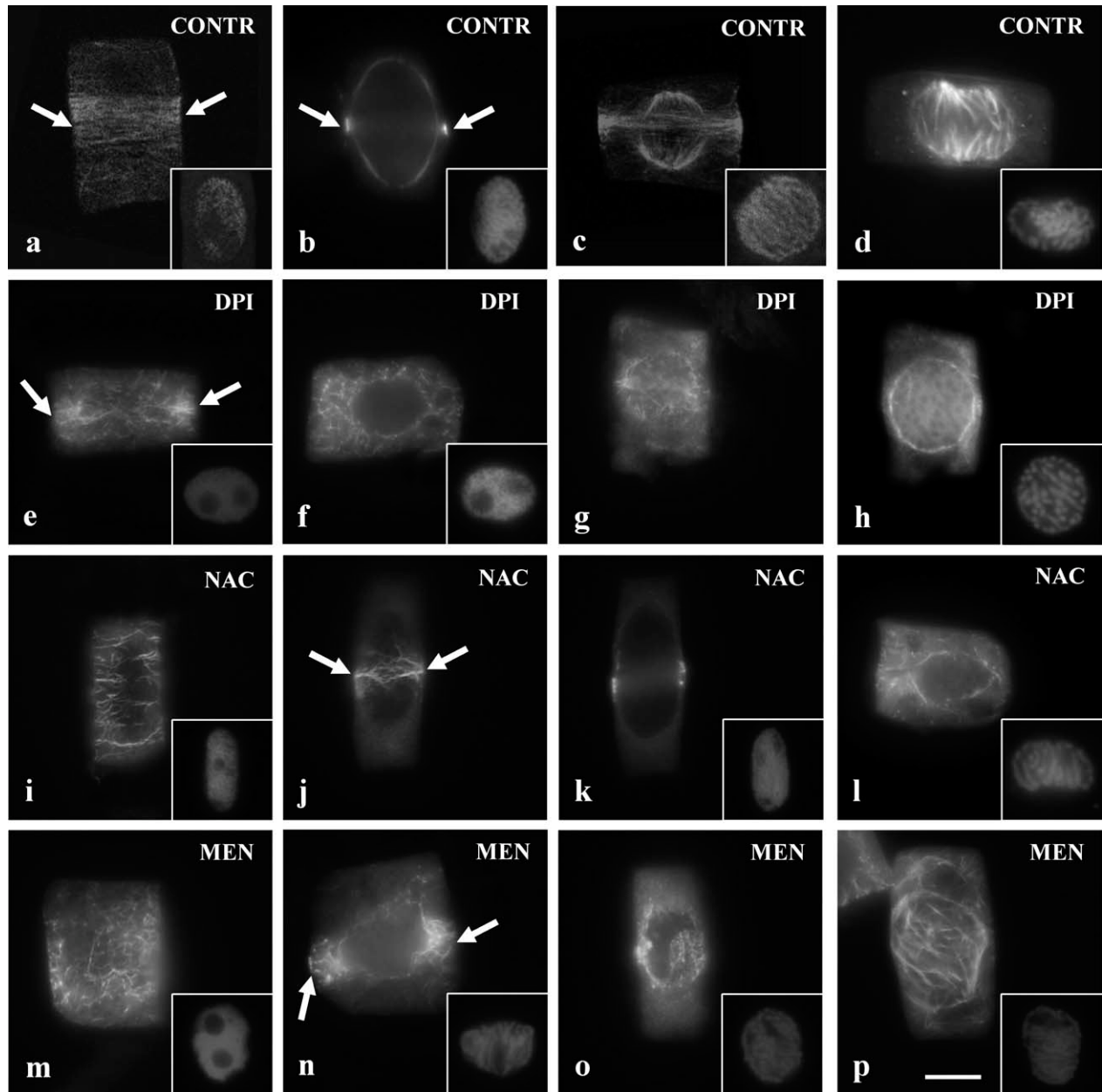


Fig. 6. *T. turgidum* control (a–d) and treated with 25 μ M DPI for 1 h (e–h), 500 μ M NAC for 2 h (i–l) and 50 μ M MEN for 1 h (m–p), preprophase/prophase root-tip cells after tubulin immunolabeling. The inset images show the nuclei after DNA staining with Hoechst 33258. (a) and (c) are CLSM images resulted in from projection of all the optical sections. (a) Preprophase cell possessing a wide MT-PPB (arrows). (b) Median view of an early prophase cell displaying perinuclear MTs. The arrows show the MT-PPB. (c) Prophase cell with mature MT-PPB and a bipolar prophase spindle. (d) Prophase spindle in a late prophase cell. The MT-PPB has disappeared. (e) DPI-treated preprophase cell displaying incomplete PPB (arrows) (cf. a, c). (f) Median view of a DPI-treated early prophase cell displaying numerous tubulin strands throughout the cytoplasm. Note the absence of MT-PPB (cf. b). (g, h) Cortical (g) and median (h) optical sections of a DPI-treated late prophase cell. Note the absence of the bipolar prophase spindle (cf. c, d). (i) NAC-treated preprophase cell possessing numerous tubulin strands throughout the cortical cytoplasm. MT-PPB is absent. (j, k) Cortical (j) and median (k) optical sections of a NAC-treated prophase cell. Note the atypical tubulin bundles at the site of PPB (arrows) and the absence of perinuclear tubulin polymers (k; cf. b). (l) NAC-treated late prophase cell lacking prophase spindle (cf. c, d). (m) MEN-treated preprophase cell lacking MT-PPB. A network consisted of atypical tubulin polymers is present at the cortical cytoplasm (cf. a). (n) MEN-treated prophase cell displaying an intense tubulin network between the PPB region and the nucleus (arrows). (o, p) MEN-treated late prophase cells presenting atypical tubulin polymer depositions around nucleus, that they do not form prophase spindle. Bar for all figures: 10 μ m.

cytoplasmic sites (Figs. 6m, 6o, 6p and 7k). Intense networks of atypical tubulin polymers were also found between nucleus and the PPB region (Fig. 6n). Although

aberrant tubulin polymers of various shapes were observed (Figs. 6m and 6o), they usually formed strand-like structures (Figs. 6p and 7k). Few MEN-treated cells displayed

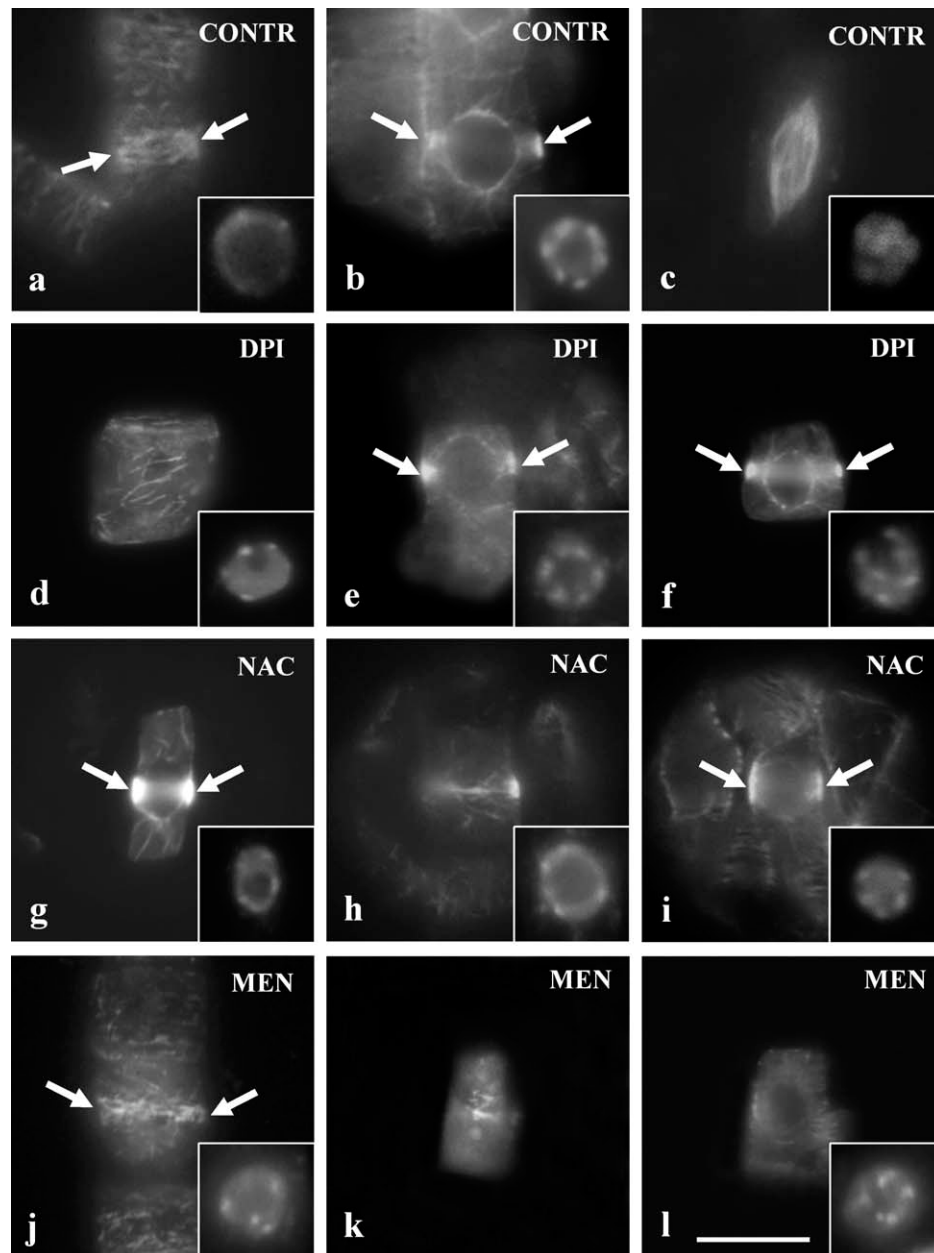


Fig. 7. *A. thaliana* control (a–c) and treated with 25 μ M DPI for 1 h (d–f), 500 μ M NAC for 1 h (g–i) and 50 μ M MEN for 1 h (j–l), preprophase/prophase root-tip cells after tubulin immunolabeling. The inset images show the nuclei after DNA staining with Hoechst 33258. (a) Control preprophase cell. The arrows point to the MT-PPB. (b) Median view of a control prophase cell. Note the narrow MT-PPB (arrows) and the perinuclear MTs. (c) Prophase spindle in a late prophase control cell. (d) DPI-treated preprophase cell exhibiting linear tubulin strands at the cortical cytoplasm. Note the absence of the MT-PPB (cf. a). (e, f) DPI-treated prophase (e) and late prophase (f) cells which both present narrow PPB (arrows) and lack prophase spindle (cf. b, c). (g) Optical section passing through the nucleus of a NAC-treated preprophase cell. Intense fluorescence is observed at the PPB region (arrows). Tubulin strands traverse the cytoplasm. (h) NAC-treated cell with an aberrant PPB. (i) Median view of a NAC-treated prophase cell. Note the wide PPB (arrows) and the absence of perinuclear tubulin polymers (cf. b, c). (j) MEN-treated preprophase cell exhibiting atypical PPB (arrows). (k, l) Optical sections passing through the cortical cytoplasm (k) and the nucleus (l) of a MEN-treated prophase cell exhibiting few linear tubulin polymers at the PPB region and no perinuclear tubulin polymers (cf. b, c). Bar for all figures: 10 μ m.

aggregations of aberrant tubulin polymers at the PPB region (Fig. 7j).

Prometaphase/Metaphase Cells

In *T. turgidum* and *A. thaliana* prometaphase control cells, MT bundles were localized among chromosomes (Figs. 8a

and 8e). As prometaphase progressed, they were connected to the kinetochores (kinetochore MT-bundles) and formed a bipolar metaphase spindle (Figs. 8i and 8m). In *T. turgidum*, metaphase spindle formed broad poles (Fig. 8i), while in *A. thaliana* spindles with pointed poles (Fig. 8m) as well as barrel-like ones displaying broad poles were

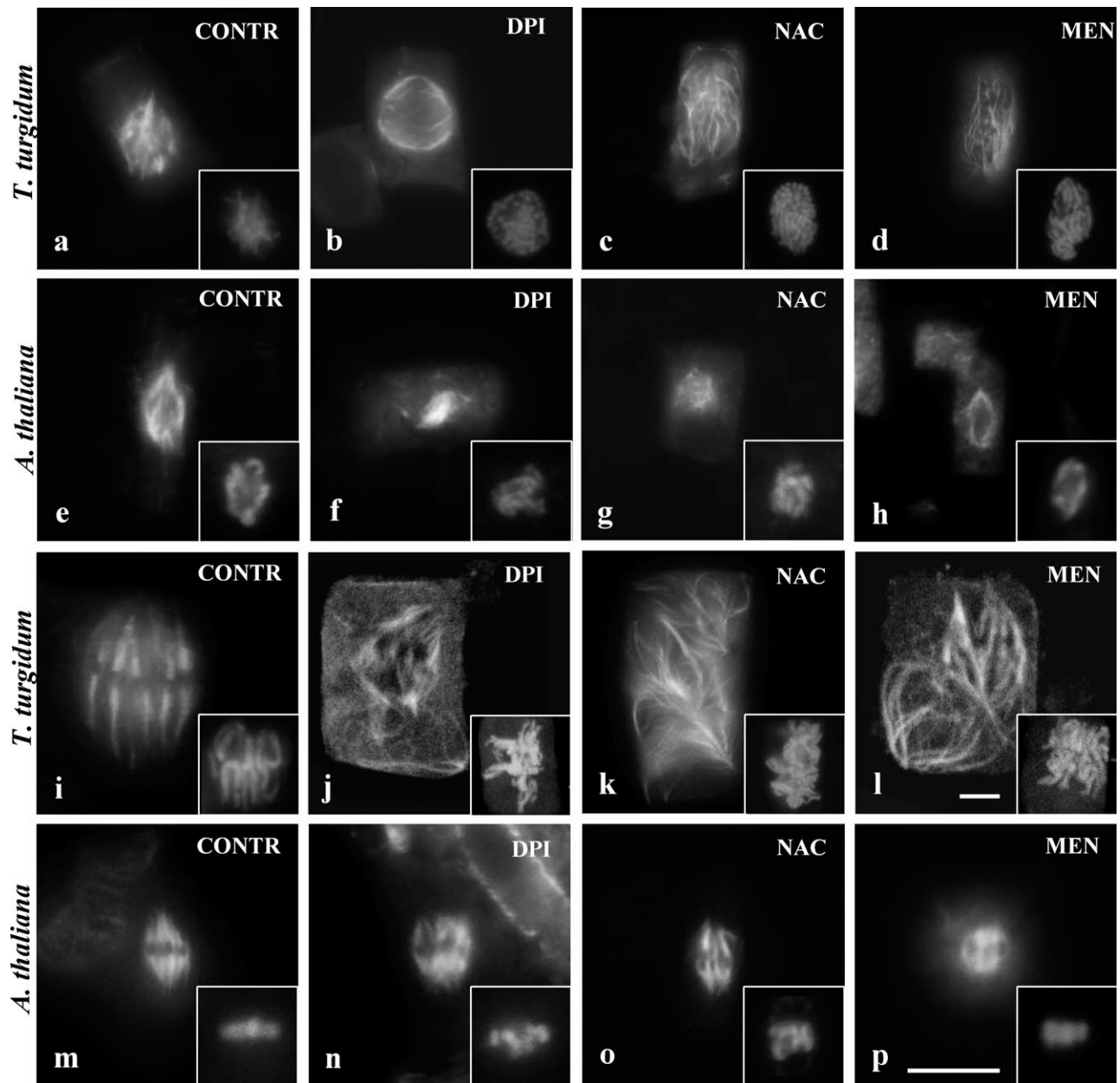


Fig. 8. *T. turgidum* (a–d, i–l) and *A. thaliana* (e–h, m–p) control (a, e, i, m) and treated (b–d, f–h, j–l, n–p) prometaphase (a–h) and metaphase (i–p) root-tip cells after tubulin immunolabeling. Insets: The prometaphase nuclei (a–h) and the metaphase chromosomes (i–p) after DNA staining with Hoechst 33258. (a–d) Tubulin polymer organization in control (a), DPI-treated (b), NAC-treated (c), and MEN-treated (d) *T. turgidum* prometaphase cells. (e–h) Tubulin polymer organization in control (e), DPI-treated (f), NAC-treated (g) and MEN-treated (h) *A. thaliana* prometaphase cells. (i–l) Metaphase spindle organization in control (i), DPI-treated (j), NAC-treated (k) and MEN-treated (l) *T. turgidum* cells (j, l projection of CLSM optical sections). (m–p) Metaphase spindle organization in control (m), DPI-treated (n), NAC-treated (o) and MEN-treated (p) *A. thaliana* cells. Treatments: DPI: 25 μ M, 1.5 h; NAC: 500 μ M, 1 h; MEN: 50 μ M, 1 h. Bars: (a–d, i–l) 10 μ m; (e–h, m–p) 10 μ m.

found [Yang et al., 2011]. The differences in metaphase spindle organization seem to depend on the chromosome arm size and alignment [Zachariadis et al., 2000] and on the cell shape [Yang et al., 2011].

DPI-, NAC- and MEN-prometaphase/metaphase treated cells of *T. turgidum* and *A. thaliana* shared almost the same abnormalities. As previously described, the treated cells displaying prometaphase chromosomes, often

possessed an intact nuclear envelope preventing tubulin polymers to reach the kinetochores. Thus, many tubulin polymers were accumulated around the prometaphase nucleus (Figs. 8b–8d and 8f–8h). The metaphase spindles observed were highly aberrant. Usually, tubulin strands appeared connected to kinetochores and formed a network failing to become a typical bipolar metaphase spindle (Figs. 8j–8l; cf. Fig. 8i and Figs. 8n–8p; cf. Fig. 8m).

They differed in thickness and length from the control kinetochore MT-bundles and were oriented in different directions.

Chromosomes aligned in metaphase plate were rarely seen in treated cells. They were grouped, or dispersed throughout the cytoplasm (Figs. 8j–8l inset; cf. Fig. 8i inset and Figs. 8n–8p inset; cf. Fig. 8m inset). Atypical tubulin strands were detected in many other cytoplasmic sites, far from the chromosomes, which often terminated close to the plasmalemma (Figs. 8k and 8l). In control metaphase cells, MTs were found only in the mitotic spindle (Figs. 8i and 8m).

Anaphase/Telophase Cells

In control anaphase cells, the daughter chromosome groups move toward the poles, while kinetochore MT-bundles shorten. During anaphase B, the overlapping pole to pole MT-bundles elongate moving further apart the spindle poles (Figs. 9a and 9e). During telophase, an interzonal MT system appears between the reforming daughter nuclei, consisting of MT-bundles overlapping on the equatorial plane (Figs. 9i and 9m).

The anaphase spindles of treated cells were abnormal, consisting of atypical tubulin polymers (Figs. 9b–9d; cf. Fig. 9a and Figs. 9f–9h; cf. Fig. 9e). Frequently, aberrant tubulin strands were localized at various positions far from the anaphase spindle. In DPI-, NAC- and MEN-treated root-tip cells, the anaphase chromosome movement was often disturbed (Figs. 9b–9d inset; cf. Fig. 9a inset and Figs. 9f–9h inset; cf. Fig. 9e inset), probably because of the abnormal spindle organization.

Treated telophase cells exhibited irregular interzonal tubulin networks and atypical tubulin polymers around the daughter chromosome groups (Figs. 9j–9l and 9n–9p). Frequently, the daughter chromosome groups did not separate (Figs. 9k and 9l inset) and therefore polyploid nuclei were formed.

Tubulin Polymer Organization in *A. thaliana* *rhd2* Dividing Root-Tip Cells

Dividing root-tip cells of *rhd2-5* and *rhd2-6* mutants displayed quite similar abnormalities in the organization of tubulin cytoskeleton. They resemble those observed in *A. thaliana* wild type root-tip cells treated with DPI. However, MT organization was typical in a significant number of cells in both mutants examined. This may be attributed to the differential expression of the RHD2/AtRBOHC in the various root cell types [Foreman et al., 2003; see below]. Probably, the cells presenting abnormalities in the organization of the tubulin cytoskeleton lacked RHD2/AtRBOHC function.

Many interphase root-tip cells exhibited thick cortical tubulin strands, not showing the parallel orientation characterizing the MTs (Fig. 10a; cf. Fig. 4e). A significant

number of *rhd2* cells appeared to delay to pass through the successive preprophase/prophase stages. The maturation of the MT-PPBs was inconsistent with chromatin condensation (Figs. 10c and 10d; cf. Figs. 7a and 7b), while their disorganization was retarded. A number of PPBs consisted of few linear tubulin polymers. Some cells displayed tubulin polymers around the preprophase/prophase nucleus (Fig. 10b), while some other not. The late prophase cells lacked a bipolar prophase spindle (Figs. 10b and 10e; cf. Figs. 7b and 7c). Prophase cells possessing thick tubulin strands dispersed all over the cytoplasm were also observed.

In prometaphase/metaphase, the nuclear envelope breakdown was delayed, while the kinetochore MT-bundles were misaligned. This resulted in metaphase chromosome misorientation (Figs. 10f–10h; cf. Figs. 8e and 8m). Anaphase chromosome movement also delayed, because of the atypical anaphase spindle organization (Fig. 10i; cf. Fig. 9e). Telophase cells often exhibited an irregular interzonal MT system, whereas the kinetochore MT-bundle disorganization delayed (Fig. 10j; cf. Fig. 9m).

TEM Examination of Tubulin Polymers in Control, Treated and Mutant Root-Tip Cells

Rhizodermal, cortex and central cylinder cells of the root meristem and the root elongation zone were examined with TEM. The outer MT diameter of control *T. turgidum* root-tip cells varies between 19 and 25 nm (Table I). TEM examination of DPI- and NAC-treated *T. turgidum* root-tip cells revealed the coexistence of MTs with tubular structures showing outer diameter much more than 25 nm (Table I; Figs. 11b, 11c and 11f). Treatment of *A. thaliana* root-tips with the above ROS modulators almost produced the effects observed in *T. turgidum* (Table I; Figs. 11d and 11e). Tubulin immunogold labeling showed that these tubular structures consist of tubulin (Fig. 11g). Therefore, in DPI- and NAC-treated cells microtubule assembly is induced (Table I; also Figs. 11b–11e; cf. Fig. 11a). The microtubules either traversed the cytoplasm solitarily (Figs. 11d and 11e) or they formed bundles (Figs. 11b, 11c and 11f; see also Supporting Information, Figs. 7a–7c). The latter could represent the linear tubulin strands observed in DPI- and NAC-treated cells after tubulin immunolabeling. Besides, some of the microtubules were curved (Supporting Information, Fig. 7d). Such microtubules overlapped at their ends may form the circular tubulin strands found in treated cells after tubulin immunolabeling.

In DPI- and NAC-treated cells, microtubules coexisted with a number of MTs. The percentage of MTs and microtubules in each treatment, their mean diameter, as well as the diameter range are presented in Table I. In *T. turgidum* DPI- and NAC-treated cells microtubules was the 93–95% of tubulin polymers counted. The respective percentage in

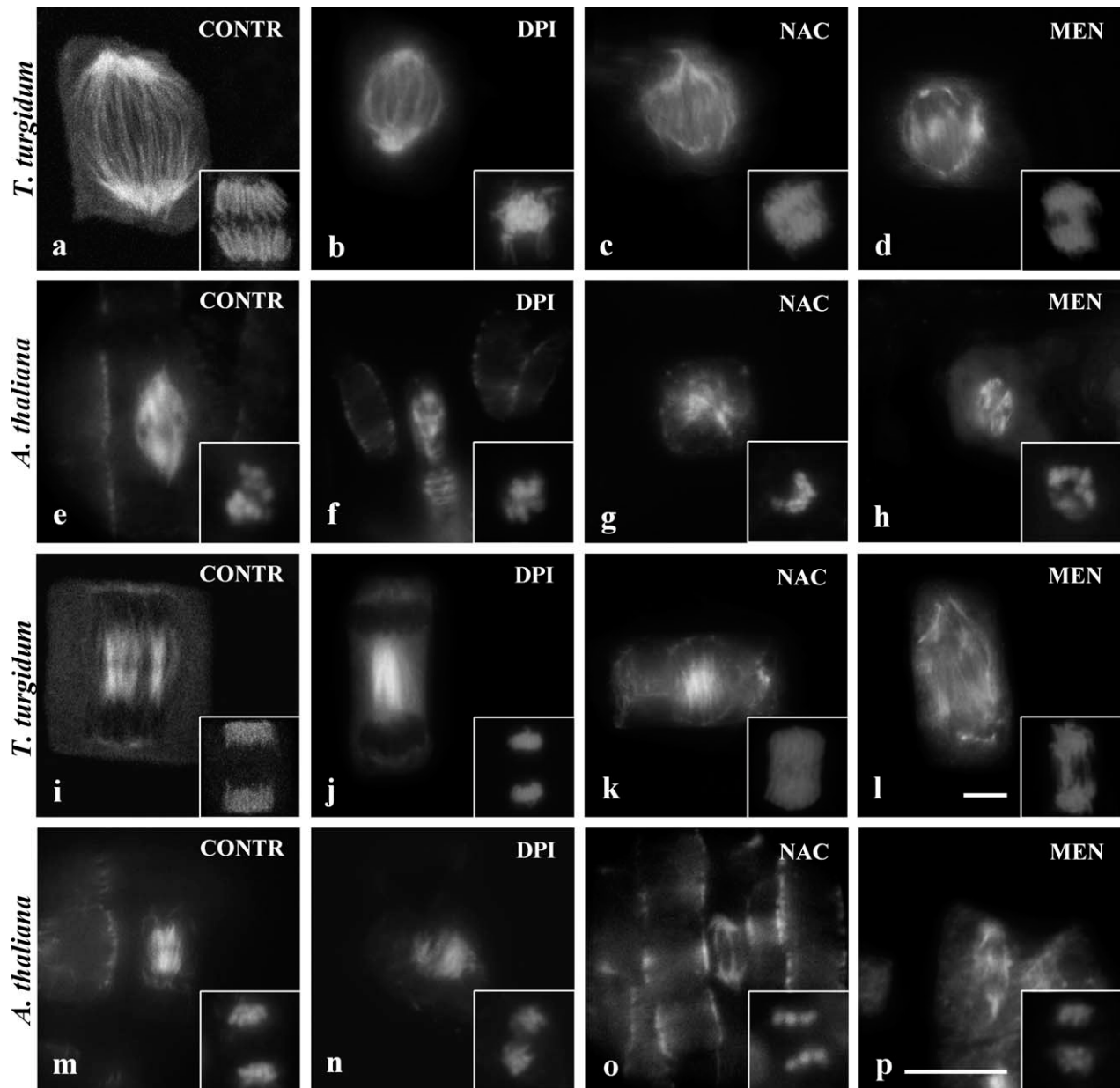


Fig. 9. *T. turgidum* (a–d, i–l) and *A. thaliana* (e–h, m–p) control (a, e, i, m) and treated (b–d, f–h, j–l, n–p) anaphase (a–h) and telophase (i–p) root-tip cells after tubulin immunolabeling. Insets: The anaphase chromosomes (a–h) and the daughter nuclei (i–p) after DNA staining with Hoechst 33258. (a–h) Anaphase spindle organization in control (a, e), DPI-treated (b, f), NAC-treated (c, g) and MEN-treated (d, h) cells (a, projection of CLSM optical sections). (i–p) Tubulin polymer organization in control (i, m), DPI-treated (j, n), NAC-treated (k, o) and MEN-treated (l, p) telophase cells (i projection of CLSM optical sections). Treatments: DPI: 25 μ M, 1.5 h; NAC: 500 μ M, 1 h; MEN: 50 μ M, 1 h. Bars: (a–d, i–l) 10 μ m; (e–h, m–p) 10 μ m.

A. thaliana treated cells was 71–74%. Therefore, after DPI- and NAC-treatment typical MTs were the minority of the cell tubulin polymers, especially in *T. turgidum* where they have been almost disappeared (Table I). Figure 12 shows the frequencies of tubulin polymers observed in *T. turgidum* (Fig. 12a) and *A. thaliana* (Fig. 12b) root-tip cells. In both plants, the majority of macrotubules exhibited outer diameter ranging from 29 to 32 nm (Figs. 12a and 12b). To test whether the macrotubule outer diameter increase was followed by a respective increase of the inner diameter, tubulin polymers from control and DPI-treated

root-tip cells were measured. Indeed, the inner diameter of the tubulin polymers assembled in the presence of DPI was about 60% greater than the MT inner diameter of the control cells in the case of *T. turgidum* and 39% higher in *A. thaliana* DPI-treated cells (Table II).

MEN seems to cause almost complete MT disappearance in *T. turgidum* and *A. thaliana* root-tip cells, since only few MTs were observed by TEM in MEN-treated cells, while macrotubules were not found (Table I). These cells exhibited paracrystal formations (Figs. 11i and 11j; see also Supporting Information, Fig. 7e), similar to

tubulin paracrystals described in other cases (see Discussion). In addition, the cytoplasm in MEN-treated cells was traversed by clearly defined electron dense strands of amorphous material (Figs. 11k and 11n; see also Supporting Information, Fig. 7f). After tubulin immunogold staining, gold granules were preferentially deposited on the paracrystals (Fig. 11l) and the electron dense material

(Figs. 11m and 11n inset), showing that they contain or consist of tubulin. Significant number of MEN-treated cells displayed paracrystals and strands of electron dense material which usually formed networks (Fig. 11k; see also Supporting Information, Figs. 7e and 7f). These networks may be responsible for the diffused pattern of tubulin polymers observed in these cells after tubulin immunolabeling (Figs. 4d, 4k, 6m and 6n).

Interestingly, in root-tip cells of *rhb2* *A. thaliana* mutants, macrotubules (Fig. 11h) coexisted with MTs. The data derived from the measurement of the outer tubulin polymer diameter in *rhb2-5* and *rhb2-6* mutants are presented in Table I. The macrotubule percentage varied in the different root cell types (Table III). The pattern of macrotubule appearance seems to be in accordance with the differential expression of RHD2/AtRBOHC protein in different root regions [Foreman et al., 2003]. Abnormal short root hairs (Fig. 11h inset), rhizodermal and endodermal cells at the root elongation zone displayed significant amounts of macrotubules (Table III). In rhizodermal *rhb2* cells in the meristem region, the macrotubules were less frequent, while in differentiating tracheary elements only MTs were present (Table III). Figure 12b shows the frequency of tubulin polymer outer diameter in *rhb2-5* and *rhb2-6* mutants. The majority of macrotubules exhibited outer diameter between 28.5 and 32 nm, similar to that of macrotubules formed in DPI-treated cells.

Discussion

Disturbance of ROS Homeostasis Induces Atypical Tubulin Polymer Formation

The findings of this study revealed for the first time that atypical tubulin polymer assembly is induced in root-tip

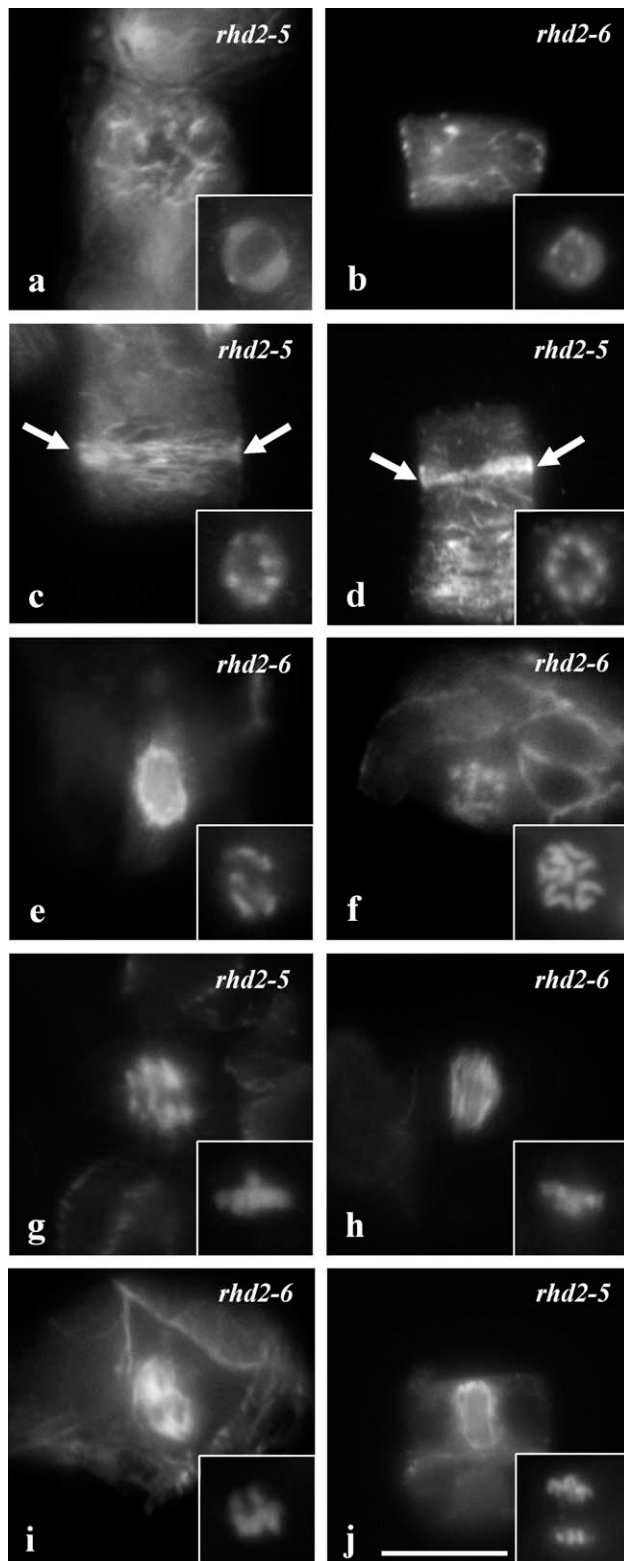


Fig. 10. (a–j) *A. thaliana rhb2-5* and *rhb2-6* root-tip cells being at different cell cycle stages after tubulin immunolabeling. Insets: The nuclei (a–d), and the chromosomes (e–j) after DNA staining with Hoechst 33258. (a) Interphase cell presenting plenty atypical tubulin polymer aggregations at the cortical cytoplasm (cf. Fig. 4e). (b) Preprophase cell lacking MT-PPB and presenting atypical cytoplasmic tubulin polymers (cf. Fig. 7b). (c, d) Early (c) and late prophase (d) cell. Despite the advanced stage of chromatin condensation (c, d inset) the cell in (c) displays a wide immature MT-PPB (arrows), while the cell in (d) a mature MT-PPB (arrows). (e, f) Prometaphase cells. The arrangement of the prometaphase chromosomes (e, f inset) suggests that nuclear envelope breakdown is delayed. Tubulin polymers surround the prometaphase chromosomes in (e) and tubulin strands in (f) are misoriented (cf. Fig. 8e). (g, h) Metaphase cells exhibiting atypical spindles (cf. Fig. 8m) failing to align all the chromosomes in the metaphase plate (see insets). (i, j) Median view of an anaphase (i) and a telophase (j) cell. The anaphase chromosome movement has been inhibited (i inset) due to the atypical anaphase spindle organization (i; cf. Fig. 9e). The telophase cell in (j) displays daughter chromosome groups (j inset) but lacks an interzonal MT system (cf. Fig. 9m). Bar for all figures: 10 μ m.

Table I. The Frequency and the Values of the Outer Diameter of Tubulin Polymers Measured by TEM in *T. turgidum* and *A. thaliana* Control and Treated Root-tip Cells

	MTs			Macrotubules		
	Frequency (%)	Diameter range (nm)	Mean diameter (nm)	Frequency (%)	Diameter range (nm)	Mean diameter (nm)
<i>Triticum</i>						
Control	100 (<i>n</i> = 365)	19.13–25.51	20.67 ± 0.13	0	–	–
DPI	7.4 (<i>n</i> = 52)	20.25–25.27	23.77 ± 0.22	92.6 (<i>n</i> = 646)	25.92–33.89	32.52 ± 0.16
NAC	4.9 (<i>n</i> = 11)	23.49–25.27	24.3 ± 0.29	95.1 (<i>n</i> = 212)	25.92–39.90	31.80 ± 0.23
MEN	100 (<i>n</i> = 45)	19.95–25.27	22.99 ± 0.30	0	–	–
<i>Arabidopsis</i>						
Control	100 (<i>n</i> = 286)	19.95–25.27	22.43 ± 0.10	0	–	–
DPI	29.0 (<i>n</i> = 34)	19.44–25.27	24.02 ± 0.30	71.0 (<i>n</i> = 83)	25.92–34.58	29.49 ± 0.23
NAC	26.0 (<i>n</i> = 44)	22.61–25.27	24.29 ± 0.16	74.0 (<i>n</i> = 125)	25.92–34.58	29.67 ± 0.21
MEN	100 (<i>n</i> = 42)	19.95–25.27	22.45 ± 0.15	0	–	–
<i>rhb2-5</i>	67.6 (<i>n</i> = 234)	19.95–25.27	22.94 ± 0.12	32.4 (<i>n</i> = 112)	25.92–34.58	29.3 ± 0.17
<i>rhb2-6</i>	34.1 (<i>n</i> = 317)	19.95–25.27	23.56 ± 0.10	63.9 (<i>n</i> = 560)	26.60–34.58	29.8 ± 0.08

n = the number of tubulin polymers measured in each case

cells of a monocotyledon and a dicotyledon plant treated with ROS modulators. NADPH oxidase inhibition by DPI and ROS scavenging by NAC resulted in macrotubule formation, whereas the oxidative stress generated by MEN induced tubulin paracrystal assembly. Considering that after the artificial decrease of ROS levels the amount of macrotubules is higher in the case of *T. turgidum* than in *A. thaliana* (Table I), it may be suggested that macrotubule induction is favored in monocotyledon plants. Besides, the presence of macrotubules in the *rhb2 A. thaliana* cells (Tables I and III) strength the hypothesis that macrotubule formation is not a side effect caused by ROS modulators, but the outcome of low ROS levels. Interestingly, in *rhb2* cell types lacking RHD2/AtRBOHC function, 80–90% of the tubulin polymers measured, were macrotubules (Table III).

Macrotubules have been observed in different plant and animal cell types [Kwiatkowska et al., 2009 and references therein], in plant cells experiencing hyperosmotic [Komis et al., 2001, 2002] and aluminum ion [Frantzios et al., 2000] stresses and they were assembled in vitro under specific conditions [Unger et al., 1990; Vater et al., 1997]. The larger macrotubule diameter has been attributed to the increase of protofilament number [Unger et al., 1990; Komis et al., 2001; Kwiatkowska et al., 2009] or to varying distances between protofilaments [Kwiatkowska et al., 2009].

Macrotubule formation in plasmolyzed root-tip cells of *T. turgidum* is controlled by a 46 KDa protein kinase (p46 MAPK), immunologically and pharmacologically related to the mammal p38 MAPK [Komis et al., 2004]. Activation of p46 MAPK was induced by phosphatidic

acid produced by the PLD activity [Komis et al., 2006], while PLC mediate macrotubule formation controlling the 4,5-phosphatidyl-inositol-biphosphate levels in plasmolyzed cells [Komis et al., 2008]. Considering that ROS signals may activate PLC and PLD [Mittler et al., 2004] and the p38-like MAPKs [Jiang and Song, 2008], it seems reasonable to suggest that macrotubule formation in root-tip cells under low ROS levels, is achieved by the mechanism functioning during macrotubule formation in plasmolyzed cells.

Tubulin paracrystals form in cells experiencing hyperosmotic stress [Komis et al., 2001, 2002, 2006], colchicine treatment [Apostolakis et al., 1990; Karagiannidou et al., 1995; Lazareva et al., 2003; Caperta et al., 2006; Panteris et al., 2010] and treatment with *Vinca* alkaloids [for literature see Apostolakis et al., 1990; Lazareva et al., 2003]. In MEN-treated cells, the strands of amorphous material observed (Figs. 11k and 11n) probably represent the tubulin matrix from which, the tubulin paracrystals arise [see also Apostolakis et al., 1990; Karagiannidou et al., 1995; Lazareva et al., 2003].

