

ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
Μ.Δ.Ε. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Διπλωματική εργασία

Αβιοτικές καταπονήσεις στο *Arabidopsis thaliana*: Διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων *sbr* (selenium binding protein) και ανάπτυξη ενός μοριακού εργαλείου για τον *in planta* ανοσοεντοπισμό τους.

Σκαμάκη Καλλιόπη

A.M. 2009002

Επιβλέπων Καθηγητής: **Ρούσσης Ανδρέας**

ΑΘΗΝΑ 2012

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ρούσσης Ανδρέας, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Χαραλαμπίδης Κοσμάς, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Αμαλία Καραγκούνη Κύρτσου, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια απονομής Μεταπτυχιακού Διπλώματος Εξειδίκευσης με τίτλο "Μικροβιακή Βιοτεχνολογία"

Το πειραματικό μέρος εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Φυσιολογίας Φυτών στον Τομέα Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πρωταρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέπων Καθηγητή αυτής της Διπλωματικής Εργασίας, τον Επίκουρο Καθηγητή Ανδρέα Ρούσση, για την καθοδήγηση και για την απεριόριστη βοήθειά του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Χαραλαμπίδη Κοσμά για την βοήθειά του καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της Διατριβής και την Καθηγήτρια Αμαλία Καραγκούνη Κύρτσου για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω Μεταπτυχιακές Σπουδές.

Θα ήταν παραλειψή μου να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθειά και τη συνεργασία τους, αλλά και όλες τις συμφοιτήτριές μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μητέρα για την απεριόριστη βοήθεια, την κατανόηση και την υπομονή της και όλη μου την οικογένεια.

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή..... 6

- 1.1. Η πρωτεΐνη Selenium binding protein (SBP) 6
 - 1.1.1. Τα γονίδια *sbp*..... 6
 - 1.1.2. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *sbp* στο φυτό *A.thaliana* 7
 - 1.1.3. Δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών SBP 8
 - 1.1.4. Πιθανοί βιολογικοί ρόλοι των πρωτεϊνών SBP..... 8
 - 1.1.5. Υποθέσεις για τις κυτταρικές λειτουργίες των πρωτεϊνών SBP 10
 - 1.1.6. Αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών SBP 11
- 1.2. Η απόκριση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα 16
 - 1.2.1. Γενικό μοτίβο των πρωτεϊνών που ρυθμίζονται σε συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα 16
 - 1.2.2. Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα και την αποτοξίνωση..... 19
- 1.3. Τα αντισώματα βαριάς αλυσίδας των Καμηλίδων 24
 - 1.3.1. Ιδιότητες των θραυσμάτων αντισωμάτων VHH 25
 - 1.3.2. Παραγωγή των θραυσμάτων αντισωμάτων VHH 28
 - 1.3.3. Ετερόλογα συστήματα παραγωγής των θραυσμάτων αντισωμάτων VHH 29
 - 1.3.4. Τα θραύσματα αντισωμάτων VHH ως μοριακό εργαλείο για την μελέτη πρωτεϊνών *in planta* 30
- 1.4. Σκοπός διπλωματικής εργασίας 32

2. Υλικά και μέθοδοι 33

- 2.1. Μέθοδοι..... 33
 - 2.1.1. Συνθήκες καλλιέργειας φυτών και βακτηρίων 33
 - 2.1.2. Βασικές τεχνικές 34
 - 2.1.2.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli*..... 40
 - 2.1.3. Ενότητες εργασιών 52
- 2.2 ΥΛΙΚΑ..... 54
 - 2.2.1. Διαλύματα, θρεπτικά υποστρώματα, αντιβιοτικά 54
 - 2.2.1.11. Διαλύματα/Αντιδραστήρια σύνθεσης cDNA..... 59
 - 2.2.2. Πλασμιδιακοί φορείς..... 60

3. Αποτελέσματα..... 63

- 3.1. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *sbp1/2/3*, *gapdh*, *fba*, *gpx6* και *gst9* του *A.thaliana* σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης..... 63

3.1.1. Πρότυπα έκφρασης των γονιδίων μετά από επίδραση χαλκού (Cu) σε αρτίβλαστα <i>A.thaliana</i>	65
3.1.2. Πρότυπα έκφρασης των γονιδίων μετά από επίδραση εξασθενούς χρωμίου (Cr) σε αρτίβλαστα <i>A.thaliana</i>	68
3.1.3. Ανάλυση των αλλαγών στην γονιδιακή έκφραση με χρήση του προγράμματος ImageJ	71
3.2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών AtSBP1/AtGAPDH/AtFBA <i>in planta</i> σε παροδικώς μετασχηματισμένα φυτά <i>N. Benthamiana</i>	76
3.3. Ανάπτυξη ενός μοριακού εργαλείου για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών SBP <i>in planta</i> βασισμένο στα αντισώματα VHH και στη μέθοδο BiFC.	81
4. Συζήτηση	86
4.1. Αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση μετά από επίδραση με βαρέα μέταλλα σε αρτίβλαστα <i>A.thaliana</i>	86
4.2. Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών AtSBP1 και AtGAPDH <i>in planta</i>	91
4.3. Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης AtSBP1 <i>in planta</i> σε πραγματικό χρόνο.....	92
5. Βιβλιογραφία	95

1. Εισαγωγή

1.1. Η πρωτεΐνη Selenium binding protein (SBP)

Η πρωτεΐνη SBP (Selenium binding protein) απομονώθηκε για πρώτη φορά από ήπαρ ποντικού σε πειράματα σήμανσης με ραδιενεργό σελήνιο με σκοπό τον εντοπισμό πρωτεϊνών που δεσμεύουν σελήνιο [1]. Οι τυπικές σεληνοπρωτεΐνες ενσωματώνουν το σελήνιο στην αμινοξική τους αλληλουχία μέσω του αμινοξέως σεληνοκυστεΐνη που κωδικοποιείται από το κωδικόνιο UGA [2]. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν την ύπαρξη πρωτεϊνών που δεσμεύουν σελήνιο μέσω σύζευξης του σεληνίου με τη γλουταθειόνη ($GSSe^-$) ή με άλλο τρόπο που δεν έχει καθοριστεί. Αυτή η ομάδα πρωτεϊνών αναφέρεται ως "selenium binding proteins" [3]. Το σελήνιο ενσωματώνεται σταθερά στην ανθρώπινη SBP, hSBP1, πιθανώς μέσω ενός σεληνοσουλφιδικού δεσμού [4].