Notably, MAP65 proteins were localized in tubulin/colchicine paracrystals, probably promoting the polymerization and/or the stabilization of these atypical tubulin polymers [Panteris et al., 2010]. Moreover, the binding of MAP65 proteins to tubulin paracrystals appears to be regulated by MAPK-induced MAP65 phosphorylation. AtMAP65-1 is phosphorylated by the MAPKs MPK4 and MPK6 [Smertenko et al., 2006], while ROS are related to MAPK cascades [Pitzchke and Hirt, 2006]. In particular, MPK3, MPK4 and MPK6 are activated by oxygen species [Miller et al., 2010]. Considering collectively these data it

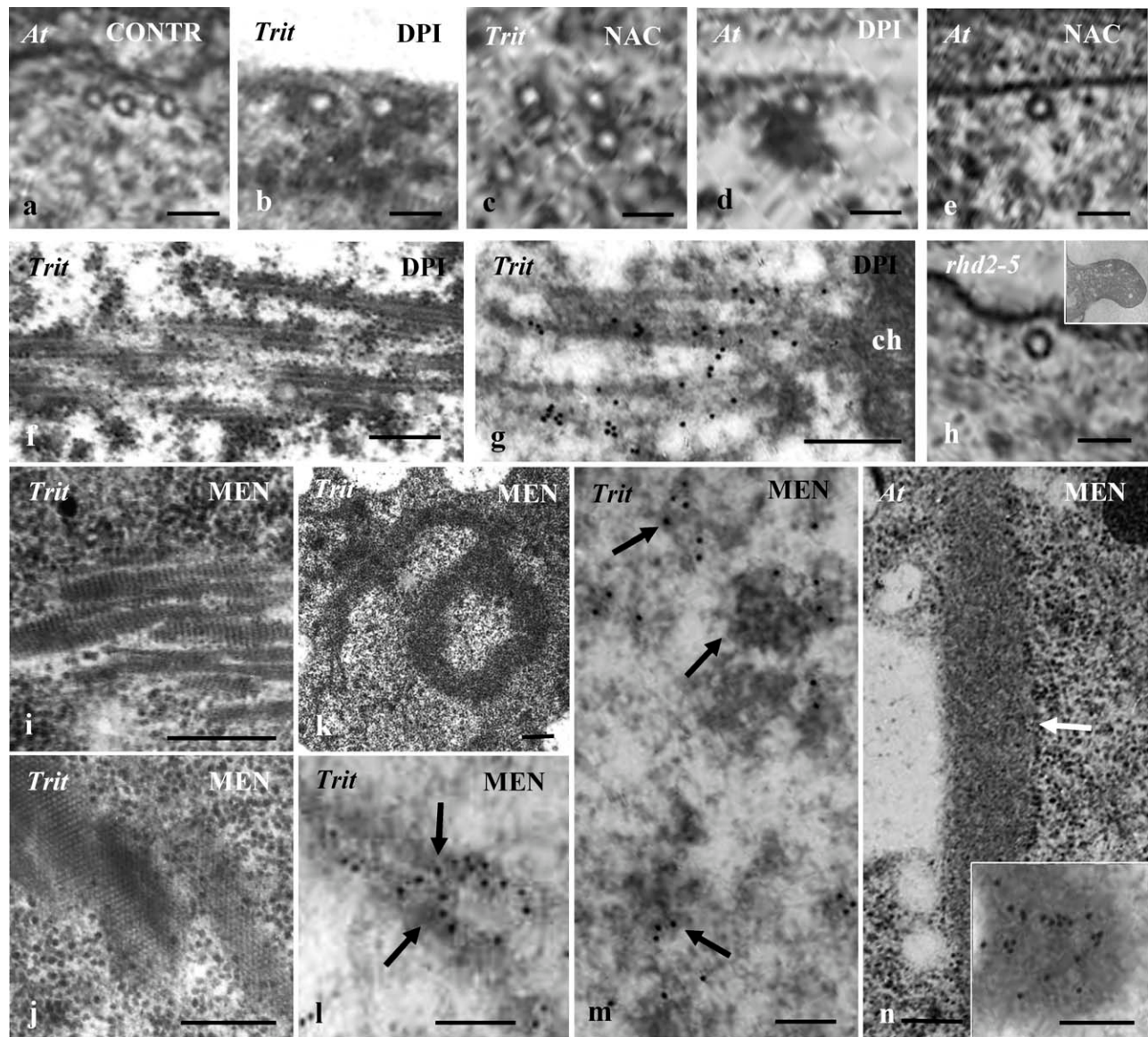


Fig. 11. (a–n) TEM micrographs. (a) Cortical MTs in transverse section of a control *A. thaliana* root-tip cell. (b–e) Transverse sections of macro tubules observed in DPI-treated (b, d) and NAC-treated (c, e), *T. turgidum* (b, c) and *A. thaliana* (d, e) root-tip cells. The images (a–e) are in the same magnification. (f) Portion of a *T. turgidum* DPI-treated cell displaying macro tubules in longitudinal section. (g) Tubulin immunogold localization in macro tubules of a *T. turgidum* DPI-treated cell. (ch) chromosome. (h) Macro tubule of a *rhd2-5 A. thaliana* short root hair (h inset). The image is in the same magnification as images (a–e). (i, j) Paracrystals in MEN-treated *T. turgidum* root-tip cells. (k) Strand of electron dense material in MEN-treated *T. turgidum* root-tip cell. (l, m) Tubulin immunogold localization in paracrystals (arrows in l) and in aggregations of electron dense material (arrows in m) of MEN-treated *T. turgidum* root-tip cells. (n) Strand of electron dense material (arrow) in MEN-treated *A. thaliana* root-tip cell. Inset: Gold granules are localized on this material after tubulin immunogold localization. Treatment: DPI: 25 μ M, 1.5 h; NAC: 500 μ M, 1 h; MEN: 50 μ M, 1 h. Bars: (a–e, h) 50 nm; (l, m, n inset) 100 nm; (f, g, i, j, n) 250 nm; (k) 500 nm.

may be assumed that in MEN-treated cells ROS overproduction induces, via MAPK activation and MAP65 phosphorylation, tubulin paracrystal assembly. This is further supported by the fact that MAP65-1 aggregations were found in MEN-treated cells (Figs. 5h and 5i). Besides, the assembly of macro tubule strands in DPI- and NAC-treated cells is probably achieved by the same mechanism since in these cells MAP65-1 appeared in strands similar to the respective atypical tubulin strands (Figs. 5e–5g). Therefore, MAP65-1, acting as a “tubulin associated pro-

tein” may underlie the bundling and/or the assembly of the atypical tubulin polymers observed in our study [see also Panteris et al., 2010].

About the properties and function of the atypical tubulin polymers found in this study, hypotheses can only be made. The atypical tubulin polymers can be considered as more stable structures compared to MTs. They form and persist in cells experiencing: (a) hyperosmotic stress [Komis et al., 2001, 2002], (b) aluminum treatment [Frantzios et al., 2000] and (c) ROS homeostasis

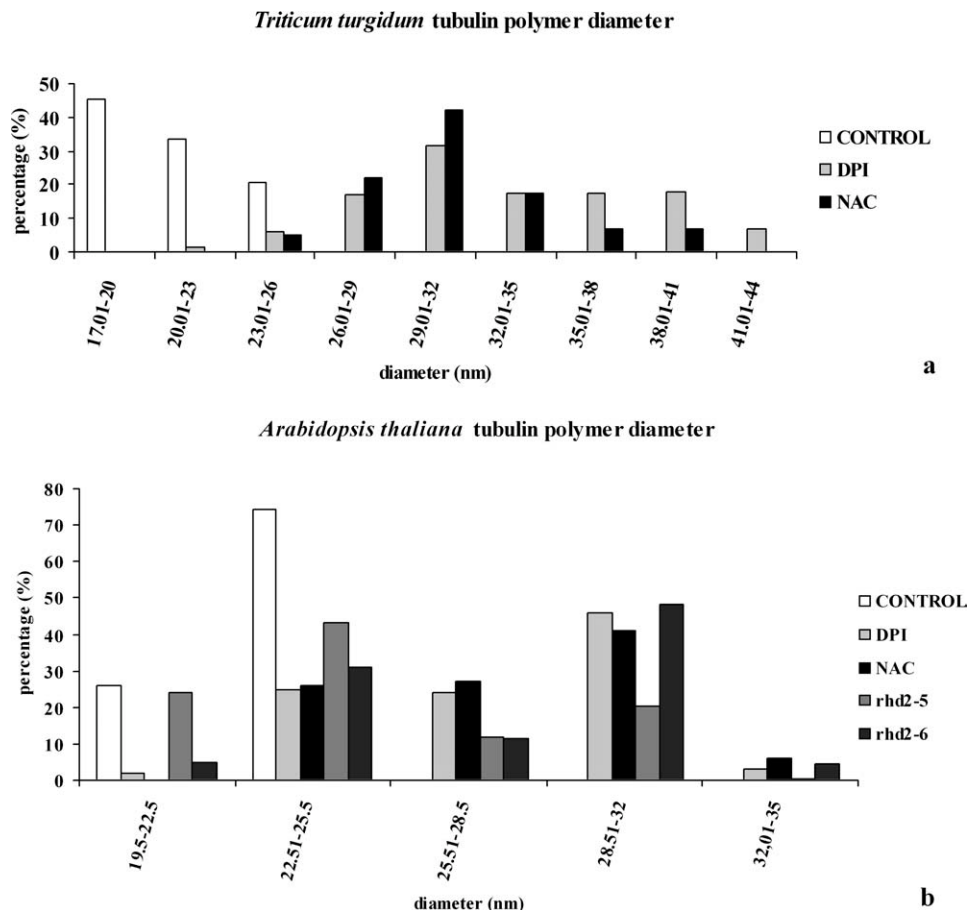


Fig. 12. Outer diameter frequencies of tubulin polymers measured in *T. turgidum* (a) control, DPI- and NAC-treated cells and *A. thaliana* (b) control, DPI-, NAC-treated and *rhb2* root-tip cells. Treatments: DPI: 50 μ M, 2 h; NAC: 500 μ M, 2 h. Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

disturbance (present study). Macrotubule and tubulin paracrystal resistance might be due to the fact that they contain or consist of acetylated tubulin, at least in colchicine treated root-tip cells of *T. aestivum* [Lazareva et al., 2003]. This hypothesis is supported by our data showing that the atypical tubulin polymers in MEN-treated *T. turgidum* root-tip cells contain acetylated tubulin (Figs. 5a–5c). Tubulin polymers containing acetylated tubulin exhibit increased stability [Perdiz et al., 2011]. It is also important that atypical tubulin polymer formation is reversible. The cells treated with ROS modulators recover and reform

typical MT arrays, when they return in control conditions (Supporting Information Figs. 6j and 6k).

Thus, the atypical tubulin polymer assembly is a common cytoskeletal adaptation against various stresses. This may provide the cells with cytoskeletal elements resistant to withstand different stress types [Komis et al., 2001, 2002]. Furthermore, the tubulin contained in the atypical polymers is somehow protected against stress, in present case against ROS homeostasis disturbance. This hypothesis is supported by the finding that in DPI-treated Rat1 fibroblasts, dynamic tyrosinated MT disassembly is followed by a marked increase in the number of stable de-tyrosinated tubulin polymers [Scaife, 2006]. Similarly, considering that oxidative stress induces tubulin modifications [Santa Maria et al., 2005], tubulin paracrystal assembly might be a cell response protecting tubulin against oxidative damage, until ROS homeostasis is restored.

Loss of ROS Homeostasis Results in MT Disappearance

Our data revealed also for the first time in plant cells that the disturbance of ROS homeostasis induce a dramatic decrease of typical MT participation in tubulin

Table II. The Values of the Inner Diameter of Tubulin Polymers Measured by TEM in *T. turgidum* and *A. thaliana* Control and Treated Root-tip Cells

Treatment	<i>Triticum</i> Mean diameter (nm)	<i>Arabidopsis</i> Mean diameter (nm)
Control	10 $\pm$ 0.11 (<i>n</i> = 158)	10.07 $\pm$ 0.16 (<i>n</i> = 101)
DPI	15.96 $\pm$ 0.15 (<i>n</i> = 112)	14.32 $\pm$ 0.22 (<i>n</i> = 102)

n = the number of tubulin polymers measured in each case

Table III. The Frequencies of Tubulin Polymers Measured in Different *rhd2* *A. thaliana* Root Cell Types

Root cell types	Macrotubules (%)	MTs (%)
Root-hair (<i>rhd2-5</i>)	89.3 (<i>n</i> = 75)	10.7 (<i>n</i> = 9)
Rhizodermis elongongation zone (<i>rhd2-6</i>)	80.6 (<i>n</i> = 282)	19.4 (<i>n</i> = 68)
Endodermis elongation zone (<i>rhd2-6</i>)	77.7 (<i>n</i> = 254)	22.3 (<i>n</i> = 73)
Rhizodermis meristem (<i>rhd2-5</i>)	32.7 (<i>n</i> = 35)	67.3 (<i>n</i> = 72)
Rhizodermis meristem (<i>rhd2-6</i>)	24.5 (<i>n</i> = 37)	75.5 (<i>n</i> = 114)
Tracheary elements (<i>rhd2-5</i>)	0	100 (<i>n</i> = 111)
Tracheary elements (<i>rhd2-6</i>)	0	100 (<i>n</i> = 86)

n = the number of tubulin polymers measured in each case

cytoskeleton. In both plants examined, MTs were minority in DPI- and NAC-treated cells that displayed lower ROS levels. In these cells, tubulin cytoskeleton consisted mostly of macrotubules (Table I). Besides, in MEN-treated cells, where ROS levels were increased, the tubulin paracrystals were the main component of the tubulin cytoskeleton and a few MTs were observed by TEM. The study of *A. thaliana* mutants showed that the decrease of the MT population is not a side effect of ROS modulators applied in this work. In *rhd2* root hairs and rhizodermal or endodermal cells in the root elongation zone, where RHD2/AtR-BOHC does not function [Foreman et al., 2003], MTs represent only the 10–20% of the tubulin polymers (Table III). Therefore, it may be suggested that plant MTs are sensitive to both ROS overproduction and low ROS levels. This is more intense in the monocotyledon *T. turgidum* than the dicotyledon *A. thaliana* (Table I). The small amount of the MTs observed after treatment with ROS modulators implies that loss of ROS homeostasis either directly destroys the MTs or leads indirectly to MT disappearance promoting tubulin polymerization into atypical tubulin polymers. Previous data from animal cells favor the first hypothesis. In particular, DPI selectively destroyed the unstable tyrosinated-MTs of Rat1 fibroblasts [Scaife, 2006]. Moreover, the oxidative stress induced by quinones disrupted MTs in both neural and non neural cells [Santa-Maria et al., 2005].

About the mechanism by which low ROS levels induce MT disappearance, hypotheses can only be made. DPI destructs unstable MTs of Rat1 fibroblasts by uncoupling their minus ends from centrosome, thus triggering MT disorganization [Scaife, 2006]. However, the author suggested that this effect is caused by DPI and not by the

altered ROS levels. Considering the similar observations made in *rhd2* mutants and DPI-treated *A. thaliana* root-tip cells, it may be assumed that this is not our case. It might be suggested that in plant cells low ROS levels interfere with MT dynamic instability leading to MT disintegration.

Alternatively, the disturbance of cytoplasmic Ca^{2+} homeostasis may underlie the almost total MT absence during oxidative stress caused by MEN-treatment. ROS can activate Ca^{2+} channels in roots [Foreman et al., 2003] and furthermore, oxidative stress is accompanied by cytoplasmic Ca^{2+} ion release [Rentel and Knight, 2004]. Considering the sensitivity of MTs to high Ca^{2+} concentrations [Hepler, 1994], it may be suggested that the disappearance of MTs, during MEN-treatment, is due to the disturbed cytoplasmic Ca^{2+} homeostasis.

Altered ROS Levels Affect Preprophase Band Organization

Our data clearly show that ROS imbalance affects PPB organization. Numerous cells of the treated root-tips of both plants examined, exhibited preprophase/prophase chromatin condensation, but not PPB. Some cells displayed atypical tubulin polymers at various positions of the cytoplasm (Figs. 6i, 6m and 7d), while some other tubulin strands at the PPB site forming incomplete or aberrant PPBs (Figs. 6e and 6j). These aberrant PPBs did not mature and persist in late prophase cells. Therefore, the disturbance of ROS homeostasis interferes with the formation, maturation and disorganization mechanisms of the PPB.

The absence of PPB from the affected cells and the formation of high abnormal PPBs can be explained by ROS interference with tubulin polymer formation, which is obvious in the present study. It seems likely that macrotubules and tubulin paracrystals cannot form a PPB like structure. The macrotubules assembled in aluminum treated root-tip cells of *T. turgidum* also exhibited a similar behavior [Frantzios et al., 2000].

Altered ROS Levels Disturb Mitotic Apparatus Organization

In higher plants, MT-organizing centers (MTOCs) function on the surface of the preprophase/prophase nucleus. They produce perinuclear MTs, which by self-organization mechanisms assemble the MT-prophase spindle [reviews by Vaughn and Harper, 1998; Schmit, 2002; Brandizzi et al., 2004; Meier and Brkljacic, 2009]. Perinuclear MTOC activation seems to be induced by intranuclear factors that during preprophase/prophase move from the nucleoplasm to the perinuclear cytoplasm [Meier and Brkljacic, 2009]. AtTPX2 is such a protein that may interact with the Aurora kinase [Vos et al., 2008].

Many preprophase/prophase treated cells of both plants examined, which have been probably entered preprophase/

prophase during treatment, lacked perinuclear tubulin polymers. As the same observation has been made in *rhb2 A. thaliana* root-tips, it cannot be considered as a side effect of ROS modulators applied, but as a result of the ROS imbalance that also induces the delay of the prometaphase nuclear envelope breakdown. Similarly, *T. turgidum* prophase cells treated with either ethidium bromide or cyclopiazonic acid, in which nuclear envelope disassembly was delayed, also lacked perinuclear MTs [Zachariadis et al., 2000, 2004]. Therefore, ROS signaling, among others, may also mediate perinuclear MTOC activation in angiosperms, probably interfering with the transfer of intranuclear factors, involved in perinuclear MTOCs activation [see Meier and Brkljacic, 2009]. Evidence favoring this idea is the fact that in DPI-treated animal cells Aurora kinase controlling MT polymerization is absent from the centrosome [Scaife, 2004].

Treated mitotic cells of both plants studied presented abnormal spindles, which lacked bipolarity and were unable to arrange and move the chromosomes. The latter can explain, at least partly, the delay of the cell cycle during the metaphase/anaphase transition (Fig. 2b). Similarly to animal DPI-treated cells [Scaife, 2005], in the treated root-tips the abnormal spindles lead to polyploid cell formation. Therefore, ROS levels regulation in dividing cells is crucial for the assembly of mitotic apparatus and the progression of mitosis.

The malfunction of the mitotic apparatus in treated cells is probably due to MT replacement by macrotubules or tubulin paracrystals. In other cases, where the dividing cells possessed such atypical tubulin polymers, comparable abnormalities were found [Frantzios et al., 2000; Komis et al., 2001, 2002]. Therefore, the mechanism controlling mitotic apparatus organization, basic components of which are motor and MT-associated proteins, seems to be unable to organize these atypical tubulin polymers into functional bipolar systems.

Altered ROS Levels Affect Cell Division Progress

In *T. turgidum* root-tips, both low and high ROS levels affected seriously cell division progress. Treatment with ROS modulators delayed the prophase/prometaphase transition and a significant cell number was accumulated in prophase (Fig. 2b). The cell arrest is not limited to the end of prophase. The majority of the dividing cells are prevented to pass through the rest successive cell cycle stages especially from metaphase to anaphase (Fig. 2b), while the exit of treated cells from the cell cycle is also delayed (Fig. 2a). Therefore, ROS modulators, at the concentrations used in this study, seriously affected cell division. Our data are in accordance with previous work in plant and animal cells indicating that ROS imbalance disturbs cell cycle [Reichheld et al., 1999; Scaife, 2004, 2005, 2006].

The delay of the cell cycle at the end of prophase is expressed by the delay of the nuclear envelope breakdown. The latter might be attributed to the possibility that ROS imbalance inhibits the activity of cyclin dependent kinases [Reichheld et al., 1999; Scaife, 2004, 2005]. These kinases phosphorylate the lamin network, triggering nuclear envelope breakdown at the end of prophase [Brandizzi et al., 2004; Evans et al., 2011]. Alternatively, it could be concluded that the effects of ROS modulators on the cytoskeleton are responsible for the delay of the nuclear envelope breakdown. It has been previously supported that the perinuclear MTs may facilitate the nuclear envelope breakdown [Hepler and Hush, 1996]. However, our data cannot support the involvement of the altered MT dynamics induced by ROS imbalance, in the delay of the nuclear envelope breakdown. In our case, the delay occurs regardless the presence or the absence of perinuclear tubulin polymers in the treated late prophase cells. Therefore, it is more probable that ROS imbalance affects directly the mechanism of the nuclear envelope breakdown.

Besides, the prevention of metaphase cells to pass to anaphase may be related to the lack of functional mitotic arrays [see also Frantzios et al., 2000; Komis et al., 2001, 2002]. Finally, treated cells delay to exit cell cycle and this also keeps pace with the delay of the nuclear envelope reconstitution around the daughter nuclei (our unpublished data).

Acknowledgments

The authors thank Prof. Liam Dolan (John Innes Centre, Norwich, UK) for the kind offer of the *rhb2 A. thaliana* seeds, Dr. Andrei Smertenko (University of Durham, Durham, UK) for the offer of the AtMAP65-1 antibody and Mr. N. Apostolakos (Laboratoire d'Astrophysique de Marseille, France) for the algorithm used. They also thank Dr. E. Rigana (Biological Imaging Unit, Foundation of Biomedical Research, Athens, Greece) for the use of the CLSM. This work was financially supported by University of Athens (project Kapodistrias).

References

- Andreeva Z, Barton D, Armour WJ, Li MY, Liao L-F, McKellar HL, Pethybridge KA, Marc J. 2010. Inhibition of phospholipase C disrupts cytoskeletal organization and gravitropic growth in *Arabidopsis* roots. *Planta* 232(5):1263–1279.
- Apostolakos P, Galatis B, Katsaros C, Schnepf E. 1990. Tubulin conformation in microtubule-free cells of *Vigna sinensis*. An immunofluorescence and electron microscope study. *Protoplasma* 154(2–3):132–143.
- Auroma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler G. 1989. The antioxidant action of *n*-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *J Free Radic Biol Med* 6(6):593–597.
- Bailey-Serres J, Mittler R. 2006. The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol* 141(2):311.

- Bolwell GP, Wojtaszek P. 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol* 51(6):347–366.
- Brandizzi F, Irons SL, Evans DE. 2004. The plant nuclear envelope: new prospects for a poorly understood structure. *New Phytol* 163(2):227–246.
- Caperta AD, Delgado M, Ressureição F, Meister A, Jones RN, Viégas W, Houben A. 2006. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. *Protoplasma* 227(2–4):147–153.
- Carol RJ, Dolan L. 2006. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *J Exp Bot* 57(8):1829–1834.
- Coelho SMB, Brownlee C, Bothwell JHF. 2008. A tip-high, Ca^{2+} -interdependent, reactive oxygen species gradient is associated with polarized growth in *Fucus serratus* zygotes. *Planta* 227(5):1037–1046.
- Evans DE, Shvedunova M, Graumann K. 2011. The nuclear envelope in the plant cell cycle: structure, function and regulation. *Ann Bot* 107(7):1111–1118.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422(6930):442–446.
- Frantzios G, Galatis B, Apostolakis P. 2000. Aluminium effects on microtubule organization in dividing root-tip cells of *Triticum turgidum*. I. Mitotic cells. *New Phytol* 145(2):211–224.
- Gapper C, Dolan L. 2006. Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol* 141(2):341–345.
- Giannoutsou EP, Apostolakis P, Galatis B. 2011. Actin filament-organized local cortical endoplasmic reticulum aggregations in developing stomatal complexes of grasses. *Protoplasma* 248(2):373–390.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press. 524 p.
- Hepler PK. 1994. The role of calcium in cell division. *Cell Calcium* 16(4):322–330.
- Hepler PK, Hush JM. 1996. Behavior of microtubules in living plant cells. *Plant Physiol* 112(2):455–461.
- Jiang J, Song C-P. 2008. MEK1/2 and p38-like MAP kinase successively mediate H_2O_2 signaling in *Vicia* guard cell. *Plant Signal Behav* 3(11):996–998.
- Joo JH, Bae YS, Lee JS. 2001. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol* 126(3):1055–1060.
- Karagiannidou Th, Eleftheriou EP, Tsekos I, Galatis B, Apostolakis P. 1995. Colchicine-induced paracrystals in root cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ann Bot* 76(1):23–30.
- Komis G, Apostolakis P, Galatis B. 2001. Altered patterns of tubulin polymerization in dividing leaf cells of *Chlorophyton comosum* after a hyperosmotic treatment. *New Phytol* 149(2):193–207.
- Komis G, Apostolakis P, Galatis B. 2002. Hyperosmotic stress formation of tubulin microtubules in root-tip cells of *Triticum turgidum*: their probable involvement in protoplast volume control. *Plant Cell Physiol* 43(8):911–922.
- Komis G, Apostolakis P, Gaitanaki C, Galatis B. 2004. Hyperosmotically induced accumulation of a phosphorylated p38-like MAPK involved in protoplast volume regulation of plasmolyzed wheat root cells. *FEBS Lett* 573(1–3):168–174.
- Komis G, Quader H, Galatis B, Apostolakis P. 2006. Microtubule-dependent protoplast volume regulation in plasmolysed root-tip cells of *Triticum turgidum*: involvement of phospholipase D. *New Phytol* 171(4):737–750.
- Komis G, Galatis B, Quader H, Galanopoulou D, Apostolakis P. 2008. Phospholipase C signaling involvement in microtubule assembly and activation of the mechanism regulating protoplast volume in plasmolyzed root cells of *Triticum turgidum*. *New Phytol* 178(2):267–282.
- Kwak JM, Nguyen V, Schroeder JI. 2006. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiol* 141(2):323–329.
- Kwiatkowska M, Stępiński D, Popłowska K. 2009. Diameters of microtubules change during rotation of the lipotubuloids of *Ornithogalum umbellatum* stipule epidermis as a result of varying protofilament monomers size and distance between them. *Cell Biol Int* 33(12):1245–1252.
- Lazareva EM, Polyakov VY, Chentsov YS, Smirnova EA. 2003. Time and cell cycle dependent formation of heterogeneous tubulin arrays induced by colchicine in *Triticum aestivum* root meristem. *Cell Biol Int* 27(8):633–646.
- Lee YJ, Yang Z. 2008. Tip growth: signaling in the apical dome. *Curr Opin Plant Biol* 11(6):662–671.
- Liszkay A, van der Zalm E, Schopfer P. 2004. Production of reactive oxygen intermediates ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , and $\cdot\text{OH}$) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol* 136(2):3114–3123.
- Meier I, Brkljacic J. 2009. Adding pieces to the puzzling plant nuclear envelope. *Curr Opin Plant Biol* 12(6):752–759.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 33(4):453–467.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem FV. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9(10):490–498.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant* 15(3):473–497.
- Napier RM, Fowke LC, Hawes C, Lewis M, Pelham HR. 1992. Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 102(2):261–271.
- Panteris E, Komis G, Adamakis IDS, Šamaj J, Bosabalidis AM. 2010. MAP65 in tubulin/colchicine paracrystals of *Vigna sinensis* root cells: possible role in the assembly and stabilization of atypical tubulin polymers. *Cytoskeleton* 67(3):152–160.
- Perdiz D, Mackeh R, Poüs C, Baillet A. 2011. The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell Signal* 23(5):763–771.
- Pitzschke A, Hirt H. 2006. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen signaling in plants. *Plant Physiol* 141(2):351–356.
- Reichheld J-P, Vernoux T, Lardon F, Montagu MV, Inze D. 1999. Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J* 17(6):647–656.
- Rentel MC, Knight MR. 2004. Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135(3):1471–1479.
- Sagi M, Fluhr M. 2006. Production of reactive oxygen species by NADPH oxidases. *Plant Physiol* 141(2):336–340.
- Sandalio LM, Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, del Río LA. 2008. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide in vivo in plant tissues. *Methods Enzymol* 440(25):397–409.
- Sang Y, Cui D, Wang X. 2001. Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126(4):1449–1458.
- Santa-Maria I, Smith MA, Perry G, Hernández F, Avila J, Moreno FJ. 2005. Effect of quinones on microtubule polymerization: a link between oxidative stress and cytoskeletal alterations in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1740(3):472–480.

- Scaife RM. 2004. G2 cell cycle arrest, down-regulation of cyclin B and induction of mitotic catastrophe by the flavoprotein inhibitor diphenyleneiodonium. *Mol Cancer Ther* 3(10):1229–1237.
- Scaife RM. 2005. Selective and irreversible cell cycle arrest by diphenyleneiodonium. *Mol Cancer Ther* 4(6):876–884.
- Scaife RM. 2006. Microtubule disassembly and inhibition of mitosis by a novel synthetic pharmacophore. *J Cell Biochem* 98(1):102–114.
- Schmit A-C. 2002. Acentrosomal microtubule nucleation in higher plants. *Int Rev Cytol* 220:257–289.
- Smertenko AP, Chang HY, Sonobe S, Fenyk SI, Weingartner M, Borge L, Hussey PJ. 2006. Control of the AtMAP65–1 interaction with microtubules through the cell cycle. *J Cell Sci* 119(15):3227–3237.
- Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell H, Kuchitsu K, Dolan L. 2008. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* 319(5867):1241–1244.
- Unger E, Böhm KJ, Vater W. 1990. Structural diversity and dynamics of microtubules and polymorphic tubulin assemblies. *Electron Microsc Rev* 3(2):355–395.
- Vater W, Böhm KJ, Unger E. 1997. Tubulin assembly in the presence of calcium ions and taxol: microtubule bundling and formation of microtubule-ring complexes. *Cell Motil Cytoskel* 36(1):76–83.
- Vaughn KC, Harper JD. 1998. Microtubule-organizing centers and nucleating sites in land plants. *Int Rev Cytol* 181:75–149.
- Vos JW, Pieuchot L, Evrard J-L, Janski N, Bergdoll M, de Ronde D, Perez LH, Sardon T, Vernos I, Schmit A-C. 2008. The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. *Plant Cell* 20(10):2783–2797.
- Yang M, Brown RC, Sack FD. 2011. Diversity of spindle morphology in *Arabidopsis* root-tips. *Plant Signal Behav* 6(1):5–7.
- Yao N, Tada Y, Sakamoto M, Nakayashiki H, Park P, Tosa Y, Mayama S. 2002. Mitochondrial oxidative burst involved in apoptotic response in oats. *Plant J* 30(5):567–579.
- Zachariadis M, Galatis B, Apostolakis P. 2000. Study of mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* treated with the DNA-intercalating agent ethidium bromide. *Protoplasma* 211(3–4):151–164.
- Zachariadis M, Quader H, Galatis B, Apostolakis P. 2001. Endoplasmic reticulum preprophase band in dividing root-tip cells of *Pinus brutia*. *Planta* 213(5):824–827.
- Zachariadis M, Quader H, Galatis B, Apostolakis P. 2004. An inhibitor of the ATP-dependent endoplasmic reticulum Ca^{2+} -pump affects spindle organization in dividing cells of the angiosperm *Triticum turgidum* but not in species of gymnosperms and pteridophytes. *J Biol Res* 2:3–19.
- Zhang W, Wang C, Qin C, Wood T, Olafsdottir G, Welti R, Wang X. 2003. The oleate-stimulated phospholipase D, PLD δ , and phosphatidic acid decrease H_2O_2 -induced cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(10):2285–2295.

Plant cell division

ROS homeostasis is required

Pantelis Livanos, Panagiotis Apostolakos and Basil Galatis*

Department of Botany; Faculty of Biology; University of Athens; Athens, Greece

Keywords: cytokinesis, macrotubules, microtubules, mitosis, reactive oxygen species, ROS signaling, tubulin paracrystals

Abbreviations: DPI, diphenylene iodonium; MAP, microtubule associated protein; MT, microtubule; PA, phosphatidic acid; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PLD, phospholipase D; PPB, preprophase band; ROS, reactive oxygen species; RBOHC, respiratory burst oxidase homolog C; RNS, reactive nitrogen species

Accumulated evidence indicates that ROS fluctuations play a critical role in cell division. Dividing plant cells rapidly respond to them. Experimental disturbance of ROS homeostasis affects: tubulin polymerization; PPB, mitotic spindle and phragmoplast assembly; nuclear envelope dynamics; chromosome separation and movement; cell plate formation. Dividing cells mainly accumulate at prophase and delay in passing through the successive cell division stages. Notably, many dividing root cells of the *rhb2 Arabidopsis thaliana* mutants, lacking the RHD2/AtRBOHC protein function, displayed aberrations, comparable to those induced by low ROS levels. Some protein molecules, playing key roles in signal transduction networks inducing ROS production, participate in cell division. NADPH oxidases and their regulators PLD, PI3K and ROP-GTPases, are involved in MT polymerization and organization. Cellular ROS oscillations function as messages rapidly transmitted through MAPK pathways inducing MAP activation, thus affecting MT dynamics and organization. RNS implication in cell division is also considered.

Reactive oxygen species (ROS) are undesirable byproducts of the aerobic life.¹ The most common between them are: the singlet oxygen, the superoxide anion, the hydroxyl radicals and the hydrogen peroxide. They are produced in several cell compartments, including mitochondria, chloroplasts, peroxisomes, as well as in the apoplast.^{2,3} Plant cells have developed astonishing abilities not only to manage the internal and external sources of ROS via enzymatic and non-enzymatic scavenging mechanisms, but also to use free radicals as signaling molecules.⁴ There is convincing evidence that ROS function as key regulators of plant development. They are implicated in a variety of biological processes such as root-hair and pollen tube growth, hormonal responses and biotic and abiotic stress responses.^{5–7} Moreover, ROS trigger signal transduction pathways and, even more, control gene expression.²

In animal cells, ROS are involved in cell proliferation regulating transition through specific cell cycle checkpoints.⁸ Similarly, plant cell cycle progression depends on redox sensing. ROS are able to modulate the activity of the cyclin dependent kinases.^{9,10} Moreover, apart from acting to protect plant cells from oxidative damage, antioxidants are also implicated in cell cycle control influencing specific cell cycle transitions. During different stages of the cell cycle, the levels of glutathione and ascorbate seem to fluctuate¹¹ along with ROS levels.^{12,13}

Despite the extensive information regarding ROS signaling in cell cycle regulation, the available knowledge on the relationship between ROS and plant cell mitosis and cytokinesis (cell division) is very limited. Plant cell division is performed by specific microtubule (MT) arrays characterized by extensive and continuous reorganization. Recent evidence revealed that ROS homeostasis is critical for plant cell division.¹⁴ In this article, the available knowledge on ROS implication in plant cell division and, particularly, in MT organization is reviewed. Moreover, the roles of proteins, which are key components of ROS signaling processes during plant cell division, are discussed.

ROS Homeostasis and Plant Cell Division

Experimental disturbance of ROS homeostasis in root-tips of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana* deeply affects mitosis¹⁴ and cytokinesis. ROS imbalance caused significant delay in the transition from prophase to prometaphase, interfered with nuclear envelope dynamics, affected prometaphase and anaphase chromosome movement and delayed cell exit from telophase. Cytokinesis was also greatly affected. As a result, multinucleate or polyploid cells were formed. Notably, mitotic and cytokinetic aberrations were found by using menadione, a quinone that induces elevated ROS levels. The aberrations were very similar to

*Correspondence to: Basil Galatis; Email: bgalatis@biol.uoa.gr
Submitted: 04/06/12; Revised: 04/27/12; Accepted: 04/27/12
<http://dx.doi.org/10.4161/psb.20530>

those detected after treatment with diphenylene iodonium (DPI), an inhibitor of NADPH oxidase, and N-acetyl cysteine, a ROS scavenger, which reduces ROS levels. These findings are strongly supported by data derived from the study of dividing root-tip cells of the *rhb2* *A. thaliana* mutants, lacking the function of the RHD2/AtRBOHC protein that is differentially expressed in roots.^{15,16} The *rhb2* plants exhibit short root hairs as well as shorter roots than the wild type.¹⁵ Definite *rhb2* root cell types displayed aberrations comparable to those found after treatment with DPI.¹⁴ Some of them seem to be the outcome of misorganization and malfunction of the tubulin cytoskeleton involved in cell division.

Nuclear envelope dynamics. ROS interference with nuclear envelope dynamics was evidenced by the delayed breakdown of the nuclear envelope at late prophase and its delayed reconstitution at telophase.¹⁴ The affected cells were accumulated at the end of prophase, while their transition to prometaphase was highly delayed or even prevented. It is well known that cyclin dependent kinases are involved in phosphorylation of the lamin network, thus triggering nuclear envelope breakdown.¹⁷ Relying on the above and on ROS interference with the activity of cyclin dependent kinases,⁹ the nuclear envelope persistence in late prophase plant cells affected by ROS modulators, can be correlated with lamin malfunction induced by ROS imbalance. Recently, it has been also found that in animal cells oxidative stress induces lamin accumulation.¹⁸

Alternatively, it must be considered that ROS homeostasis interferes with Ca^{2+} homeostasis¹⁵ and that nuclear envelope disintegration and reconstitution require definite local Ca^{2+} oscillations.¹⁹ Therefore, it might be suggested that the aberrant nuclear envelope behavior is caused by the imbalance of cytoplasmic Ca^{2+} homeostasis that is induced by loss of ROS homeostasis. ROS can activate Ca^{2+} channels in roots,¹⁵ while oxidative stress is accompanied by Ca^{2+} release in cytosol.²⁰

Organization of tubulin cytoskeleton. ROS imbalance causes multiple effects on tubulin cytoskeleton in dividing root-tip cells,¹⁴ which are structurally expressed as follows: (1) Preprophase band (PPB) formation was prevented in many preprophase/prophase cells, while when it was present it was appeared highly aberrant, consisting of atypical tubulin polymers. (2) The perinuclear tubulin polymer formation in prophase cells was inhibited. In case of their presence, they failed to assemble a bipolar prophase spindle. (3) The metaphase and anaphase spindle organization was also perturbed. These mitotic spindles displayed tubulin strands randomly oriented incapable to form bipolar systems. (4) The phragmoplast, made of atypical tubulin polymers, was aberrant, and its expansion toward cell cortex was delayed (Fig. 1C; cf. Fig. 1A). Consequently, in many affected cytokinetic cells the cell plate was absent or highly atypical (Fig. 1D; cf. Fig. 1B). Abnormalities in spindle and phragmoplast organization may be attributed to the replacement of MTs by atypical tubulin polymers.¹⁴ A more detailed discussion on atypical tubulin polymer formation upon ROS imbalance is presented below.

Concerning the absence of perinuclear tubulin polymers in prophase cells, it might be suggested that the perinuclear MT-organizing center activation is affected by the presence of ROS

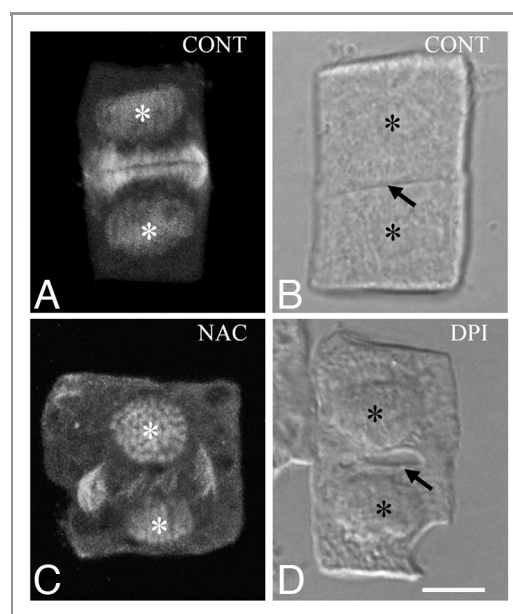


Figure 1. Cytokinetic control (A and B) and treated with ROS modulators (C and D) *T. turgidum* root-tip cells as they appear after tubulin immunolabeling (A and C) and DIC optics (B and D). The asterisks mark the daughter nuclei and the arrows point to cell plates. Aberrant phragmoplast expansion follows treatment with N-acetyl cysteine (C; cf. A), while a dilated cell plate (D; cf. B) forms in the presence of diphenylene iodonium. Treatments: (C) NAC 250 μM , 1 h; (D) DPI 25 μM , 1 h. Bar: 10 μm .

modulators. AtTPX2 is a protein, which seems to be implicated in the perinuclear MT-organizing center activation. It is believed that, after its transport from nucleus into cytoplasm, this protein is phosphorylated by aurora kinases.²¹ In animal cells, ROS are implicated in the activation of the α -aurora kinase. The phosphorylated form of this kinase is absent from the centrosome of DPI treated animal cells.^{22,23} Then, it may be extrapolated that cells affected by ROS modulators aurora kinases fail in phosphorylating the AtTPX2 protein. In *A. thaliana*, α -aurora kinases have been also implicated in the determination of the cell division plane.²⁴ Therefore, ROS imbalance, modifying the activity of aurora kinases, might prevent PPB formation in many affected cells.

Chromosome movement. ROS modulators interfere with the metaphase chromosome alignment on the equatorial spindle plane as well as with the anaphase chromosome movement.¹⁴ This may be due to the inability of the affected cells to assemble functional spindles and to inhibition of chromatid separation. Besides, the latter process depends on the action of proteases named separases. Prior to chromatid segregation, separases are bound to a small protein, the securin that inhibits their action. The anaphase promoting complex is responsible for the liberation of separases, which cleave the cohesin complex holding daughter chromatids together.^{25,26} The function of separases is well known in dividing animal cells, whereas recent data indicate their participation in plant cell division.^{26,27} In animal cells, ROS overproduction prevents the anaphase chromosome separation. Treatment with

hydrogen peroxide inhibits anaphase promoting complex and subsequently blocks the separase-securin disassociation, delaying cell cycle progress.²⁵ Moreover, in animal as well as in plant cells aurora kinase is implicated in chromosome segregation.²⁸ At least in animal cells experiencing low ROS levels, α -aurora kinase expression is affected.^{22,23} Besides, the assembly of non-functional mitotic spindles and phragmoplasts can be explained by the presence of atypical tubulin polymers, which is induced by the loss of ROS homeostasis.¹⁴ Macrotubules (tubulin tubules exhibiting diameter greater than that of MTs) form in low ROS levels and tubulin paracrystals in elevated ones (see below).

Imbalanced ROS Levels and Atypical Tubulin Polymer Formation

In animal cells, the loss of ROS homeostasis affects MT cytoskeleton. Treatment of Rat1 fibroblasts with DPI, which leads to low ROS production, caused disassembly of tyrosinated MTs and their replacement by detyrosinated ones.²⁹ Besides, oxidative stress applied on human cortical neuron cell lines, induced MT loss, which was followed by MT rearrangement.³⁰

In plants, the first information on the functional relationship between ROS and MT cytoskeleton was derived from the study of cellular responses to biotic or abiotic stress. Salinity stress followed by ROS overproduction³¹ led to MT depolymerization and subsequently to MT reorganization, which is probably required in order for cells to withstand salt stress.³² Furthermore, *Verticillium dahliae* toxins applied on *A. thaliana* leaves induced a rapid increase of ROS levels, which in turn resulted in MT disruption.³³ Interestingly, treatment of *A. thaliana* leaves with DPI that reduces ROS levels alleviates the effects of *V. dahliae* toxins on the MT cytoskeleton. In addition, Nick³⁴ noted that biotic stress perception depends on MTs and is also mediated by RBOHC (respiratory burst oxidase homolog), the plant homolog of the NADPH oxidase that upon activation catalyzes ROS production in the apoplast.