1.1.1. Τα γονίδια *sbp*

Ο αριθμός των γονιδίων *sbp* ποικίλει ανάμεσα σε διαφορετικά είδη. Το φυτό *A.thaliana* έχει τρία ομόλογα γονίδια *sbp* που κωδικοποιούν τρεις πρωτεΐνες SBP (SBP1/2/3), ενώ τα περισσότερα ψυχανθή και μονοκοτυλήδονα έχουν ένα γονίδιο *sbp* [5]. Δύο γονίδια *sbp* έχουν ταυτοποιηθεί στο ποντίκι και ένα στον άνθρωπο. Η δομή ιντρονίων-εξωνίων των γονιδίων *sbp* είναι διαφορετική μεταξύ απομακρυσμένων οργανισμών, ενώ είναι αρκετά σταθερή μεταξύ συγγενών οργανισμών. Για παράδειγμα, πολλά ομόλογα στα φυτά έχουν συγκρίσιμες δομές με έξι ή επτά εξώνια με μεγέθη μεταξύ ~100 μέχρι 500 ζευγών βάσεων, ενώ στα ζώα αποτελούνται από 12 εξώνια μικρότερου μεγέθους (~50 μέχρι 300 ζεύγη βάσεων). Οι κωδικές περιοχές των γονιδίων *Atsbp1* και *Atsbp2* και των *Atsbp3* και *Atsbp1* του *A.thaliana* παρουσιάζουν ποσοστό ταυτότητας αλληλουχίας 85% και 69%, αντίστοιχα [6]. Στοιχίση των κωδικών αλληλουχιών με τις γονιδιωματικές περιοχές των γονιδίων *sbp* του *A.thaliana* δείχνουν την οργάνωση ιντρονίων-εξωνίων που περιγράφονται στην **EIKONA 1.1**.



ΕΙΚΟΝΑ 1.1. Σχηματική αναπαράσταση της συντηρημένης δομής ιντρονίων-εξωνίων των γονιδίων *sbp* των φυτών *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Selaginella moellendorffii* και *A.thaliana*. Όλα τα γονίδια *sbp* περιέχουν επτά εξώνια με εξαίρεση το γονίδιο *Atsbp2*, που περιέχει έξι. Τα μέγεθη των εξωνίων και των ιντρονίων είναι συγκρίσιμα μεταξύ των γονιδίων *Atsbp1* και *Atsbp3*. Στο *Atsbp2*, το πρώτο ιντρόνιο και το τρίτο εξώνιο είναι μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα ιντρόνια και εξώνια των υπόλοιπων γονιδίων *sbp*. Η οργάνωση ιντρονίων-εξωνίων των *Atsbp1* και *Atsbp3* είναι παρόμοια με αυτή των γονιδίων *sbp* των φυτών *Glycine max*, *Oryza sativa*, *Selaginella moellendorffii* και *A.thaliana*. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα εξώνια και με γκρι γραμμές τα ιντρόνια.

1.1.2. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *sbp* στο φυτό *A.thaliana*

Τα γονίδια *sbp* στα φυτά εκφράζονται σταθερά σε διάφορους ιστούς. Το πρότυπο ιστοειδικής έκφρασης του γονιδίου της *AtSBP1* έχει μελετηθεί σε διαγονιδιακές σειρές *A.thaliana* που εκφράζουν το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *Atsbp1* [8]. Σε ώριμα φυτά εκφράζεται στα φύλλα, τους βλαστούς, τα άνθη, τους μίσχους και τα σπέρματα. Υψηλή έκφραση παρατηρήθηκε σε νεαρούς αυξανόμενους ιστούς, όπως οι άκρες των ριζών και ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες δευτερογενείς ρίζες νεαρών αρτιβλάστων, στα νεαρά αυξανόμενα φύλλα και στις ροζέτες ώριμων φυτών. Κατά την ανάπτυξη, έκφραση της *AtSBP1* ανιχνεύεται μόλις εμφανίζεται η άκρη της ρίζας. Φαίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου *sbp1* ρυθμίζεται κατά την ανάπτυξη του φυτού. Το γονίδιο *Atsbp2* έχει παρόμοιο πρότυπο ιστοειδικής έκφρασης με το γονίδιο *Atsbp1*, όμως δεν ανιχνεύεται στις ρίζες και τα άνθη. Το γονίδιο *Atsbp3* εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα μόνο στις ρίζες νεαρών αρτιβλάστων [8].

1.1.3. Δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών SBP

Ομόλογες πρωτεΐνες SBP έχουν βρεθεί σε πολλούς ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς και παρουσιάζουν ιδιαίτερως συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία σε όλο το μήκος του πολυπεπτιδίου, με κάποια ιδιαίτερα συντηρημένα πιθανά λειτουργικά μοτίβα. Οι πρωτεΐνες SBP των φυτών παρουσιάζουν ποσοστό ταυτότητας αμινοξικής αλληλουχίας 77 με 88% μεταξύ τους και 57 με 60% με την πρωτεΐνη που κωδικοποιεί SBP του ανθρώπου (hSBP). Επίσης, η hSBP πρωτεΐνη εμφανίζει ποσοστό ταυτότητας αμινοξικής αλληλουχίας 86% με την SBP του ποντικού, αλλά και 37% με αμινοξικές αλληλουχίες αρχαιοβακτηρίων. Οι ιδιαίτερα συντηρημένες αλληλουχίες των πρωτεϊνών SBP υποδεικνύουν ότι πιθανόν έχουν έναν θεμελιώδη βιολογικό ρόλο [5]. Λίγες οικογένειες πρωτεϊνών, όπως οι ιστόνες, η ακτίνη, η ουβικουΐτίνη, η τουμπουλίνη (49%), οι HS70 (75%) και οι HSP60 (44%), ανάμεσά τους και η SBP είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν τόσο μεγάλη ταυτότητα αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ ανθρώπων και φυτών [5].

Τα συντηρημένα πιθανά λειτουργικά μοτίβα των πρωτεϊνών SBP περιλαμβάνουν ένα μοτίβο CSSC, χαρακτηριστικό οξειδοαναγωγασών θειολών-δισουλφιδίων, που καταλύουν την οξείδωση θειολών και την αναγωγή και ισομερίωση πρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών και παίζουν καταλυτικό ρόλο σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Διαθέτουν επίσης, πιθανά μοτίβα δέσμησης μετάλλων (HxD και HxH), πιθανά σήματα παραμονής στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συσκευή Golgi (KDEL), δύο πιθανά μοτίβα δέσμησης στην κλαθρίνη και υψηλό ποσοστό καταλοίπων ιστιδίνης (3%) [7].