In dividing plant cells, the serious effects of the experimentally induced ROS homeostasis disruption on MT cytoskeleton were monitored in root-tip cells of the angiosperms *T. turgidum* and *A. thaliana*.¹⁴ Under either low or increased ROS levels, MTs coexisted with atypical tubulin polymers. In DPI and N-acetyl cysteine treated cells, the majority of tubulin polymers were macrotubules, while in menadione treated cells, tubulin cytoskeleton was mainly consisted of tubulin paracrystals.¹⁴ Unlikely, the oxidative stress induced by hydrogen peroxide mimics the effects of DPI. In root-tip cells of *T. turgidum*, treatment with hydrogen peroxide resulted in replacement of MTs by tubulin strands (Fig. 2A; cf. Fig. 2B) similar to those observed in DPI treated cells (Fig. 2B; cf. Fig. 2C). This may be attributed to the mode by which hydrogen peroxide exerts its function. Contrary to other oxidative stress generators,³⁵ the exogenously applied hydrogen

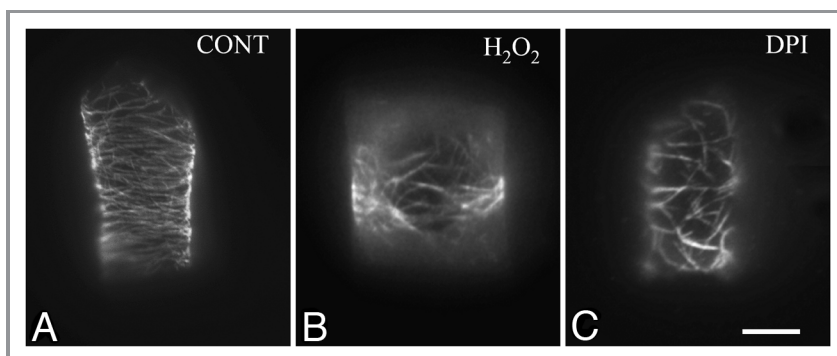


Figure 2. Control (A) and treated with hydrogen peroxide (B) and diphenylene iodonium (DPI) (C) *T. turgidum* root-tip cells as they appear after tubulin immunolabeling. The effects of hydrogen peroxide treatment on tubulin cytoskeleton (B; cf. A) are comparable to those induced by DPI (C; cf. B). Treatments: (B) H_2O_2 4 mM, 1 h; (C) DPI 25 μ M, 1 h. Bar: 10 μ m.

peroxide mainly accumulates in the apoplast and diffuses into cytoplasm through the plasma membrane.³⁶

Western blotting analysis showed that loss of ROS homeostasis disturbs the levels of α -tubulin in roots of *T. turgidum*. Treatment with DPI, N-acetyl cysteine and hydrogen peroxide caused increase of α -tubulin levels, while on the contrary menadione treatment resulted in reduced α -tubulin levels (Fig. 3). This implies a direct effect of increased free radicals on α -tubulin (see also ref. 30). Similarly, the oxidative stress generated by quinones in human brain cell extracts reduced significantly the levels of β -tubulin.³⁷

Moreover, immunoblotting revealed that treatment of roots with ROS modulators induces α -tubulin acetylation as well as a slight decrease of the tyrosinated α -tubulin levels (Fig. 3). Since acetylated tubulin is absent from the control roots (Fig. 3), it might be suggested that macrotubules and tubulin paracrystals consist of or contain acetylated tubulin. These data strengthen previous ones derived by indirect immunofluorescence, which showed the presence of acetylated tubulin in the atypical tubulin polymers.¹⁴ During oxidative stress, tubulin acetylation may

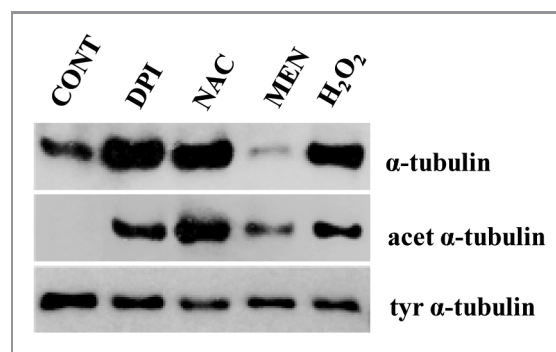


Figure 3. Western blot analysis of α -tubulin, acetylated and tyrosinated α -tubulin levels after treatment of *T. turgidum* roots with ROS modulators for 1 h. Twenty micrograms of total protein extract were loaded per well in every case. Protein amount was assessed with Bradford reagent (CONT, dH_2O ; DPI, diphenylene iodonium 25 μ M; NAC, N-acetyl cysteine 250 μ M; MEN, menadione 25 μ M; H_2O_2 4 mM).

represent a cell response, necessary to protect tubulin from the elevated ROS levels.

As far as MT disappearance associated with the disturbance of ROS homeostasis is concerned, several hypotheses can be formulated. Thus, the increased ROS levels may lead to direct MT disruption through: (A) elevation of Ca^{2+} levels,^{14,32} (B) oxidative modifications of tubulin,³⁷ and/or (C) inactivation of MT-associated proteins (MAPs).³³ However, the possibility that low ROS levels induce MT disintegration by interference with MT dynamic instability cannot be also excluded.¹⁴ It has been supported that DPI destructs the unstable MTs of Rat1 fibroblasts by uncoupling their minus end from centrosome, thus triggering MT disintegration.²⁹

Signaling Mechanisms Inducing ROS Production: The Crucial Role of the NADPH Oxidase

Ca^{2+} levels have been implicated in the activation of NADPH oxidases,¹⁶ enzymes playing a key role in ROS signaling. They are considered as enzymes involved in “deliberating” ROS production.³⁸ These membrane-bound enzymes transfer electrons from NADPH to molecular oxygen generating superoxide anions in the apoplast. Superoxide anions could react with H_2O to produce hydrogen peroxide.³⁹ Several indications suggest that ROS production catalyzed by NADPH oxidase influences MT organization. Some of the protein molecules involved in regulation of the NADPH oxidases have been also implicated in MT organization. Among others, proteins that activate NADPH oxidases are phospholipase D (PLD), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and ROP-GTPases. A similar model describing the control of the actin cytoskeleton in root-hair tip growth has already been proposed by Samaj et al.⁴⁰ The role of these proteins during cell division is discussed below.

Direct evidence, which favors the idea that ROS production by NADPH oxidases is important for the organization of tubulin cytoskeleton and cell division, has been derived from the study of dividing root-tip cells of the *rhd2-5* and *rhd2-6* *A. thaliana* mutants.¹⁴ They lack the RBOHC, one of the ten *A. thaliana* NADPH oxidases, which is differentially expressed in roots.¹⁶ Specific root cell types of these mutants, i.e., root-hairs, rhizodermal and endodermal cells, exhibited arrays of tubulin polymers consisted of macrotubules and MTs. The percentage of macrotubules varied among different root cell types,¹⁴ but the pattern of their appearance was in accordance with the pattern of expression of the RHD2 protein in control *A. thaliana* roots.¹⁵ The tubulin cytoskeleton defects displayed by these mutants can be safely attributed to the lack of the NADPH oxidase RBOHC and explain the mitotic¹⁴ and cytokinetic disorders (Fig. 4D; cf. Fig. 4A) found in many cells. This strengthens findings obtained after treatment of root-tip cells with DPI and shows that the disturbance of the tubulin cytoskeleton is due to the reduction of ROS production.

Phospholipase D. PLDs are membrane phosphodiesterases involved in ROS responses. They also trigger ROS production.⁴¹ In guard cells, PLD α 1 generates phosphatidic acid (PA) in response to abscisic acid and contributes to ROS mediated

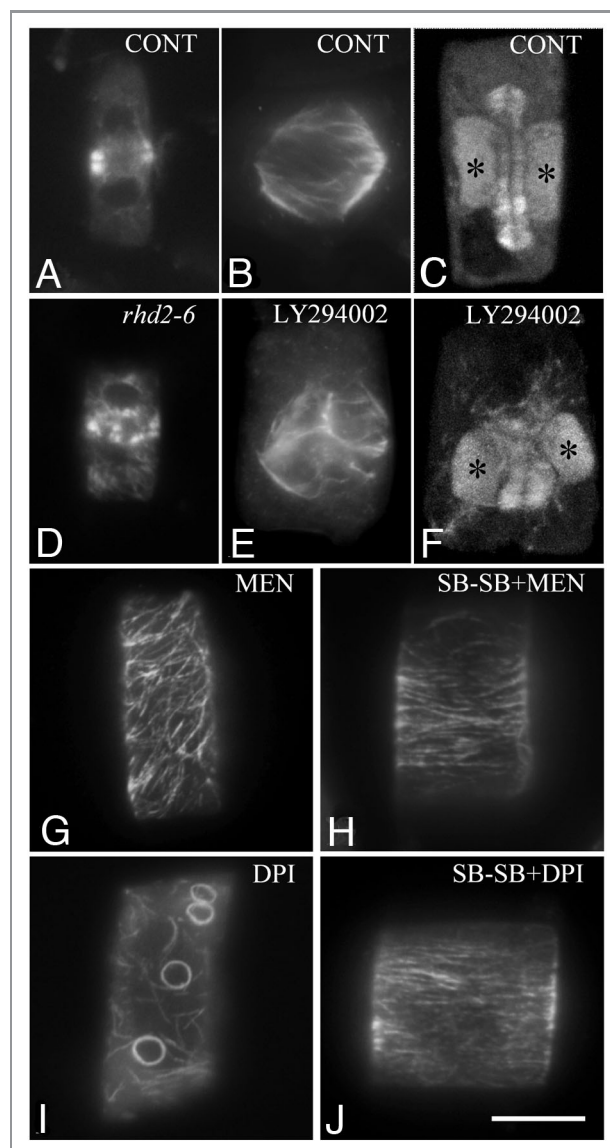


Figure 4. *A. thaliana* (A and D) and *T. turgidum* (B, C and E–J) root-tip cells as they appear after tubulin immunolocalization. (A and D) Cytokinetic cells from wild type (A) and *rhd2-6* (D) *A. thaliana* roots. Note the differences in phragmoplast organization. (B, C, E and F) Prometaphase (B and E) and cytokinetic (C and F) control (B and C) and treated cells with the specific inhibitor of PI3K LY294002 (E and F). The asterisks mark the daughter nuclei. Treatment: LY294002 50 μM , 2 h. (G and I) Atypical tubulin polymers appeared in cells after treatment with ROS modulators (compare Fig. 2A). Treatments: (G) MEN, menadione 25 μM , 1 h; (I) DPI, diphenylene iodonium 25 μM , 1 h. (H and J) The intensity of atypical tubulin polymer formation is clearly alleviated in the presence of the p38 MAPK specific inhibitor SB203580 (compare G and I). Treatments: (H) SB 10 μM , 30 min + SB plus MEN 25 μM , 1 h; (J) SB 10 μM , 30 min + SB plus DPI 25 μM , 1 h. Bar: 10 μM .

stomatal closure.⁴² PA activates the main NADPH oxidases of guard cells, RBOHD and RBOHF. Moreover, PA binds directly to RBOHs resulting in their activation.^{38,42} Besides, a significant amount of experimental work shows that, in plant cells, PA levels affect MT organization. For example, 1-butanol, which functions

as substrate of PLD and results in inhibition of PLD derived PA production, disrupts MT arrays and blocks cell division in *Silvetia compressa* zygotes.⁴³ In addition, 1-butanol induces extensive MT depolymerization in BY-2 cells and *A. thaliana* seedlings^{44,45} and affects tubulin cytoskeleton in plasmolyzed root-tip cells of *T. turgidum*.⁴⁶ Therefore, it is tempting to suggest that PLD, among others, influences tubulin cytoskeleton, via the NADPH oxidase dependent ROS generation.

Phosphatidylinositol 3-kinase. Phosphatidylinositol 3-phosphate is a phosphoinositide generated by PI3K, which is involved in ROS production.⁴⁷ In animal cells, phosphatidylinositol 3-phosphate seems to stimulate ROS production by direct binding to the PX domain of the NADPH oxidase.⁴⁸ In plants, this enzyme is required for root-hair growth. PI3K inhibition by its specific inhibitor LY294002 prevented tip growth in root-hairs and simultaneously reduced ROS production.⁴⁹ However, RBOHC is required exclusively for ROS generation at the onset of root-hair elongation. Other ROS generators seem to be implicated in PI3K induced ROS production at the late stages of root-hair elongation.⁴⁹

Treatment of *T. turgidum* and *A. thaliana* root-tips with LY294002 disturbed the organization of tubulin cytoskeleton (Fig. 4E and F; cf. Fig. 4B and C) and seriously affected cell division. The effects were very similar to those recorded after DPI treatment. These findings allow the hypothesis that ROS generation, which is stimulated by the action of PI3K in dividing cells, participates in ROS homeostasis mechanisms. However, at present we are not in position to estimate RBOHC contribution in ROS production driven by PI3K.

Rho-related proteins. In plants, the ROP-GTPases seem to function as molecular rheostats in sensing oxygen deprivation.⁵⁰ These proteins are involved in RBOH activation. For example, in rice NADPH oxidase activation is mediated by binding to Rac GTPase.⁵¹ On the other hand, kinesins and MAPs are considered as effector molecules of Rho-related GTPases, thus regulating MT organization and dynamics.^{52,53} However, it remains unclear whether cytoskeleton signaling via ROP-GTPases includes ROS signaling (see also ref. 52).

ROS Signaling Transduction, Organization of Tubulin Cytoskeleton and Cell Division

MAPs. Recent data suggest that MAP65 is involved in the formation of atypical tubulin polymers induced by ROS modulators.¹⁴ Immunolocalization of MAP65-1 proteins in *A. thaliana* root-tips revealed the presence of MAP65-1 on microtubules and in tubulin paracrystals. Moreover, MAP65 proteins participate in the assembly of tubulin paracrystals formed after colchicine treatment.⁵⁴ MAP65 is activated after phosphorylation by MPK4 and MPK6. MPK4 and MPK6 are key components in ROS signaling transduction.⁵⁵ Therefore, it might be suggested that MAP65 activation is regulated, at least in part by ROS levels, to promote MT-bundling in normal conditions and the atypical tubulin polymer formation under disturbed ROS levels. Consequently, this protein seems to respond to changes of MAPK signaling induced by ROS levels.

MAPKs. MPK4 is a MAPK involved in abiotic signal perception and its action as ROS responsive MAPK has been well appreciated.⁵⁵ In addition, MPK4 co-localized with MT arrays in *A. thaliana* root cells in a pattern similar to that of MAP65-1.⁵⁶ MPK4 plays a role in the transition from mitosis to cytokinesis, whereas the *mpk4* mutant exhibits aberrant spindles and phragmoplasts.⁵⁷ Therefore, MPK4, apart from the abiotic signal transduction, appears to be implicated in sensing alterations in ROS levels as well as in the regulation of MT organization during plant cell division. MPK4 activation depends on its phosphorylation by MEKK1. This MAPKKK is involved in the expression of numerous genes implicated in cellular redox control.⁵⁸ Relation between MEKK1 and MPK4 dependent MT regulation has been recently described.⁵⁹

In animal cells, the p38 MAPK is a stress responsive MAPK, which is upregulated under oxidative stress and downregulated when ROS levels decrease.^{60,61} A p46 MAPK, displaying immunological and pharmacological properties similar to those of the p38 MAPK, is activated in plants experiencing osmotic stress. Its phosphorylation seems to induce changes in tubulin cytoskeleton under hyperosmotic conditions, stimulating microtubule formation.⁶² Considering that under disturbed ROS levels the root-tip cells assemble atypical tubulin polymers,¹⁴ it was investigated whether the p38-like kinase (p46 MAPK) is involved in the formation of these tubulin polymers.

In this direction, the specific p38 MAPK inhibitor SB203580 was applied together with drugs creating oxidative stress on *T. turgidum* roots. In presence of the inhibitor, the intensity of the atypical tubulin polymer appearance was alleviated (Fig. 4H; cf. Fig. 4G). This is in accordance with the hypothesis that p38 like MAPK is activated in plants experiencing oxidative stress and mediates the formation of atypical tubulin polymers, probably to prevent tubulin damage by oxidative modification.¹⁴ Moreover, application of the SB203580 together with DPI or N-acetyl cysteine also seemed to alleviate atypical tubulin polymer assembly in root-tip cells (Fig. 4J; cf. Fig. 4I). Therefore, in cells treated with ROS modulators in the presence of the p38 MAPK inhibitor, the organization of the tubulin cytoskeleton is comparable to that of the untreated cells (Figs. 4H and J; cf. Fig. 2A). This was not expected since p38 kinase, at least in animal cells, is activated under oxidative stress and is down-regulated under low ROS levels.^{60,61}

Reactive Nitrogen Species

Emerging evidence reveals that apart from ROS, the reactive nitrogen species (RNS) play a particular role in cell cycle regulation.^{63,64} In several cases, ROS act cooperatively with RNS to stimulate responses through the same signaling cascades.⁶⁵ They can also co-interact, e.g., nitric oxide anion can interact with superoxide anion to form peroxynitrite.⁶⁶ Nitric oxide is produced by non enzymatic mechanisms in the apoplast or inside the cells by the activation of nitric oxide synthase putative enzymes.⁶⁷ RNS are produced simultaneously with ROS in biotic or abiotic stress conditions. The role of RNS in MT cytoskeleton has been recently reviewed.⁶⁸ As in the case of ROS, nitric oxide also

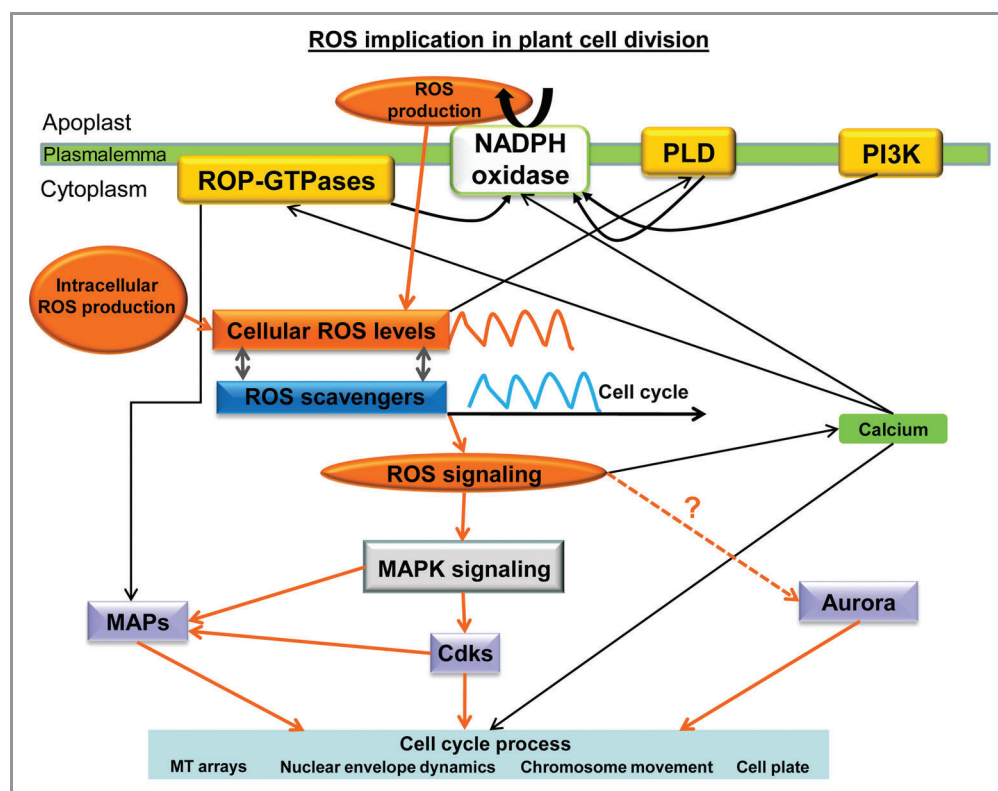


Figure 5. Simplified diagram describing probable routes of ROS implication in cell division. Abbreviations used: Aurora, Aurora kinases; Cdks, cyclin dependent kinases; MAPs, microtubule associated proteins; MAPK, mitogen activated protein kinase; NADPH oxidase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PLD, phospholipase D; ROP-GTPases, rho-related GTPases of plants; ROS, reactive oxygen species

induces tubulin post transcriptional modifications (tyrosine nitration). Nitric oxide donors and scavengers regulate MT organization. In particular, RNS homeostasis seems to be critical for the proper cortical MT formation. Therefore, studies concerning ROS, MT organization and cell division should also consider RNS involvement in the future.

Conclusion and Future Perspectives

ROS signaling triggered “a new wave” of research in plant cells.⁴ Among others, information accumulated so far allow the hypothesis that ROS are molecules functioning as signaling components during cell division, through complex signaling pathways. The fluctuations of oxidants and antioxidants during cell division¹¹⁻¹³ support ROS implication in this process, while ROS imbalance induces formation of atypical tubulin polymers.¹⁴

ROS production seems to be induced by environmental, hormonal or other intercellular signals. NADPH oxidase releases ROS in the apoplast that enter into the cytoplasm. ROS production by NADPH oxidases is triggered by PLD, PI3K or ROP-GTPases. Intracellular ROS level oscillations keep pace with respective antioxidant oscillations. Subsequently, ROS acting as signaling molecules contribute to the establishment of Ca^{2+} gradients and participate in the control of regulatory proteins such as cyclin dependent kinases, MAPs and possibly aurora kinases. Thus, ROS are implicated in the regulation of cell cycle

progress, organization of MT arrays, nuclear envelope dynamics and cell plate formation (Fig. 5).

However, further work is needed to elucidate what exactly ROS do and how. Particular attention should also be paid to identify the role of each type of ROS in cell division, the sites of their production, as well as their targets. In this direction, examination of MT organization in mutants lacking proteins involved in ROS production and scavenging would also improve the existing knowledge on the relation between ROS and plant cell division. Moreover, further transcriptome and proteome analysis under conditions creating low or elevated ROS levels would reveal missing links in the effects of ROS on MTs, whereas analysis using oxyblot technique could show oxidative modifications in several proteins induced by ROS. In any case, experiments with ROS modulators should be carefully interpreted, since ROS imbalance may cause cell damage.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We are grateful to Dr H. Quader (Biocenter Klein Flottbek, University of Hamburg, Hamburg, Germany) for the kind offer of the LY294002. The present study was financed by the University of Athens.

References

- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 2004; 9:490-8; PMID:15465684; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 2004; 55:373-99; PMID:15377225; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Møller IM, Sweetlove LJ. ROS signalling—specificity is required. *Trends Plant Sci* 2010; 15:370-4; PMID:20605736; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.008>
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandeputte K, et al. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci* 2011; 16:300-9; PMID:21482172; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>
- Miller G, Shulaev V, Mittler R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol Plant* 2008; 133:481-9; PMID:18346071; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x>
- Swanson S, Gilroy S. ROS in plant development. *Physiol Plant* 2010; 138:384-92; PMID:19947976; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01313.x>
- Torres MA. ROS in biotic interactions. *Physiol Plant* 2010; 138:414-29; PMID:20002601; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x>
- Burhans WC, Heintz NH. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med* 2009; 47:1282-93; PMID:19486941; <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.026>
- Reichheld J-P, Vernoux T, Lardon F, Van Montagu M, Inzé D. Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J* 1999; 17:647-56; <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00413.x>
- Fehér A, Otvös K, Pasternak TP, Szendner AP. The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G_0 -to- G_1 transition) of plant cells. *Plant Signal Behav* 2008; 3:823-6; PMID:19704510; <http://dx.doi.org/10.4161/psb.3.10.5908>
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol Biochem* 2002; 40:537-48; [http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01414-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01414-6)
- Menon SG, Goswami PC. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* 2007; 26:1101-9; PMID:16924237; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209895>
- Vivancos PD, Dong Y, Ziegler K, Markovic J, Pallardó FV, Pellny TK, et al. Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole-cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. *Plant J* 2010; 64:825-38; PMID:21105929; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04371.x>
- Livanos P, Galatis B, Quader H, Apostolakis P. Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces atypical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2012; 69:1-21; PMID:21976360; <http://dx.doi.org/10.1002/cm.20538>
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 2003; 422:442-6; PMID:12660786; <http://dx.doi.org/10.1038/nature01485>
- Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell E, Kuchitsu K, Dolan L. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* 2008; 319:1241-4; PMID:18309082; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1152505>
- Evans DE, Shvedunova M, Graumann K. The nuclear envelope in the plant cell cycle: structure, function and regulation. *Ann Bot* 2011; 107:1111-8; PMID:21239406; <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcq268>
- Barascu A, Le Chalony C, Pennarun G, Genet D, Imam N, Lopez B, et al. Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B₁ accumulation. *EMBO J* 2012; 31:1080-94; PMID:22246186; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.492>
- Hepler PK. The role of calcium in cell division. *Cell Calcium* 1994; 16:322-30; PMID:7820852; [http://dx.doi.org/10.1016/0143-4160\(94\)90096-5](http://dx.doi.org/10.1016/0143-4160(94)90096-5)
- Rentel MC, Knight MR. Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2004; 135:1471-9; PMID:15247375; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.042663>
- Vos JW, Pieuchot L, Evrad J-L, Janski N, Bergdoll M, de Ronde D, et al. The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. *Plant Cell* 2008; 20:2783-97; PMID:18941054; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.056796>
- Scaife RM. G₂ cell cycle arrest, down-regulation of cyclin B, and induction of mitotic catastrophe by the flavoprotein inhibitor diphenyleneiodonium. *Mol Cancer Ther* 2004; 3:1229-37; PMID:15486190
- Scaife RM. Selective and irreversible cell cycle inhibition by diphenyleneiodonium. *Mol Cancer Ther* 2005; 4:876-84; PMID:15956245; <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0009>
- Van Damme D, De Rybel B, Gudesblat G, Demidov D, Grunewald W, De Smet I, et al. *Arabidopsis* α Aurora kinases function in formative cell division plane orientation. *Plant Cell* 2011; 23:4013-24; PMID:22045917; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.089565>
- Chang T-S, Jeong W, Lee D-Y, Cho C-S, Rhee SG. The RING-H2-finger protein APC11 as a target of hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 2004; 37:521-30; PMID:15256223; <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.006>
- Wu S, Scheible W-R, Schindelasch D, Van Den Daele H, De Veylder L, Baskin TI. A conditional mutation in *Arabidopsis thaliana* separase induces chromosome non-disjunction, aberrant morphogenesis and cyclin B1:1 stability. *Development* 2010; 137:953-61; PMID:20150278; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.041939>
- Moschou PN, Bozhkov PV. Separases: biochemistry and function. *Physiol Plant* 2012; 145:67-76; PMID:22121979; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01550.x>
- Kurihara D, Matsunaga S, Uchiyama S, Fukui K. Live cell imaging reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant Cell Physiol* 2008; 49:1256-61; PMID:18593743; <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcn098>
- Scaife RM. Microtubule disassembly and inhibition of mitosis by a novel synthetic pharmacophore. *J Cell Biochem* 2006; 98:102-14; PMID:16365878; <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.20758>
- Allani PK, Sum T, Bhansali SG, Mukherjee SK, Sonce M. A comparative study of the effect of oxidative stress on the cytoskeleton in human cortical neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 196:29-36; PMID:15050405; <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2003.12.010>
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 2010; 33:453-67; PMID:19712065; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Wang C, Li J, Yuan M. Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2007; 48:1534-47; PMID:17906320; <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcm123>
- Yao L-L, Zhou Q, Pei B-L, Li Y-Z. Hydrogen peroxide modulates the dynamic microtubule cytoskeleton during the defence responses to *Verticillium dahliae* toxins in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 2011; 34:1586-98; PMID:21707649; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02356.x>
- Nick P. Microtubules and the tax payer. *Protoplasma* 2011; doi: 10.1007/s00709-011-0339-5.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press 1989.
- Wan X-Y, Liu J-Y. Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7:1469-88; PMID:18407957; <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M700488-MCP200>
- Santa-Maria I, Smith MA, Perry G, Hernández F, Avila J, Moreno FJ. Effect of quinones on microtubule polymerization: a link between oxidative stress and cytoskeletal alterations in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740:472-80.
- Marino D, Dunand C, Puppo A, Pauly N. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci* 2012; 17:9-15; PMID:22037416; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2011.10.001>
- Sagi M, Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol* 2006; 141:336-40; PMID:16760484; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.078089>
- Šamaj J, Baluška F, Menzel D. New signalling molecules regulating root hair tip growth. *Trends Plant Sci* 2004; 9:217-20; PMID:15130546; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.008>
- Zhang W, Yu L, Zhang Y, Zhang X. Phospholipase D in the signaling networks of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1736:1-9.
- Zhang Y, Zhu H, Zhang Q, Li M, Yan M, Wang R, et al. Phospholipase D α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2009; 21:2357-77; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.108.062992>
- Peters NT, Logan KO, Miller AC, Kropf DL. Phospholipase D signaling regulates microtubule organization in the fucoid alga *Silvetia compressa*. *Plant Cell Physiol* 2007; 48:1764-74; PMID:17967797; <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcm149>
- Hirase A, Hamada T, Itoh TJ, Shimmen T, Sonobe S. n-Butanol induces depolymerization of microtubules in vivo and in vitro. *Plant Cell Physiol* 2006; 47:1004-9; PMID:16699178; <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcj055>
- Motes CM, Pechter P, Yoo CM, Wang Y-S, Chapman KD, Blancaflor EB. Differential effects of two phospholipase D inhibitors, 1-butanol and N-acyl ethanolamine, on in vivo cytoskeletal organization and *Arabidopsis* seedling growth. *Protoplasma* 2005; 226:109-23; PMID:16333570; <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-005-0124-4>
- Komis G, Quader H, Galatis B, Apostolakis P. Microtubule-dependent protoplast volume regulation in plasmolysed root-tip cells of *Triticum turgidum*: involvement of phospholipase D. *New Phytol* 2006; 171:737-50; PMID:16918545; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01784.x>
- Joo JH, Yoo HJ, Hwang I, Lee JS, Nam KH, Bae YS. Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Lett* 2005; 579:1243-8; PMID:15710420; <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.018>

48. Ellson CD, Gobert-Gosse S, Anderson KE, Davidson K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40^(phox). *Nat Cell Biol* 2001; 3:679-82; PMID:11433301; <http://dx.doi.org/10.1038/35083076>
49. Lee Y, Bak G, Choi Y, Chuang W-I, Cho H-T, Lee Y. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in root hair growth. *Plant Physiol* 2008; 147:624-35; PMID:18408046; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.117341>
50. Nibau C, Wu HM, Cheung AY. RAC/ROP GTPases: 'hubs' for signal integration and diversification in plants. *Trends Plant Sci* 2006; 11:309-15; PMID:16737841; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2006.04.003>
51. Wong HL, Pinontoan R, Hayashi K, Tabata R, Yaeno T, Hasegawa K, et al. Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell* 2007; 19:4022-34; PMID:18156215; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.055624>
52. Fu Y. ROP GTPases and the cytoskeleton. In: Yalovsky S, Baluška F, Jones A. eds. *Integrated G proteins signaling in plants*. Springer-Verlag Heidelberg 2010; 91-104.
53. Mucha E, Fricke I, Schaefer A, Wittinghofer A, Berken A. Rho proteins of plants—functional cycle and regulation of cytoskeletal dynamics. *Eur J Cell Biol* 2011; 90:934-43; PMID:21277045; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.11.009>
54. Panteris E, Komis G, Adamakis I-DS, Šamaj J, Bosabalidis AM. MAP65 in tubulin/colchicine paracrystals of *Vigna sinensis* root cells: possible role in the assembly and stabilization of atypical tubulin polymers. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010; 67:152-60; PMID:20217678
55. Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2010; 61:621-49; PMID:20441529; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112252>
56. Beck M, Komis G, Müller J, Menzel D, Šamaj J. *Arabidopsis* homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *Plant Cell* 2010; 22:755-71; PMID:20215588; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.109.071746>
57. Beck M, Komis G, Ziemann A, Menzel D, Šamaj J. Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 2011; 189:1069-83; PMID:21155826; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03565.x>
58. Nakagami H, Soukupová H, Schikora A, Zárský V, Hirt H. A Mitogen-activated protein kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2006; 281:38697-704; PMID:17043356; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M605293200>
59. Komis G, Illés P, Beck M, Šamaj J. Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol* 2011; 14:1-8; PMID:21144795; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2011.07.008>
60. Kurata S-i. Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *J Biol Chem* 2000; 275:23413-6; PMID:10856288; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C000308200>
61. Gaitanaki C, Papatriantafyllou M, Stathopoulou K, Beis I. Effects of various oxidants and antioxidants on the p38-MAPK signalling pathway in the perfused amphibian heart. *Mol Cell Biochem* 2006; 291:107-17; PMID:16710743; <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-006-9203-x>
62. Komis G, Apostolakis P, Gaitanaki C, Galatis B. Hyperosmotically induced accumulation of a phosphorylated p38-like MAPK involved in protoplast volume regulation of plasmolyzed wheat root cells. *FEBS Lett* 2004; 573:168-74; PMID:15327993; <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.065>
63. Ötvös K, Pasternak TP, Miskolczi P, Domoki M, Dorjgotov D, Szűcs A, et al. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J* 2005; 43:849-60; PMID:16146524; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02494.x>
64. Correa-Aragunde N, Graziano M, Chevalier C, Lamattina L. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J Exp Bot* 2006; 57:581-8; PMID:16410257; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erj045>
65. Molassiotis A, Fotopoulos V. Oxidative and nitrosative signaling in plants: two branches in the same tree? *Plant Signal Behav* 2011; 6:210-4; PMID:21325889; <http://dx.doi.org/10.4161/psb.6.2.14878>
66. Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF. NO synthesis and signaling in plants—where do we stand? *Physiol Plant* 2010; 138:372-83; PMID:19912564; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01308.x>
67. Stöhr C, Stremlau S. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J Exp Bot* 2006; 57:463-70; PMID:16356940; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erj058>
68. Yemets AI, Krasylenko YA, Lytvyn DI, Sheremet YA, Blume YB. Nitric oxide signalling via cytoskeleton in plants. *Plant Sci* 2011; 181:545-54; PMID:21893251; <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.017>

Original Article

Phosphorylation of a p38-like MAPK is involved in sensing cellular redox state and drives atypical tubulin polymer assembly in angiosperms

Pantelis Livanos¹, Basil Galatis¹, Catherine Gaitanaki² & Panagiotis Apostolakos¹

Departments of ¹Botany, and ²Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Athens, Athens 15784, Greece

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) imbalance is a stressful condition for plant cells accompanied by dramatic changes in tubulin cytoskeleton. Here, evidence is provided that alterations in ROS levels directly interfere with the phosphorylation state of a p38-like MAPK in the angiosperms *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*. Both oxidative stress generators and chemicals inducing ROS scavenging or decreasing ROS production resulted in the accumulation of a phospho-p46 protein similar to p38-MAPK. Importantly, the *rhd2* *A. thaliana* mutants exhibited a remarkable increase in levels of phospho-p46. The presence of the p38-MAPK inhibitor SB203580 attenuated the response to ROS disturbance, prevented microtubule disappearance and resulted in a dramatic decrease in the number of atypical tubulin polymers. Moreover, in roots treated simultaneously with substances inducing ROS overproduction and others resulting in low ROS levels, phospho-p46 levels and the organization of tubulin cytoskeleton were similar to controls. Collectively, our experimental data suggest, for the first time in plants, that p46 functions as a putative sensor of redox state, the activation of which initiates downstream signalling events leading to microtubule disruption and subsequent assembly of atypical tubulin polymers. Thus, p46 seems to participate in perception of ROS homeostasis disturbance as well as in cellular responses to redox imbalance.

Key-words: microtubules; microtubules; oxidants; oxidative stress; reactive oxygen species; tubulin paracrystals.

INTRODUCTION

The p38-MAPK pathway is intimately associated with responses to various environmental stimuli, such as osmotic shock, ultraviolet radiation and heat in animals and yeast (Zarubin & Han 2005). These signals and other extracellular factors rapidly activate p38-MAPKs, which in turn phosphorylate a broad range of proteins including protein kinases, phospholipases, microtubule-associated proteins (MAPs) and transcription factors (Cuadrado & Nebreda 2010).

Cellular signalling mediated by reactive oxygen species (ROS) also involves p38-MAPK pathways (Ray *et al.* 2012). It is well established that oxidative stress, selectively activates p38-MAPK signalling cascades, a response attenuated by antioxidants (Kurata 2000; Gaitanaki *et al.* 2006).

In plants, several studies support the existence of stress related p38-like MAPKs. A p38-like kinase has been implicated in the transmission of oxidative stress signals in *Arabidopsis thaliana* (Capone *et al.* 2004), whereas the presence of the selective p38-MAPK inhibitor SB203580 interferes with the abscisic acid induced and H₂O₂-mediated stomatal closure in *Vicia faba* (Jiang & Song 2008; Jiang *et al.* 2008). Recently, it was found that in *Perilla frutescens*, the p38-MAPK pathway is involved in the activation of antioxidant responses (Izumi *et al.* 2012). Moreover, phospho-p38-like proteins mediate the adaptation of *Dunaliella* species to osmotic shock and ultraviolet radiation (Jiménez *et al.* 2004; García-Gómez *et al.* 2012), and a 46 kDa protein (p46) displaying similar immunological and pharmacological properties to the mammalian p38-MAPK has been involved in osmoregulation in *Triticum turgidum* root cells (Komis *et al.* 2004). Besides, diverse types of stress induce reorganization of the microtubule (MT) cytoskeleton, thus MTs are nowadays considered as emerging components of plant sensory mechanisms (Nick 2012).

Recent evidence revealed that ROS act as signalling molecules during plant cell division, while their imbalance deeply affects tubulin cytoskeleton in *T. turgidum* and *A. thaliana* dividing root cells (Livanos *et al.* 2012a,b). Experimental disturbance of ROS homeostasis rapidly stimulates MT disruption and leads to the assembly of resistant atypical tubulin polymers, the microtubules and tubulin paracrystals (Livanos *et al.* 2012a). Moreover, in *Arabidopsis* epidermal cells, H₂O₂ triggers MT depolymerization in response to biotic stress (Yao *et al.* 2011). Taking into consideration the role of p38 signalling pathways in stress perception and the implication of the p46-MAPK in the assembly of atypical tubulin polymers during hyperosmotic treatment in plants (Komis *et al.* 2004), it was investigated whether this kinase is involved in sensing alterations of redox state in *T. turgidum* and *A. thaliana*. Phospho-p46 accumulation was also examined in *rhd2* *A. thaliana* mutants since these plants lack the function of RHD2/RBOHC, one of the *A. thaliana* NADPH

Correspondence: P. Apostolakos. E-mail: papostol@biol.uoa.gr

oxidases, thus exhibiting low ROS levels (Takeda *et al.* 2008; Livanos *et al.* 2012a). Additionally, p46 participation in signal transduction mechanisms that drive the formation of atypical tubulin polymers during loss of ROS homeostasis was examined. To our knowledge, this is the first study in plants dealing with the implication of p38-like signalling in perception of ROS homeostasis disturbance and moreover in the consequent assembly of atypical tubulin polymers.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Unless otherwise specified, all chemicals used were purchased from Sigma Aldrich Chemical Co (Saint Louis, MO, USA) and Merck (Darmstadt, Germany) and were of the highest grade available.

Plant material

Caryopses of *T. turgidum* L. var. Athos, kindly offered by the National Agricultural Research Foundation, Cereal Institute, Thessaloniki, Greece, were allowed to germinate on moist filter papers in Petri dishes in darkness for 48 h at 25 ± 1 °C. Wild type ecotype Columbia and *rhd2 A. thaliana* seeds, after imbibition in distilled water for 48 h at 4 °C, were placed in Petri dishes containing Murashige and Skoog medium (Murashige & Skoog 1962) in agar and germinated under 16 h photoperiod in a plant growth chamber for 48–72 h at 18 °C. The *rhd2 A. thaliana* seeds were generously given by Prof. Liam Dolan (John Innes Centre, Norwich, UK).

Treatments

Treatments in *T. turgidum* roots were carried out as previously described (Komis *et al.* 2004). The roots were detached and left in Hoagland's solution (20 mM MES, pH 5.6, 5 mM CaCl_2 , 5 mM KNO_3 , 2 mM MgSO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 1 μM NaFeEDTA, 0.1 μM NaMoO_4 , 0.1 μM CuSO_4 , 0.1 μM ZnSO_4 and 0.1 μM MnCl_2 plus 20 mM glucose) for 3 h in order to recover from wounding, considering that root excision could result in wound stress and subsequent increase in ROS levels (Vylegzhanina *et al.* 2001). The roots were then treated with Hoagland's solutions as described below. Alternatively, roots of intact seedlings were immersed in aqueous solutions. In the case of *A. thaliana*, intact seedlings were used.

The pharmacological reagents used in the present study were (1) 25 μM diphenylene iodonium (DPI), (2) 250 μM n-acetyl-cysteine (NAC), (3) 25 μM menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone; MEN), (4) 4 mM hydrogen peroxide (H_2O_2) and (5) 10 μM SB203580 [4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-imidazole; Calbiochem-Millipore, Billerica, MA, USA].

DPI and NAC were applied as ROS decreasing agents, while MEN and H_2O_2 as ROS generators (Livanos *et al.* 2012a,b). In particular, DPI is an inhibitor of NADPH oxidase causing decrease in ROS production (Bolwell & Wojtaszek 1997; Foreman *et al.* 2003). Plant NADPH oxidases, known

as Rbohs (respiratory burst oxidase homologs), are plasmalemma-located enzymes that catalyse the production of superoxide anions in the apoplast. Superoxide anions are converted to H_2O_2 by dismutation (Sagi & Fluhr 2006). NAC is a non-specific ROS scavenger since it can interact with various ROS including H_2O_2 , hydroxyl and superoxide radicals (Aruoma *et al.* 1989; Benrahmoune *et al.* 2000). MEN is a synthetic derivative of vitamin K1 that results in intracellular ROS generation, as it is oxidized rapidly upon its entrance into the cells (Kawamura *et al.* 2006). H_2O_2 is a highly reactive molecule that diffuses easily across membranes (Petrov & Van Breusegem 2012). Finally, SB203580 is a selective p38-MAPK inhibitor that has been also successfully applied in plants (Komis *et al.* 2004; Izumi *et al.* 2012).

Both concentrations of the substances and treatment durations were derived from those used in previous works of our research group (Livanos *et al.* 2012a,b). Fluorescein diacetate-propidium iodide double staining revealed that these treatments did not cause any necrotic symptoms in root cells (Livanos *et al.* 2012a). All treatments were carried out in darkness at 25 ± 1 °C. The chemical substances mentioned above were derived from stock solutions of 100 mM DPI, 250 mM MEN and 25 mM SB203580 in dimethyl sulfoxide (DMSO), 100 mM NAC and 30% (w/v) H_2O_2 in water, and were diluted in water or MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] buffered Hoagland's solution. The final DMSO concentration in treatment solutions was no more than 0.35% (v/v). Roots or intact seedlings immersed in distilled water or in Hoagland's solution, occasionally containing the appropriate volumes of DMSO, were used as controls.

ROS staining

The ability of the substances used in the present study to influence redox status in *T. turgidum* and *A. thaliana* seedlings was confirmed using 25 μM 2,7 dichlorofluorescein diacetate (DCF), a ROS-sensitive fluorophore added in treatment solutions 30 min before the end of each treatment as previously described (Livanos *et al.* 2012a). The photographs of each sample were taken at the same exposure time.

Protein extraction

Control or treated *T. turgidum* roots were homogenized using a mortar and pestle with 1 vol. of ice-cold β -glycerophosphate buffer pH 7.5, containing 20 mM glycerophosphate, 50 mM NaF, 2 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 10 mM DTT (dithiothreitol), 20 mM HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid], 0.2 mM Na_3VO_4 and a tablet of Mini Complete protease inhibitors cocktail (Roche Diagnostics Ltd, Mannheim, Germany). Control, treated and mutant *A. thaliana* seedlings were first immersed in liquid nitrogen and afterwards were homogenized using a micropestle and the β -glycerophosphate buffer. Following extraction on ice for 15 min, samples were centrifuged (6000 g, 30 min, 4 °C), and the supernatants were boiled with 0.33 vol. of sodium dodecyl sulphate (SDS) sample buffer [SB4X: 0.33 mol L⁻¹ Tris-HCl (pH 6.8), 10%

(w/v) SDS, 13% (v/v) glycerol, 20% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.2% (w/v) bromophenol blue] (Laemmli 1970). Protein concentrations were determined by Bradford protein assay using bovine serum albumin (BSA) as the standard. Samples were stored at -80°C until use.

SDS-PAGE and immunoblot analysis

Samples containing equivalent amounts of total protein (50 μg) along with pre-stained molecular mass marker (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) were separated by SDS-PAGE on 10% (w/v) acrylamide, 0.275% (w/v) bisacrylamide slab gels in a Mini-protean tetra cell apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and transferred electrophoretically onto nitrocellulose membranes (0.45 μm ; Protran, Schleicher and Schuell, Dassel, Germany). Membranes were then incubated in TBS-T [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20] containing 5% (w/v) non-fat milk powder for 1 h, at room temperature. Subsequently, membranes were incubated overnight with the appropriate antibody, according to the manufacturer's instructions (1:1000 dilution). Antibodies specific for the phosphorylated forms of p38-MAPK (#9211) and MAPK-Activated Protein Kinase 2 (MAPKAPK2) (#3041) were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). In particular, the antibody #9211 detects the levels of the dually phosphorylated p38-MAPK at threonine 180 and tyrosine 182, whereas the antibody #3041 detects endogenous levels of MAPKAPK2, a well-established p38-MAPK substrate (Yuan *et al.* 2010), phosphorylated at threonine 334. Following three washes with TBS-T (10 min each), the blots were incubated with an anti-rabbit or an anti-mouse horse radish peroxidase conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), diluted 1:5000 in TBS-T containing 5% (w/v) BSA at room temperature for 1 h. After washing blots in TBS-T (3×10 min), bands were detected using enhanced chemiluminescence reagent (Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Super RX film was purchased from Fuji (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan). Blot bands intensity was quantified by laser scanning Image J densitometry software (Image J v.1.46, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Equal protein loading was verified by immunoblotting identical samples with a mouse monoclonal anti-GAPDH (Ambion, Austin, TX, USA) or a rabbit polyclonal anti-*Arabidopsis thaliana* GAPDH antibody (provided by Dr. I.D. Adamakis, Department of Botany, School of Biology, Aristotle University, Thessaloniki, Greece). Normalization was carried out by dividing the average value of each protein studied with the respective levels of GAPDH.

Statistical analysis

Western blot images shown are representative of at least three independent experiments. Each data point represents the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of samples from roots treated under the respective conditions, in at least three independent experiments. The statistical significance of the differences in phospho-p46 levels were detected using

Student's paired *t*-test. Differences were deemed significant, when *P*-values < 0.05 were obtained.

Tubulin immunolabelling

Control and treated root tips of *T. turgidum* were fixed with 8% (w/v) paraformaldehyde in PEM buffer [50 mM PIPES (piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid), 5 mM EGTA (ethyleneglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid), 5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$] pH 6.8 for 45 min. The samples were washed three times with the same buffer for 15 min and the cell walls were digested with 2% (w/v) cellulase (Onozuka, Honshua, Tokyo, Japan), 1% (w/v) macerozyme (Onozuka) and 1% (w/v) driselase in PEM pH 5.6 for 45 min. The root tips were washed again with PEM and squashed in coverslips precoated with 1 mg mL^{-1} poly-L-lysine. The cells were then treated with 3% (v/v) Triton X-100 and 5% (v/v) DMSO containing 2% (w/v) BSA in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min. Afterwards, the cells were washed with PBS and incubated overnight with anti- α -tubulin monoclonal antibody (YOL 1/34, Serotec, Oxford, UK). After three washes, again with PBS, the cells were incubated with anti-rat fluorescein isothiocyanate conjugated IgGs for 1 h at 37°C . Both, the primary and the secondary antibodies were diluted 1:40 in PBS containing 2% (w/v) BSA. DNA staining was performed using 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Hoechst 33258 and finally, the cells were mounted in an anti-fade solution containing p-phenyldiamine. The specimens were examined with a Zeiss Axioplan microscope equipped with an ultraviolet source, proper filters and a Zeiss Axiocam MRc5 digital camera.

Transmission electron microscopy (TEM)

T. turgidum root tips were processed for TEM examination according to standard procedures. In brief, the samples were double-fixed with 3% (v/v) glutaraldehyde and 1% (w/v) OsO_4 in sodium cacodylate buffer, dehydrated in an acetone series, infiltrated in a graded series of Spurr's resin (Serva, Heidelberg, Germany) in propylene oxide and embedded in small plastic dishes filled with pure Spurr's resin. Thin sections prepared with an LKB ultratome III were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Philips 300 TEM.

Tubulin polymer diameter measurement on TEM micrographs

The diameter of the tubulin polymers was measured on digitalized TEM micrographs, using the CorelDraw Graphics Suite X4 (Corel Suite, Pantone, Ottawa, Canada) dimension tool calibrated with a grated replica grid (Livanos *et al.* 2012a).

RESULTS

Disturbance of ROS homeostasis induces the phosphorylation of a p38-like MAPK

ROS staining using DCF revealed that ROS modulators used in the present study indeed interfere with ROS levels. In

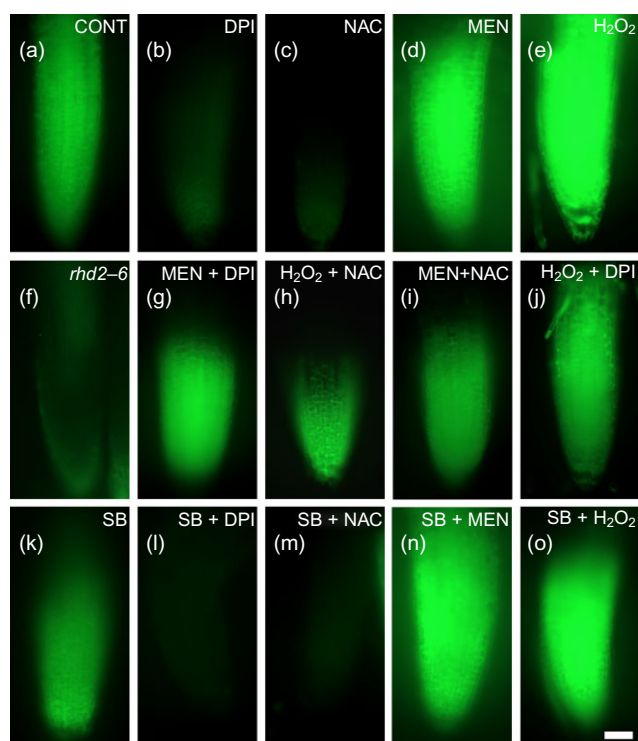


Figure 1. Control (a), treated (b–e, g–j, k–o) and *rhd2-6* (f) *A. thaliana* root tips after 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF) staining. The optical sections pass through rhizodermis. All photographs were taken at the same exposure time. Note the differences in fluorescence intensity between (b–f) and (a) and the fact that the intensity of fluorescence in (g–j) is similar to that of the control (a). Additionally, fluorescence levels between (k) and (a), as well as between (l–o) and (b–e) are similar. Treatments: diphenylene iodonium (DPI; 25 μ M), n-acetyl cysteine (NAC; 250 μ M), menadione (MEN; 25 μ M), H_2O_2 (4 mM), SB203580 (10 μ M). The incubation with treatment solutions lasted 2 h. DCF in a final solution of 25 μ M was added 30 min before the end of each treatment. Bar: 25 μ m.

particular, DPI and NAC resulted in decreased ROS levels in *T. turgidum* and *A. thaliana* roots (Fig. 1b,c; cf. Fig. 1a; see also Livanos *et al.* 2012a). In addition, the levels of ROS in *rhd2* *A. thaliana* roots were significantly lower compared with the wild type (Fig. 1f; cf. Fig. 1a; see also Livanos *et al.* 2012a). On the other hand, MEN and H_2O_2 treatments led to ROS overproduction (Fig. 1d,e; cf. Fig. 1a; see also Livanos *et al.* 2012a).

Moreover, it was confirmed that the anti-phospho-p38-MAPK antibody recognizes a 46 kDa protein band in *T. turgidum* root extracts (Figs 2 & 3), as it had been previously reported (Komis *et al.* 2004). Further, it was found that the phosphorylation state of this protein alters in response to H_2O_2 . Oxidative stress induced by H_2O_2 triggered the p46 phosphorylation in a dose and time dependent manner (Fig. 2). The levels of phospho-p46 were accumulated within the first 5 min upon H_2O_2 treatment, reached a maximum at 15 min gradually decreasing thereafter (Fig. 2a). The H_2O_2 concentration inducing a maximum effect at 15 min of treatment was 4 mM (Fig. 2b). The concentrations of the other ROS interfering agents used in this study were selected

according to their effects on the tubulin cytoskeleton (Livanos *et al.* 2012a, b). Treatment of *T. turgidum* roots with ROS modulators and subsequently western immunodetection of the phospho-p46 MAPK revealed that in all cases, the phospho-p46 levels were raised in treated roots. It should be noted that both experimental handlings (i.e. intact seedlings in water solutions and detached roots in Hoagland's solutions) resulted in a similar response regarding p46 phosphorylation (Fig. 3a,b). The accumulation of phospho-p46 was 2.90 ± 0.04 , 2.45 ± 0.24 , 2.60 ± 0.21 and 2.20 ± 0.12 -fold higher compared with that of controls after 15 min treatment of detached roots with DPI, NAC, MEN and H_2O_2 , respectively (Fig. 3a). Similarly, treatment of intact seedlings for 1 h with aqueous solutions of the same substances, resulted in a comparable pattern of accumulation, with a respective 3.02 ± 0.29 , 2.92 ± 0.27 , 2.80 ± 0.14 , 2.93 ± 0.4 -fold increase in phospho-p46 levels (Fig. 3b).

Immunoblotting of *A. thaliana* extracts from control and treated seedlings revealed that the anti-phospho-p38-MAPK antibody recognizes a protein band of approximately 46 kDa (Fig. 4). Similarly to effects described above for *T. turgidum*, ROS modulators affected the phospho-levels of this protein. The accumulation of phospho-p46 in DPI, NAC, MEN and H_2O_2 was higher compared with the controls, respectively (Fig. 4). Interestingly, extremely high levels of phospho-p46 accumulation compared with the wild type were detected in *rhd2-6* seedlings (Fig. 4). These mutants lack the function of RBOHC, one of the 10 NADPH oxidases of *A. thaliana* and exhibit low ROS levels (Foreman *et al.* 2003; Livanos *et al.* 2012a; see also Fig. 1f).

Additional experiments were carried out in order to monitor the effects of the substances, applied in combinations, on phospho-p46 accumulation. The following pairs of treatments were examined: (1) H_2O_2 + DPI, (2) H_2O_2 + NAC, (3) MEN + DPI and (4) MEN + NAC. In each pair, one substance increases, while the other decreases ROS levels. Consequently, as was assessed by DCF staining, in all cases, the ROS levels in these roots were different compared with those treated with only one ROS modulator (Fig. 1g–j; cf. Fig. 1b–e) and almost identical to that observed in control roots (Fig. 1g–j; cf. Fig. 1a). All the above mentioned combinations resulted in a significant decrease in phospho-p46 accumulation compared with the respective accumulation in treated roots with solely applied ROS modulators (Fig. 5). Quantification of relative protein levels showed that phospho-p46 levels were comparable with those detected in the untreated roots (Fig. 5). These results demonstrate that p46 phosphorylation is the outcome of any significant alteration in ROS levels and not a side effect. This view is also strongly supported by the fact that phospho-p46 accumulation is significantly increased in untreated *rhd2* *A. thaliana* mutants (Fig. 4).

SB203580 abolishes both the phosphorylation and the activity of the p38-like MAPK in roots treated with ROS modulators

Experiments using the selective p38-MAPK inhibitor SB203580 were carried out in order to examine whether it

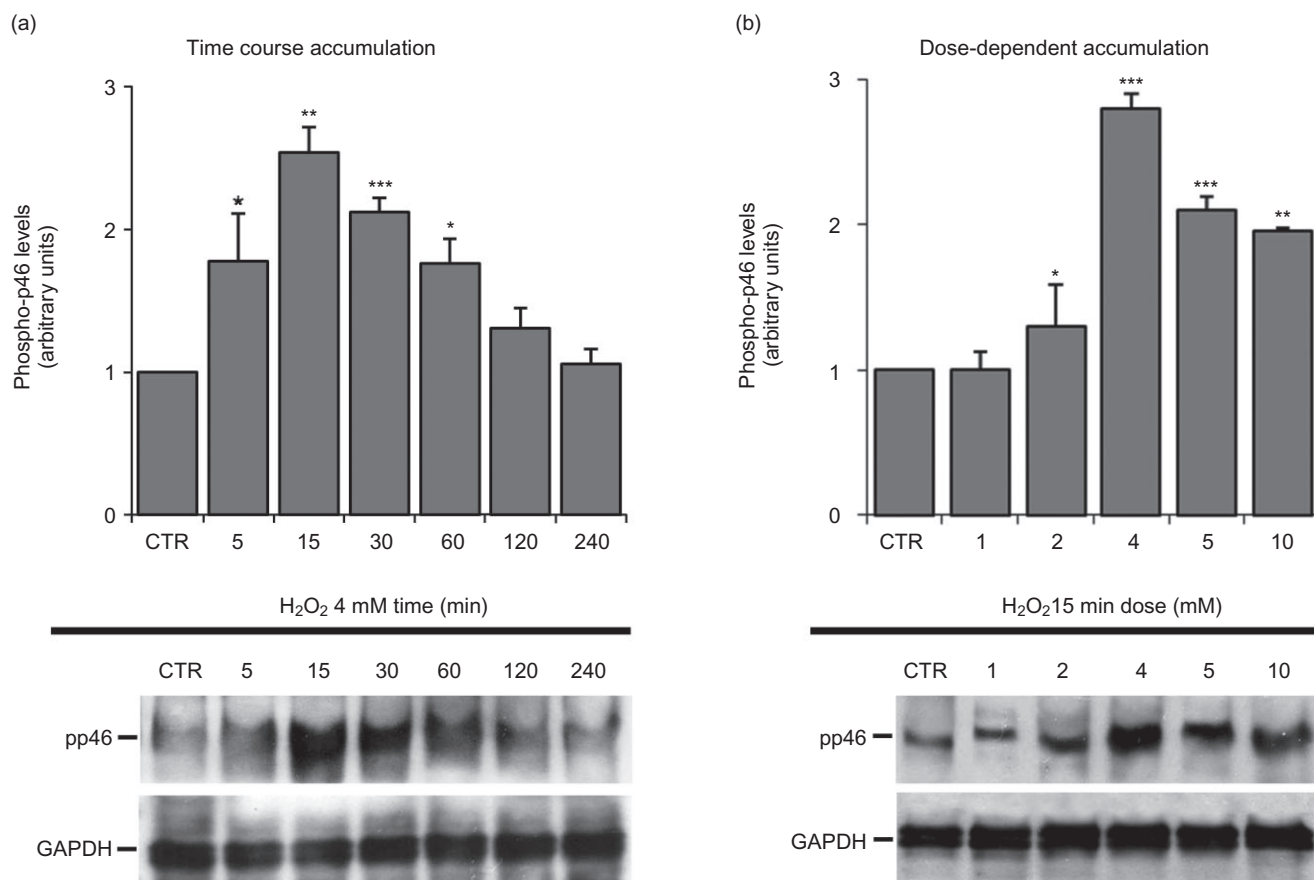


Figure 2. H₂O₂ induced oxidative stress triggers p46-MAPK phosphorylation in *T. turgidum* roots. This response is time and dose dependent. Representative Western blots showing phospho-p46 levels varying, depending on time (a) and dose (b) of treatment with H₂O₂. H₂O₂ concentration was 4 mM in (a), while the treatment duration in (b) was 15 min. The relative differences on mean values of phospho-p46 levels between control (CTR) and treated roots are presented on the diagrams above the blots. Mean values in each case were derived from three independent experiments. *P*-values < 0.05 were deemed statistically significant. (**P*-value < 0.05; ***P*-value < 0.01; ****P*-value < 0.001). CTR (a, b), Hoagland's solution.

interferes with phospho-p46 levels in *T. turgidum* roots treated with ROS modulators. The inhibitor alone was applied for a 30 min pretreatment and afterwards together with each of redox-modulating agent. Initially, the effects of SB203580 on phospho-p46 levels in H₂O₂ treated roots were examined. It was found that the levels of the p46 phosphokinase were decreased compared with those of H₂O₂ treated roots (Fig. 6a). The decrease in phospho-p46 accumulation was dependent on the concentration of the inhibitor (Fig. 6a). The duration of the treatment with the H₂O₂ plus SB203580 was 15 min since the maximum phospho-p46 accumulation was produced after 15 min upon treatment with H₂O₂ alone (Fig. 2a). The minimum SB203580 concentration producing significant attenuation on phospho-p46 accumulation (more than 46% of the respective accumulation during H₂O₂ treatment) was 10 μ M (Fig. 6a). Thus, this concentration was chosen for the rest experiments.

The observation that phospho-p46 levels were diminished upon H₂O₂ plus SB203580 treatment led us to perform immunoblots on root extracts using the anti-phospho-MAPKAPK2 antibody. MAPKAPK2 is a potent substrate of

the animal p38-MAPK (Yuan *et al.* 2010). Using this antibody a protein was detected at approximately 50 kDa. The accumulation of this protein in *T. turgidum* roots was considerably higher after treatment with 4 mM H₂O₂ than in untreated roots (Fig. 6b), whereas 10 μ M SB203580 prevented this response (Fig. 6b). This supports further the existence of p38-like MAPK signalling pathways in plants.

Subsequently, SB203580 was used together with DPI, NAC and MEN. Similar to effects described above for H₂O₂, SB203580 attenuated phospho-p46 accumulation in detached roots treated with DPI, NAC and MEN for 15 min (Fig. 7a). SB203580 resulted in a 29.00, 21.10 and 27.00% decrease in phospho-p46 levels, compared with the levels measured in roots treated alone with DPI, NAC and MEN, respectively (Fig. 7a). Additionally, p46 phosphorylation was also abolished in roots of intact seedlings treated for 1 h with either of DPI, NAC, MEN or H₂O₂ plus SB203580 (Fig. 7b). Phospho-p46 levels were respectively decreased by 53.60, 53.80, 29.00 and 48.80%.

Notably, DCF staining revealed that SB203580 did not interfere with cellular ROS levels in roots treated with ROS modulators (Fig. 1k–o; cf. Fig. 1a–e). Further, it was assured

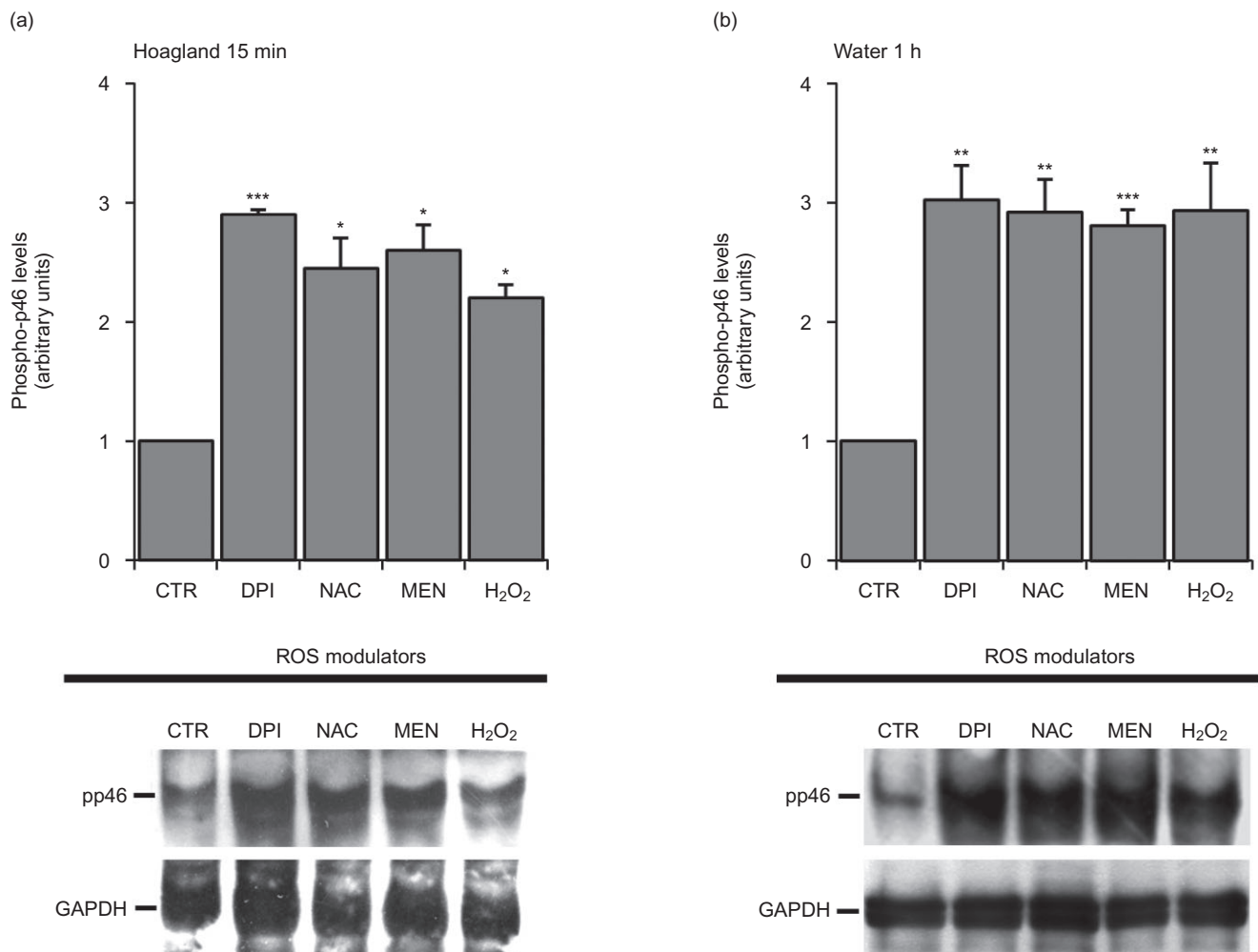


Figure 3. Effects of reactive oxygen species (ROS) modulators on phospho-p46 levels in *T. turgidum* roots. Roots were treated with 25 μ M of NADPH oxidase inhibitor diphenylene iodonium (DPI), 250 μ M of the ROS scavenger n-acetyl cysteine (NAC), 25 μ M of the oxidative stress generator menadione (MEN) and 4 mM H₂O₂. Western blots of root protein extracts from excised roots (a) and intact seedlings (b) treated with ROS modulators diluted in Hoagland's solution for 15 min and in distilled water for 1 h, respectively. The relative mean values of phospho-p46 levels for each case are presented in the diagrams above the blots. Mean values in each case were derived from four independent experiments. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant. (**P*-value < 0.05; ***P*-value < 0.01; ****P*-value < 0.001). CTR (a) control, Hoagland's solution; CTR (b) control, distilled water.

that phospho-p46 accumulation can be safely attributed to ROS disturbance and not to the presence of DMSO in treatment solutions. The concentration and the duration of treatments with equal amounts of DMSO was 0.025% (v/v) for 15 min (Supporting Information Fig. S1; MEN), 0.25% (v/v) for 15 min and 0.35% (v/v) for 45 min (Supporting Information Fig. S1; DPI and SB + DPI) and 0.25% for 1 h (Supporting Information Fig. S1; DPI). It is clear that DMSO concentrations used in this work did not significantly alter phospho-p46 levels in roots (Supporting Information Fig. S1).

Inhibition of p46 phosphorylation neutralizes the effects of ROS disturbance on tubulin cytoskeleton

As it has been previously reported (Livanos *et al.* 2012a,b), elimination of ROS levels using DPI and NAC, as well as

ROS overproduction after MEN treatment result in multiple effects on tubulin cytoskeleton in *T. turgidum* and *A. thaliana* roots. The first outcome of ROS disturbance is the gradual disappearance of MTs. Cortical MTs are more sensitive than the preprophase MT band, spindle and the phragmoplast MT arrays of dividing cells and disappear after the first 15 min of treatment (Livanos *et al.* 2012a). Afterwards, atypical tubulin polymers assemble. In the cases of treatment with DPI or NAC, the atypical tubulin polymers are macrotubules, whereas tubulin paracrystal conformations are formed in MEN-treated root cells. In *T. turgidum* and *A. thaliana* DPI-treated roots, the mean macrotubule diameter is 32.00 and 29.00 nm, respectively, whereas in NAC treated roots it is 31.00 and 29.00 nm, respectively (Livanos *et al.* 2012a). The abundance of the aforementioned tubulin polymers depends on the time and the dose of each treatment. These polymers appear as amorphous, wavy, rod-like or annular structures

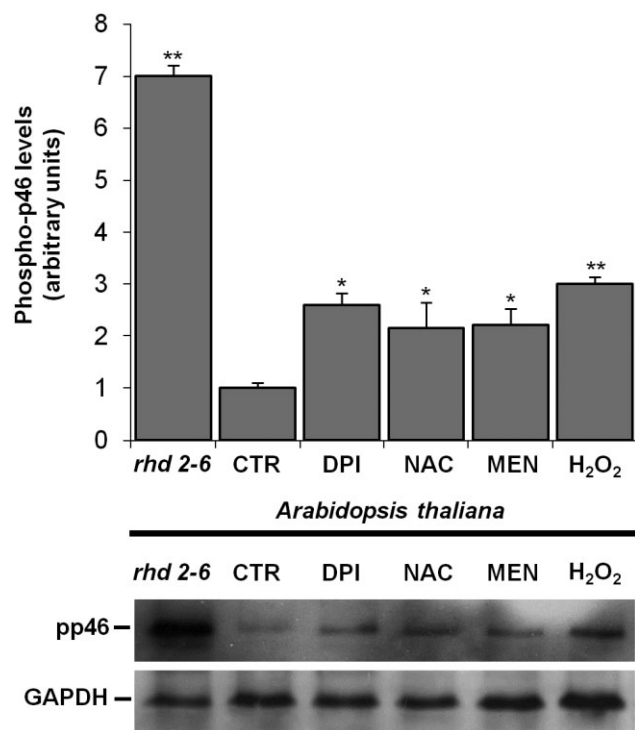


Figure 4. Effects of reactive oxygen species (ROS) modulators on phospho-p46 levels in wild-type *A. thaliana* control (CTR) and treated seedlings and phospho-p46 levels of *rhd2-6 A. thaliana* mutants. Treatments: DPI diphenylene iodonium; 25 μ M, NAC n-acetyl cysteine; 250 μ M, MEN menadione; 25 μ M and H₂O₂ 4 mM. The duration of the treatment was 2 h in every case. The relative mean values of phospho-p46 levels for each case are presented in the diagrams above the blots. Mean values in each case were derived from three independent experiments. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant. (**P*-value < 0.05; ***P*-value < 0.01).

after tubulin immunolabelling (Fig. 8b–d; cf. Fig. 8a; see also Livanos *et al.* 2012a,b). In the present study, it was found that, similar to effects described above, the H₂O₂-induced oxidative stress resulted in the disruption of MTs within the first 30 min from the onset of treatment. Subsequently, atypical tubulin polymers were detected in H₂O₂-treated cells (Fig. 8e). These polymers resembled in appearance those observed in DPI- and NAC-treated cells (Fig. 8e; cf. Fig. 8b,c; see also Livanos *et al.* 2012b). In contrast to what was detected in MEN-treated cells (Livanos *et al.* 2012a), TEM examination revealed that H₂O₂-treated cells did not form tubulin paracrystals but an increased amount of microtubules (Table 1). Out of 88 tubulin polymers measured in these cells, 68 (77.27%) were microtubules (mean diameter 29.00 $\pm$ 0.22 nm) and 20 (22.73%) MTs (mean diameter 24.27 $\pm$ 0.25 nm).

To further confirm that the alterations in ROS levels and the subsequent p46 activation are a primary cause for the atypical tubulin polymer assembly, the effects of the combinations of agents interfering with ROS on tubulin cytoskeleton were examined. Since, it was found that these treatments resulted in a considerable alteration in phospho-p46 levels (Fig. 5),

the roots were incubated with H₂O₂ + DPI, H₂O₂ + NAC, MEN + DPI and MEN + NAC and were processed for tubulin immunolabelling. It was found that the cortical tubulin cytoskeleton was not significantly affected in the great majority of these cells (Fig. 8g–j; cf. Fig. 8b–e) and seemed to consist of MTs (Fig. 8g–j; cf. Fig. 8f, DMSO control; Fig. 8a, water control). Notably, the cortical tubulin cytoskeleton in DMSO-treated cells displayed the same organization with the control incubated with distilled water cells (Fig. 8f; cf. Fig. 8a).

Furthermore, given that SB203580 had the ability to attenuate phospho-p46 accumulation during ROS homeostasis disturbance (Fig. 7), it was investigated whether it is also capable of inducing any inhibitory effect in the assembly of the atypical tubulin polymers. Hence, roots were incubated for 30 min with SB203580, prior to treatment with each of the different ROS modulators used in this study plus the inhibitor. The root tips were subsequently processed for tubulin immunolocalization and TEM examination. Immunofluorescence revealed that in most of the root cells treated as described above, the atypical tubulin polymers were absent

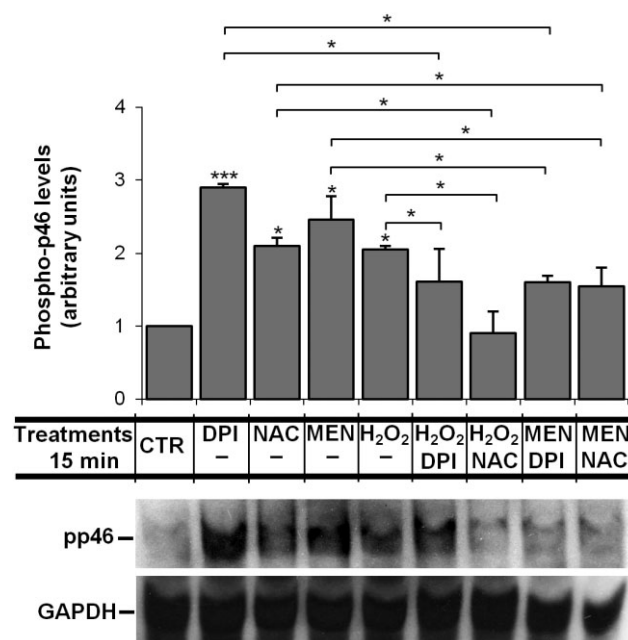


Figure 5. Simultaneous treatments of *T. turgidum* roots with oxidants together with substances inducing low reactive oxygen species (ROS) levels resulted in a decrease in p46 phosphorylation. The oxidants were menadione (MEN; 25 μ M) or H₂O₂ (4 mM) and were applied together with diphenylene iodonium (DPI; 25 μ M) or n-acetyl cysteine (NAC; 250 μ M). Roots were treated for 15 min with Hoagland's solutions containing alone or combined the different ROS modulators. A representative blot showing a different response regarding p46 phosphorylation, when ROS modulators used in combinations compared with the respective levels, when the substances applied solely. Mean values of relative phospho-p46 levels are presented in the diagrams located above. Mean values were derived from three independent experiments and differences between groups were deemed statistically significant when *P*-value was less than 0.05 (**P*-value < 0.05; ****P*-value < 0.001). CTR, control, Hoagland's solution.

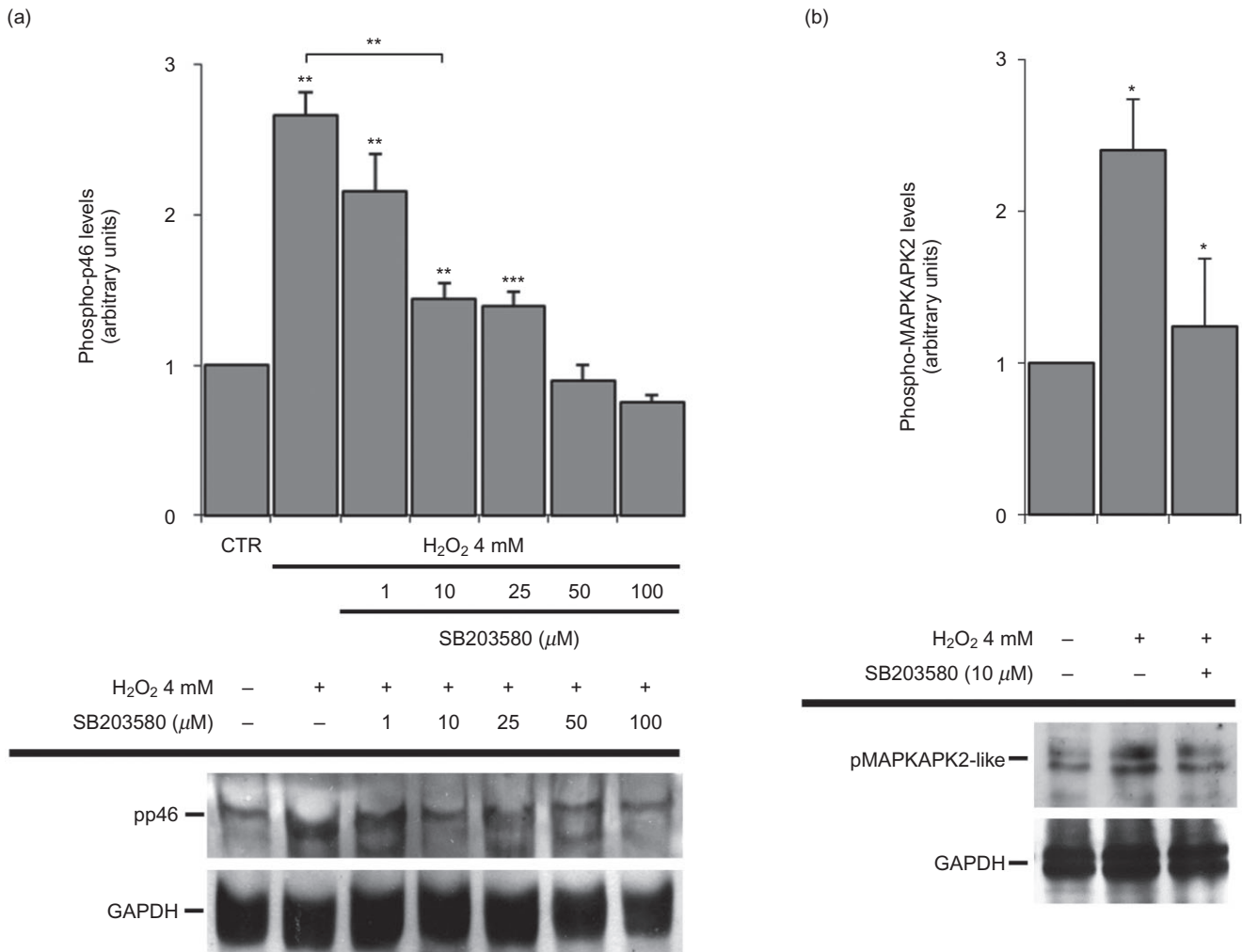


Figure 6. (a) Effect of the selective p38-MAPK inhibitor SB203580 on H₂O₂ induced p46 phosphorylation in *T. turgidum* roots. SB203580 suppresses the increase in phospho-p46 levels in a dose dependent manner. A representative Western blot of protein extracts from H₂O₂-treated roots for 15 min with the simultaneous presence of different concentrations of SB203580. Initially, the roots were pretreated for 30 min with the respective concentration of the SB203580 and subsequently with 4 mM H₂O₂ plus different concentrations of SB203580. The minimum concentration producing a significant decrease in phospho-p46 levels is 10 μM SB203580. The diagram above shows mean values of the relative phospho-p46 levels between different treatments. Mean values were derived from three independent experiments. *P*-values < 0.05 were deemed statistically significant. (**P*-value < 0.05; ***P*-value < 0.01; ****P*-value < 0.001). CTR, control, Hoagland's solution. (b) H₂O₂ treatment induced the increase in phosphorylation of a MAPKAPK2-like protein in *T. turgidum* roots. MAPKAPK2 is the substrate of animal p38-MAPK. This response is attenuated in the presence of 10 μM SB203580. The diagram shows the relative mean values of the levels of this phospho-protein in any case. Mean values were derived from three independent experiments. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant. (**P*-value < 0.05).

(Fig. 8l–o; cf. Fig. 8b–e). On the contrary, linear tubulin structures, resembling in appearance MTs, were detected (Fig. 8k–o). It is worthwhile noting that treatment with 10 μM SB203580 alone for 1.5 h did not cause any detectable effect on cortical MTs (Fig. 8k; cf. Fig. 8a).

Importantly, it was found that the selective p38-MAPK inhibitor SB203580 prevented also MT disappearance stimulated by redox homeostasis disturbance. In root cells treated with ROS modulators, MT disruption was initiated within the first 15 min and was completed after 30 min of incubation in treatment solution (Fig. 9a,c,e,g; cf. Fig. 8a; see also Livanos *et al.* 2012a). On the contrary, pretreatment with SB203580

and subsequent incubation of roots with the treatment solution plus the inhibitor for 15 min, did not affect considerably the MT arrays (Fig. 9b,d,f,h; cf. Fig. 9a,c,e,g). It seems that these cells displayed almost typical cortical MT arrays (Fig. 9b,d,f,h; cf. Fig. 8a,k).

The above observations were also confirmed by TEM examination. The presence of SB203580 alleviated the effects of ROS modulators on the tubulin cytoskeleton. The percentage of MTs and microtubules in root tips of *T. turgidum* for each treatment as well as their mean diameter are presented in Table 1. The amount of microtubules was significantly decreased in root cells treated with DPI or NAC in the

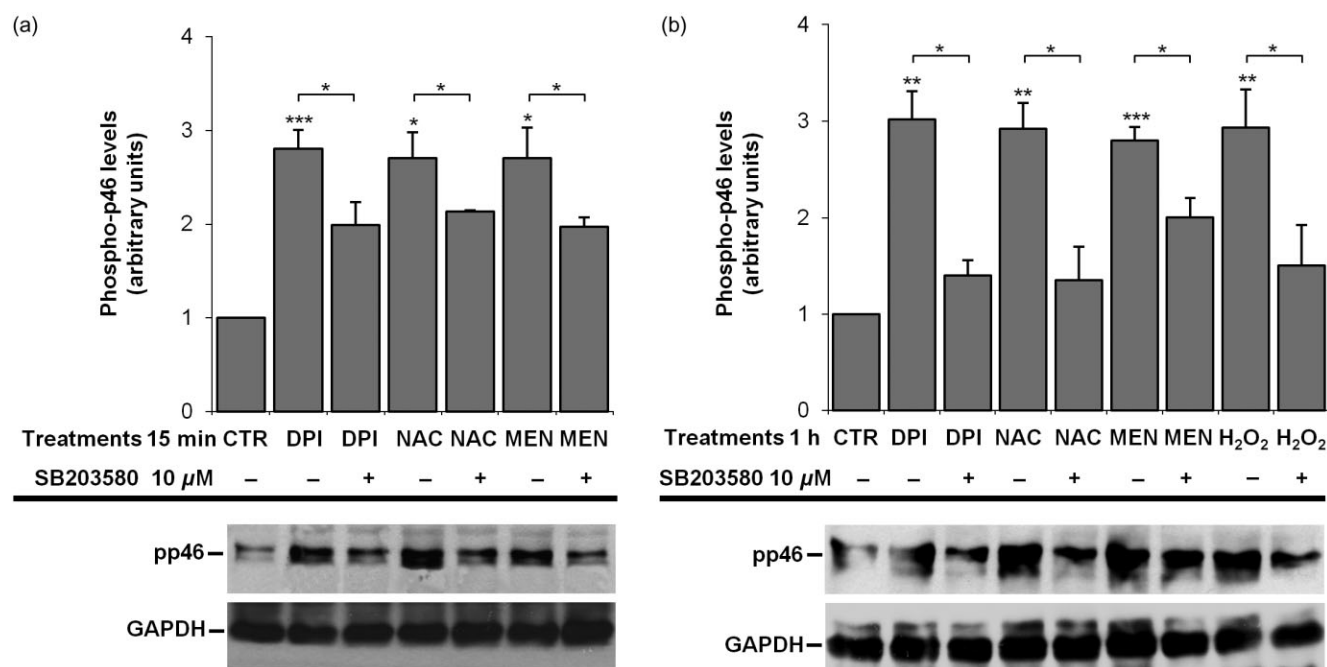


Figure 7. The p38-MAPK selective inhibitor SB203580 prevents p46 phosphorylation in *T. turgidum* roots treated with reactive oxygen species (ROS) modulators. The ROS interfering substances were diphenylene iodonium (DPI; 25 μM), n-acetyl cysteine (NAC; 250 μM), menadione (MEN; 25 μM) and H₂O₂ (4 mM). Representative Western blots of root protein extracts originated from two different experimental handlings. Excised roots treated for 15 min (a) and roots from intact seedlings treated for 1 h (b) with ROS modulators alone or in the presence of 10 μM SB203580. In both cases, roots were pre-incubated for 30 min with the inhibitor. Mean values in each case were derived from four independent experiments. *P*-values < 0.05 were deemed statistically significant. (**P*-value < 0.05; ***P*-value < 0.01; ****P*-value < 0.001). CTR (a) control, Hoagland's solution; CTR (b) control, distilled water.

presence of the inhibitor SB203580. In this case, the microtubules were only 26.50 and 25.53% of the tubulin polymer measured. The respective percentage in cells treated with alone DPI or NAC for 1 h was 92.60 and 95.10% (Table 1; Livanos *et al.* 2012a). Similarly, in roots treated with H₂O₂ plus SB203580, the microtubules were 27.56%, whereas the respective percentage in H₂O₂ treated roots was 77.27% (Table 1). Finally, in roots treated with MEN together with SB203580, no tubulin paracrystals were detected and all the tubulin polymers found were MTs (mean diameter 23.94 ± 0.16). These results clearly show a correlation between p46 phosphorylation state and the assembly of atypical tubulin polymers with respect to cellular redox alterations.