1.1.4. Πιθανοί βιολογικοί ρόλοι των πρωτεϊνών SBP

1.1.4.1. Πιθανές βιολογικές λειτουργίες της SBP στα φυτά

Βάσει του προτύπου έκφρασης της στο ψυχανθές *Lotus japonicus*, η SBP έχει προταθεί ότι συμμετέχει στον σχηματισμό φυματίων και στη συμβίωση μεταξύ φυτού και αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων. Όμως η SBP στα φυτά εμπλέκεται και σε μη συμβιωτικές διεργασίες, αφού εκφράζεται σταθερά και σε φυτά που δεν ανήκουν στην οικογένεια των ψυχανθών, όπως το *A.thaliana* και το ρύζι [5].

Μελέτες σε διάφορα είδη φυτών όπως το *A.thaliana* [9-12], το γλυκό σόργο [13] και ο ηλίανθος [14] έχουν δείξει ότι τα γονίδια *sbp* ρυθμίζονται μεταγραφικά όταν το φυτό εκτίθεται σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Η έκφραση της SBP στο ρύζι ενεργοποιείται από ενδογενή σηματοδοτικά μόρια που επάγουν ανθεκτικότητα στην μόλυνση από παθογόνα, όπως το γιασμονικό οξύ (JA) και το σαλικυλικό οξύ, και από ουσίες που προκαλούν την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), όπως το ζιζανιοκτόνο paraquat και η φυτοορμόνη αποκοπτικό οξύ (ABA). Το αποκοπτικό οξύ, το οποίο είναι γνωστό ότι συμμετέχει στην μεταβίβαση περιβαλλοντικών σημάτων στα φυτά, επάγει την έκφραση του ομόλογου γονιδίου της SBP και στο βρυόφυτο *Physcomytrella patens* [15].

Στο ρύζι, η SBP συμμετέχει στην απόκριση του φυτού σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις και όταν υπερεκφράζεται, τα φυτά αποκτούν ενισχυμένη ανθεκτικότητα σε διάφορα παθογόνα [16]. Επιπλέον, στο *A.thaliana* τα φυτά που υπερεκφράζουν το γονίδιο *Atsbp1* διαθέτουν ενισχυμένη ανθεκτικότητα σε αυξημένες συγκεντρώσεις σεληνίου [6] και υπεροξειδίου του υδρογόνου [17].

Η έκφραση του γονιδίου της AtSBP1 ρυθμίζεται θετικά σε συνθήκες έλλειψης θείου στο *A.thaliana* [18] και στα μονοκύτταρα πράσινα φύκη *Clamydomonas reihardtii* [19]. Στο *A.thaliana* η έλλειψη θείου προάγει την έκφραση του γονιδίου *sbp1* και τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) ρυθμίζουν την εκφρασή του γονιδίου *Atsbp1* σε συνθήκες έλλειψης θείου [17]. Επίσης, στα μεταλλάγματα του *A.thaliana cad2-1* που εμφανίζουν υπερευεσθησία σε αυξημένες συγκεντρώσεις καδμίου λόγω έλλειψης γλουταθειόνης και κατ'επέκταση φυτοχηλατινών (PCs) που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των φυτών σε αυξημένες συγκεντρώσεις καδμίου, η υπερέκφραση του γονιδίου *Atsbp1* οδηγεί σε εξάλειψη της υπερευαισθησίας των φυτών στο κάδμιο. [8].

1.1.4.2. Πιθανές βιολογικές λειτουργίες της SBP στα ζώα

Η ανάλυση των βιολογικών λειτουργιών της SBP στα ζώα υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη αυτή διαδραματίζει πολλαπλούς ρόλους. Μελέτες στα θηλαστικά έχουν δείξει ότι συμμετέχει στη τοξικότητα που προκαλείται από διάφορες ουσίες όπως η παρακεταμόλη [20] και οι περιβαλλοντικοί ρυπαντές. Οι μηχανισμοί με τους οποίους προκαλούνται οι τοξικές επιδράσεις από αυτές τις ουσίες δεν είναι

γνωστοί, όμως σε όλες τις περιπτώσεις προκαλούν την παραγωγή τοξικών ηλεκτρόφιλων και ενεργών μορφών οξυγόνου. Γι'αυτό το λόγο έχει προταθεί ότι η SBP συμμετέχει στην αποτοξίνωση τοξικών ηλεκτρόφιλων και ενεργών μορφών οξυγόνου [21].

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η SBP σχετίζεται με αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και ο ανασταλτικός της ρόλος έχει συσχετιστεί με την αντικαρκινική δράση του σεληνίου [22]. Επιπλέον, η SBP έχει ταυτοποιηθεί ανάμεσα στα προϊόντα που έχουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης και η έκφραση της hSBP έχει βρεθεί ότι μειώνεται σε διάφορους επιθηλιακούς καρκίνους [23-28]. Επιπλέον, χαμηλά επίπεδα έκφρασης της hSBP σε διάφορους καρκίνους έχουν σχετιστεί με φτωχή πρόγνωση [26-29]. Με βάση αυτές τις μελέτες, έχει προταθεί ότι η hSBP μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της εξέλιξης καρκίνου. Παρ'όλα αυτά η δράση της SBP στη διαδικασία της καρκινογένεσης και στη μετάσταση δεν έχει προσδιοριστεί. Επιπρόσθετα, η έκφραση της SBP ρυθμίζεται και σε άλλες ασθένειες των θηλαστικών όπως η σχιζοφρένεια [30].

1.1.5. Υποθέσεις για τις κυτταρικές λειτουργίες των πρωτεϊνών SBP

Στη βιβλιογραφία έχουν συζητηθεί πολλές υποθέσεις για τις κυτταρικές λειτουργίες της SBP. Έχει προταθεί ότι πιθανώς σχετίζεται με την απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση και τον έλεγχο του οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου του κυττάρου [31]. Η SBP εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, όμως οι *Porat et al.* [32] έδειξαν ότι ένα κλάσμα της SBP (10%) δεσμεύεται παροδικά στις μεμβράνες της συσκευής Golgi και σε μικρότερο βαθμό του ενδοπλασματικού δικτύου. Χρησιμοποιώντας μία δοκιμασία ανασύστασης της μεταφοράς πρωτεϊνών μεταξύ των δεξαμενών Golgi *in vitro* έδειξαν ότι η SBP προάγει τη μεταφορά πρωτεϊνών μεταξύ των δεξαμενών Golgi και πρότειναν ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της προσάραξης και της σύντηξης κυστιδίων [32]. Επιπλέον, στο *Lotus japonicus* πειράματα ανοσοεντοπισμού έδειξαν ότι η SBP εντοπίζεται σε περιοχές συσσώρευσης μεμβρανών, όπως το μολυσματικό νημάτιο και της περιβακτηριακή μεμβράνη των συμβιοσωμάτων [5].

1.1.6. Αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών SBP

Η SBP του ανθρώπου, hSBP, έχει εντοπιστεί στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα [33]. Μελέτη σε καρκινικές σειρές κυττάρων με πειράματα συνεργιστικής ανοσοκαθίζησης/ανοσοκατακρήμνισης και μεταφοράς ενέργειας φθορισμού με συντονισμό (FRET) έδειξαν ότι η hSBP αλληλεπιδρά με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 1 (GPX1) [34]. Ο *Fang* και οι συνεργάτες του [34] επιπλέον έδειξαν ότι υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση στην έκφραση των δύο πρωτεϊνών. Σε καρκινικές σειρές, αύξηση της επιπέδων έκφρασης της hSBP είχε αποτέλεσμα μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της GPX1 και υπερέκφραση της GPX1 είχε αποτέλεσμα αναστολή της μεταγραφής και της μετάφρασης του γονιδίου της hSBP. Επίσης, αυξανόμενη συγκέντρωση σεληνίου οδηγεί σε αυξανόμενα επίπεδα έκφρασης της GPX1 και αντίστοιχη μείωση της hSBP. Με αυξανόμενη παροχή σεληνίου σε μεταλλαγμένες καρκινικές σειρές κυττάρων που δεν εκφράζουν την GPX1 βρήκαν ότι η επίδραση αυτή εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης της GPX1, και όχι από κάποια άλλη συνέπεια ή λειτουργία του σεληνίου. Είναι πιθανό η μείωση των υπεροξειδίων που αναμένεται με αυξημένη δραστηριότητα της GPX1 να έχει αποτέλεσμα την μείωση της μεταγραφής της hSBP.

Σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη, πρόσφατα περιγράφηκε η αλληλεπίδραση της hSBP με το ένζυμο από-ουβικουϊτίνωσης που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη von Hippel–Lindau (pVHL), VDU1. Η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται από το σελήνιο, αφού η hSBP αλληλεπιδρά ειδικά με τον VDU1 όταν δεσμεύει σελήνιο. Αυτή η αλληλεπίδραση υποδεικνύει ότι η hSBP παίζει κάποιο ρόλο στην ρύθμιση της πρωτεόλυσης που μεσολαβείται από ουβικουϊτίνωση [4].

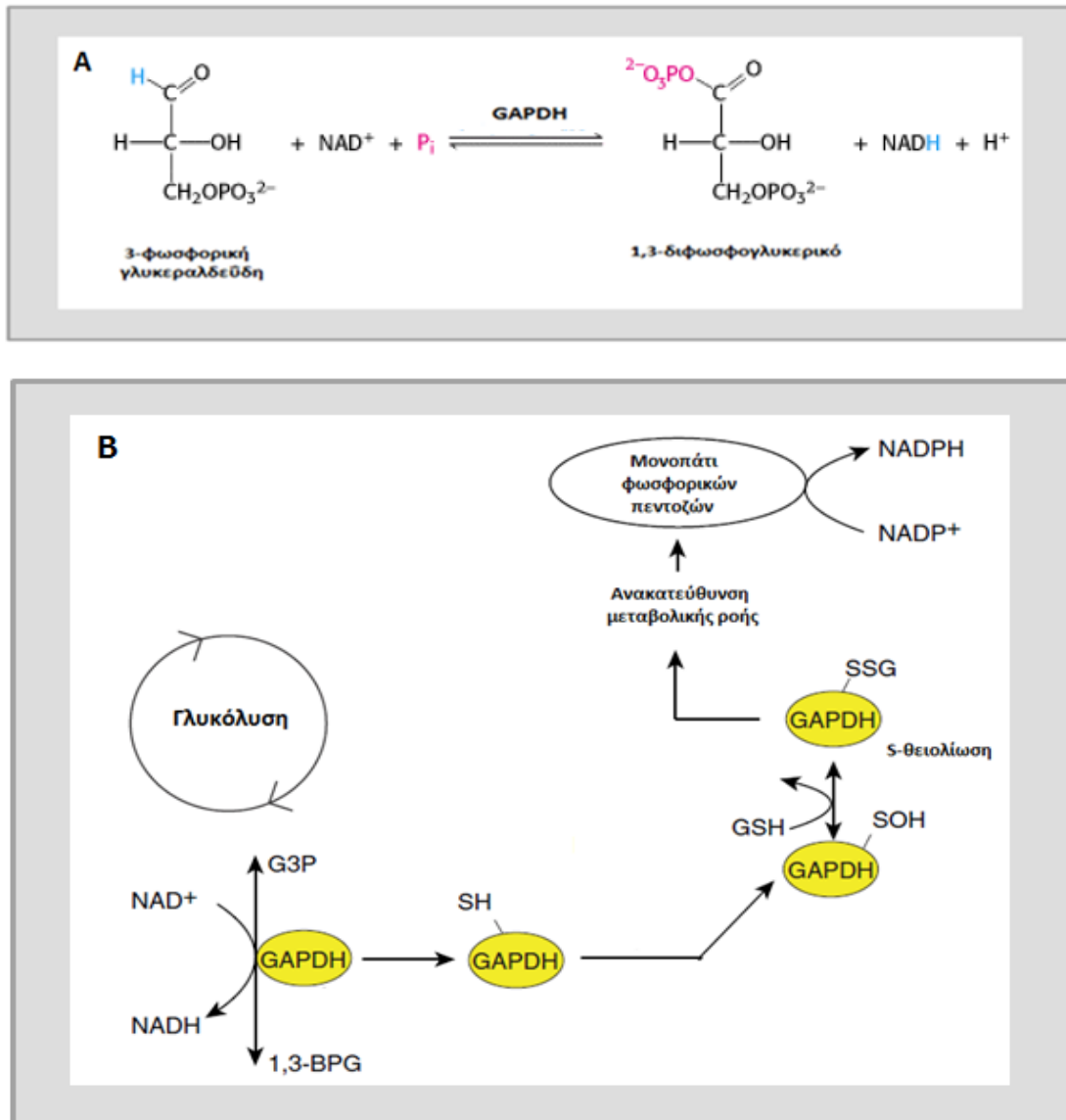
Στο φυτό *A.thaliana*, βρέθηκε ότι η AtSBP1 αλληλεπιδρά *in vitro* και *in vivo* με γλυκολυτικά ένζυμα, συγκεκριμένα με μία αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) και μία αλδολάση της 1,6-δισφωσφορικής φρουκτόζης (FBA). Η αλληλεπίδραση αυτή υποδεικνύει την ύπαρξη ενός βιοχημικού δικτύου που περιλαμβάνει πολυ-λειτουργικές πρωτεΐνες. Η GAPDH του *Escherichia coli* έχει την ικανότητα να δεσμεύει σελήνιο πιθανώς συζευγμένο με τη γλουταθειόνη [35]. Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ότι αυτές οι πρωτεΐνες μπορεί να συμμετέχουν στη ρύθμιση και το μεταβολισμό του σεληνίου στα κύτταρα [7].