DISCUSSION

p38-like MAPK in plants

Examination of the existing literature revealed that there is no evidence that proteins identical to animal p38-MAPKs are present in plants. This conclusion is based on the absence of plant proteins that possess the characteristic for p38, TGY (thr-gly-tyr) phosphorylation motif (Suarez Rodriguez *et al.* 2010). However, it is apparent that p38-like kinases function in plants. The antibody used in the present study raised against animal p38-MAPK successfully recognizes a 57 kDa in *Dunaliella viridis* (Jiménez *et al.* 2004), a 40 kDa in

Dunaliella tertiolecta (García-Gómez *et al.* 2012), a 46 kDa in *T. turgidum* and *A. thaliana* (Komis *et al.* 2004; present study) and a 38 kDa in *Perilla frutescens* (Izumi *et al.* 2012) extracts. Moreover, using p38 blocking peptides García-Gómez *et al.* (2012) showed that the p40 p38-like MAPK in *D. tertiolecta* presents high degree of similarity with the mammalian p38-MAPK. It is worth noting that Komis *et al.* (2004) demonstrated that this antibody does not cross-react with the phospho-ERK species.

The presence of p38-like MAPKs in plants is strongly supported by the fact that the selective p38-MAPK inhibitor SB203580 decreases the levels of the phospho-p38-like MAPK in cells of *T. turgidum* that are plasmolysed or that have been treated with ROS modulators (Komis *et al.* 2004; present study), as well as in cells of *P. frutescens* in which the expression of antioxidant enzymes has been triggered (Izumi *et al.* 2012). In addition, this inhibitor prevents protoplast volume regulation in plasmolysed *T. turgidum* root cells (Komis *et al.* 2004) and blocks the abscisic acid or H₂O₂-induced stomatal closure (Jiang *et al.* 2008). Similarly, in the present study, the cytoskeletal effects induced by ROS modulators in root cells were alleviated in the presence of SB203580.

Furthermore, it is well established that SB203580 selectively blocks the phosphorylation of downstream substrates of p38-MAPKs (Davies *et al.* 2000). Accordingly, in the present study, inhibition of the p46 phosphorylation by SB203580 (Fig. 6a) was found to prevent the increase in phosphorylation

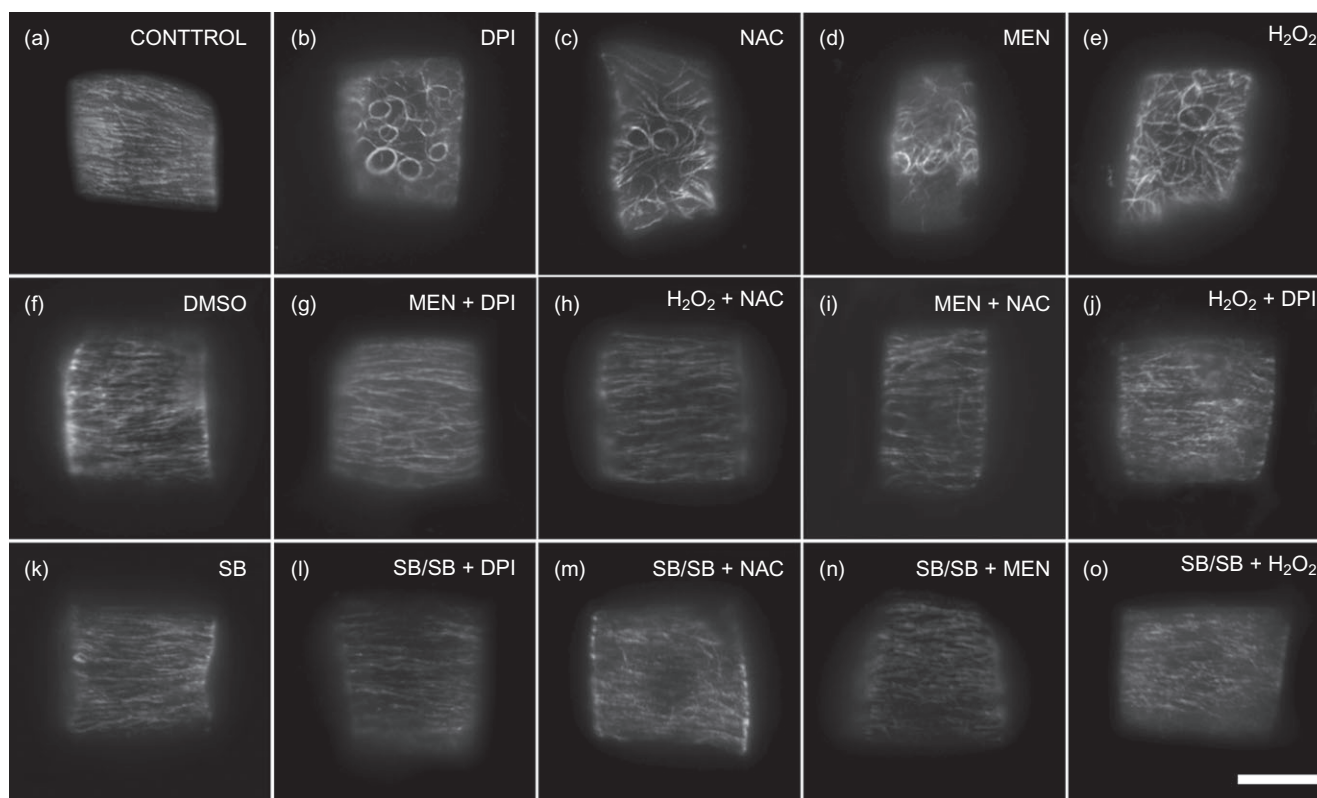


Figure 8. Atypical tubulin polymer assembly induced by reactive oxygen species (ROS) disturbance is attenuated when ROS modulators were applied in combinations as well as during subsequent incubation of the ROS interfering agents with the p38-MAPK inhibitor SB203580. Tubulin immunodetection in *T. turgidum* interphase root tip cells treated with ROS modulators alone (b–e), combined (g–j) or together with SB203580 (l–o). (a–e): Control cell (a) and cells treated with DPI (b), NAC (c), MEN (d), H₂O₂ (e) for 1 h. (f–j): Cells treated with DMSO (f), MEN + DPI (g), H₂O₂ + NAC (h), MEN + NAC (i), H₂O₂ + DPI (j). (k–o): Cell treated with SB203580 for 1.5 h (k) and cells preincubated with SB203580 for 30 min and then treated for 1 h with DPI + SB203580 (l), NAC + SB203580 (m), MEN + SB203580 (n), H₂O₂ + SB203580 (o). DPI, diphenylene iodonium, 25 μ M; NAC, n-acetyl cysteine, 250 μ M; MEN, menadione, 25 μ M; H₂O₂ 4 mM; DMSO, dimethyl sulfoxide, 0.35% (v/v); SB203580 10 μ M. Bar: 10 μ m.

Table 1. Reactive oxygen species (ROS) imbalance drives the assembly of atypical tubulin polymers in *T. turgidum* root cells via p46 phosphorylation. The table shows the tubulin polymer content and the mean values of diameter of the tubulin polymers in untreated or treated with ROS modulators for 1 h roots with or without the p38-MAPK inhibitor SB203580, as were classified by transmission electron microscopy (TEM) examination. Roots treated with ROS modulators plus SB203580 were initially pre-incubated with the inhibitor alone for 30 min. The measurement of the tubulin polymer diameter was achieved using the CorelDraw Graphics Suite X4 dimension tool calibrated with a grated replica grid. The values presented for untreated roots and for 1 h of treatment alone with DPI and NAC were derived from previous work (Livanos *et al.* 2012a). *n* = number of tubulin polymer measured in each case. DPI, diphenylene iodonium, 25 μ M; NAC, n-acetyl cysteine, 250 μ M; H₂O₂ 4 mM; SB203580 10 μ M

Treatments	Microtubules		Macrotubules	
	Frequency (%)	Mean diameter (nm)	Frequency (%)	Mean diameter (nm)
CONTROL	100.00 (<i>n</i> = 365)	20.67 $\pm$ 0.13	–	–
DPI	7.40 (<i>n</i> = 52)	23.77 $\pm$ 0.22	92.60 (<i>n</i> = 646)	32.52 $\pm$ 0.16
SB/SB + DPI	73.50 (<i>n</i> = 86)	23.84 $\pm$ 0.13	26.50 (<i>n</i> = 31)	30.77 $\pm$ 0.56
NAC	4.90 (<i>n</i> = 11)	24.30 $\pm$ 0.29	95.10 (<i>n</i> = 212)	31.80 $\pm$ 0.23
SB/SB + NAC	74.65 (<i>n</i> = 106)	24.06 $\pm$ 0.11	25.53 (<i>n</i> = 36)	30.56 $\pm$ 0.40
H ₂ O ₂	22.73 (<i>n</i> = 20)	24.27 $\pm$ 0.25	77.27 (<i>n</i> = 68)	29.00 $\pm$ 0.22
SB/SB + H ₂ O ₂	72.44 (<i>n</i> = 71)	23.63 $\pm$ 0.19	27.56 (<i>n</i> = 27)	31.38 $\pm$ 0.55

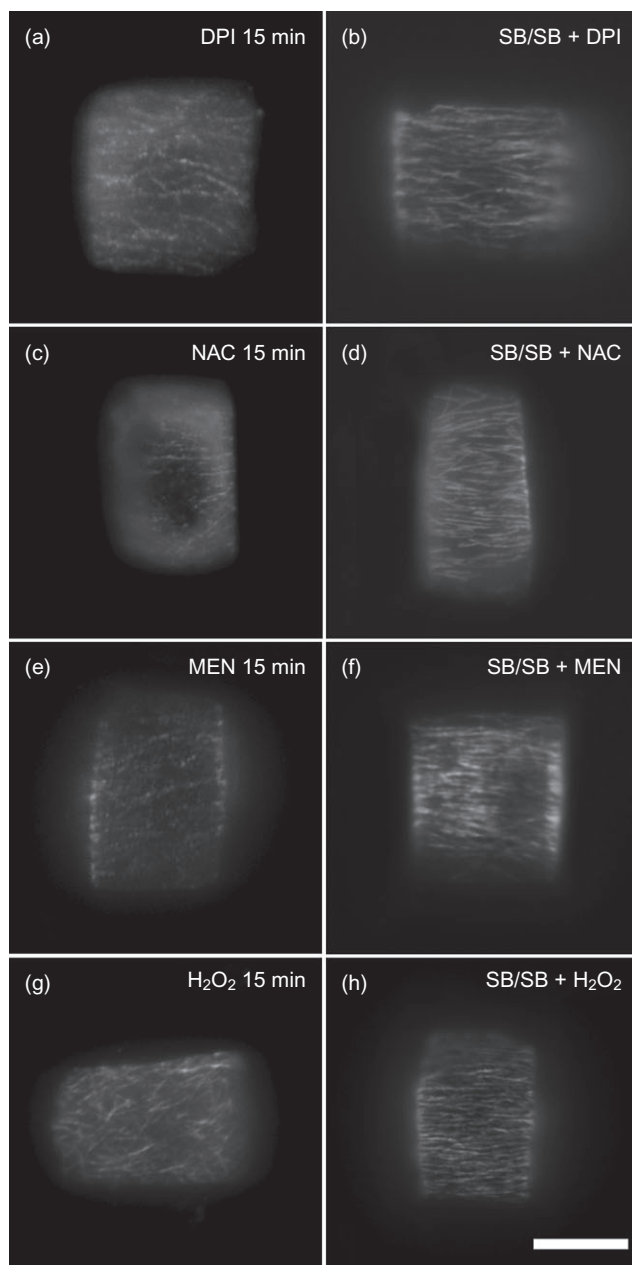


Figure 9. The selective p38-MAPK inhibitor SB203580 prevents loss of microtubule induced by reactive oxygen species (ROS) homeostasis disturbance. *T. turgidum* interphase root tip cells treated for 15 min with ROS modulators alone (a, c, e, g), pretreated with SB203580 for 30 min and treated afterwards with SB203580 together with each of the chemicals for 15 min (b, d, f, h), as they appear after tubulin immunodetection. DPI, diphenylene iodonium, 25 μ M; NAC, n-acetyl cysteine, 250 μ M; MEN, menadione, 25 μ M; H₂O₂ 4 mM; SB203580 10 μ M. Bar: 10 μ m.

of a protein displaying similar immunological properties with the MAPKAPK2 in H₂O₂-treated roots (Fig. 6b). MAPKAPK2 is a substrate of p38-MAPKs (Yuan *et al.* 2010). Therefore, in *T. turgidum*, p46 phosphorylation is accompanied by the phosphorylation of a MAPKAPK2-like protein and this response is blocked by SB203580. Collectively, these

data strongly support the existence of p38-like MAPK in plants and its implication in stress transmitting signalling routes.

p46 phosphorylation in sensing redox imbalance

One of the main findings of this study is that the phosphorylation state of p46-p38-like MAPK changes in response to redox imbalance. The decrease in ROS levels, achieved by DPI and NAC (Livanos *et al.* 2012a; see also Fig. 1b,c), stimulates p46 phosphorylation (Fig. 3). Moreover, immunoblotting of phospho-p46 in untreated seedlings of *rh2 A. thaliana* mutants revealed that phospho-p46 levels were dramatically increased (Fig. 4). ROS levels in *rh2* roots are considerably decreased compared with the wild type (Fig. 1f; cf. Fig. 1a; see also Foreman *et al.* 2003; Livanos *et al.* 2012a). In addition, ROS generators like MEN- or H₂O₂-inducing oxidative stress (Livanos *et al.* 2012a; see also Fig. 1d,e) also result in an increase of phospho-p46 levels (Fig. 3). This response was not expected since in animal cells, elevation of ROS levels stimulates p38 phosphorylation, while treatment with antioxidants suppresses the activation of the p38-MAPK (Kurata 2000; Gaitanaki *et al.* 2006). Therefore, in plants, any significant alteration of redox state induces p46 phosphorylation. These observations suggest that in plants, p46-MAPK is implicated in the mechanism(s) sensing redox changes and that its phosphorylation occurs upon alterations of cellular ROS levels. Considering that ROS disturbance serves as a stress signal (Foyer & Noctor 2005a,b), phosphorylation of p46 seems to be involved in the mechanism of its perception.

ROS, apart from their toxic effects, function as important signalling molecules (Foreman *et al.* 2003). In this direction, the unexpected phosphorylation of p46 under low ROS levels may be attributed to the cellular mechanisms involved in restoration of ROS homeostasis. Plants possess several enzymes for 'deliberate' ROS generation, including the Rbohs (Marino *et al.* 2012). Rbohs are homologous to the catalytic subunit gp91 of human phagocytes NADPH oxidase (Sagi & Fluhr 2006). Interestingly, p38-MAPK activation in human neutrophils is accompanied by NOX activation and subsequent ROS production (Lal *et al.* 1999). Moreover, the inhibition of p38 activity results in a decrease in NADPH oxidase-mediated ROS production (Bao *et al.* 2007). In plants, phospho-p46 accumulation was observed in treatments with the NADPH oxidase inhibitor DPI (Figs 3 & 4), as well as in *rh2 A. thaliana* seedlings lacking RBOHC (Fig. 4), where ROS levels in roots are considerably low (Foreman *et al.* 2003). These data may therefore lead to the hypothesis that in angiosperms, p46 and NADPH oxidases function in feedback-connected signalling cascades.

p46, MT disappearance and atypical tubulin polymer formation

A consequence of redox imbalance in plant cells is MT disappearance and the assembly of the atypical tubulin polymers (Livanos *et al.* 2012a,b). This is not surprising since the

MT cytoskeleton has a leading crucial role in sensing different types of abiotic stress (Nick 2013). Furthermore, p38-MAPK has been repeatedly implicated in driving MT disorganization and promoting tubulin polymerization during stress in animal cells. For instance, hypoxia treatment in different animal cells results in MT disruption (Hu *et al.* 2010). In this study, the authors showed that the rapid p38-MAPK activation is accompanied by Op18/stathmin activation through dephosphorylation and MAP4 inactivation by phosphorylation. Both events were correlated to disorganization of the MT cytoskeleton and were attenuated in the presence of SB203580 (Hu *et al.* 2010). Similar findings regarding the behaviour of the MT cytoskeleton in 2-methoxyestradiol-treated human endothelial cells support a role for p38-MAPK in the mechanisms of MT destabilization (Bogatcheva *et al.* 2007). On the other hand, the phosphorylation of p38-MAPK confers the ability of As_2O_3 to induce tubulin polymerization in HeLa and MCF-7 cells (Shen *et al.* 2011). Therefore, p38-MAPK, a ROS sensor kinase in animal cells (Dolado *et al.* 2007), affects MT dynamics in multiple ways.

In the present case, the p46-MAPK could be in a similar manner responsible for MT disruption and the consequent atypical tubulin polymer assembly during ROS imbalance. Our data clearly showed that ROS overproduction, as well as the inhibition of NADPH oxidase and the extensive ROS scavenging, successively stimulate p46 phosphorylation (Fig. 3), MT disappearance (Fig. 9a,c,e,g) and atypical tubulin polymer assembly (Fig. 8a–e). Moreover, SB203580 prevents p46 phosphorylation as well as its function (Figs 6 & 7), MT disruption (Fig. 9) and the formation of microtubules and tubulin paracrystals (Fig. 8k–o, Table 1). Therefore, similar to those described for osmoregulation in plasmolysed plant cells (Komis *et al.* 2004), in angiosperms, p46 is involved in the mechanisms directing MT loss and their replacement by atypical tubulin polymers. Evidence favouring the proposed role of p46 is that treatments with oxidants in combinations with either of DPI or NAC not only result in decreased phospho-p46 levels (Fig. 5), but also have no detectable effects on tubulin cytoskeleton and avert the assembly of atypical tubulin polymers (Fig. 8f–j). Therefore, it is likely that p46 phosphorylation state interferes with the organization of the tubulin cytoskeleton. Low phospho-p46 levels do not affect cortical MTs, whereas the induced by ROS disturbance activation of p46 rapidly results in MT disruption and drives the assembly of atypical tubulin polymers. The case of the *rh2 A. thaliana* mutant confirmed this hypothesis. These plants exhibit high levels of phospho-p46 (Fig. 4) and concurrently, a large amount of root cells display aberrations in tubulin cytoskeleton, which is mostly consisted of microtubules (Livanos *et al.* 2012a,b).

Signalling mechanisms driving the assembly of atypical tubulin polymers

In plants, the exact role of p46 implication in signal transduction pathways cannot be easily identified. The only fact known with certitude is that this protein functions as a

p38-like stress-activated MAPK. Therefore, it is difficult to specify the proteins that mediate p46 phosphorylation as well as its downstream substrates. The data presented in this study showed that proteins like MAPKAPK2 could act, among others, as substrates for p46 (Fig. 6b). Notably, MAPKAPK2 has been correlated with the organization of tubulin cytoskeleton at least in mouse meiotic cells (Yuan *et al.* 2010).

Based on the existing knowledge about animal p38-MAPK (Hu *et al.* 2010), it may be assumed that p46 could interfere with the induction of MAP phosphorylation. Recent evidence implicates the protein MAP65-1 in the assembly of microtubules and tubulin paracrystals during ROS homeostasis disturbance (Livanos *et al.* 2012a). Moreover, the action of MAP65-1 is similar to that of MAP2 and MAP4 (Ebner *et al.* 1999; Dehmelt & Halpain 2004; see also Panteris *et al.* 2010). Phospho-p38-MAPK directly phosphorylates MAP4 *in vivo* (Hu *et al.* 2010), whereas it can weakly phosphorylate MAP2 *in vitro* (Björkblom *et al.* 2005). Besides, MAP65-1 serves as a substrate for the *Arabidopsis* MAPKs, MPK3, MPK6 and MPK4 (Panteris *et al.* 2010), which are all proteins participating in the transduction of ROS signals (Suarez Rodriguez *et al.* 2010). In particular, MPK4 phosphorylation is a result of MEKK1/2 function during loss of ROS homeostasis (Nakagami *et al.* 2006), whereas MPK3 and MPK6 are activated by ANP1 (*Arabidopsis*-NPK1-related protein kinase 1) in response to oxidative stress (Kovtun *et al.* 2000). Alternatively, apart from a possible participation of p46 in the complex routes of ROS signalling, the possibility that p46 may directly, when activated, phosphorylate MAP65-1, thus, driving the atypical tubulin polymer assembly, cannot be excluded.

Moreover, phosphatidic acid, which is generated by phospholipase D during oxidative stress, can also stimulate ROS production via NADPH oxidase (Wang *et al.* 2006). This lipid mediator also promotes MPK3 and MPK6 activation via OXI1 kinase, which is required for oxidative burst signalling (Rentel *et al.* 2004; Testerink & Munnik 2005; see also Foyer & Noctor 2005b). This is interesting since it has been shown that phospholipase D-mediated phosphatidic acid production is upstream of p46 phosphorylation during microtubule formation in plasmolysed *T. turgidum* root cells (Komis *et al.* 2006).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Prof. Liam Dolan (John Innes Centre, Norwich, UK) for the kind offer of the *rh2 A. thaliana* seeds and Dr. I.D. Adamakis (Department of Botany, School of Biology, Aristotle University, Thessaloniki, Greece) for the kind offer of the anti-GAPDH antibody. This work was financed by the University of Athens.

REFERENCES

- Aruoma O.I., Halliwell B., Hoey B.M. & Butler J. (1989) The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* **6**, 593–597.

- Bao W., Behm D.J., Nerurkar S.S., Ao Z., Bentley R., Mirabile R.C., ... Yue T.-L. (2007) Effects of p38 MAPK inhibitor on angiotensin II-dependent hypertension, organ damage, and superoxide anion production. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **49**, 362–368.
- Benrahmoune M., Thérond P. & Abedinzadeh Z. (2000) The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine. *Free Radical Biology and Medicine* **29**, 775–782.
- Björkblom B., Östman N., Hongisto V., Komarovski V., Filén J.-J., Nyman T.A., ... Coffey E.T. (2005) Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector. *Journal of Neuroscience* **25**, 6350–6361.
- Bogatcheva N.V., Djanybek A., Mambetsariev B., Moldobaeva N. & Verin A. (2007) Involvement of microtubules, p38, and Rho kinases pathway in 2-methoxyestradiol-induced lung vascular barrier dysfunction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **292**, 487–499.
- Bolwell G.P. & Wojtaszek P. (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**, 347–366.
- Capone R., Tiwari B.S. & Levine A. (2004) Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 425–428.
- Cuadrado A. & Nebreda A.R. (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal* **429**, 403–417.
- Davies S.P., Reddy H., Caivano M. & Cohen P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal* **351**, 95–105.
- Dehmelt L. & Halpain S. (2004) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology* **6**, 204. doi:10.1186/gb-2004-6-1-204.
- Dolado I., Swat A., Ajenjo N., De Vita G., Cuadrado A. & Nebreda A.R. (2007) p38 α MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* **11**, 191–205.
- Ebneth A., Drewes G., Mandelkow E.-M. & Mandelkow E. (1999) Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **44**, 209–224.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., ... Dolan L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**, 442–446.
- Foyer C.H. & Noctor G. (2005a) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* **17**, 1866–1875.
- Foyer C.H. & Noctor G. (2005b) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* **28**, 1056–1071.
- Gaitanaki C., Papatrifiantayllou M., Stathopoulou K. & Beis I. (2006) Effects of various oxidants and antioxidants on the p38-MAPK signalling pathway in the perfused amphibian heart. *Molecular and Cellular Biochemistry* **291**, 107–117.
- García-Gómez C., Parages M.L., Jiménez C., Palma A., Mata M.T. & Segovia M. (2012) Cell survival after UV radiation stress in the unicellular chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* is mediated by DNA repair and MAPK phosphorylation. *Journal of Experimental Botany* **63**, 5259–5274.
- Hu J.-Y., Chu Z.-G., Han J., Dang Y.-M., Yan H., Zhang Q., ... Huang Y.-S. (2010) The p38/MAPK pathway regulates microtubule polymerization through phosphorylation of MAP4 and Op18 in hypoxic cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 321–333.
- Izumi Y., Matsumura A., Wakita S., Akagi K.-i., Fukuda H., Kume T., ... Akaike A. (2012) Isolation, identification, and biological evaluation of Nrf2-ARE activator from the leaves of green perilla (*Perilla frutescens* var. *crispa* f. *viridis*). *Free Radical Biology and Medicine* **53**, 669–679.
- Jiang J. & Song C.-P. (2008) MEK1/2 and p38-like MAP kinase successively mediate H₂O₂ signaling in *Vicia* guard cell. *Plant Signaling and Behavior* **3**, 996–998.
- Jiang J., Wang P., An G., Wang P. & Song C.-P. (2008) The involvement of a p38-like MAP kinase in ABA-induced and H₂O₂-mediated stomatal closure in *Vicia faba* L. *Plant Cell Reports* **27**, 377–385.
- Jiménez C., Berl T., Rivard C.J., Edelstein C.L. & Capasso J.M. (2004) Phosphorylation of MAP kinase-like proteins mediate the response of the halotolerant alga *Dunaliella viridis* to hypertonic shock. *Biochimica et Biophysica Acta* **1664**, 61–69.
- Kawamura F., Hirashima N., Furuno T. & Nakanishi M. (2006) Effects of 2-Methyl-1,4-naphthoquinone (Menadione) on cellular signaling in RBL-2H3 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **29**, 605–607.
- Komis G., Apostolakis P., Gaitanaki C. & Galatis B. (2004) Hyperosmotically induced accumulation of a phosphorylated p38-like MAPK involved in protoplast volume regulation of plasmolyzed wheat root cells. *FEBS Letters* **573**, 168–174.
- Komis G., Quader H., Galatis B. & Apostolakis P. (2006) Macrotubule-dependent protoplast volume regulation in plasmolysed root-tip cells of *Triticum turgidum*: involvement of phospholipase D. *New Phytologist* **171**, 737–750.
- Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G. & Sheen J. (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 2940–2945.
- Kurata S.-I. (2000) Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 23413–23416.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680–685.
- Lal A.S., Clifton A.D., Rouse J., Segal A.W. & Cohen P. (1999) Activation of the neutrophil NADPH oxidase is inhibited by SB 203580, a specific inhibitor of SAPK2/p38. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **259**, 465–470.
- Livanos P., Galatis B., Quader H. & Apostolakis P. (2012a) Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces atypical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*. *Cytoskeleton* **69**, 1–21.
- Livanos P., Apostolakis P. & Galatis B. (2012b) Plant cell division: ROS homeostasis is required. *Plant Signaling and Behavior* **7**, 771–778.
- Marino D., Dunand C., Puppo A. & Pauly N. (2012) A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in Plant Science* **17**, 9–15.
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Nakagami H., Soukupová H., Schikora A., Žárský V. & Hirt H. (2006) A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 38697–38704.
- Nick P. (2012) Microtubules and the tax payer. *Protoplasma* **249**, 81–94.
- Nick P. (2013) Microtubules, signalling and abiotic stress. *The Plant Journal* **75**, 309–323.
- Pantheris E., Komis G., Adamakis I.-D.S., Šamaj J. & Bosabalidis A.M. (2010) MAP65 in tubulin/colchicine paracrystals of *Vigna sinensis* root cells: possible role in the assembly and stabilization of atypical tubulin polymers. *Cytoskeleton* **67**, 152–160.
- Petrov V.D. & Van Breusegem F. (2012) Hydrogen peroxide—a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants* **2012**, pls014. doi:10.1093/aob/pla/pls014.
- Ray P.D., Huang B.-W. & Tsuiji Y. (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signalling. *Cellular Signaling* **24**, 981–990.
- Rentel M.C., Lecourieux D., Ouaked F., Usher S.L., Petersen L., Okamoto H., ... Knight M.R. (2004) OX11 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **427**, 858–861.
- Sagi M. & Fluhr R. (2006) Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* **141**, 336–340.
- Shen L., Xu W., Li A., Ye J. & Zhou J. (2011) JWA enhances As₂O₃-induced tubulin polymerization and apoptosis via p38 in HeLa and MCF-7 cells. *Apoptosis* **16**, 1177–1193.
- Suarez Rodriguez M.C., Petersen M. & Mundy J. (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621–649.
- Takeda S., Gapper C., Kaya H., Bell H., Kuchitsu K. & Dolan L. (2008) Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* **319**, 1241–1244.
- Testerink C. & Munnik T. (2005) Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends in Plant Science* **10**, 368–375.
- Vylegzhanina N.N., Gordon L.K., Minibayeva F.V. & Kolesnikov O.P. (2001) Superoxide production as a stress response of wounded root cells: ESR spin-trap and acceptor methods. *Applied Magnetic Resonance* **21**, 63–70.
- Wang X., Devaiah S.P., Zhang W. & Welti R. (2006) Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in Lipid Research* **45**, 250–278.
- Yao L.-L., Zhou Q., Pei B.-L. & Li Y.-Z. (2011) Hydrogen peroxide modulates the dynamic microtubule cytoskeleton during the defense responses to *Verticillium dahliae* toxins in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* **34**, 1586–1598.

- Yuan J., Xu B.-Z., Qi S.-T., Tong J.-S., Wei L., Li M., . . . Sun Q.-Y. (2010) MAPK-activated protein kinase 2 is required for mouse meiotic spindle assembly and kinetochore-microtubule attachment. *PLoS ONE* **5**, e11247.
- Zarubin T. & Han J. (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research* **15**, 11–18.

Received 13 March 2013; received in revised form 12 October 2013; accepted for publication 14 October 2013

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Figure S1. Effects of SB203580 or DMSO alone on phospho-p46 levels in *T. turgidum* control roots. Representative Western blots of controls showing phospho-p46 accumulation in excised roots treated for 15 min in Hoagland's solutions (left) or roots from intact seedlings treated with water

solutions for 1 h (right). From left to right: Lanes 1, 2, 3, 4: Detached roots incubated in Hoagland's solution (1) or in the same solution containing 10 μ M SB203580 (2), 0.35% (v/v) DMSO (3; equal to DMSO concentration in SB + DPI treated roots), 0.25% (v/v) DMSO (4; equal to DMSO concentration in DPI treatments). Lanes 5, 6: Detached roots incubated in Hoagland's solution for 15 min (5), or in 0.025% (v/v) DMSO (6; equal to DMSO concentration in treatments with MEN). Lanes 7, 8: Roots treated with distilled water (7), or an aqueous solution containing 0.25% (v/v) DMSO (8; equal to DMSO concentration in treatments with DPI). The mean values of phospho-p46 accumulation in the diagram above were derived from four independent experiments in each case. The differences on phospho-p46 levels between control, and DMSO and SB203580 treated roots were not significant (*P* value > 0.05). CTR, Control; DMSO, dimethyl sulfoxide; DPI, diphenylene iodonium; MEN, menadione.

The interplay between ROS and tubulin cytoskeleton in plants

Pantelis Livanos, Basil Galatis, and Panagiotis Apostolakos*

Department of Botany; Faculty of Biology; University of Athens; Athens, Greece

Keywords: antioxidants, macrotubules, microtubules, oxidative stress, reactive oxygen species, redox sensing, tubulin paracrystals

Abbreviations: MAP, microtubule associated protein; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MT, microtubule; PA, phosphatidic acid; PLD, phospholipase D; ROS, reactive oxygen species

Plants have to deal with reactive oxygen species (ROS) production, since it could potentially cause severe damages to different cellular components. On the other hand, ROS functioning as important second messengers are implicated in various developmental processes and are transiently produced during biotic or abiotic stresses. Furthermore, the microtubules (MTs) play a primary role in plant development and appear as potent players in sensing stressful situations and in the subsequent cellular responses. Emerging evidence suggests that ROS affect MTs in multiple ways. The cellular redox status seems to be tightly coupled with MTs. ROS signals regulate the organization of tubulin cytoskeleton and induce tubulin modifications. This review aims at summarizing the signaling mechanisms and the key operators orchestrating the crosstalk between ROS and tubulin cytoskeleton in plant cells. The contribution of several molecules, including microtubule associated proteins, oxidases, kinases, phospholipases, and transcription factors, is highlighted.

Reactive oxygen species (ROS) appeared as a consequence of the introduction of oxygen into earth's atmosphere.¹ ROS collectively comprise a group of radical derivatives of oxygen including superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$) and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), or non radicals such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and hydrogen peroxide (H_2O_2).² They are extremely reactive molecules that display different properties from molecular oxygen or other chemical species and are capable of inducing severe damages in cellular components. However, due to their unique chemical features, ROS have evolved as essential regulators in various biological processes.^{1,3} In animal cells, they are produced as byproducts of oxygen metabolism or after enzymatic activity in mitochondria, cytoplasm and extracellular sites.⁴ In plants, they are generated accidentally or even deliberately in fluctuations in various cellular compartments, such as mitochondria, chloroplasts, peroxisomes as well as the apoplast.³ ROS are critical

for pollen tube growth, gametogenesis and embryo development, root hair development, and stomatal function,⁵⁻⁸ and they mediate plant responses to hormonal stimuli.⁹ Besides their levels rapidly increase during stress resulting in the so-called oxidative burst.¹⁰ Hence, ROS generation is of particular importance for the interaction of plants with biotic factors,¹¹ and during abiotic stresses including salt, cold, osmotic, and drought stress.^{8,10} The crucial contribution of ROS in a broad range of plant developmental and stress processes lies on their ability to act as signals, carry messages, and trigger transduction mechanisms.¹²

On the other hand, microtubules (MTs) are fundamental organelles of plant cells intimately involved in regulation of their morphogenesis¹³ and undergo extensive reorganization during abiotic stress¹⁴ or biotic interactions.¹⁵ Increasing evidence indicates that ROS and MTs are team players and that their fates converge during plant life.^{16,17} Furthermore, ROS have been repeatedly shown to influence tubulin cytoskeleton in various ways.¹⁸ This review attempts to summarize the existing information relevant to ROS and MTs in plants, trying to shed some light on their emerging crosstalk.

ROS homeostasis and tubulin cytoskeleton during plant life

ROS oscillations occur along with fluctuations of antioxidants throughout plant cell division.^{19,20} Apart from its role in regulating specific cell cycle checkpoints,¹⁹ ROS homeostasis, namely the balance between ROS generation and scavenging,^{1,10} is critical for proper completion of cell division due to its interference with mechanisms that direct the organization of successive MT arrays in dividing cells.^{17,18} The chemically-induced disturbance of ROS homeostasis, assessed by using selective ROS-sensitive fluorescent probes, severely affects the MT arrays. Oxidative stress induced by hexavalent chromium²¹ or other chemicals^{17,18} disrupts mitosis and cytokinesis in root-tip cells of angiosperms. The elimination of cellular ROS levels results in almost the same effects. Diphenylene iodonium, a specific inhibitor of ROS-producing NADPH oxidase and the ROS scavenger n-acetyl-cysteine harms mitotic and cytokinetic MT arrays in *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana* root tips.¹⁸ What's more, many cells of *rhb2 A. thaliana* mutant lacking the function of a NADPH oxidase display low ROS levels in roots and simultaneously defects on MT systems.^{17,18} In addition, exogenous application of the antioxidant tripeptide glutathione on *Picea abies* cells affects interphase cortical MTs and the MT-preprophase band.²² The effects of ROS imbalance on MTs are not restricted

*Correspondence to: Panagiotis Apostolakos, Email: papostol@biol.uoa.gr

Submitted: 01/06/2014; Revised: 01/31/2014; Accepted:

01/31/2014; Published Online: 02/12/2014

Citation: Livanos P, Galatis B, Apostolakos P. The interplay between ROS and tubulin cytoskeleton in plants. Plant Signaling & Behavior 2014; 9:e28069; PMID: 24521945; <http://dx.doi.org/10.4161/psb.28069>

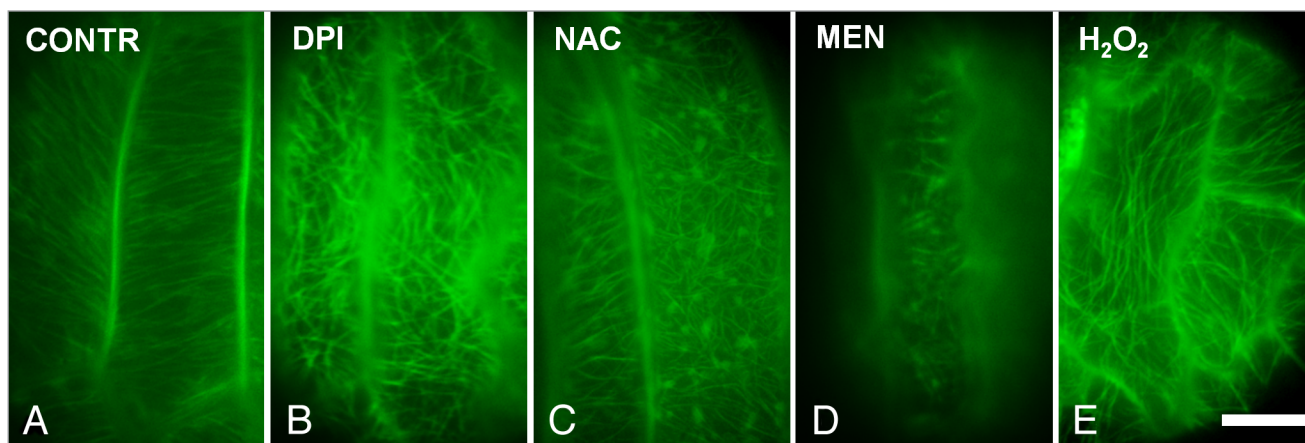


Figure 1. The disturbance of reactive oxygen species (ROS) homeostasis affects tubulin cytoskeleton organization in transgenic *Arabidopsis* plants expressing GFP:TUA6. (**A–E**): Epidermal cells from 4-d-old hypocotyls of seedlings treated with distilled water (**A**) or with ROS modulators (**B–E**). The decrease of ROS levels forced either by the NADPH oxidase inhibitor diphenylene iodonium (DPI) or by the ROS scavenger n-acetyl-cysteine (NAC) results in disruption and reorganization of the tubulin cytoskeleton into random mesh-like arrays (**B, C**; cf. **A**). Similarly, oxidative stress induced by the oxidizing agent menadione (MEN) and hydrogen peroxide (H_2O_2) results in MT remodeling (**D, E**; cf. **A**). CONTR, distilled water; DPI, 50 μ M; NAC, 500 μ M; MEN, 50 μ M, H_2O_2 , 5 mM. Treatments: 2 h. Scale bar: 10 μ m.

to dividing cells. Treatments of GFP:TUA6 transgenic *Arabidopsis* seedlings with ROS modulators revealed that the cortical MTs in developing epidermal cells of hypocotyls and cotyledons are also sensitive to alterations in ROS levels (Fig. 1). Moreover, *Arabidopsis* epidermal cells exposure to ROS-generating titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles disrupted the MT networks and led to formation of tubulin aggregates.²³ Hence, either ROS overproduction or elimination forces the disappearance of MTs and their replacement by stable and resistant atypical tubulin polymers (see also ref. 24). These polymers may be macrotubules i.e., tubulin tubules displaying higher outer diameter compared with typical MTs, or paracrystal conformations containing tubulin referred as tubulin paracrystals.¹⁸

On the other hand, elevation of ROS levels has been recorded during almost every type of biotic or abiotic stress and functions as a universal signal triggering downstream responses.²⁵ Stress-induced ROS generation occurs in different cellular sources, activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades and leads to upregulation of several transcription factors.²⁶ In addition, many different kinds of stress induce rearrangements in tubulin cytoskeleton.^{14,15} MTs participate in biotic stress responses, including the pathogen attack-induced programmed cell death.²⁷ Likewise, disruption and depolymerization of MTs at the site of pathogen infection has been repeatedly observed.^{15,27} Moreover, MT reorganization occurs along with oxidative burst during mechanical stress and both these phenomena are implicated in sensing mechanical stimulation.^{28,29} Therefore, it is reasonable to assume that ROS generation and cytoskeletal alterations might be coupled during plant life. Both drive developmental procedures and, during stress, they promote the perception of the stimuli, as well as the consequent responses.

Implications of cytoskeletal contribution to deliberate ROS production

One of the most important protein groups that respond to stress and concurrently contribute to ROS production is that of Rbohs

(respiratory burst oxidase homologs).¹⁰ They are plasmalemmal enzymes that catalyze superoxide production in the apoplast.³⁰ Superoxide may be protonated to form hydroperoxyl radical ($\cdot O_2H$) or converted to hydrogen peroxide, which easily diffuses into the cytosol and initiates signaling transduction.³⁰ The activation of NADPH oxidases followed by ROS generation has been recorded in defense responses of *A. thaliana* against *Verticillium dahliae* toxins³¹ or those against the bacterial elicitors flg22 and Harpin in *Vitis* cells.³² Using diphenylene iodonium alone or together with exogenously added hydrogen peroxide Yao et al.³¹ showed that the NADPH oxidase-mediated ROS accumulation is responsible for MT-depolymerization. In turn, the depolymerization of cortical MTs has been repeatedly suggested to be essential for the expression of specific resistant genes.^{31,32}

Recent evidence suggested the existence of a positive feedback relationship between tubulin cytoskeleton and ROS production and revealed a new mode of NADPH oxidase regulation. In this relationship, the MT-associated protein MAP65-1 displays a unique role, different than usual. ZmMAP65-1a that was found to be increased after application of hydrogen peroxide was also shown to regulate hydrogen peroxide amplification upon treatment of *Zea mays* leaves with brassinosteroid phytohormones.³³ The ROS-responsive ZmMPK5 interacts with ZmMAP65-1a toward activating the expression of NADPH oxidase genes and the subsequent responses.³³ In particular, the transcription of several antioxidant defense genes, which is initiated after NADPH oxidase activation, requires the phosphorylation of ZmMAP65-1a by ZmMPK5.^{33,34} Therefore, it is very interesting that, during stress, cytoskeletal proteins respond to elevated ROS levels and at the same time activate the NADPH oxidase assisting the purposeful production of ROS.