1.1.6.1. Η αφυδρογονάσης της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) και ο ρόλος της σε συνθήκες καταπόνησης

Το γλυκολυτικό ένζυμο αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) μετατρέπει την 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη σε 1,3 διφωσφογλυκερικό, παρουσία NAD^+ και ανόργανου φωσφορικού, και διαμεσολαβεί τον σχηματισμό NADH και ATP (**ΕΙΚΟΝΑ 1.2**). Η GAPDH εκτός από το ρόλο της ως γλυκολυτική συστατική πρωτεΐνη του κυταροπλάσματος, οδηγείται και σε άλλα λειτουργικά μονοπάτια εκτός της γλυκόλυσης ύστερα από μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, S-θειολίωση και S-νιτροσουλίωσης. Αυτά περιλαμβάνουν την επιδιόρθωση του DNA [36], την εξαγωγή του tRNA από τον πυρήνα [37], τη μεταγραφική ρύθμιση [38] τη μεταφορά και σύντηξη κυστιδίων [39, 40], την οργάνωση του κυτταροσκελετού [41] και τον κυτταρικό θάνατο [42-45]. Εκτός από το κυτταρόπλασμα, όπου εντοπίζεται η GAPDH σε φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη αυτή ανιχνεύεται και σε άλλα διαμερίσματα του κυττάρου, όπως στον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια και τα κυστίδια. Όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε διάφορους παράγοντες καταπόνησης, πραγματοποιείται υποκυτταρική ανακατανομή της GAPDH. Οι πολυ-λειτουργικές ιδιότητες της GAPDH πιθανώς ρυθμίζονται, μέσω του ολιγομερισμού της, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και του υποκυτταρικού εντοπισμού της [46].

Η θειολική ομάδα της κυστεΐνης του καταλυτικού κέντρου της GAPDH τροποποιείται με S-θειολίωση σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης. Η απενεργοποίηση της GAPDH με S-θειολίωση είναι αναστρέψιμη, οπότε θα μπορούσε να επιτρέψει στην GAPDH να λειτουργεί ως διακόπτης που δίνει τη δυνατότητα στα κύτταρα να αλλάζουν μεταξύ μεταβολικών λειτουργιών και να διατηρούν το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο. Πράγματι, ο *Krobitsch* και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η οξειδωτική αναστολή των γλυκολυτικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένης της GAPDH, αποτελεί μία ελεγχόμενη απόκριση που δίνει τη δυνατότητα στα κύτταρα να ανακατευθύνουν το μεταβολισμό των υδρογονανθράκων από τη γλυκόλυση στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών, όπου παράγεται NADPH, το οποίο αποτελεί την αναγωγική δύναμη των κυττάρων για να προστατευτούν από την οξειδωτική καταπόνηση [47] (**ΕΙΚΟΝΑ 1.2**). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι με αυτό το κατάλοιπο

κυστεΐνης, η GAPDH μπορεί να ρυθμίζει σηματοδοτικά κυτταρικά μονοπάτια σε απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση [48, 49].



ΕΙΚΟΝΑ 1.2. Α,Β) Το γλυκολυτικό ένζυμο αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) καταλύει την αναστρέψιμη μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (G3P) σε 1,3 διφωσφογλυκερικό (1,3-BPG), ανάγωντας το NAD⁺ σε NADH. **Β)** Διαφορετικές μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις της GAPDH καθορίζουν μερικές μη-γλυκολυτικές λειτουργίες της. Σε συνθήκες κυτταρικής οξειδωτικής καταπόνησης, η θειολική ομάδα της κυστεΐνης του καταλυτικού κέντρου της GAPDH τροποποιείται με αναστρέψιμη S-θειολίωση (-SSG), μηχανισμός με τον οποίο το γλυκολυτικό ένζυμο προστατεύεται από μη αναστρέψιμη οξειδωτική απενεργοποίηση και έχει συνέπεια την ανακατεύθυνση της μεταβολικής ροής από το μονοπάτι της γλυκόλυσης σε αυτό των φωσφορικών πεντοζών για να διατηρηθεί μία βέλτιστη αναλογία NADPH/NADP⁺ [46].

Η GAPDH ήταν από τα πρώτα γλυκολυτικά ένζυμα που βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με την τουμπουλίνη και την ακτίνη, διευκολύνοντας τον σχηματισμό δεσμίδων μικροσωλινίσκων και τον πολυμερισμό της ακτίνης, αντίστοιχα [50, 51]. Πολλές

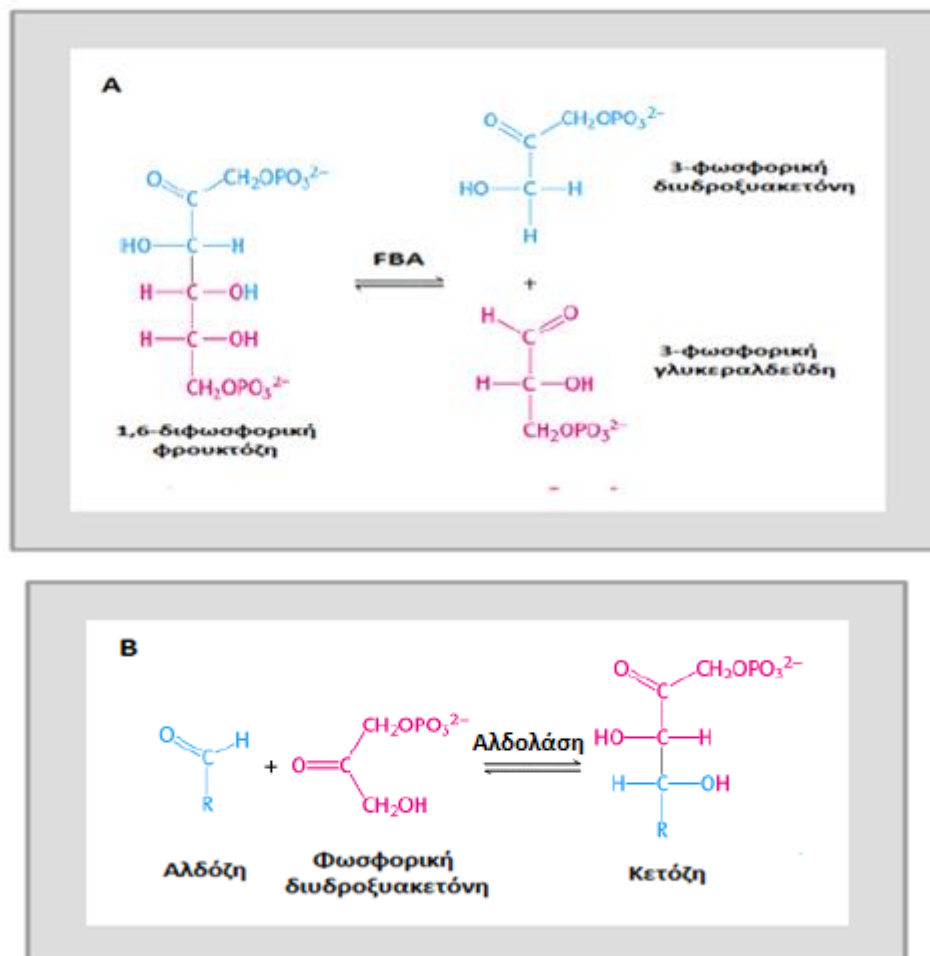
μελέτες από διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν υποδείξει τη συμμετοχή κάποιων ισομορφών της GAPDH στην μεταφορά και την σύντηξη μεμβρανών σε βιολογικά συστήματα [46]. Η GAPDH μετά από έκθεση σε παράγοντες καταπόνησης μέσω S-νιτροσουλώσεως από το μονοξειδίο του αζώτου μετατοπίζεται στον πυρήνα και συμμετέχει στον κυτταρικό θάνατο [52, 53]. Στον πυρήνα η GAPDH συμμετέχει επίσης στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [54], τη μεταγραφή του DNA [55], την προστασία των τελομερών και την επιδιόρθωση του DNA [56].

Τα φυτικά κύτταρα έχουν δύο ένζυμα GAPDH στο κυτταρόπλασμα, το ένα είναι η GAPC (phosphorylating GAPDH) που καταλύει τη μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (Ga3P) σε 1,3 διφωσφογλυκερικό και διαμεσολαβεί τον σχηματισμό NADH και ATP και το άλλο, η NP-GAPDH (non-phosphorylating GAPDH) καταλύει την οξείδωση της Ga3P σε 3-φωσφογλυκερικό (3-PGA) και παράγεται NADPH (αλλά όχι ATP) [57]. Έχει προταθεί ότι η NP-GAPDH μεταφέρει την Ga3P που παράγεται από τον κύκλο του Calvin στο κυτταρόπλασμα και παράγει NADPH μέσω της οξείδωσης της Ga3P [58, 59]. Ο ρόλος της σε μη φωτοσυνθετικούς ιστούς δεν έχει ξεκαθαριστεί.

1.1.6.2. Η αλδολάση της 1,6-δισφωσφορικής φρουκτόζης (FBA) και ο ρόλος της σε συνθήκες καταπόνησης

Η αλδολάση της 1,6-δισφωσφορικής φρουκτόζης (FBA) αποτελεί μεταβολικό ένζυμο κλειδί που καταλύει τη διάσπαση της 1,6-δισφωσφορικής φρουκτόζης σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και 3-φωσφορική διδροξυακετόνη και μία αναστρέψιμη αλδολική συμπύκνωση, και εμπλέκεται στα μονοπάτια της γλυκόλυσης, της γλυκονεογένεσης και των φωσφορικών πεντοζών στα φυτά. Οι FBAs στα φυτά αποτελούνται από δύο ισομορφές, τη χλωροπλαστική και την κυταροπλασματική [60]. Η χλωροπλαστική FBA αποτελεί ένα ένζυμο απαραίτητο στον κύκλο του Calvin, όπου μέσω των δραστηριοτήτων της παράγονται μεταβολίτες για τη βιοσύνθεση αμύλου [61], ενώ η κυταροπλασματική FBA αποτελεί μέρος του βιοσυνθετικού μονοπατιού της σουκρόζης, όπου καταλύει την αντίδραση παραγωγής 1,6-δισφωσφορικής φρουκτόζης. Επιπλέον, η κυταροπλασματική FBA αποτελεί ένζυμο κλειδί στα μονοπάτια της γλυκόλυσης και της γλυκονεογένεσης (ΕΙΚΟΝΑ 1.3).

Δεν υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με την απόκριση των γονιδίων FBA σε συνθήκες καταπόνησης. Πολλές αναφορές περιγράφουν τη συσσώρευση των πρωτεϊνών FBA στα φυτά σε απόκριση σε συνθήκες υψηλής αλατότητας [62], και υπερέκφραση μίας χλωροπλαστικής FBA στον καπνό βελτιώνει την ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες υψηλής αλατότητας [63, 64]. Στο βαμβάκι καταπονήσεις όπως η ξηρασία, η αυξημένη αλατότητα και το αποσκισικό οξύ (ABA) ενυσχύουν την συσσώρευση των μεταγράφων του γονιδίου της αλδολάσης της 1,6-δισφωφορικής φρουκτόζης, *GaAldp* [65].



ΕΙΚΟΝΑ 1.3. **A)** Η αλδολάση της 1,6-δισφωφορικής φρουκτόζης (FBA) καταλύει την αναστρέψιμη διάσπαση της 1,6-δισφωφορικής φρουκτόζης σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και 3-φωσφορική διυδροξυακετόνη και **B)** μία αναστρέψιμη αλδολική συμπύκνωση μεταξύ της φωσφορικής διυδροξυακετόνης και μίας αλδεΐδης (αλδόζη). Αυτό το ένζυμο είναι πολύ εξειδικευμένο για την φωσφορική διυδροξυακετόνη, αλλά χρησιμοποιεί ποικιλία αλδεϊδών.