The implication of NADPH oxidase and ROS homeostasis in regulation of MT organization is further supported by the case of *rhd2* *A. thaliana* mutants, which lack one of the *A. thaliana* NADPH oxidases. The *rhd2* mutants display low ROS levels and simultaneously tubulin cytoskeleton defects and a significant

amount of microtubules in roots.¹⁸ Interestingly, these plants exhibit extremely elevated levels of a p46 p38-like MAPK.³⁵ It was recently found that in angiosperms the p46 MAPK is implicated in sensing cellular ROS level alterations. ROS overproduction as well as elimination of ROS levels resulted in the activation of this protein.³⁵ Once activated, p46 drives the assembly of atypical tubulin polymers.³⁵ This strengthens the view that the mechanisms maintaining homeostasis during low or elevated ROS levels are connected by feedback loops and tightly linked to cytoskeletal responses.

ROS signaling and the role of phosphatidic acid

The p46 MAPK is assumed to be directly or indirectly involved in MAP65-1 activity toward the assembly of atypical tubulin polymers during ROS imbalance.³⁵ Moreover, MAP65-1 is phosphorylated by several other ROS-responsive MAPKs. AtMPK3, AtMPK4, and AtMPK6, which are activated by ROS,³⁶ have been shown to directly phosphorylate AtMAP65-1.^{37,38} The activity of MAP65-1 is also modulated by its interaction with phosphatidic acid (PA), an important lipid mediator produced by phospholipase D (PLD).³⁹ PA and MAP65-1 synergy plays a critical role during salt stress, since PA binds to MAP65-1 and enhances tubulin polymerization and the MT-bundling activity of MAP65-1.³⁹ Salinity forces MT depolymerization followed by MT reorganization into stable arrays, responses leading to salt tolerance. The oxidative burst seems to have a significant part in these processes.²⁴ PA production and activation of p46 p38-like MAPK mediate the assembly of microtubules during protoplast volume regulation in plasmolysed *T. turgidum* root-tip cells.⁴⁰ In *A. thaliana*, PA produced by PLD regulates ROS generation by NADPH oxidase during stomatal closure induced by treatment with abscisic acid.⁴¹ Interestingly, in *Vicia* a p38-like MAPK participates in abscisic acid triggered oxidative burst, whereas this hormone was found to activate p38 MAPK in chloronema cells of *Funaria hygrometrica*.^{42,43} Considering the data presented above, it may be proposed that the interactions between PLD and its derivative PA, p38-like MAPKs and NADPH oxidase-derived ROS collectively orchestrate the rearrangements of tubulin cytoskeleton, which are part of the responses to external stimuli.

This implies that ROS mediate stress responses and hormone signaling, through converging pathways. Such responses repeatedly include participation of the tubulin cytoskeleton and recruitment of tubulin associated proteins. In this direction, ZmMPK5 is activated by abscisic acid⁴⁴ and concurrently, as it was previously noticed, interacts with ZmMAP65-1a toward ROS production after treatment with brassinosteroids.³³ Abscisic acid also strongly modifies the levels of α and β tubulin mRNA transcripts⁴⁵ and induces depolymerization and reorganization of cortical MTs.^{46,47} In addition, it is known that the rest classes of phytohormones also modulate ROS levels in plants,⁹ whereas almost all the hormones interfere with plant cytoskeleton.^{48,49} Although, some implications suggest ROS involvement in hormone-induced tubulin cytoskeleton remodeling, their exact role cannot be easily identified.

MT-associated transcription factors involved in fine tuning of ROS levels

An attractive example of a possible interconnection between MTs, hormones and effector molecules are DELLA proteins.

These proteins are transcription factors, which participate in hormone signaling mechanisms⁵⁰ and mediate several developmental processes in plants.⁵¹ During stress, DELLA proteins promote the transcription of genes encoding antioxidant proteins, such as superoxide dismutase. Hence, they contribute to fine tuning of cellular ROS levels.^{50,52} Importantly, DELLA proteins have been recently implicated in governing cortical MT organization in *Arabidopsis* during cell expansion induced by gibberellins.⁵¹ In particular, these proteins affect, among others, the availability of α/β tubulin heterodimers and consequently the polymerization of MTs due to their ability to direct the prefoldin complex localization, which is required for tubulin folding. Furthermore, Locascio et al.⁵¹ note that the DELLA-dependent accumulation of prefoldin complex in nucleus is potentially crucial for the expression of several tubulin encoding genes. This is very interesting since it is known that the disturbance of ROS homeostasis affects the levels of α or β tubulin in plants and animals, leading in some cases to elevated tubulin levels (see also ref. 23).^{17,53} We may then extrapolate that the upregulation of tubulin is part of the antioxidant defense responses induced by transcriptional mediators like DELLA proteins. In this direction, tubulin upregulation may follow treatments with chemicals inducing low ROS levels.¹⁷ These data further support the hypothesis that the dynamic regulation of tubulin cytoskeleton is part of the cellular mechanisms driving the restoration of ROS homeostasis.

Some aspects on the oxidation of tubulins

Paradigms from animal cells support the view that the regulation of tubulin cytoskeleton act protectively against perturbations of cellular redox state.⁵⁴ It is well known that tubulins are extremely sensitive to oxidative stress and that their cysteine residues could be easily oxidized, even after a short exposure to ROS.⁵⁴ Oxidation of cysteine sulfhydryl groups may promote the cross-linking between α and β tubulin due to formation of disulfide bonds, thus preventing the assembly of MTs.^{54,55} Of outstanding interest is the case of β III isoform of animal β tubulins (reviewed by Ludueña⁵⁴). This isoform lacks cys239, one of the cysteines of β tubulin, which easily forms disulfide bonds and its oxidation has been straightly correlated with the inhibition of MT assembly.⁵⁴ Importantly, the β III isoform is present at high levels in cells displaying regularly elevated ROS levels and is upregulated in oxidative stress treated cells.⁵⁴ Therefore, it seems that redox sensing may be related to the expression of different tubulin isoforms and this may prevent cellular damage.

Such information regarding plant cell tubulins is missing. However, proteome examination of *A. thaliana* cells treated with hydrogen peroxide revealed that α and β plant tubulins are also susceptible to oxidation.⁵⁶ Besides, using proteomic analysis it was found that both α and β tubulins undergo S-glutathionylation in *A. thaliana* cells, after application of the oxidant *t*-butyl-hydroperoxide (*t*-BuOOH).⁵⁷ Glutathione binding offers protection to thiol groups of cysteine against oxidation. Nevertheless, thiolation itself could influence the activity of the modified protein or even drive signal transduction.^{57,58} Thus, it seems that apart from mechanisms that perceive cellular redox status, additional regulatory mechanisms sense the redox status of tubulin. Since the later is strongly related to the

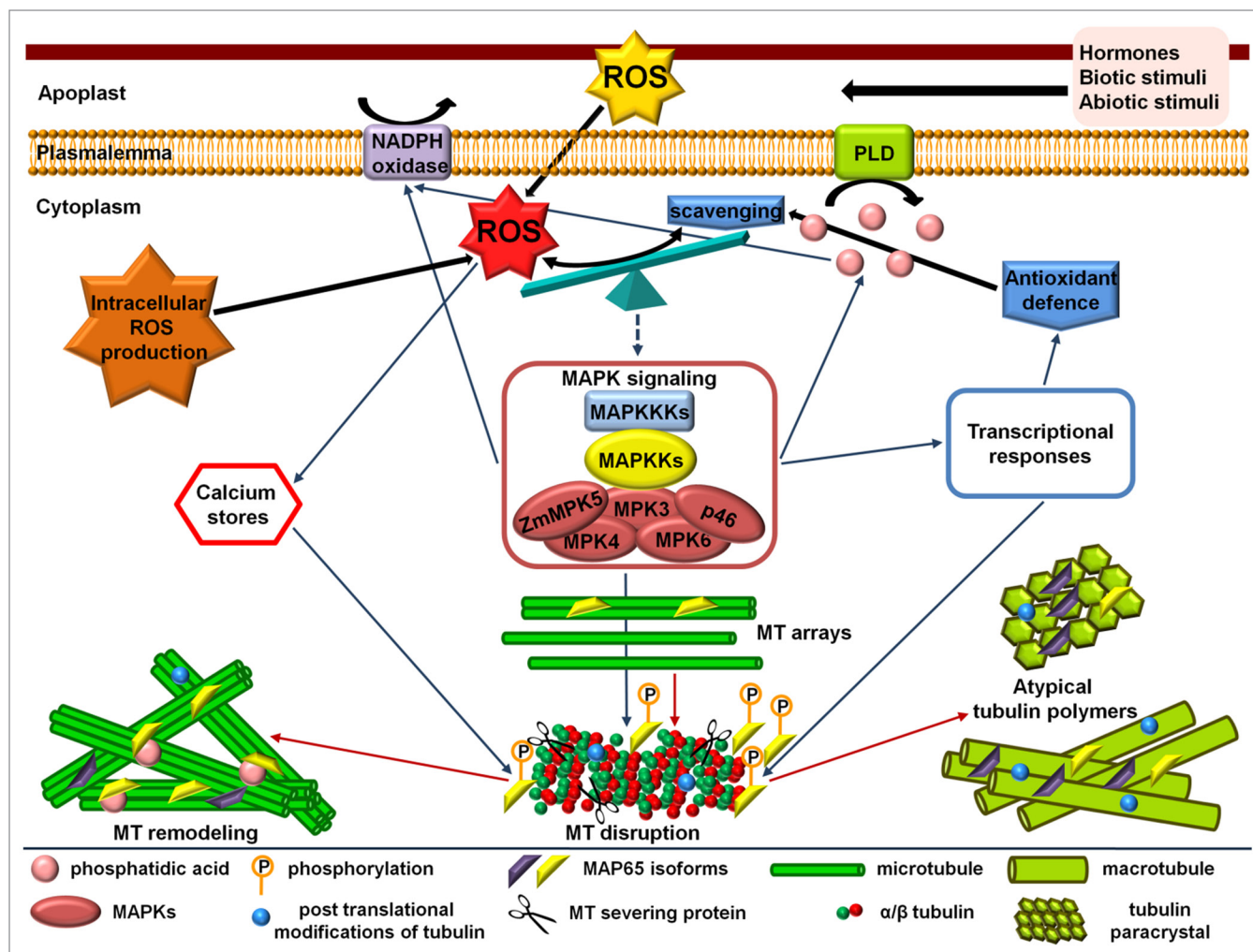


Figure 2. Simplified hypothetical model describing the changes mediated by reactive oxygen species (ROS) level alteration with respect to the organization of tubulin cytoskeleton. ROS and antioxidant balance is further influenced by abiotic or biotic stimuli. In any case, the ROS produced in the apoplast (e.g., derived from NADPH oxidase) enter the cytosol and together with intracellularly generated ROS constitute the total amount of cellular ROS. Consequently, the result of the tag war between oxidant generation and antioxidant defenses is perceived and either directly or through feedback connected signaling cascades forces the reorganization of tubulin cytoskeleton. The reorganization among others aids the restoration of ROS homeostasis. The microtubule (MT) arrays disappear and MT remodeling, or the assembly of atypical tubulin polymers like macrotubules and tubulin paracrystals, follows. These processes are mediated by MT-associated proteins (MAPs) assisted by other molecules such as phosphatidic acid produced by phospholipase D (PLD). The modifications of tubulin or MAPs at the post-translational level may crucially contribute to this interplay.

capability for MT assembly,^{59,60} such mechanisms may protect tubulin against irreversible oxidation.⁶⁰

Tubulin cytoskeleton remodeling during ROS imbalance

The formation of stable atypical tubulin polymers, following the disturbance of ROS homeostasis, can be explained considering that they contain or consist of modified tubulins. Apart from oxidative modifications ROS imbalance was found to rapidly induce other post-translational modifications in plants, such as tubulin acetylation^{17,18} (see also ref. 21) or slight alterations of the tyrosinated tubulin levels.¹⁷ Such modifications that amend the tubulin polymer properties are common in stress conditions.³² For example, hyperosmotic treatment stimulates phosphorylation of α -tubulin.⁶¹ Interestingly, osmotic stress results not only in cellular oxidative burst,¹⁰ but also in disappearance of MTs followed by the assembly of macrotubules.⁴⁰ ROS production and its interplay with

MT reorganization allow adaptive response during osmotic stress in a model proposed by Nick et al.⁶² Taking into consideration the data presented above, we may propose that tubulin post-translational modifications during ROS homeostasis disturbance could be correlated with the behavior of the tubulin cytoskeleton. A possible explanation of this behavior might be that such modifications probably, among others, influence the interaction of tubulins or MTs with associated macromolecules (see also ref. 63) as well as the properties of tubulin polymers.

Regarding the process of MT destruction, one would suggest that ROS might directly or indirectly interfere with aspects of proper tubulin polymerization, such as the concentration of calcium or the availability of free tubulin heterodimers.⁶⁴ It is known that increased ROS levels are implicated in raising calcium levels⁷ and that MTs are sensitive to calcium concentrations.⁶⁴ Elevated

calcium may lead to destruction of MTs⁶⁵ and ROS might interfere with the amount of tubulin available for polymerization.¹⁷ The disruption of MTs could potentially be mediated by the activation of MT severing proteins like katanin. Katanin is a heterodimeric protein that binds to and cleaves MTs.⁶⁶ In plants, it was shown to be recruited during cytoskeletal responses to several stimuli that induce elevation of cellular ROS levels, such as mechanical stress and wounding,^{8,28,29} blue light,^{67,68} and hormonal responses.^{9,66} However, the extent of association of ROS fluctuations with katanin activation remains to be found. Besides, MT disappearance could be further promoted by weakening of MAP binding to MTs. For instance, phosphorylation of MAP65–1, which belongs to MAP65 protein family and has been implicated in MT bundling, results in its dissociation from MTs and leads to MT disassembly.³⁷ Therefore, it is very interesting that MAP65–1 is one of the substrates of the ROS-activated MAPKs, AtMPK3, AtMPK4, AtMPK6.^{36–38}

Importantly, MAP65–1 mediates the formation of atypical tubulin polymers, i.e., microtubules and tubulin paracrystals during ROS disturbance.¹⁸ MAP65 proteins also participate in the assembly of tubulin paracrystals after treatment of *Vigna sinensis* roots with colchicine.⁶⁹ What's more, the MAP65–6 along with MAP65–1 has been found to promote the organization of resistant thick MT bundles during salt stress, which appear as a mesh-like network.⁷⁰ The binding capacity of different MAP65 proteins to MTs highly depends on the MT-binding domains of MAP65 isoforms, which are localized to the C-terminal of each protein molecule.⁷¹ Besides, post-translational modifications of tubulin could modulate the binding potential to different MAPs.⁶³ Hence, we may suggest that, during atypical tubulin polymer formation accompanying loss of ROS homeostasis, MAPs promoting the assembly of tubulin polymers other than MTs preferably bind to modified tubulin.

Concluding Remarks

ROS homeostasis is of particular importance for plant life and, nowadays, emerges as a significant regulator of tubulin cytoskeleton. The interplay between ROS and tubulin cytoskeleton is implicated in sensing almost every stressful situation and drives the succeeding responses. The responses against various stimuli are mediated through converging signaling cascades that aim at restoring ROS homeostasis. During this process the remodeling of tubulin cytoskeleton seems to play a crucial role. Such remodeling includes, among others, the recruitment of MAPs which is forced by MAPK signaling and regulatory mechanisms acting at transcriptional and post-transcriptional level. Some of the possible participants of this complex crosstalk, which were discussed in the present article, are illustrated in **Figure 2**. The existence of other signaling routes, protein components and additional mechanisms cannot be excluded. Further experimentation is needed in order to establish a more clear relationship between ROS homeostasis and tubulin cytoskeleton. ROS appear as ideal players in fine tuning of the behavior of tubulin cytoskeleton during stress. It would therefore be very promising to further investigate the ROS-dependent MT-mediated developmental processes.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The authors would like to express their thanks to Dr František Baluška (University of Bonn, Germany) for his kind invitation to prepare this review and Dr Ioannis-Dimosthenis Adamakis (Aristotle University of Thessaloniki, Greece) for the GFP:TUA6 *A. thaliana* seeds. This work has been financed by the University of Athens, Greece.

References

- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 2004; 9:490–8; PMID:15465684; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006; 141:312–22; PMID:16760481; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 2004; 55:373–99; PMID:15377225; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 2011; 194:7–15; PMID:21746850; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201102095>
- Potocký M, Jones MA, Bezvoda R, Smirnov N, Zárský V. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytol* 2007; 174:742–51; PMID:17504458; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02042.x>
- Martin MV, Fiol DF, Sundaresan V, Zabaleta EJ, Pagnussat GC. oiwa, a female gametophytic mutant impaired in a mitochondrial manganese-superoxide dismutase, reveals crucial roles for reactive oxygen species during embryo sac development and fertilization in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2013; 25:1573–91; PMID:23653473; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.109306>
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 2003; 422:442–6; PMID:12660786; <http://dx.doi.org/10.1038/nature01485>
- Pitzschke A, Forzani C, Hirt H. Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8:1757–64; PMID:16987029; <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2006.8.1757>
- Kwak JM, Nguyen V, Schroeder JI. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiol* 2006; 141:323–9; PMID:16760482; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.079004>
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 2010; 33:453–67; PMID:19712065; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Torres MA. ROS in biotic interactions. *Physiol Plant* 2010; 138:414–29; PMID:20002601; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x>
- Møller IM, Sweetlove LJ. ROS signalling-specificity is required. *Trends Plant Sci* 2010; 15:370–4; PMID:20605736; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.008>
- Kost B, Mathur J, Chua N-H. Cytoskeleton in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 1999; 2:462–70; PMID:10607658; [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00024-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00024-2)
- Nick P. Microtubules, signalling and abiotic stress. *Plant J* 2013; 75:309–23; PMID:23311499; <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12102>
- Hardham AR. Microtubules and biotic interactions. *Plant J* 2013; 75:278–89; PMID:23480445; <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12171>
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Jansen MAK. Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell Environ* 2009; 32:158–69; PMID:19021890; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01908.x>
- Livanos P, Apostolakis P, Galatis B. Plant cell division: ROS homeostasis is required. *Plant Signal Behav* 2012; 7:771–8; PMID:22751303; <http://dx.doi.org/10.4161/psb.20530>
- Livanos P, Galatis B, Quader H, Apostolakis P. Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces atypical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2012; 69:1–21; PMID:21976360; <http://dx.doi.org/10.1002/cm.20538>
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol Biochem* 2002; 40:537–48; [http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01414-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01414-6)

20. Vivanco PD, Dong Y, Ziegler K, Markovic J, Pallardó FV, Pellny TK, Verrier PJ, Foyer CH. Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole-cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. *Plant J* 2010; 64:825-38; PMID:21105929; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04371.x>
21. Eleftheriou EP, Adamakis I-DS, Fatsiou M, Panteris E. Hexavalent chromium disrupts mitosis by stabilizing microtubules in *Lens culinaris* root tip cells. *Physiol Plant* 2013; 147:169-80; PMID:22607451; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01652.x>
22. Urbanek A, Zechmann B, Zellnig G, Müller M. Aspects of glutathione treatment on the cytoskeleton in different cells of *Picea abies*. *Phyton* 2003; 43:319-33
23. Wang S, Kurepa J, Smalle JA. Ultra-small TiO₂ nanoparticles disrupt microtubular networks in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 2011; 34:811-20; PMID:21276012; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02284.x>
24. Wang C, Li J, Yuan M. Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2007; 48:1534-47; PMID:17906320; <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcm123>
25. Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* 2006; 9:436-42; PMID:16759898; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.014>
26. Jaspers P, Kangasjärvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiol Plant* 2010; 138:405-13; PMID:20028478; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01321.x>
27. Smertenko A, Franklin-Tong VE. Organisation and regulation of the cytoskeleton in plant programmed cell death. *Cell Death Differ* 2011; 18:1263-70; PMID:21566662; <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2011.39>
28. Monshausen GB, Gilroy S. Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends Cell Biol* 2009; 19:228-35; PMID:19342240; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2009.02.005>
29. Landrein B, Hamant O. How mechanical stress controls microtubule behavior and morphogenesis in plants: history, experiments and revisited theories. *Plant J* 2013; 75:324-38; PMID:23551516; <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12188>
30. Fluhr R. Reactive oxygen-generating NADPH oxidases in plants. In: Reactive oxygen species in plant signaling, signaling and communication in plants. del Ryo LA, Puppo A, eds. Heidelberg: Springer-Verlag, 2009; 1-23.
31. Yao L-L, Zhou Q, Pei B-L, Li Y-Z. Hydrogen peroxide modulates the dynamic microtubule cytoskeleton during the defence responses to *Verticillium dahliae* toxins in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 2011; 34:1586-98; PMID:21707649; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02356.x>
32. Chang X, Nick P. Defence signalling triggered by Flg22 and Harpin is integrated into a different stilbene output in *Vitis* cells. *PLoS One* 2012; 7:e40446; PMID:22792328; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040446>
33. Zhu Y, Zuo M, Liang Y, Jiang M, Zhang J, Scheller HV, Tan M, Zhang A. MAP65-1a positively regulates H₂O₂ amplification and enhances brassinosteroid-induced antioxidant defence in maize. *J Exp Bot* 2013; 64:3787-802; PMID:23956414; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ert215>
34. Zhang A, Zhang J, Ye N, Cao J, Tan M, Zhang J, Jiang M. ZmMPK5 is required for the NADPH oxidase-mediated self-propagation of apoplastic H₂O₂ in brassinosteroid-induced antioxidant defence in leaves of maize. *J Exp Bot* 2010; 61:4399-411; PMID:20693409; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erq243>
35. Livanos P, Galatis B, Gaitanaki C, Apostolakis P. Phosphorylation of a p38-like MAPK is involved in sensing cellular redox state and drives atypical tubulin polymer assembly in angiosperms. *Plant Cell Environ* 2013; <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12222>; PMID:24138172
36. Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2010; 61:621-49; PMID:20441529; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112252>
37. Smertenko AP, Chang H-Y, Sonobe S, Fenyl SI, Weingartner M, Bögre L, Hussey PJ. Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *J Cell Sci* 2006; 119:3227-37; PMID:16847052; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.03051>
38. Hoehenwarter W, Thomas M, Nukarinen E, Egelhofer V, Röhrig H, Weckwerth W, Conrath U, Beckers GJ. Identification of novel *in vivo* MAP kinase substrates in *Arabidopsis thaliana* through use of tandem metal oxide affinity chromatography. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12:369-80; PMID:23172892; <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M112.020560>
39. Zhang Q, Lin F, Mao T, Nie J, Yan M, Yuan M, Zhang W. Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2012; 24:4555-76; PMID:23150630; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.104182>
40. Komis G, Quader H, Galatis B, Apostolakis P. Microtubule-dependent protoplast volume regulation in plasmolysed root-tip cells of *Triticum turgidum*: involvement of phospholipase D. *New Phytol* 2006; 171:737-50; PMID:16918545; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01784.x>
41. Zhang Y, Zhu H, Zhang Q, Li M, Yan M, Wang R, Wang L, Welti R, Zhang W, Wang X. Phospholipase α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2009; 21:2357-77; PMID:19690149; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.108.062992>
42. Jiang J, Song C-P. MEK1/2 and p38-like MAP kinase successively mediate H₂O₂ signaling in *Vicia* guard cell. *Plant Signal Behav* 2008; 3:996-8; PMID:19704432
43. D'Souza JS, Johri MM. ABA and NaCl activate myelin basic kinase in the chloronema cells of the moss *Funaria hygrometrica*. *Plant Physiol Biochem* 2002; 40:17-24; [http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01344-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01344-4)
44. Liu Y. Roles of mitogen-activated protein kinase cascades in ABA signaling. *Plant Cell Rep* 2012; 31:1-12; PMID:21870109; <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-011-1130-y>
45. Gianì S, Qin X, Faoro F, Breviaro D. In rice, Oryzalin and abscisic acid differentially affect tubulin mRNA and protein levels. *Planta* 1998; 205:334-41; PMID:9640661; <http://dx.doi.org/10.1007/s004250050328>
46. Jiang C-J, Nakajima N, Kondo N. Disruption of microtubules by abscisic acid in guard cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol* 1996; 37:697-701; <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029001>
47. Shibaoka H. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1994; 45:527-44; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.45.060194.002523>
48. Baluška F, Volkmann D, Barlow PW. Hormone-cytoskeleton interactions in plant cells. In: Biochemistry and molecular biology of plant hormones. Hooykaas PJJ, Hall MA, Libbenga KR, eds. Amsterdam: Elsevier, 1999; 363-90.
49. Blume YB, Krasylenko YA, Yemets AI. Effects of phytohormones on the cytoskeleton of the plant cell. *Russ J Plant Physiol* 2012; 59:515-29; <http://dx.doi.org/10.1134/S1021443712040036>
50. Tognetti VB, Mühlenbock P, Van Breusegem F. Stress homeostasis - the redox and auxin perspective. *Plant Cell Environ* 2012; 35:321-33; PMID:21443606; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02324.x>
51. Locascio A, Blázquez MA, Alabadi D. Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin-DELLA interaction. *Curr Biol* 2013; 23:804-9; PMID:23583555; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.053>
52. Achard P, Renou J-P, Berthomé R, Harberd NP, Genschik P. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol* 2008; 18:656-60; PMID:18450450; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.034>
53. Santa-María I, Smith MA, Perry G, Hernández F, Avila J, Moreno FJ. Effect of quinones on microtubule polymerization: a link between oxidative stress and cytoskeletal alterations in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740:472-80; PMID:15949717; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2004.11.024>
54. Ludueña RF. A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013; 302:41-185; PMID:23351710; <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407699-0.00002-9>
55. Landino LM, Hasan R, McGaw A, Cooley S, Smith AW, Masselam K, Kim G. Peroxynitrite oxidation of tubulin sulfhydryls inhibits microtubule polymerization. *Arch Biochem Biophys* 2002; 398:213-20; PMID:11831852; <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.2001.2729>
56. Wang H, Wang S, Lu Y, Alvarez S, Hicks LM, Ge X, Xia Y. Proteomic analysis of early-responsive redox-sensitive proteins in *Arabidopsis*. *J Proteome Res* 2012; 11:412-24; PMID:22050424; <http://dx.doi.org/10.1021/pr200918f>
57. Dixon DP, Skipsey M, Grundy NM, Edwards R. Stress-induced protein S-glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2005; 138:2233-44; PMID:16055689; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.058917>
58. Rouhier N, Lemaire SD, Jacquot J-P. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu Rev Plant Biol* 2008; 59:143-66; PMID:18444899; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092811>
59. Clark HM, Hagedorn TD, Landino LM. Hypothiocyanous acid oxidation of tubulin cysteines inhibits microtubule polymerization. *Arch Biochem Biophys* 2014; 541:67-73; PMID:24215946; <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.026>
60. Landino LM, Moynihan KL, Todd JV, Kennett KL. Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314:555-60; PMID:14733943; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.126>

61. Ban Y, Kobayashi Y, Hara T, Hamada T, Hashimoto T, Takeda S, Hattori T. α -tubulin is rapidly phosphorylated in response to hyperosmotic stress in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2013; 54:848-58; PMID:23628996; <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pct065>
62. Nick P. Why to spend tax money on plant microtubules? In: *Applied Plant Cell Biology*. Nick P, Opatrný Z. eds. *Plant Cell Monographs*. Berlin: Springer-Verlag, 2014; 22:39-67.
63. Cai G. Assembly and disassembly of plant microtubules: tubulin modifications and binding to MAPs. *J Exp Bot* 2010; 61:623-6; PMID:20080825; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erp395>
64. Fosket DE, Morejohn LC. Structural and functional organization of tubulin. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1992; 43:201-40; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.001221>
65. Hepler PK, Hush JM. Behavior of microtubules in living plant cells. *Plant Physiol* 1996; 112:455-61; PMID:12226402
66. Burk DH, Zhong R, Ye Z-H. The katanin microtubule severing protein in plants. *J Integr Plant Biol* 2007; 49:1174-82; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1672-9072.2007.00544.x>
67. Lindeboom JJ, Nakamura M, Hibbel A, Shundyak K, Gutierrez R, Ketelaar T, Emons AM, Mulder BM, Kirik V, Ehrhardt DW. A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science* 2013; 342:1245533; PMID:24200811; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1245533>
68. Wen F, Xing D, Zhang L. Hydrogen peroxide is involved in high blue light-induced chloroplast avoidance movements in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2008; 59:2891-901; PMID:18550599; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ern147>
69. Panteris E, Komis G, Adamakis I-DS, Šamaj J, Bosabalidis AM. MAP65 in tubulin/colchicine paracrystals of *Vigna sinensis* root cells: possible role in the assembly and stabilization of atypical tubulin polymers. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010; 67:152-60; PMID:20217678
70. Mao T, Jin L, Li H, Liu B, Yuan M. Two microtubule-associated proteins of the *Arabidopsis* MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiol* 2005; 138:654-62; PMID:15908607; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.052456>
71. Smertenko AP, Kaloriti D, Chang H-Y, Fiserova J, Opatrný Z, Hussey PJ. The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of *Arabidopsis* microtubule-associated protein MAP65 isoforms. *Plant Cell* 2008; 20:3346-58; PMID:19060108; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.108.063362>

Auxin as an inducer of asymmetrical division generating the subsidiary cells in stomatal complexes of *Zea mays*

Pantelis Livanos, Eleni Giannoutsou, Panagiotis Apostolakos, and Basil Galatis*

Department of Botany; Faculty of Biology; University of Athens; Athens, Greece

Keywords: auxin carriers, auxin signaling, morphogenesis, phosphatidyl-inositol-3-kinase, PIN1, polarity, stomatal complexes

Abbreviations: AF, actin filament; DIC, differential interference contrast; GMC, guard cell mother cell; IAA, indole-3-acetic acid; MT, microtubule; NAA, 1-naphthaleneacetic acid; NOA, 1-naphthoxyacetic acid; PDK, 3-phosphoinositide-dependent kinase; PI3K, phosphatidyl-inositol-3-kinase; PLC, phospholipase C; PLD, phospholipase D; ROP GTPases, Rho-like GTPases of plants; SMC, subsidiary cell mother cell; TIBA, 2,3,5-triodobenzoic acid.

The data presented in this work revealed that in *Zea mays* the exogenously added auxins indole-3-acetic acid (IAA) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA), promoted the establishment of subsidiary cell mother cell (SMC) polarity and the subsequent subsidiary cell formation, while treatment with auxin transport inhibitors 2,3,5-triodobenzoic acid (TIBA) and 1-naphthoxyacetic acid (NOA) specifically blocked SMC polarization and asymmetrical division. Furthermore, in young guard cell mother cells (GMCs) the PIN1 auxin efflux carriers were mainly localized in the transverse GMC faces, while in the advanced GMCs they appeared both in the transverse and the lateral ones adjacent to SMCs. Considering that phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) is an active component of auxin signal transduction and that phospholipid signaling contributes in the establishment of polarity, treatments with the specific inhibitor of the PI3K LY294002 were carried out. The presence of LY294002 suppressed polarization of SMCs and prevented their asymmetrical division, whereas combined treatment with exogenously added NAA and LY294002 restricted the promotional auxin influence on subsidiary cell formation. These findings support the view that auxin is involved in *Z. mays* subsidiary cell formation, probably functioning as inducer of the asymmetrical SMC division. Collectively, the results obtained from treatments with auxin transport inhibitors and the appearance of PIN1 proteins in the lateral GMC faces indicate a local transfer of auxin from GMCs to SMCs. Moreover, auxin signal transduction seems to be mediated by the catalytic function of PI3K.

Introduction

Stomatal complexes in *Zea mays* and generally in Poaceae is the outcome of a definite sequence of three asymmetrical divisions that give rise to the guard cell mother cell (GMC) and two subsidiary cells laterally to it, and a symmetrical one which produces the pair of guard cells (Fig. 1).¹⁻³ Among them, the divisions generating the subsidiary cells have been repeatedly studied, since they constitute a very attractive model to investigate the premitotic cell polarization and the following asymmetrical division. The subsidiary cell mother cell (SMC) asymmetrical division is undoubtedly triggered by a local induction stimulus "emitted" by the GMC (reviews by refs. 2–4; see Fig. 1).

This stimulus triggers a definite sequence of polarization events that precede and accompany the asymmetrical SMC division, which in turn creates a minute subsidiary cell and a large typical epidermal one. Although over the last decades the successive stages of SMC protoplast polarization and the mechanisms

that mediate or promote its asymmetrical division have been studied (reviews by refs. 2, 3, 5), the nature of inductive stimulus still remains unknown. This signal might be a chemical substance emitted by the GMC^{1,2,6-9} or a mechanical stimulus exerted by the GMC on its lateral SMCs.^{2,10-13} Considering the above, as well as that SMC division is characterized by a shift of the division plane orientation in protoderm from transverse to leaf axis to longitudinal one (review by ref. 2; see also Fig. 1), it is reasonable to assume that the inductive stimulus might be a hormone-like substance.

Auxin might be an ideal inducer of polarity, since it directs cellular patterning by controlling division plane orientation.¹⁴⁻¹⁶ This hormone plays a key role in plant development regulating a remarkably wide range of developmental processes.¹⁷ In *Arabidopsis*, auxin participates in leaf development, where among others, seems to coordinate asymmetrical cell differentiation and division.^{18,19} The unique morphogenetic auxin properties could be, at least in part, attributed to its ability to become

*Correspondence to: Basil Galatis; Email: bgalatis@biol.uoa.gr

Submitted: 08/08/2014; Revised: 09/20/2014; Accepted: 09/23/2014

<http://dx.doi.org/10.4161/15592324.2014.984531>

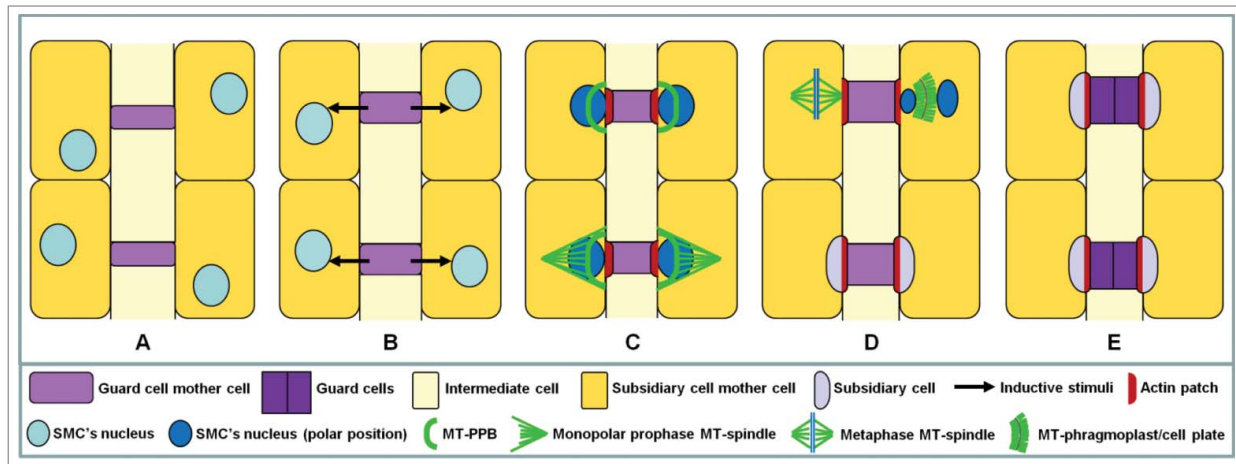


Figure 1. Diagram illustrating the development of *Zea mays* stomatal complexes. MT: microtubule; PPB: preprophase band; SMC: subsidiary cell mother cell.

asymmetrically and polarly distributed.¹⁷ In *Zea mays*, it is polarly transported along the main leaf axis.^{20,21} Auxin transportation is mediated by several families of auxin transporters, which participate in intracellular and intercellular auxin influx and efflux.²² Transporters that provide directionality to the intercellular auxin flow are, among others, the PIN-FORMED (PIN) efflux carriers and the AUXIN INSENSITIVE1 (AUX1) influx carriers.^{17,22-24}

In developing stomatal complexes of grasses, like those of *Z. mays*, the shift in division plane orientation, as well as SMC polarization, might be induced by a local change in the direction of auxin flow in growing epidermis. To investigate this hypothesis the effects of indole-3-acetic acid (IAA), its synthetic analog 1-naphthaleneacetic acid (NAA), and those of the specific auxin transport inhibitors 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA)²⁵ and 1-naphthoxyacetic acid (NOA)²⁵ on the asymmetrical divisions generating subsidiary cells in *Z. mays*, were monitored. TIBA disrupts the cycling of PIN1 carriers and affects auxin transport by interfering with membrane trafficking processes.²⁶ NOA is considered as an inhibitor of auxin influx since it has been shown to affect cellular auxin uptake facilitated by AUX1 transporters.²⁵ In addition, taking into consideration that polar PIN localization is indicative of the auxin flow direction,²⁷ the localization of PIN1, one of the first identified PIN efflux carriers,²² in the developing *Z. mays* stomatal complexes was also examined.

Interestingly, phospholipid signaling is required for PIN localization and cooperates with auxin in establishing cell polarity.²⁸ In addition, phospholipases C and D (PLC/PLD) signal transduction pathways seem to promote the induction or perception of the stimuli emitted by the GMC, controlling the SMC asymmetrical division.¹² On the other hand, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) modulates phospholipid turnover catalyzing the phosphorylation of phosphoinositides and importantly, its function assists auxin signaling.²⁹ Moreover, PI3K catalytic activity is necessary for generation of cell polarity in migrating monospores of the red alga *Porphyra yezoensis*.³⁰ Thus, the role of PI3K in the

asymmetrical division of SMCs and its potential implication in mediating signal transduction of auxin was evaluated, using the specific PI3K inhibitor LY294002.³¹ As far as we know, this is the first study involving auxin signaling in polarization/asymmetrical division of SMCs in grasses.

Results

Subsidiary cell formation in control seedlings

General remarks

In *Z. mays*, cells of particular protodermal rows, the stomatal ones, undergo asymmetrical divisions close to basal leaf meristem producing the GMCs (Fig. 2A). Initially, GMCs appear rectangular in paradermal view (Fig. 2A and B), however, as they develop, GMCs elongate along the stomatal row axis and before their division they tend to assume an almost square shape in paradermal view (Fig. 2C). The assembly of an interphase microtubule (MT)-ring lining the mid-region of lateral and periclinal GMC cell walls (Fig. 2E and F), which is followed by deposition of a cellulose microfibril ring at these regions, plays a critical role in GMC morphogenesis.^{2,32} The cellulose microfibril ring allows the elongation of the lateral cell walls and simultaneously prevents the expansion of the transverse ones (Fig. 2A–C). The anticlinal cell walls oriented parallel to the leaf axis are defined as lateral walls, while those oriented transversely to leaf axis are the transverse cell walls. The periclinal ones are those exhibiting a parallel to leaf surface orientation.

Before division, the length of GMCs, which represents the dimension parallel to the stomatal row axis, increases about 125.00%. Simultaneously, its width, the dimension vertical to the same axis, appears 34.60% decreased.¹³ As a result, SMCs bulge locally toward their adjacent GMCs (Fig. 2C). The latter cells emit a stimulus that induces asymmetrical division of the SMCs yielding a minute lens-shaped subsidiary cell, adjacent to the inducing GMC (Figs. 1, 2C). The local bulging of *Z. mays*

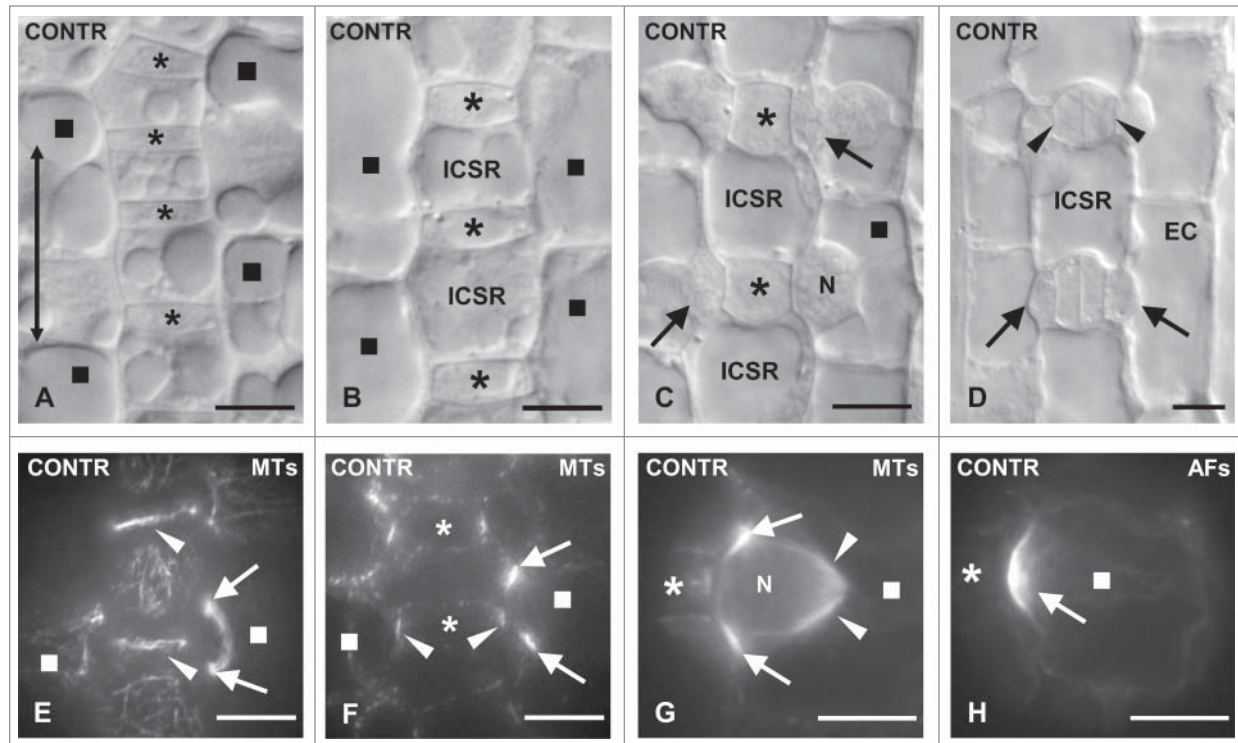


Figure 2. (A–D) Areas of *Z. mays* stomatal rows, as observed with DIC optics, displaying young GMCs (A), GMCs in an intermediate developmental stage (B), advanced GMCs (C) and young stomatal complexes (D). The double arrow in (A) shows the longitudinal leaf axis. The asterisks mark the GMCs and the squares the SMCs. In the SMC shown in (C) the nucleus (N) has occupied its polar position. The arrows point to the daughter cell walls of the asymmetrical divisions that create the subsidiary cells. The arrowheads point to the young guard cells. EC: epidermal cell; ICSR: intervening cell of the stomatal row. (E and F) GMCs (asterisks) and SMCs (squares) after tubulin immunolabeling in external (E) and median (F) optical planes. The arrows point to preprophase MT-band profiles of a SMC and the arrowheads to those of an interphase MT-ring in GMCs. (G) Tubulin immunolabeling in a prophase SMC (square). The arrows indicate the preprophase MT-band, the arrowheads the half prophase MT-spindle, while the asterisk marks the inducing GMC. N: nucleus. (H) AF-patch (arrow) in SMC (square), which bulges toward the inducing GMC (asterisk). Scale bars: 10 μm .