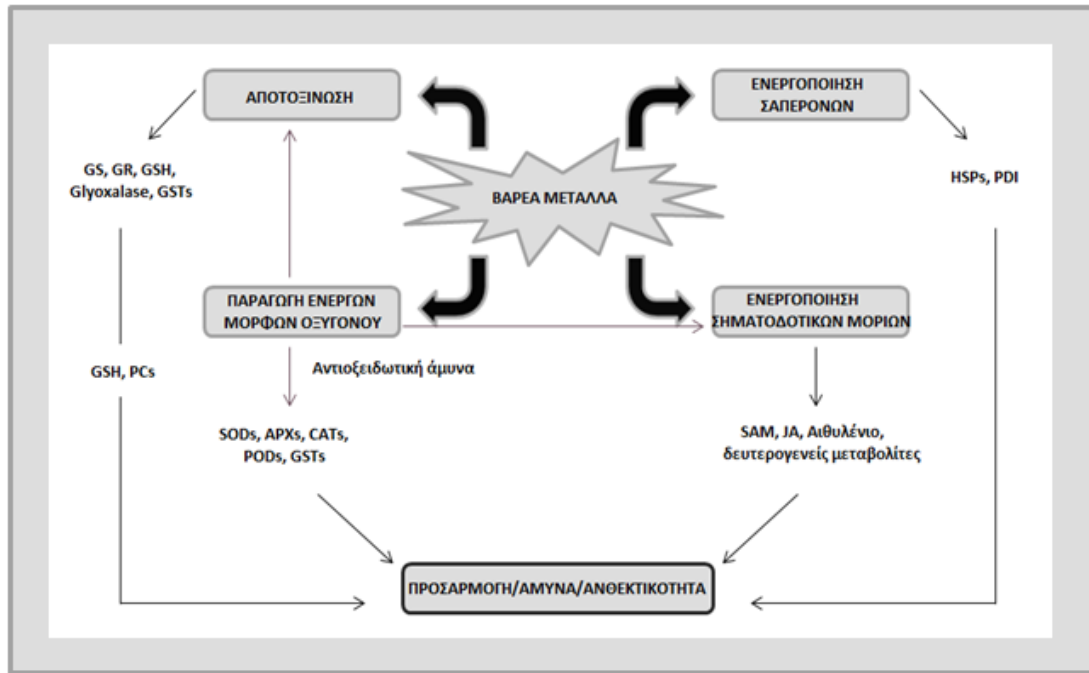
1.2. Η απόκριση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα

Στις μέρες μας, η μόλυνση των εδαφών από βαρέα μέταλλα και μεταλλοειδή αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα. Στα εδάφη τα επίπεδα τοξικότητας από βαρέα μέταλλα, όπως το αλουμίνιο, το κάδμιο, ο χαλκός, το χρώμιο κ.α. αυξάνονται συνεχώς ως αποτέλεσμα των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων καθώς επίσης και λόγω της γεωχημικής διάβρωσης των πετρωμάτων και άλλων περιβαλλοντικών αιτιών όπως, οι εκρήξεις ηφαιστειών και η όξινη βροχή. Αυτά προκαλούν την μόλυνση των υδάτων και των αρδευτικών εδαφών και έχει αναφερθεί ότι η ετήσια τοξικότητα όλης αυτής της κινητικότητας των μετάλλων ξεπερνάει τη συνολική τοξικότητα των ραδιενεργών και οργανικών αποβλήτων που παράγονται ετησίως από όλες τις πηγές [66].

Η ταυτοποίηση των λειτουργικών γονιδίων ή πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης που προκαλούνται από βαρέα μέταλλα αποτελεί βασικό βήμα για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών των αποκρίσεων των φυτών σε καταπονήσεις και για την ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών που έχουν ενισχυμένη ανθεκτικότητα σε συνθήκες καταπόνησης που προκαλούνται από βαρέα μέταλλα ή φυτά που έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιηθούν στην φυτοεξυγίανση [66].

1.2.1. Γενικό μοτίβο των πρωτεϊνών που ρυθμίζονται σε συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα

Με βάση τη βιβλιογραφία έχει διαμορφωθεί ένα γενικό μοτίβο των αμυντικών μηχανισμών που επάγονται σε απόκριση στην καταπόνηση από βαρέα μέταλλα. (ΕΙΚΟΝΑ 1.4). Τα επίπεδα έκφρασης των σαπερονών και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το ιασμονικό οξύ, αυξάνονται. Επιπλέον, τα βαρέα μέταλλα προκαλούν αλλαγές στο πρωτογενή μεταβολισμό, όπως αναστολή της φωτοσύνθεσης και μείωση της χλωροφύλλης, που πιθανότατα προκαλείται από την αρνητική ρύθμιση του ενζύμου καρβοξυλάση της διφωσφορικής ριβουλόζης (RuBisCO) και άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην φωτοσύνθεση. Επιπλέον, επηρεάζεται ο ενεργειακός μεταβολισμός.



ΕΙΚΟΝΑ 1.4. Γενικό μοτίβο των αμυντικών μηχανισμών που προκαλούνται από ιόντα βαρέων μετάλλων στα φυτικά κύτταρα. Μετά την είσοδο τους στα κύτταρα μέσω παθητικής ή ενεργής μεταφοράς, τα βαρέα μέταλλα παράγουν ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) και ενεργοποιούν μηχανισμούς αποτοξίνωσης, σηματοδοτικά μόρια και σαπερόνες, που τελικά οδηγούν σε ενισχυμένο επίπεδο ανθεκτικότητας στην καταπόνηση. GR, αναγωγάση της γλουταθειόνης GS, Γλουταμινική συνθετάση GSH, γλουταθειόνη, PCs, φυτοχηλατίνες GSTs, τρανσφεράσες της γλουταθειόνης APXs, Υπεροξειδάσες του ασκορβικού οξέως CATs, καταλάσες PODs, υπεροξειδάσες SODs, υπεροξειδικές δισμουτάσες JA, Ιασμονικό οξύ SAM, S-αδενοσυλομεθειονίνη HSPs, πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης PDI, ισομεράση των δισουλφιδίων των πρωτεϊνών.