SMCs toward the inducing GMCs is also facilitated by the patterned expansion of intervening cells of the stomatal row (see also Fig. 2A–C).¹³

It has been estimated that in *Z. mays* seedlings grown in dark at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, the GMCs exhibiting a width/length ratio between 0.8 and 1.4 are in their majority capable of emanating inductive stimulus toward the adjacent SMCs.¹² GMCs aspect ratio was assessed in a central optical cell plane using a light microscope equipped with a micrometer scale. In the current study, according to their aspect ratio, the GMCs were classified in two subgroups: (a) GMCs with aspect ratio more than 1.4 which are present close to meristem leaf region, from now on called “young” GMCs and (b) GMCs with respective ratio less than 1.4, which are located at protodermal regions where the subsidiary cell formation occurs, from now on called “advanced” GMCs. Based on the above consideration, each SMC was classified according to the particular category of its neighbor GMC and its status (divided or not). Laterally to advanced GMCs 70.41% of SMCs (1090 out of 1548 SMCs measured) have been divided asymmetrically (Fig. 3), whereas the percentage of divided SMCs adjacent to young GMCs is 17.00% (154 out of 906 SMCs measured;

Fig. 3). Besides, 97.20% of SMCs adjacent to young guard cells (Fig. 2D) have been divided (958 out of 986 SMCs; Fig. 3).

SMC polarization

The primary protoplasmic events of SMCs’ polarization preceding asymmetrical division are: (a) The migration of nucleus toward the inducing GMC (Figs. 1C, 2C). It has been calculated that in 77.56% of SMCs (446 out of 575 measured) adjacent to advanced GMCs the nucleus occupies its polar position (Fig. 4). The percentage of SMCs adjacent to young GMCs possessing a properly positioned nucleus is 26.23% (106 out of 404 SMCs; Fig. 4). (b) The cortical cytoplasm lining the SMC cell wall region shared with the GMC lacks MTs (Fig. 2F).^{33,34} (c) The assembly of an unusually shaped preprophase MT-band at the polar end of SMC (reviews by refs. 2, 3, 5; see also Figs. 1C, 2E–G). (d) The organization of a monopolar prophase MT half-spindle, which is connected with the preprophase MT-band and seems to anchor the nucleus to its polar position (Figs. 1C, 2G).³³ (e) The organization of an actin filament (AF)-patch (for literature see refs. 2, 3; see also Figs. 1C, 2H) and an endoplasmic reticulum-patch¹³ at the polar end of SMC.

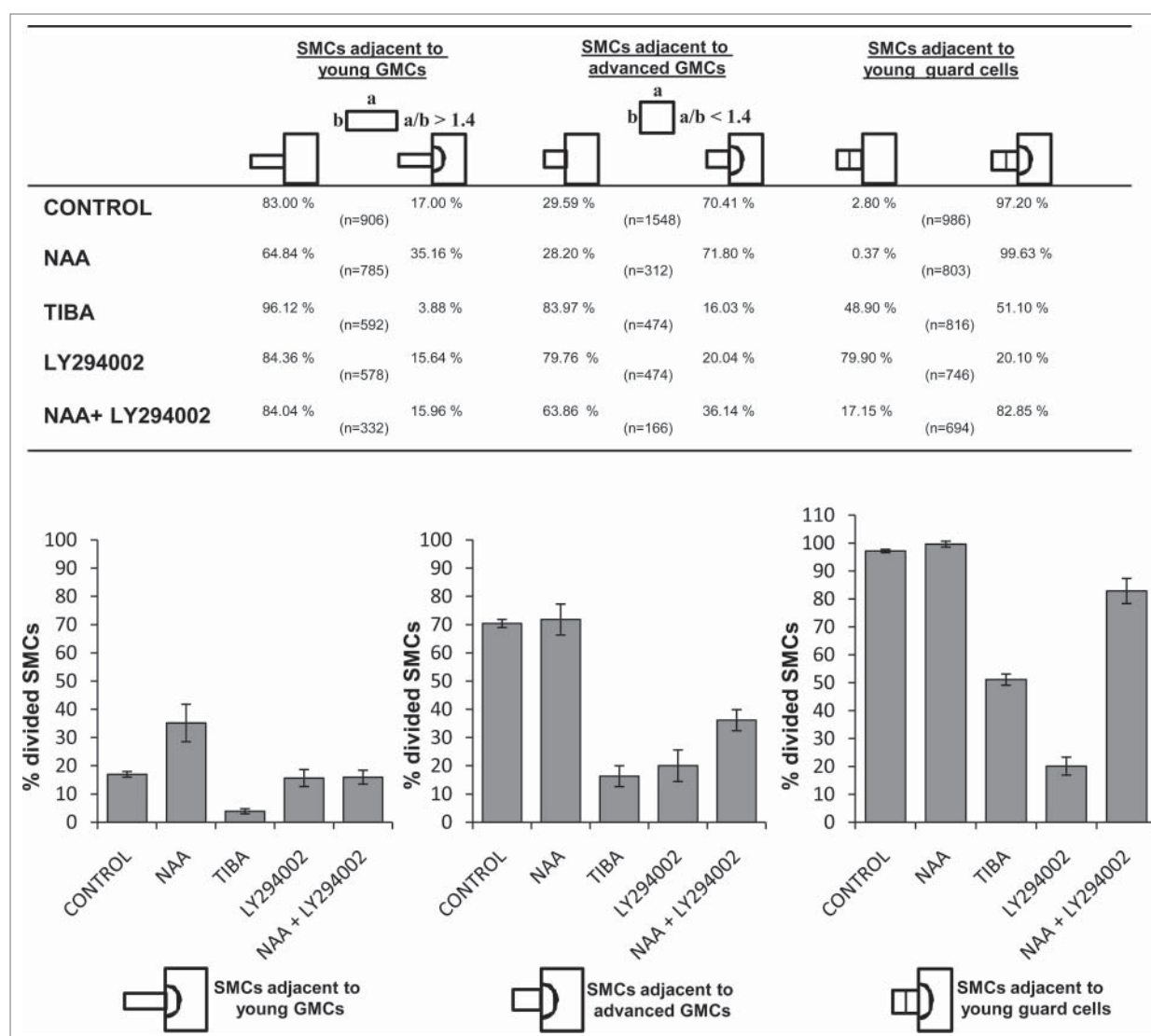


Figure 3. Table and the respective histograms presenting the percentages of subsidiary cell formation in control and treated seedlings. Treatments: CONTROL dH₂O; NAA 100 μ M, 48 h; TIBA 300 μ M, 48 h; LY294002 50 μ M, 72 h; NAA 100 μ M + LY294002 50 μ M, 48 h.

PIN1 localization in GMCs and SMCs

Immunolabeling revealed that PIN1 auxin efflux carriers in *Z. mays* protodermal cells were polarly localized. In regions close to meristem, where newly formed GMCs are found, PIN1 fluorescence signal was mainly emitted by the transverse cell faces, including those of GMCs and only a weak signal emitted by the lateral ones (Fig. 5A). During GMC growth, the intensity of PIN1 fluorescence in the latter regions was increased and eventually in advanced GMCs, PIN1 seemed to accumulate in both transverse and lateral GMC faces (Fig. 5B; cf. Fig. 5A). In some advanced GMCs the fluorescence of PIN1 carriers appeared even more intense along the lateral GMC faces than along the transverse ones (Fig. 5B). Therefore, the lateral faces of many GMCs, which are close to SMCs, are enriched in PIN1 carriers (Fig. 5B).

Exogenous addition of auxins promotes subsidiary cell formation

Although IAA or NAA, at durations applied in this work, did not detectably affect seedling growth, they led to a remarkable increase in SMC polarization and promoted its asymmetrical division, behaving similarly. In protodermal areas displaying advanced GMCs, the amount of divided SMCs was comparable to that of the controls. Out of 312 NAA-treated SMCs measured, 71.80% have been successfully divided (Fig. 3). However, in regions exhibiting young GMCs the percentage of divided SMCs was 35.16% (276 out of 785 SMCs measured), considerably increased compared to that of the control leaves (Figs. 3; see also Fig. 6A and B). Moreover, in leaves treated with auxins all young stomatal complexes possessed two subsidiary cells (Figs. 3, 6C). Even in controls, a small amount of undivided SMCs adjacent to

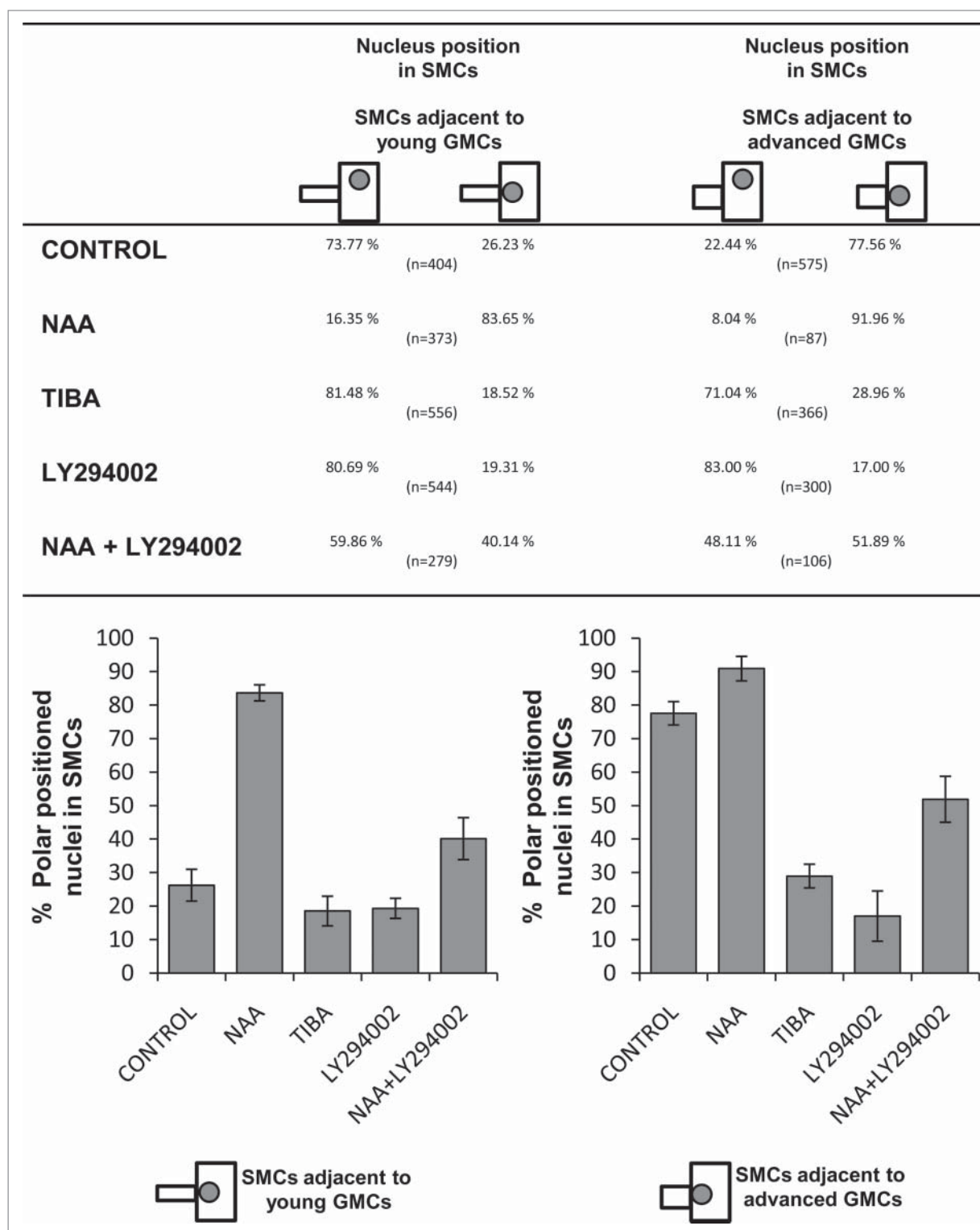


Figure 4. Table and the respective histograms showing the percentages regarding the polar positioning of SMC nucleus in control and treated seedlings. CONTROL dH₂O; NAA 100 μ M, 48 h; TIBA 300 μ M, 48 h; LY294002 50 μ M, 72 h; NAA 100 μ M + LY294002 50 μ M, 48 h.

young guard cells exists (2.80%; Fig. 3). These data suggest that the addition of exogenous NAA and IAA favors, to some extent, the asymmetrical division of SMCs and interestingly, promotes the initiation of SMC division in protodermal regions

close to leaf meristem. Besides, in treated seedlings, many GMCs divided symmetrically before acquiring their almost square, in paradermal view, shape (Fig. 6C; cf. Fig. 2D). This observation suggests that the exogenously provided auxins promote both

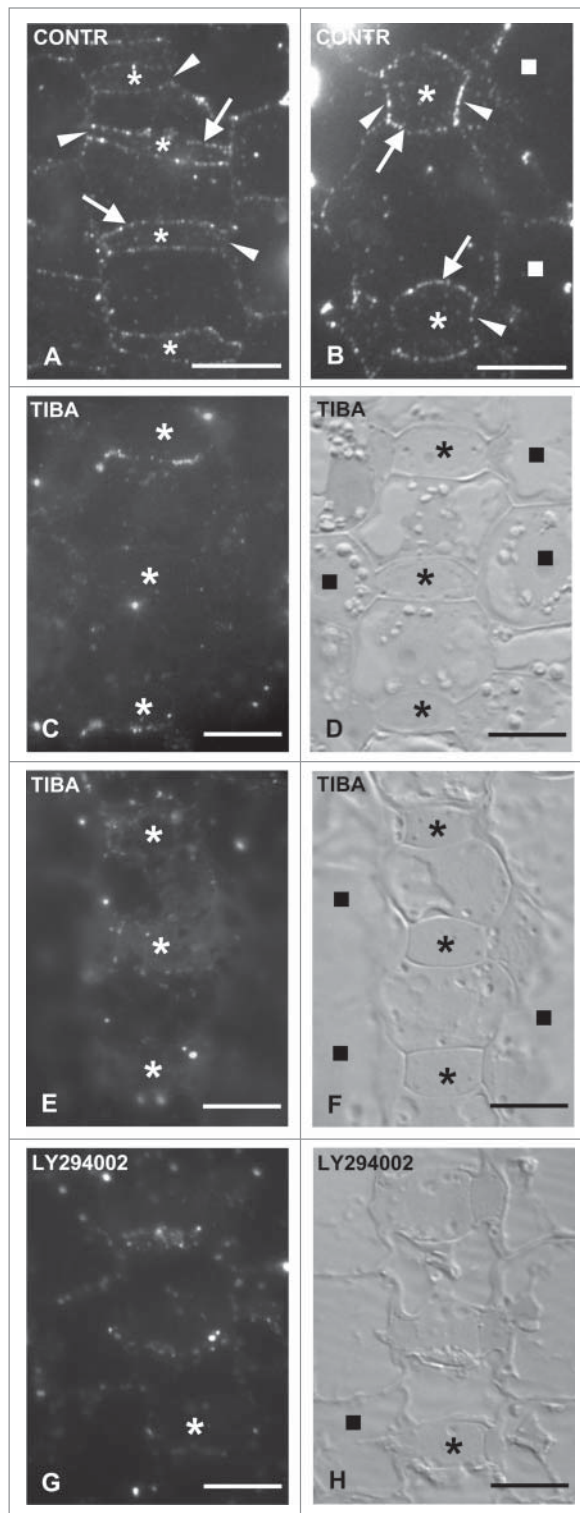


Figure 5. Immunolocalization of PIN1 carriers in control (A, B) and treated (C–H) GMCs (asterisks) and SMCs (squares). The arrows point to transverse and the arrowheads to lateral cell walls. (A) Young GMCs. (B) Advanced GMCs. (C–F) TIBA-treated GMCs (asterisks) as they appear after PIN1 carrier immunolabeling (C and E) and using DIC optics (D and F). (G and H) Immunolabeling of PIN1 carriers in a LY294002-treated GMC (asterisk) (G) and the respective DIC image (H). Treatments: (C–F) TIBA 300 μ M, 48 h; (G and H): LY294002 50 μ M, 48 h. Scale bars: 10 μ m.

asymmetrical and symmetrical stomatal cell divisions and consequently, the stomatal complex development was attained more closely to the leaf base than in the control leaves (Fig. 6C; cf. Fig. 2D).

Premittotic polarization of the auxin-treated SMCs was also favored. The amount of SMCs possessing the nucleus at its polar position was considerably increased. This was very intense in protodermal regions close to leaf meristem, where the polarized SMCs adjacent to young GMCs was 83.65% (312 out of 373 SMCs; see also Fig. 6D), nearly 3-fold higher compared to the controls (Fig. 4). Similarly, the respective amount of polarized SMCs adjacent to advanced GMCs was increased (Fig. 4). Besides, the interphase GMC MT-ring was almost typical in appearance (Fig. 6E and F; cf. Fig. 2E and F). As in controls SMCs, the cortical cytoplasm lining the cell wall between SMC and GMC was devoid of MTs. Moreover, laterally to the inducing GMCs a typical preprophase MT-band was formed in treated SMCs (Fig. 6E and F).

In control leaves, these polarizing events predominantly characterized SMCs in contact with advanced GMCs (Fig. 2C, E, F). However, in leaves incubated with NAA and IAA they were also observed in SMCs adjacent to young GMCs (Fig. 6D–F). In many SMCs, a typical preprophase MT-band was detected, although their nucleus did not occupy a polar position. Nevertheless, this can be also detected in control seedlings of *Z. mays* and other grasses.^{2,35,36} The treated SMCs displayed numerous endoplasmic AFs, many of which traversed the perinuclear cytoplasm (Fig. 6G). A well-organized AF-patch was found only in those SMCs bulging toward the advanced GMCs (Fig. 6G; cf. Fig. 2H). The SMCs that were in contact with young GMCs and did not bulge toward them possessed numerous AFs randomly distributed, but not distinct AF-patches (Fig. 6H). Collectively, these data suggest that auxin also promotes SMC polarization establishment and favors the appearance of this phenomenon to protodermal areas close to leaf meristem.

Inhibition of auxin transport restrains subsidiary cell formation

Although TIBA, at durations and concentrations used in this work did not interfere with the growth of *Z. mays* seedlings and especially GMC morphogenesis, subsidiary cell formation was inhibited (Fig. 7A). The percentages of divided TIBA-treated SMCs adjacent to young GMCs, advanced GMCs, or young guard cells were 3.88%, 16.03% and 51.10% respectively (Fig. 3). Therefore, the number of divided SMCs, in all cases, was definitely lower compared to that of controls, whereas the number of undivided SMCs was considerably higher (Fig. 3). As a result, unlike to controls, in seedlings incubated with TIBA, large protodermal areas, possessing advanced GMCs or young guard cells, lacked subsidiary cells (Fig. 7A and B). Notably, the symmetrical divisions in the meristem, the asymmetrical ones generating the GMCs, as well as the symmetrical GMC divisions appeared to proceed normally. This evaluation was made by tracing numerous young daughter cell walls after staining with aniline blue (Fig. 7C). The amount of the so-called persistent GMCs, which are the undivided GMCs exhibiting

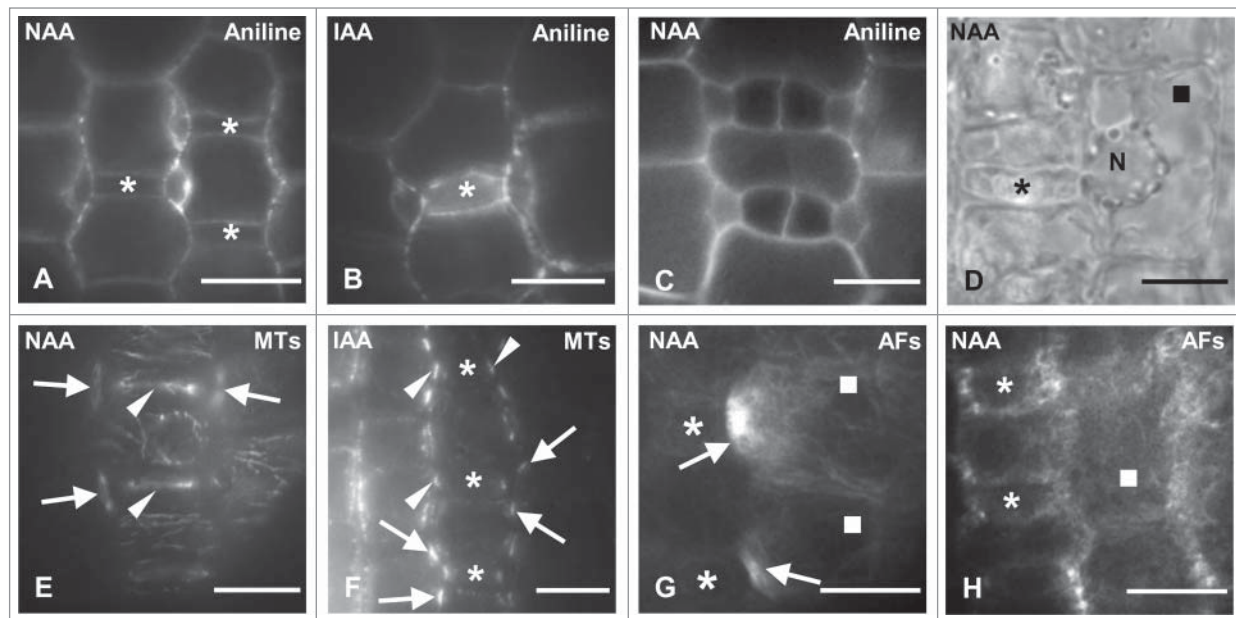


Figure 6. (A–C) Protodermal areas near the leaf base of NAA- (A and C) and IAA-treated (B) seedlings as viewed after aniline blue staining. Bilaterally to the young GMCs (asterisks in (A) and (B)) subsidiary cells have been formed (cf. Fig. 2A and B). The stomatal complexes shown in (C) have been formed before the GMCs acquire a square shape (compare Fig. 2C and D). (D) DIC optical view of polarized NAA-treated SMC (square) in contact with a young GMC (asterisk) (cf. Fig. 2B and C). N: nucleus. (E and F) NAA- (E) and IAA- (F) treated young GMCs (asterisks) and their neighbor SMCs after tubulin immunolabeling in external (E) and median (F) optical plane. The arrows point to profiles of preprophase MT-band in SMCs and the arrowheads to the interphase MT-ring in GMCs. (G) AF-organization in NAA-treated SMCs (squares) in contact with advanced GMCs (asterisks). The arrows show AF-patches. (H) AF-organization in young NAA-treated GMCs (asterisks) and their adjacent SMCs (square). Treatments: NAA 100 μ M, 48 h; IAA 200 μ M, 48 h. Scale bars: 10 μ m.

distinct morphological features of guard cells was only 3.93% in 280 young stomatal complexes measured (Fig. 7E; cf. Fig. 2C and D; see also ref. 32, 37). These data demonstrate that in *Z. mays* protoderm TIBA specifically inhibits the asymmetrical SMC division.

Premitotic SMC polarization was also affected in TIBA-treated leaves, where the polar migration of SMC nucleus toward the adjacent GMC was greatly inhibited (Fig. 7D). Out of 366 SMCs adjacent to advanced GMCs, 28.96% possessed polar positioned nucleus, whereas the majority of these SMCs (71.04%) exhibited nuclei at random sites (Fig. 4). The respective percentage of properly positioned nucleus in SMCs adjacent to young GMCs was 18.52% out of 556 SMCs measured (Fig. 4). Moreover, although in controls, young guard cells were also capable of inducing polarization in their partner SMCs,^{35,36} in many TIBA-treated stomatal complexes lacking subsidiary cells, the nucleus of SMC resided far from the polar SMC end (Fig. 7F).

The interphase MT-ring in GMCs was typical after the application of TIBA (Fig. 7G and I), however, many advanced GMCs emitted an intense tubulin fluorescence signal lining the whole surface of the lateral cell wall (Fig. 7H). This implies that TIBA somehow interferes with GMC cortical MT reorganization during GMC transition from interphase to preprophase/prophase (for a review see ref. 2). Besides, TIBA did not considerably affect the organization of cortical MTs in SMCs. The sites of contact between SMC and GMC in treated SMCs lacked cortical MTs

and the preprophase MT-band organization laterally to adjacent GMC was almost typical, regardless the position of the SMC nucleus (Fig. 7I and J). In contrast, TIBA affected to some extent AF-organization. The SMCs bulging toward the neighbor GMC displayed not very well defined polar AF-patches (Fig. 7K and L; cf. Fig. 2H).

Treatment with TIBA affected also the distribution of PIN1 carriers in *Z. mays* protoderm. The advanced GMCs displayed spherical conformations in the cytoplasm emitting weak PIN1 fluorescence (Fig. 5C and E). Relatively few and unequally distributed PIN1 carriers were only detected on the anticlinal GMC faces (Fig. 5C–F; cf. Fig. 5B).

To further investigate the implication of auxin transport in subsidiary cell formation treatments with the auxin influx inhibitor NOA were also carried out. Interestingly, NOA interfered with subsidiary cell generation and the migration of SMC nucleus toward its polar site. The amount of divided NOA-treated SMCs laterally to young or advanced GMCs was 9.21% (21 out of 228 SMCs) and 33.47% (79 out of 236 SMCs), respectively. The respective percentages in control leaves were 17.00% and 70.41%. Consequently, protodermal areas of seedlings incubated with NOA containing advanced GMCs or young guard cells frequently lacked subsidiary cells (Fig. 8A–C). Although in treated SMCs adjacent to young GMCs the percentage of polarized nuclei was comparable to controls, the amount of polarized NOA-treated SMCs next to advanced GMCs was dramatically decreased. Only, 41.40% out of 157 SMCs

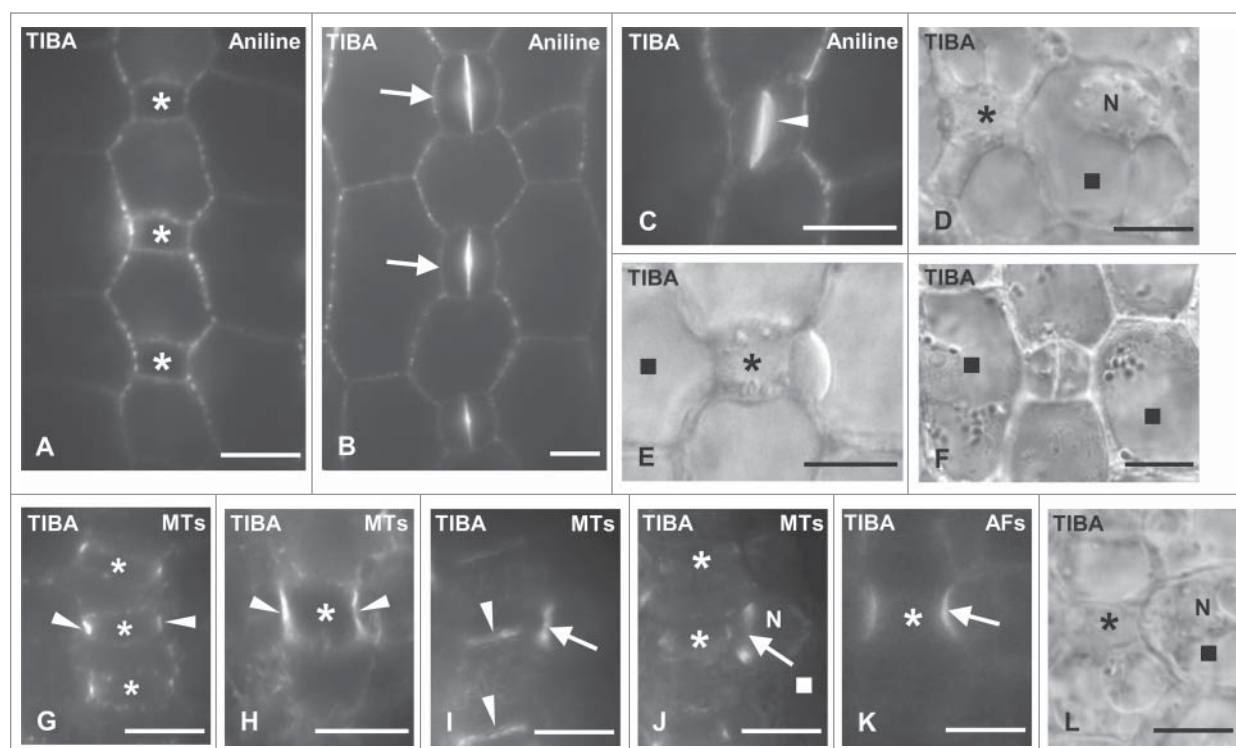


Figure 7. Protodermal areas of seedlings incubated with TIBA. (A–C) Optical sections of stomatal rows after aniline blue staining. The asterisks mark advanced GMCs, the arrows young stomatal complexes and the arrowhead in (C) a newly formed daughter cell wall of the symmetrical GMC division. Note the absence of subsidiary cells. (D) Treated SMC (square) as seen in DIC optics. The nucleus (N) is far from the inducing GMC (asterisk). (E and F). DIC optical views of a persistent GMC (E) and a young stomatal complex lacking subsidiary cells (F). The SMCs in (F) (squares) are not polarized. (G and H) Young (G) and advanced (H) treated GMCs (asterisks) after tubulin immunolabeling. The arrowheads show optical sections of the interphase MT-ring. (I and J) Treated SMC (square) following tubulin immunolabeling in external (I) and median (J) optical plane. The arrows point to sections of the preprophase MT-band of the SMC and the arrowheads to sections of the interphase MT-ring of the GMCs. N: nucleus. (K and L) Treated advanced GMC (asterisk) and one of the neighbor SMCs (square) after AFs staining (K) and in DIC optics (L). The arrows show the AF-patch of the SMC. In (L) the SMC bulges toward the "inducing" GMC and its nucleus (N) has not occupied its polar position (compare Fig. 2C). Treatments: TIBA (A–C) 100 μ M, 48 h; (D–L) 300 μ M, 48 h. Scale bars: 10 μ m.

measured exhibited a properly positioned nucleus, whereas in controls the respective percentage was 77.56%. Fig. 8B shows treated SMCs possessing a nucleus located far from the inducing GMC. These findings suggest that auxin influx is also critical for SMC polarization and division.

Additional control experiments were carried out in order to clarify whether auxin accumulation or its polar transport was responsible for the promotion of subsidiary cell formation observed after NAA or IAA (see above). Treatments with NAA in combination with TIBA or NOA were carried out. Under these circumstances many protodermal regions containing advanced GMCs or young guard cells were devoid of subsidiary cells (Fig. 8D–F). These findings suggest that not only auxin accumulation but mainly its transport is a prerequisite for subsidiary cell formation.

Selective inhibition of the catalytic activity of PI3K blocks subsidiary cell generation

Although treatment of *Z. mays* seedlings with the specific PI3K inhibitor LY294002 for 24–72 h did not affect their growth or GMC morphogenesis, subsidiary cell formation was

largely prevented (Fig. 9A). The amount of newly formed subsidiary cells was greatly decreased compared to controls. Out of 474 SMCs adjacent to advanced GMCs, only 20.04% had been divided and 15.64% out of 578 SMCs laterally to young GMCs had generated subsidiary cells (Fig. 3). The percentage of undivided SMCs adjacent to young guard cells was 79.90% (596 out of 746 SMCs; Fig. 3). Consequently, many stomatal complexes lacked subsidiary cells (Fig. 9B). Similarly, to the results obtained with TIBA and NOA, the inhibition of asymmetrical SMC division by LY294002 treatment seems to be highly specific. The symmetrical GMC divisions were not significantly affected (Fig. 9A). Only a small population (7.40%) of persistent GMCs (Fig. 9C) was detected in treated seedlings.

LY294002 clearly interfered with nuclear migration to the polar site of SMCs (Fig. 9D). A random position of nucleus was detected in 80.69% SMCs adjacent to young and 83.00% SMCs laterally to advanced GMCs (Fig. 4), as well as in many SMCs next to young guard cells (Fig. 9B). On the contrary, in treated SMCs neither the preprophase MT-band nor the AF-patch formation were inhibited, although the latter was not well organized (Fig. 9E–G).

LY294002 seems also to disturb the PIN1 carrier localization. The affected protodermal cells displayed spherical configurations, differently distributed compared to those of controls and emitting poor PIN1 fluorescence signal (Fig. 5G). In particular, in the advanced treated GMCs PIN1 carriers were randomly located, unlike the controls where they tended to be equally distributed in all the anticlinal GMC faces (Fig. 5G and H; cf. Fig. 5B).

Auxin and PI3K interplay promotes subsidiary cell formation

Considering the similar effect caused by inhibition of auxin transport and LY294002 on premitotic SMC polarization and asymmetrical division, it was investigated whether auxin and PI3K cooperate to generate subsidiary cells, applying exogenously NAA together with the specific PI3K inhibitor. NAA and LY294002 separately produced opposite effects on subsidiary cell formation (Fig. 3). Compared to SMCs solely incubated with NAA the percentage of divided SMCs adjacent to young and advanced GMCs in NAA+LY294002-treated seedlings was

decreased (Fig. 3). Besides, opposite to the results obtained from NAA treatment, a population (17.15%) of undivided SMCs adjacent to young guard cells was observed (Figs. 3, 10A). Premitotic SMC polarization was also disturbed (Fig. 10B and C; cf. Fig. 2C). The percentages of SMCs exhibiting a nucleus at its polar position were much lower than the respective ones obtained when the seedlings were treated with NAA (Fig. 4). These data favor the hypothesis that PI3K is implicated in transduction of the auxin signal, and that both are required for generation of SMC polarity and asymmetrical division.

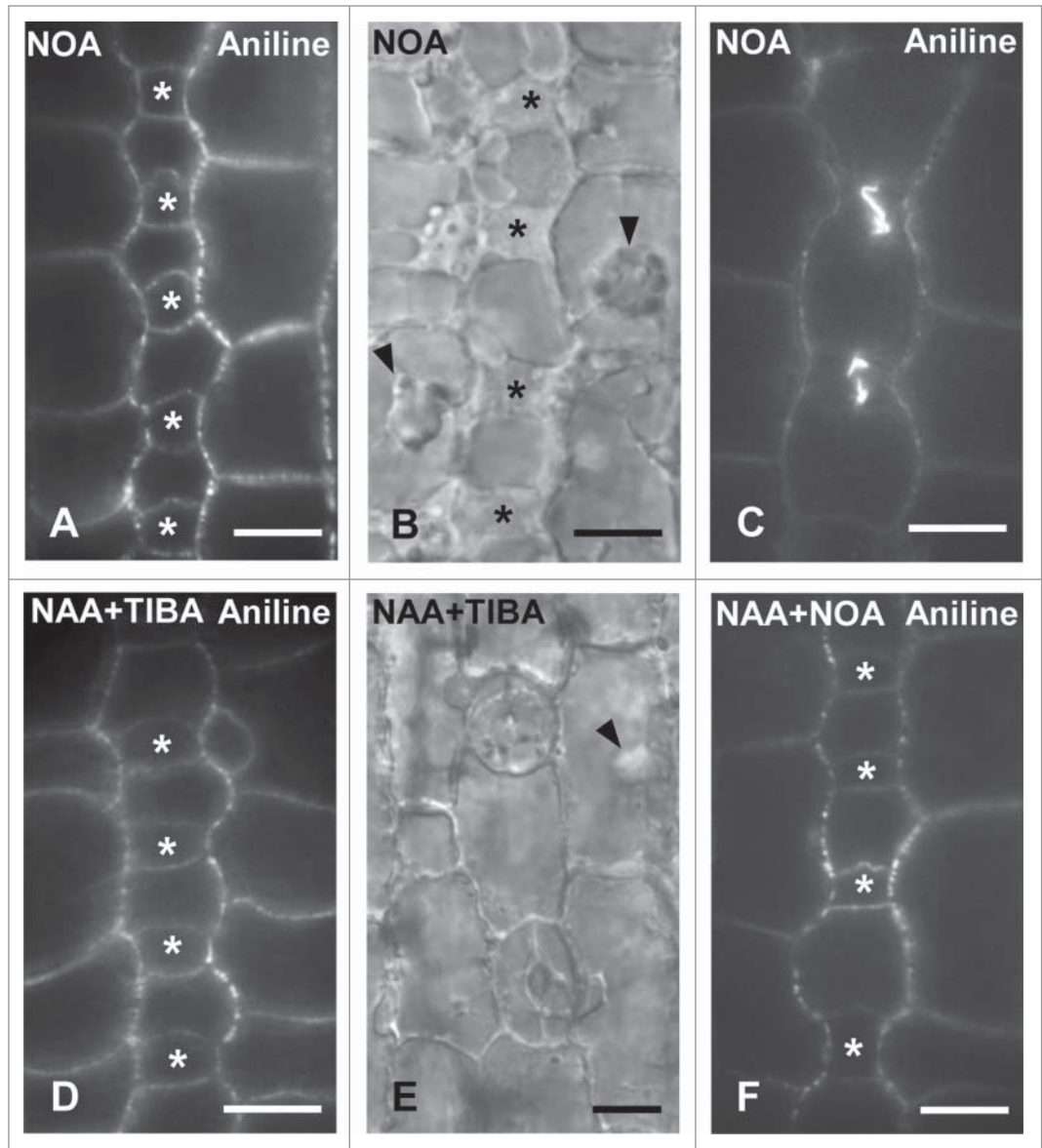


Figure 8. Protodermal areas of seedlings treated with NOA (A–C), NAA + TIBA (D and E) and NAA + NOA (F). The asterisks mark advanced GMCs and the arrowheads in (B) and (E) point to SMC nucleus. (A–C) Optical sections of stomatal rows after aniline blue staining (A and C) and under DIC optics (B). Note the absence of subsidiary cells adjacent to advanced GMCs (A, B) and to young guard cells (C). (D and E) Stomatal row of NAA + TIBA-treated leaves containing advanced GMCs (D) and young stomata (E). Note the absence of subsidiary cells. (F) Protodermal region of seedlings incubated with NAA + NOA lacking subsidiary cells. Treatments: (A–C): NOA 50 μ M, 72 h; (D and E): NAA 100 μ M + TIBA 300 μ M, 72 h; (F): NAA 100 μ M + NOA 50 μ M, 72 h. Scale Bars: 10 μ m.

Discussion

Auxin and the inductive stimulus in stomatal complexes

The hypothesis that the stimulus emanating from the grass GMCs, which triggers asymmetrical division in the adjacent SMCs, is a chemical substance possibly hormonal in nature has been suggested more than 50 years ago.^{1,6,7,38} The chemical nature of the inductive stimulus is adequately supported from previous results obtained from caffeine-treated *Z. mays* seedlings in which the daughter cell wall separating the subsidiary cell remained incomplete, resulting in the formation of

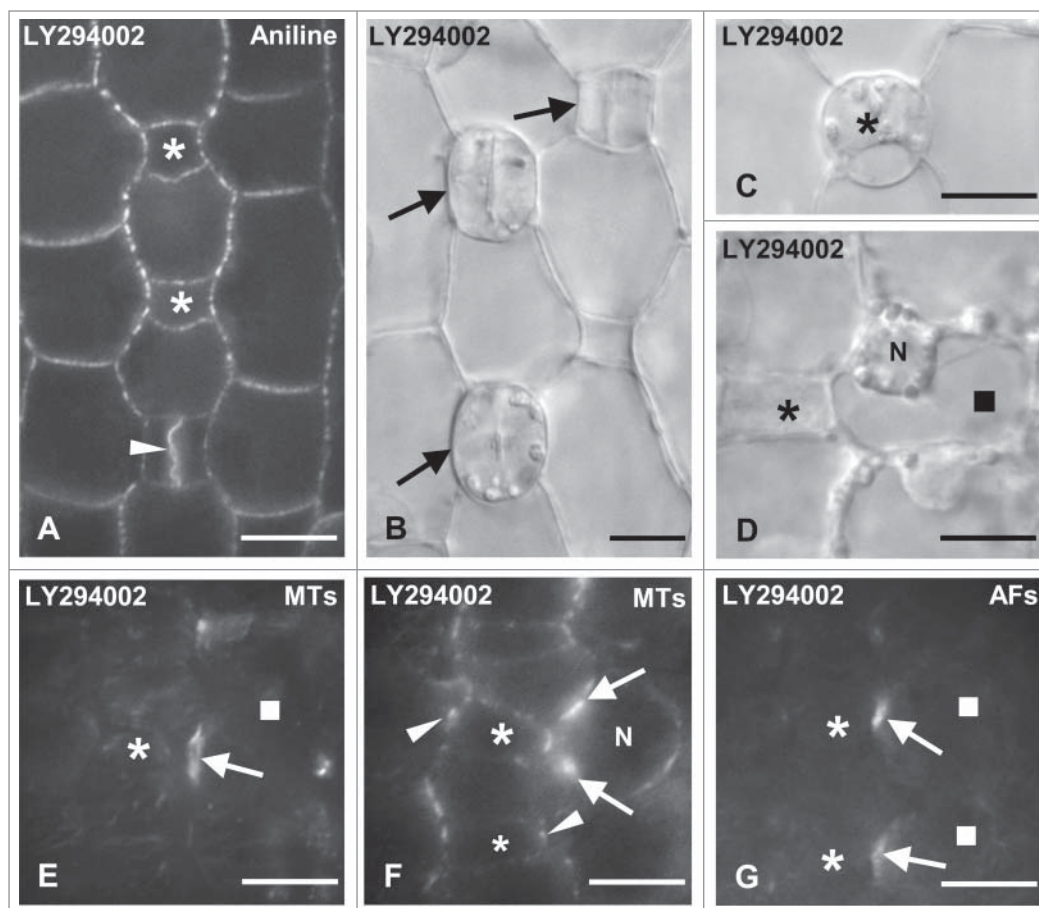


Figure 9. Protodermal areas of seedlings incubated with LY294002. (A and B) Optical sections of stomatal rows after aniline blue staining (A) and under DIC optics (B). The asterisks mark advanced GMCs, the arrows young stomatal complexes and the arrowhead a newly formed daughter cell wall of the symmetrical GMC division. Note the absence of subsidiary cells in all cases. (C and D) Persistent GMC (asterisk in C) and treated SMC (square in D) as they appear under DIC optics. The SMC nucleus (N) has not occupied a polar position near the neighboring GMC (asterisk; cf. Fig. 2C). (E and F) Treated SMC (square) after tubulin immunolabeling in external (E) and median (F) optical planes. The arrows point to the SMC preprophase MT-band and the arrowheads show the GMC interphase MT-ring. N: nucleus. (G) Treated SMCs (squares) after AF staining. The arrows show the AF-patch in each SMC and the asterisks the neighboring GMC. Note the local "protrusion" of the SMCs toward the neighboring GMCs. Treatments: LY294002 50 μ M, (A, D–G): 48; (B and C): 72 h. Scale bars: 10 μ m.

The emerging role of auxin in SMC polarization and asymmetrical division is further supported by data derived from proteomic analysis showing that the *Z. mays* protodermal areas close to leaf meristem are enriched in several auxin related proteins.³⁹ It is worthwhile noting that not just auxin accumulation but its polarized transport seems to be critical for the induction of subsidiary cell generation. This may be concluded, considering that auxin transport inhibitors TIBA and NOA prevented SMC polarization and subsidiary cell formation, regardless the simultaneous presence of exogenously added NAA (Fig. 8D–F).

Strictly defined auxin transport routes control development and patterning of several plant tissues and organs, via managing the distribution of auxin transporters (reviews by refs. 15, 22, 27, 40, 41). Since it is known that PIN polarity primarily determines the direction of auxin flow,²⁷ a local transport of auxin from *Z. mays* GMCs to SMCs is further supported by the particular appearance of PIN1 efflux carriers on the lateral GMC faces. In

aborted SMCs. As a consequence, their adjacent GMCs were also capable of inducing divisions in the next cell compartment probably due to the transport or diffusion of the stimulus through minute perforations of the incomplete subsidiary cell wall.⁹

The experimental data present in this work indicate for the first time that auxin might operate as the inductive stimulus that forces the asymmetrical division of *Z. mays* SMCs. Incubation of *Z. mays* seedlings with the specific auxin transport inhibitors TIBA and NOA blocked subsidiary cell formation (Figs. 3, 7A and B, 8A–C). On the contrary, the exogenously added NAA and IAA promoted the asymmetrical SMC division and interestingly in this case, the GMCs seem to become potent to induce divisions in SMCs at an earlier stage of their development (Figs. 3, 6A and B). Thus, in NAA- and IAA-treated leaves subsidiary cell formation occurred in protodermal regions closer to the leaf base than in the control ones.

young GMCs, they were mainly localized to the transverse GMC faces, but in the advanced ones they were found in all transverse and lateral GMC faces (Fig. 5A and B). Notably, at this developmental leaf stage, in the rest protodermal cells, PIN1 carriers were mainly localized at the transverse cell faces. In this direction, the inhibition of subsidiary cell formation in TIBA-treated leaves is accompanied by disturbance of PIN1 localization in GMCs (Fig. 5C–F). Therefore, it may be suggested that during GMC morphogenesis a programmed change in the direction of auxin transport takes place, which is critical for subsidiary cell formation. Since AUX1 inhibition by NOA also prevented the asymmetrical division of SMCs (Fig. 8A–C), a local accumulation of auxin influx carriers is expected in *Z. mays* SMC polar face in control leaves, and this possibility should be investigated.

Evidence accumulated over the last years suggests that auxin is intimately involved in development of stomatal complexes of the

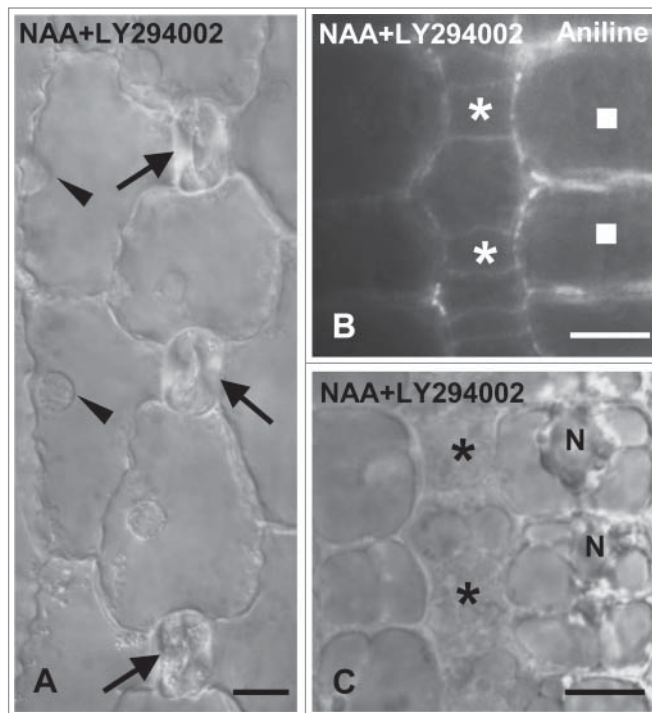


Figure 10. Protodermal areas of seedlings incubated with NAA plus LY294002. (A) DIC optical view of a stomatal row. The young stomata (arrows) lack subsidiary cells. The arrowheads indicate the nucleus of each SMC that is located far from the respective stoma. (B and C) Treated SMCs (squares) after aniline blue staining (B) and in DIC optics (C). The nucleus (N) resides far from the adjacent GMCs (asterisks). Treatments: NAA 100 μ M + LY294002 50 μ M, 48 h. Scale bars: 10 μ m.

dicotyledonous species *Arabidopsis thaliana*. In *A. thaliana* hypocotyl protoderm, auxin, acting synergistically with other hormones, promotes the asymmetrical divisions producing the GMCs.⁴² Its crucial implication in controlling stomatal patterning of cotyledon and leaf protoderm in *A. thaliana* was further strengthened by recent data demonstrating that, during stomatal complex development, auxin was massively transported between different stomatal cell types. Interestingly, prior to the symmetrical division of GMCs, the levels of auxin constantly decreased in these cells.¹⁹ Thus, in *A. thaliana*, GMCs seem to function as local auxin protodermal sources. More recently, Zhang et al.⁴³ showed that auxin interferes with stomatal development in a dose-dependent manner. Low levels of auxin in *A. thaliana* mesophyll promote stomatal formation, whereas elevated auxin concentrations inhibited this process. Taken, our findings and the above mentioned into consideration, it seems reasonable to extrapolate that *Z. mays* GMCs also act as local protodermal sources releasing auxin in the adjacent SMCs. Such release might function as an inductive stimulus specifically involved in polarization and asymmetrical division of the SMCs.

Auxin signaling and induction of SMC division

The view that the local change in the direction of auxin flow is involved in signal transduction that leads to the asymmetrical division of SMCs, is further supported by the results obtained

after treatments with TIBA and NOA. TIBA, which disrupts PIN1 localization and blocks auxin transport^{25,26} (see also Fig. 5C-F) and NOA which inhibits auxin influx, interfering with AUX1 carriers,^{19,25} both resulted in a great inhibition of SMC division (Figs. 3, 8A-C). Therefore, this hormone could specifically interfere with the induction of this division. The finding that auxin signaling participates in cell cycle control, regulating specific cell cycle checkpoints during transition from G1 to S and from G2 to M phase,^{41,44-46} corroborates this hypothesis.

Besides, PI3K in plants is an active mediator of auxin signaling and is involved in auxin-dependent processes such as root gravitropism.²⁹ In animal cells, PI3Ks have been implicated in regulation of various steps of cell division.⁴⁷ The participation of PI3K's catalytic activity in subsidiary cell generation of *Z. mays* is supported by the specific blockage of the asymmetrical division producing the subsidiary cells, after incubation of seedlings with the specific inhibitor LY294002 (Fig. 3). The ability of LY294002 to reverse the effect on subsidiary cell formation exerted by the exogenously added auxin allows the hypothesis that a dynamic interplay exists between PI3K and this hormone. In particular, NAA plus LY294002 treatment resulted in a remarkable reduction in the amount of subsidiary cells compared to solely NAA-treated *Z. mays* seedlings (Fig. 3).

Auxin signaling and SMC polarization

Moreover, auxin promotes polarization preceding the asymmetrical division in several cell types, including lateral root founder cells and brown algae zygotes.⁴¹ In the present case, auxin signaling interferes with establishment of polarity in SMCs. The addition of exogenous auxins promotes polar migration of SMC nucleus, whereas treatments with TIBA and NOA inhibited this process (Figs. 4, 8B). Unlike to control seedlings, NAA and IAA treatments stimulate the polar positioning of SMC nucleus at protodermal regions close to leaf base (Fig. 4). The similarity of the findings obtained by TIBA, NOA, LY294002, and NAA plus LY294002 treatments in polar movement of SMC nucleus, suggests that auxin and PI3K act cooperatively in the induction of polarity in SMCs.

The migration of the nucleus toward the polar SMC site is mediated by AF cytoskeleton (reviews by ref. 2, 11, 48, 49) and interestingly, the NAA-treated SMCs adjacent to young or advanced GMCs exhibited an increased population of perinuclear AFs. Consistently, auxin signaling interferes with the organization of actin cytoskeleton. In *A. thaliana* leaf epidermal cells, auxin that is transported in the apoplast, modulates the activity of ROP GTPases, which in turn influence AF-organization in neighbor cells.⁵⁰⁻⁵² Thus, RAC/ROPs (Rho-like Rac/Rop GTPases of plants) could function as spatial switches relaying localized auxin signals.⁵³ ROP patches follow auxin gradients that establish polarity in trichoblasts⁵³ and importantly, ROPs accumulate at the polar end of *Z. mays* SMCs.⁵⁴ However, the absence of specific ROPs from *Z. mays* mutants produced only weak defects in SMC polarization. On the contrary, in *pan1/pan1 rop2/rop2 rop9/+* triple mutants lacking partially ROP function and simultaneously, the activity of a receptor like kinase (RLK) named PAN1 (pangloss1), the premitotic SMC

polarization was seriously affected.⁵⁴ Notably, PAN1 and its partner PAN2 also exhibit polar accumulation in SMCs of *Z. mays*.^{55,56}

Considering that PAN1 and ROPs cooperate on positioning SMC nucleus and that in *pan1* mutants AF-patches were absent,^{54,55} it may be suggested that PAN1 may generally interfere with cortical AF-organization. This protein also accumulates at definite regions of subsidiary cells and intervening cells of stomatal rows of *Z. mays*,^{57,58} where distinct AF accumulations have also been found.^{34,58} Thus, the AF-patches at the polar end of *Z. mays* SMCs, should not be considered as prime polarizing factors, since they are absent from SMCs in other grasses like *Triticum turgidum*, but they may be related to the local SMC bulging toward the inducing GMC.^{12,34} Evidence favoring this hypothesis is that in TIBA- and LY294002-treated SMCs, where the polar nucleus migration and the asymmetrical division were inhibited, AF-patches were assembled. Moreover, in auxin-treated leaves, in which SMC polarization and asymmetrical division is expanded into protodermal regions close to leaf base, AF-patch was only detected in SMCs bulging toward their adjacent GMCs.

Polar MT-organization does not seem to be considerably affected in TIBA or LY294002-treated SMCs. Although these treatments block nucleus positioning and the entry of SMCs to division, the preprophase MT-band adjacent to GMC is properly assembled. Therefore, division plane in SMCs, as it is expressed by the preprophase MT-band organization, is determined regardless the inhibition of asymmetrical division. These data may confirm the hypothesis that, in SMCs of grasses, asymmetrical division and determination of the division plane are controlled by different stimuli, both of GMC origin.¹² SMC division seems to be triggered by auxin signaling, whereas the SMC division plane may be differently determined.

The plane of SMC division might be determined by local mechanical stresses exerted on SMCs by GMCs.^{2,12,34,59} The driving force generating such local mechanical stresses might be originated by the unequal elongation rates between the GMCs, the SMCs and the intervening cells of stomatal row. In particular, the lateral GMC cell wall seems to elongate more intensely than its SMC wall partner and the proximal to the GMC cell wall regions of the intervening stomatal row cells (unpublished data). Consequently, mechanical stresses applied to certain SMC cell wall areas may define the position of the unusual SMC preprophase MT-band. In TIBA or LY294002 treated seedlings, where GMC morphogenesis was not affected, the SMCs displayed a typical preprophase MT-band, despite the inhibition of their asymmetrical division, probably because these putative mechanical stresses are not hampered (see also ref. 12). On the contrary, in NAA- and IAA-treated seedlings where the SMC divisions occur at an early stage of GMC morphogenesis, the mechanical stresses and consequently the formation of the SMC preprophase MT-band may be generated in an opposite way. In this case, the slightly growing lateral GMC walls apply tensions to the adjacent growing SMC wall regions and the proximal regions of intervening cells of the stomatal row that display higher elongation rate at this developmental stage.

PI3K and auxin signal transduction

The findings of this study also suggest the implication of PI3K's catalytic activity in transduction routes accomplishing auxin signaling in developing *Z. mays* stomatal complexes. This is indicated by the extensive attenuation of SMC polarization/asymmetrical division after the inhibitory effect of LY294002 (Figs. 3 and 4). Moreover, LY294002 alleviated the promoting effects of the exogenously added auxin in SMC polarization and the subsequent formation of subsidiary cells (Figs. 3 and 4). PI3K may mediate these events influencing the recycling of PIN1 carriers since it is known that this is an actin dependent process,¹⁵ and that PI3K interferes with the organization of actin cytoskeleton.^{30,47}

Alternatively, PI3K may act regulating the activity of PIN1 carriers. PINOID kinases catalyzing the phosphorylation of PIN1 proteins are activated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinases (PDKs).⁶⁰ PDKs can bind to a broad range of lipids including the catalytic product of plant PI3K phosphatidylinositol-3-phosphate.⁴⁷ Other phosphoinositide kinases,²⁸ inositol triphosphate and phosphatidic acid generated from the activity of the phospholipid degrading enzymes PLCs and PLDs respectively, also mediate polar auxin transport controlling the distribution and activation of PIN carriers.^{61,62} These data support the view that phospholipid turnover could be important for subsidiary cell generation, among others, directing polar movement of auxin. This hypothesis is in accordance with previous work demonstrating that the catalytic activity of PLCs and PLDs interferes with subsidiary cell formation in *Z. mays*.¹² PI3K apart from its potential participation in mediating auxin-induced processes, via establishment of phospholipid asymmetry across plasmalemma similarly to other phosphoinositide kinases,²⁸ may promote also signal transduction initiated by the local auxin transport from GMCs to SMCs (see also ref. 47).

In conclusion, the data presented in this article reveal for the first time that auxin signaling is implicated in polarization establishment and asymmetrical division of SMC and that PI3K actively participates in auxin signal transduction toward generation of subsidiary cells of *Z. mays*.

Materials and Methods

Plant material

Caryopses of *Zea mays* L. var Aris, kindly offered by the National Agricultural Research Foundation (Cereal Institute, Thessaloniki, Greece), were allowed to germinate on moist filter papers in darkness for 72 h at 25 ± 1°C.

Treatments

Three days-old seedlings were incubated with aqueous solutions of 200 µM IAA (Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands), 100 µM NAA (Duchefa), 100–300 µM TIBA (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA), 50 µM NOA (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 50 µM LY294002 (Sigma), as well as with NAA + TIBA, NAA + NOA; and NAA + LY294002 at concentrations mentioned above. The roots were excised and the seedlings

were then placed on cotton wetted with treatments solutions. Treatments were carried out in darkness at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24–72 h. Following the same procedure, control seedlings were placed on cotton wetted with distilled water. The substances were derived from dimethyl sulfoxide stock solutions. The maximum dimethyl sulfoxide concentration in treatment solutions was 0.5% (v/v). To confirm that the solvent, at the concentrations used in this study, did not cause any side effect, additional control experiments were performed. In these cases the seedlings used as controls were placed on cotton wetted with 0.5% (v/v) dimethyl sulfoxide dissolved in distilled water. Experiments were repeated at least three times.

Immunocytochemistry

MT immunodetection was performed as was described in Panteris et al.³³ In brief, hand-made leaf strips from control or treated seedlings were fixed for 1 h with 4% (w/v) paraformaldehyde in PEM buffer [50 mM piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid), 5 mM ethyleneglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 6.8] containing 2% (v/v) dimethyl sulfoxide and 0.1% (v/v) Triton X-100. After three washes with the same buffer the cell walls were digested with 1% (w/v) cellulase (Onozuka, Honshua, Tokyo, Japan), 1% (w/v) macerozyme (Onozuka) and 1% (w/v) driselase (Sigma) in PEM buffer pH 5.0, for 15 min. The specimens were washed again with PEM, pH 6.8 and were extracted with 5% (v/v) dimethyl sulfoxide and 1% (v/v) Triton X-100 in phosphate buffered saline (PBS) for 20 min. After rinsing with PBS the leaf strips were incubated overnight with a rat monoclonal anti- α tubulin antibody (YOL; Clone 1/34; Serotec, Oxford, UK) and afterwards with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rat IgGs (Sigma) for 2 h at 37°C . Both antibodies were diluted 1:40 in PBS containing 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA). DNA staining was performed using 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33258 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Finally, the leaf strips were mounted with an anti-fade solution containing *p*-phenyldiamine.

Actin filament staining

Visualization of AFs was achieved using the procedure described previously in Panteris et al.³⁴ Leaf strips of control and treated seedlings were incubated for 30 min in dark with 300 μM *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester (Sigma) in PEM containing 2% (v/v) dimethyl sulfoxide and 0.1% (v/v) Triton X-100. The strips were then prefixed with 1% (w/v) paraformaldehyde in PEM for 20 min and fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde for 1 h. Afterwards, they were washed with PEM and extracted with 5% (v/v) dimethyl sulfoxide and 1% (v/v) Triton X-100 in PEM for 20 min. The strips were finally incubated for 1 h at 37°C with Alexa Fluor 568-conjugated phalloidin diluted 10% (v/v) in PEM from a stock solution

of 200 Units/ml phalloidin in methanol (Molecular Probes), and they were mounted with the anti-fade solution.

PIN1 localization in semithin sections

For PIN1 immunolocalization in semithin sections, small leaf pieces of control and treated leaves were fixed in 2% (w/v) paraformaldehyde and 0.1% (v/v) glutaraldehyde in PEM, pH 6.8, at 4°C for 1.5 h. The specimens were then washed in the same buffer and dehydrated in a graded ethanol series (10–90%) diluted in distilled water and three times in absolute ethanol, for 30 min (each step), at 0°C . The material was post-fixed with 0.25% (w/v) osmium tetroxide added to the 30% ethanol step for 2 h. The material was infiltrated with LR White (LRW; Sigma) acrylic resin diluted in ethanol, in 10% steps to 100% (1 h in each), at 4°C and finally with pure resin overnight. The samples were embedded in gelatin capsules filled with LRW resin and polymerized at 60°C , for 48 h.

Semithin sections of material embedded in LRW resin were transferred to poly-L-lysine (Sigma) coated glass slides and blocked with 5% (w/v) BSA in PBS for 5 h. After washing with PBS, anti PIN1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:20 in PBS containing 2% (w/v) BSA was applied overnight, at room temperature. Following rinsing with PBS and blocking again with BSA, the sections were incubated for 3 h, at 37°C and then they were left overnight at room temperature in fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-goat IgGs (Sigma) diluted 1:40 in PBS containing 2% (w/v) BSA. The sections were finally mounted with the anti-fade solution.

Observation and photography

Paradermal leaf sections of control and treated seedlings were visualized with a Zeiss Axioplan microscope (Zeiss Oberkochen, Germany) equipped with a micrometric scale, a differential interference contrast (DIC) system and an Axiocam MRc5 digital camera. Some sections were incubated with a solution of 0.05% (w/v) aniline blue (Sigma) in 0.07 M K_2HPO_4 buffer, pH 8.5.⁶³ This handling allows the staining of newly formed daughter cell walls since they contain large amount of callose. The specimens were examined with the Zeiss Axioplan microscope which was equipped with UV source and proper filters.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the University of Athens, Greece.

References

1. Stebbins LG, Shah SS. Developmental studies of cell differentiation in the epidermis of monocotyledons. II. Cytological features of stomatal development in the Graminae. *Dev Biol* 1960; 2:477-500; [http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606\(60\)90050-6](http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(60)90050-6)
2. Galatis B, Apostolakis P. The role of the cytoskeleton in the morphogenesis and function of stomatal complexes. *New Phytol* 2004; 161:613-39; <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00986.x>
3. Facette MR, Smith LG. Division polarity in developing stomata. *Curr Opin Plant Biol* 2012; 15:585-92; PMID:23044038; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2012.09.013>
4. Pillitteri LJ, Torii KU. Mechanisms of stomatal development. *Annu Rev Plant Biol* 2012; 63:591-614; PMID:22404473

5. Wick SM. The preprophase band. In: Lloyd CW. ed. The cytoskeletal basis of plant growth and form. Academic Press London 1991; 231-44.
6. Bünning E. Polarität und inäquale teilung pflanzlichen protoplasten. *Protoplasmatologia* 1957; 8:1-86.
7. Stebbins LG, Jain SK. Developmental studies of cell differentiation in the epidermis of monocotyledons. I. *Allium*, *Rhoeo*, and *Commelina*. *Dev Biol* 1960; 2:409-26; [http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606\(60\)90025-7](http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(60)90025-7)
8. Pickett-Heaps JD, Northcote DH. Cell division in the formation of the stomatal complex of the young leaves of wheat. *J Cell Sci* 1966; 1:121-8; PMID:5929805
9. Apostolakis P, Galatis B. Induction, polarity and spatial control of cytokinesis in some abnormal subsidiary cell mother cells of *Zea mays*. *Protoplasma* 1987; 140:26-42; <http://dx.doi.org/10.1007/BF01273253>
10. Green PB, Erickson RO, Richmond PA. On the physical basis of cell morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1970; 175:712-31; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1970.tb45187.x>
11. Pickett-Heaps JD, Gunning BES, Brown RC, Lemmon BE, Cleary AL. The cytoplasmic concept in plant cells: cytoplasmic domains and the evolution of spatially organised cell division. *Am J Bot* 1999; 86:153-72; PMID:21680355; <http://dx.doi.org/10.2307/2656933>
12. Apostolakis P, Panteris E, Galatis B. The involvement of phospholipases C and D in the asymmetric division of subsidiary cell mother cells of *Zea mays*. *Cell Motil Cytoskel* 2008; 65:863-75; <http://dx.doi.org/10.1002/cm.20308>
13. Giannoutsou E, Apostolakis P, Galatis B. Actin filament-organized local cortical endoplasmic reticulum aggregations in developing stomatal complexes of grasses. *Protoplasma* 2011; 248:373-90; PMID:20644970; <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-010-0180-2>
14. Dhonukshe P, Kleine-Vehn J, Friml J. Cell polarity, auxin transport, and cytoskeleton-mediated division planes: who comes first? *Protoplasma* 2005; 226:67-73; PMID:16231102; <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-005-0104-8>
15. Oliva M, Vernoux T, Traas J. From auxin transport to patterning. In: Chen R, Baluška F. eds. Polar auxin transport. Springer-Verlag Heidelberg 2013; 259-79.
16. Prasad K, Dhonukshe P. Polar auxin transport: cell polarity to patterning. In: Chen R, Baluška F. eds. Polar auxin transport. Springer-Verlag Heidelberg 2013; 25-44.
17. Forestan C, Varotto S. The role of PIN auxin efflux carriers in polar auxin transport and accumulation and their effect on shaping maize development. *Mol Plant* 2012; 5:787-98; PMID:22186966; <http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssf103>
18. Zgurski JM, Sharma R, Bolokoski DA, Schultz EA. Asymmetric auxin response precedes asymmetric growth and differentiation of *asymmetric leaf1* and *asymmetric leaf2* Arabidopsis leaves. *Plant Cell* 2005; 17:77-91; PMID:15608337; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104.026898>
19. Le J, Liu X-G, Yang K-Z, Chen X-L, Zou J-J, Wang H-Z, Wang M, Vanneste S, Morita M, Tasaka M, et al. Auxin transport and activity regulate stomatal patterning and development. *Nature Commun* 2014; 5:3090; <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4090>
20. Tsiantis M, Brown MIN, Skibinski G, Langdale JA. Disruption of auxin transport is associated with aberrant leaf development in maize. *Plant Physiol* 1999; 121:1163-8; PMID:10594103; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.121.4.1163>
21. Nelissen H, Rymen B, Jikumaru Y, Demuyneck K, Van Lijsebettens M, Kamiya Y, Inzé D, Beemster GTS. A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Curr Biol* 2012; 22:1183-7; PMID:22683264; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.065>
22. Balzan S, Gurmukh SJ, Carraro N. The role of auxin transporters in monocots development. *Front Plant Sci* 2014; 5:393; PMID:25177324; <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00393>
23. Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jurgens G, Friml J. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 2003; 115:591-602; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00924-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00924-3)
24. Nick P. Probing the actin-auxin oscillator. *Plant Signal Behav* 2010; 5:94-8; PMID:20023411; <http://dx.doi.org/10.4161/psb.5.2.10337>
25. Tsuda E, Yang H, Nishimura T, Uehara Y, Sakai T, Furutani M, Koshida T, Hirose M, Nozaki H, Murphy AS, et al. Alkoxy-auxins are selective inhibitors of auxin transport mediated by PIN, ABCB, and AUX1 transporters. *J Biol Chem* 2011; 286:2354-64; PMID:21084292; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.171165>
26. Geldner N, Friml J, Stierhof Y-D, Jurgens G, Palme K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 2001; 413:425-8; PMID:11574889; <http://dx.doi.org/10.1038/35096571>
27. Wiśniewska J, Xu J, Seifertová D, Brewer PB, Růžicka K, Blilou I, Rouquie D, Benková E, Scheres B, Friml J. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* 2006; 312:883; PMID:16601151; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1121356>
28. Tejos R, Sauer M, Vanneste S, Palacios-Gomez M, Li H, Heilmann M, van Wijk R, Vermeer JEM, Heilmann I, Munnik T, et al. Bipolar plasma membrane distribution of phosphoinositides and their requirement for auxin-mediated cell polarity and patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2014; 26:2114-28; PMID:24876254; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.114.126185>
29. Joo JH, Yoo HJ, Hwang I, Lee JS, Nam KH, Bae YS. Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Lett* 2005; 579:1243-8; PMID:15710420; <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.018>
30. Li L, Saga N, Mikami K. Phosphatidylinositol 3-kinase activity and asymmetrical accumulation of F-actin are necessary for establishment of cell polarity in the early development of monospores from the marine red alga *Porphyra yezoensis*. *J Exp Bot* 2008; 59:3575-86; PMID:18703492; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ern207>
31. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994; 269:5241-48; PMID:8106507
32. Galatis B. The organization of microtubules in guard cell mother cells of *Zea mays*. *Can J Bot* 1982; 60:1148-66; <http://dx.doi.org/10.1139/b82-145>
33. Panteris E, Apostolakis P, Galatis B. Cytoskeletal asymmetry in *Zea mays* subsidiary cell mother cells: a monopolar prophase microtubule half-spindle anchors the nucleus to its polar position. *Cell Motil Cytoskel* 2006; 63:696-709; <http://dx.doi.org/10.1002/cm.20155>
34. Panteris E, Galatis B, Quader H, Apostolakis P. Cortical actin filament organization in developing and functioning stomatal complexes of *Zea mays* and *Triticum turgidum*. *Cell Motil Cytoskel* 2007; 64:531-48; <http://dx.doi.org/10.1002/cm.20203>
35. Galatis B, Apostolakis P, Katsaros C. Synchronous organization of two preprophase microtubule bands and final cell plate arrangement in subsidiary cell mother cells of some *Triticum* species. *Protoplasma* 1983; 117:24-39; <http://dx.doi.org/10.1007/BF01281781>
36. Galatis B, Apostolakis P, Katsaros C. Positional inconsistency between preprophase microtubule band and final cell plate arrangement during triangular subsidiary cell and atypical hair cell formation in two *Triticum* species. *Can J Bot* 1984; 62:343-59; <http://dx.doi.org/10.1139/b84-053>
37. Galatis B. Differentiation of stomatal meristemoids and guard cell mother cells into guard-like cells in *Vigna sinensis* leaves after colchicine treatment. An ultrastructural and experimental approach. *Planta* 1977; 136:103-14; PMID:24420314; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00396185>
38. Bünning E. General processes of differentiation. In: Milthorpe F.L. ed. The growth of leaves. Butterworths Scientific Publications London 1956; 18-30.
39. Facette MR, Shen Z, Björnsdóttir FR, Briggs SP, Smith LG. Parallel proteomic and phosphoproteomic analyses of successive stages of maize leaf development. *Plant Cell* 2013; 25:2798-812; PMID:23933881; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.112227>
40. Wabnick K, Kleine-Vehn J, Balla J, Sauer M, Naramoto S, Reinöhl V, Merks RMH, Govaerts W, Friml J. Emergence of tissue polarization from synergy of intracellular and extracellular auxin signaling. *Mol Syst Biol* 2010; 6:447; PMID:21179019
41. De Smet I, Beekman T. Asymmetric cell division in land plants and algae: the driving force for differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12:177-88; PMID:21346731; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3064>
42. Saibo NJM, Vriezen WH, Beemster GTS, Van Der Straeten D. Growth and stomata development of *Arabidopsis* hypocotyls are controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxins. *Plant J* 2003; 33:989-1000; PMID:12631324; <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2003.01684.x>
43. Zhang J-Y, He S-B, Li L, Yang H-Q. Auxin inhibits stomatal development through MONOPTEROS repression of a mobile peptide gene STOMAGEN in mesophyll. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2014; 111:E3015-23; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1400542111>
44. Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inzé D, Beekman T. Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 2002; 14:2339-51; PMID:12368490; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.004960>
45. De Veylder L, Beekman T, Inzé D. The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:655-65; PMID:17643126; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2227>
46. Wang L, Ruan Y-L. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signalling. *Front Plant Sci* 2013; 4:163; PMID:23755057
47. Lee Y, Munnik T, Lee Y. Plant Phosphatidylinositol 3-Kinase. In: Munnik T. ed. Lipid Signaling in Plants. Plant Cell Monographs, Springer-Verlag Heidelberg 2010; 16:95-106.
48. Cleary AL. Actin in formation of stomatal complexes. In: Staiger CJ, Baluška F, Volkmann D, Barlow PW. eds. Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions. Kluwer Academic Publishers Dordrecht 2000; 411-26.
49. Smith LG. Plant cell division: building walls in the right places. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:33-9; PMID:11413463; <http://dx.doi.org/10.1038/35048050>
50. Xu T, Wen M, Nagawa S, Fu Y, Chen J-G, Wu M-J, Perrot-Rechenmann C, Friml J, Jones AM, Yang Z. Cell surface- and Rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell* 2010; 143:99-110; PMID:20887895; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.003>
51. Yang Z, Lavagi I. Spatial control of plasma membrane domains: ROP GTPase-based symmetry breaking. *Curr Opin Plant Biol* 2012; 15:601-7; PMID:23177207; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2012.10.004>
52. Nakamura M, Kiefer CS, Grebe M. Planar polarity, tissue polarity and planar morphogenesis in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2012; 15:593-600; PMID:22906885; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2012.07.006>
53. Wu H-m, Hazak O, Cheung AY, Yalovsky S. RAC/ROP GTPases and auxin signaling. *Plant Cell* 2011; 23:1208-18; PMID:21478442; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.083907>
54. Humphries JA, Vejlupekova Z, Luo A, Meeley RB, Sylvestre AW, Fowler JE, Smith LG. ROP GTPases act with the receptor-like protein PAN1 to polarize asymmetric cell division in maize. *Plant Cell* 2011; 23:2273-84; PMID:21653193; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.085597>

55. Cartwright HN, Humphries JA, Smith LG. PAN1: a receptor-like protein that promotes polarization of an asymmetric cell division in maize. *Science* 2009; 323:649-51; PMID:19179535; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1161686>
56. Zhang X, Facette M, Humphries JA, Shen Z, Park Y, Sutimantapani D, Sylvester AW, Briggs SP, Smith LG. Identification of PAN2 by quantitative proteomics as a leucine-rich repeat-receptor-like kinase acting upstream of PAN1 to polarize cell division in maize. *Plant Cell* 2012; 24:4577-89; PMID:23175742; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.104125>
57. Panteris E, Galatis B, Apostolakis P. Examination of the possible role of PAN1 protein in the ontogenesis of *Zea mays* stomatal complexes. In: Gkelis S, Karousou R, Kokkini S, Panteris E. eds. Program and Abstracts. 13th Panhellenic Scientific Conference, Hellenic Botanical Society, Thessaloniki 3–6 October, 2013; p. 118.
58. Sutimantapani D, Pater D, Smith LG. Divergent roles for maize PAN1 and PAN2 receptor-like proteins in cytokinesis and cell morphogenesis. *Plant Physiol* 2014; 164:1905-17; PMID:24578508; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.113.232660>
59. Kennard JL, Cleary AL. Pre-mitotic nuclear migration in subsidiary mother cells of *Tradescantia* occurs in G1 of the cell cycle and requires F-actin. *Cell Motil Cytoskel* 1997; 36:55-67; [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1997\)36:1%3c55::AID-CM5%3e3.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1997)36:1%3c55::AID-CM5%3e3.0.CO;2-G)
60. Zegzouti H, Anthony RG, Jahchan N, Bögre L, Christensen SK. Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in *Arabidopsis*. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2006; 103:6404-9; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510283103>
61. Li G, Xue H-W. *Arabidopsis* *PLD ζ 2* regulates vesicle trafficking and is required for auxin response. *Plant Cell* 2007; 19:281-95; PMID:17259265; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.106.041426>
62. Testerink C, Munnik T. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J Exp Bot* 2011; 62:2349-61; PMID:21430291; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/err079>
63. O'Brien TP, McCully ME. The study of plant structure. Principles and selected methods. *Termarcarphi Pty, Melbourne* 1981; 352p.

VII.2 ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΛΙΒΑΝΟΣ ΠΑΝΤΕΛΕΗΜΩΝ

Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, 15784, Αθήνα

ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

2007-2009: Άμισθος επιστημονικός συνεργάτης της ομάδας κυτταρικής βιολογίας φυτών του Τομέα Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας

2009: Πτυχιούχος του Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ.

2009 έως σήμερα: Υποψήφιος διδάκτορας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ με γνωστικό αντικείμενο: «Μηχανισμοί μεταγωγής σήματος και οργάνωση του φυτικού κυτταροσκελετού. Ο ρόλος των δραστικών μορφών οξυγόνου».

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ*

- 1. Apostolakos P., Livanos P., Galatis B. 2009.** Microtubule involvement in the deposition of radial fibrillar callose arrays in stomata of the fern *Asplenium nidus* L. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 66:342-349.
- 2. Apostolakos P., Livanos P., Nikolakopoulou T.L., Galatis B. 2009.** The role of callose in guard cell wall formation and stomatal differentiation in the fern *Asplenium nidus*. *Annals of Botany* 104:1373-1387.
- 3. Apostolakos P., Livanos P., Nikolakopoulou T.L., Galatis B. 2010.** Callose implication in stomatal opening and closure in the fern *Asplenium nidus*. *New Phytologist* 186:623-635.
- 4. Livanos P., Galatis B., Quader H., Apostolakos P. 2012.** Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces atypical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*. *Cytoskeleton* 69:1-21.
- 5. Livanos P., Apostolakos P., Galatis B. 2012.** Plant cell division: ROS homeostasis is required. *Plant Signaling & Behavior* 7:771-778.
- 6. Livanos P., Galatis B., Gaitanaki C., Apostolakos P. 2014.** Phosphorylation of a p38-like MAPK is involved in sensing cellular redox state and drives atypical tubulin polymer assembly in angiosperms. *Plant, Cell & Environment* 37:1130-1143.
- 7. Livanos P., Galatis B., Apostolakos P. 2014.** The interplay between ROS and tubulin cytoskeleton in plants. *Plant Signaling & Behavior* 9:e28069.
- 8. Livanos P., Giannoutsou E., Apostolakos P., Galatis B. 2015.** Auxin as an inducer of asymmetrical division generating the subsidiary cells in stomatal complexes of *Zea mays*. *Plant Signaling & Behavior* 10:e984531.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ*

- 1. Λιβανός Π., Γαλάτης Β., Αποστολάκος Π. 2007.** Η Φωσφολιπάση C εμπλέκεται στους μηχανισμούς ελέγχου της κυτοκίνησης στα ανώτερα φυτά. *Πρακτικά 29^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών*, σσ. 222-223.
- 2. Λιβανός Π., Γαλάτης Β., Αποστολάκος Π. 2008.** Η Φωσφολιπάση C εμπλέκεται στην οργάνωση της μιτωτικής συσκευής στα ανώτερα φυτά. *Πρακτικά 30^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών*, σσ. 276-277.
- 3. Λιβανός Π., Quader H., Γαλάτης Β., Αποστολάκος Π. 2009.** Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στη διεξαγωγή της κυτοκίνησης στα ανώτερα φυτά. *Πρακτικά 31^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών*, σσ. 194-195.

4. Λιβανός Π., Quader H., Γαλάτης Β., Αποστολάκος Π. 2009. Συμμετοχή των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στους μηχανισμούς οργάνωσης της μιτωτικής και κυτοκινητικής συσκευής των αγγειοσπέρμων. *Πρακτικά 11^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού συνεδρίου Ελληνικής Βοτανικής Εταιρίας*, σ. 110.
5. Αποστολάκος Π., Λιβανός Π., Νικολακοπούλου Θ., Γαλάτης Β. 2009. Ο ρόλος της καλλόξης στη διαφοροποίηση και λειτουργία των στομάτων του περιδοφύτου *Asplenium nidus* L. *Πρακτικά 11^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού συνεδρίου Ελληνικής Βοτανικής Εταιρίας* σ. 42.
6. Λιβανός Π., Quader H., Γαλάτης Β., Αποστολάκος Π. 2010. Η PI3-κινάση συμμετέχει στην οργάνωση των επάλληλων συστημάτων μικροσωληνίσκων σε διαιρούμενα κύτταρα ακρόρριζου του φυτού *Triticum turgidum*. *Πρακτικά 32^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών*, σσ. 190-191.
7. Λιβανός Π., Γαλάτης Β., Quader H., Αποστολάκος Π. 2011. Η διατάραξη της ομοιόστασης των ελευθέρων ριζών οξυγόνου επάγει τη δημιουργία άτυπων πολυμερών σωληνίνης στο ακρόρριζο των φυτών *Triticum turgidum* και *Arabidopsis thaliana*. *Πρακτικά 33^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών*, σσ. 160-161.
8. Αποστολάκος Π., Λιβανός Π., Νικολακοπούλου Θ., Γαλάτης Β. 2011. Συμμετοχή της καλλόξης στο μηχανισμό λειτουργίας των στομάτων του περιδοφύτου *Asplenium nidus*. *Πρακτικά 12^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού συνεδρίου Ελληνικής Βοτανικής Εταιρίας* σ. 40-41.
9. Λιβανός Π., Γαλάτης Β., Quader H., Αποστολάκος Π. 2011. Ομοιόσταση ελευθέρων ριζών οξυγόνου και άτυπα πολυμερή σωληνίνης: ο ρόλος της ακετυλιωμένης σωληνίνης και της MAP65-1 πρωτεΐνης. *Πρακτικά 12^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού συνεδρίου Ελληνικής Βοτανικής Εταιρίας* σ. 119-120.
10. Stokes I., Apostolakis P., Livanos P., Exley C. 2013. Localization of callose in rice tissue using aniline blue and immunofluorescence staining. 10th Keele meeting on Aluminum. Winchester, England, Book of Abstracts p.50.
11. Λιβανός Π., Γαλάτης Β., Γαϊτανάκη Α., Αποστολάκος Π. 2013. Η φωσφορυλίωση μιας p38-like MAPK συμμετέχει στην αντίληψη μεταβολών στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών οξυγόνου των φυτικών κυττάρων και δρομολογεί την οργάνωση άτυπων πολυμερών σωληνίνης. *Πρακτικά 35^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών*, σσ. 192-193.
12. Λιβανός Π., Γαλάτης Β., Γαϊτανάκη Α., Αποστολάκος Π. 2013. Ομοιόσταση ελευθέρων ριζών οξυγόνου και κυτταροσκελετός σωληνίνης: Ο ρόλος μιας p46 MAPK όμοιας με την p38-MAPK. *Πρακτικά 13^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού συνεδρίου Ελληνικής Βοτανικής Εταιρίας* σ. 91.
13. Λιβανός Π., Γαλάτης Β., Αποστολάκος Π. 2014. Ο ρόλος της PI-3 κινάσης στην εκδήλωση των ασυμμέτρων κυτταροδιαρρέσεων που οδηγούν στη δημιουργία παραστοματικών κυττάρων στο φυτό *Zea mays*. *Πρακτικά 36^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών*, σσ. 188-189.

* Οι υπ' αριθμόν 4, 5, 6, 7, 8 δημοσιεύεις και οι ανακοινώσεις 3, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 13 περιέχουν δεδομένα της διατριβής.