Σε βιοχημικό επίπεδο, παρατηρήθηκε διαταραχή των καταβολικών μονοπατιών που έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή ATP και αλλαγές στις ποσότητες των ενδιάμεσων μεταβολιτών [67]. Για να διατηρηθεί η ομοιόσταση ή τουλάχιστον να προστατευθούν τα κύτταρα, ενεργοποιούνται μηχανισμοί που απαιτούν ενέργεια. Για να ανταποκριθούν στην αυξημένη απαίτηση για ATP, NADH, NADPH και αναγωγικών μορίων, η αφθονία πολλών ενζύμων που εμπλέκονται στην παροχή ενέργειας (γλυκόλυση, πορεία των φωσφορικών πεντοζών, κύκλος κιτρικού οξέως, αποικοδόμηση του αμύλου) συνήθως αλλάζει όταν τα φυτά εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων [68-70]. Όμως είναι δύσκολο να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση τοξικών μετάλλων στον μεταβολισμό των φυτών. Τέλος, σημαντικές είναι οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα και σε διαδικασίες αποτοξίνωσης. Κάποιες από τις αλλαγές αυτές αναλύονται στην παράγραφο 1.3.2. Παρ'όλα αυτά,

δεν υπάρχει συγκεκριμένος μηχανισμός που να προσδίδει ανθεκτικότητα σε διαφορετικά μέταλλα, αλλά η ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένα μέταλλα περιλαμβάνει διακριτούς εξειδικευμένους μηχανισμούς για κάθε μέταλλο [71].

1.2.1.1. Η απόκριση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης από υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού (Cu)

Ο χαλκός αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τα φυτά, αλλά όταν βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο χώμα, μπορεί να αποτελέσει σημαντική τοξική ουσία για τα φυτικά κύτταρα λόγω των ανασταλτικών του επιδράσεων σε πολλές βιολογικές και βιοχημικές λειτουργίες [69, 72, 73]. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιήσει την πρωτεομική τεχνολογία για να ερευνήσουν πρωτεΐνες που αποκρίνονται στο χαλκό στα μονοκοτυλήδονα [73, 74] και στα δικοτυλήδονα [69, 75]. Ο Hajdich και οι συνεργάτες του [62] ήταν οι πρώτοι που μελέτησαν την απόκριση του πρωτεόματος των φύλλων του ρυζιού στην καταπόνηση λόγω έκθεσης σε χαλκό, και βρήκαν ότι επηρεάζονται περισσότερο οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση. Ωστόσο, σημαντική αύξηση στην αφθονία μερικών αντιοξειδωτικών μορίων και πρωτεϊνών που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών υποδεικνύει ότι αυτά μπορεί να εμπλέκονται στην απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από το χαλκό. Υπάρχουν στοιχεία ότι οι μεταλλοθειονίνες (MTs) εμπλέκονται στην απόκριση των φυτών στο χαλκό [76], αλλά δεν έχει ξεκαθαριστεί ο ρόλος των φυτοχηλατινών (PCs) στην αποτοξίνωση του χαλκού [77]. Σε βλαστώντα σπέρματα ρυζιού εκτός από τις αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες, αύξηση παρατηρήθηκε στις αποθηκευτικές πρωτεΐνες του σπέρματος, ενώ μείωση παρατηρήθηκε σε κάποια ένζυμα της γλυκόλυσης, υποδεικνύοντας ότι η οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από τον χαλκό μπορεί να αναστέλλει κάποια γλυκολυτικά ένζυμα [78]. Ο Smith και οι συνεργάτες του [75] διεξήγαγαν μία συγκριτική πρωτεομική ανάλυση της απόκρισης των τρανσφερασών της γλουταθειόνης (GSTs) του *A.thaliana* στο χαλκό. Τέσσερις τρανσφεράσες της γλουταθειόνης έδειξαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης, υποδεικνύοντας ότι οι GSTs μπορεί να έχουν ειδικές λειτουργίες στην αποτοξίνωση του χαλκού στα φυτικά κύτταρα.

1.2.1.2. Η απόκριση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης από υψηλές συγκεντρώσεις χρωμίου (Cr)

Σε υψηλές συγκεντρώσεις το εξασθενές χρώμιο (Cr (VI)) μπορεί να έχει φυτοτοξικές επιδράσεις στην ανάπτυξη και τον μεταβολισμό του φυτού, οδηγώντας σε οξειδωτικές βλάβες των κυττάρων. Αντίθετα από άλλα μέταλλα το Cr δεν μπορεί να επάγει την παραγωγή φυτοχηλατινών (PCs) [79, 80]. Ο μεταβολισμός του Cr στα φυτικά κύτταρα δεν έχει κατανοηθεί. Ο *Labra* και οι συνεργάτες του [81] εφάρμοσαν πρωτεομική μελέτη για να μελετήσουν τα μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην καταπόνηση από χρώμιο σε βλαστώντα σπέρματα. Αρτίβλαστα αραβοσίτου εκτέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις διχρωμικού καλίου, και ανέλυσαν το πρωτεομικό μονοπάτι και την συγκέντρωση μεταλλοθειονινών (MT). Παρατήρησαν αύξηση στην αφθονία πολλών αντιοξειδωτικών, αποτοξινωτικών και γλυκολυτικών ενζύμων υποδεικνύοντας ότι σε συνθήκες καταπόνησης από χρώμιο ενεργοποιήθηκαν μηχανισμοί απόκρισης στην οξειδωτική καταπόνηση ταυτόχρονα με κάποια επίδραση στον μεταβολισμό των σακχάρων [80, 81]. Επιπλέον, αύξηση στην αφθονία του ενζύμου *glyoxalase 1* και των MTs μετά από έκθεση σε Cr υποδεικνύει ότι τα φυτά μπορεί να χρησιμοποιούν τα μονοπάτια της *glyoxalase* και των MTs για να αποτοξινώσουν το Cr ή τα τοξικά παραπροϊόντα που επάγονται από αυτό.

1.2.2. Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα και την αποτοξίνωση

Είναι ξεκάθαρο ότι η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων μεταλλικών ιόντων προκαλεί οξειδωτική καταπόνηση στα φυτά [72, 82]. Η έκφραση πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας ρυθμίζονται διαφορετικά κατά την απόκριση των φυτών σε τοξικές συγκεντρώσεις μετάλλων. Τα μέταλλα που συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις (redox-active) όπως ο χαλκός και ο σίδηρος, καταλύουν το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου μέσω αντιδράσεων τύπου Haber–Weiss ή Fenton και παράγουν ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), δημιουργώντας οξειδωτική καταπόνηση στα κύτταρα. Σημαντική αύξηση της έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας

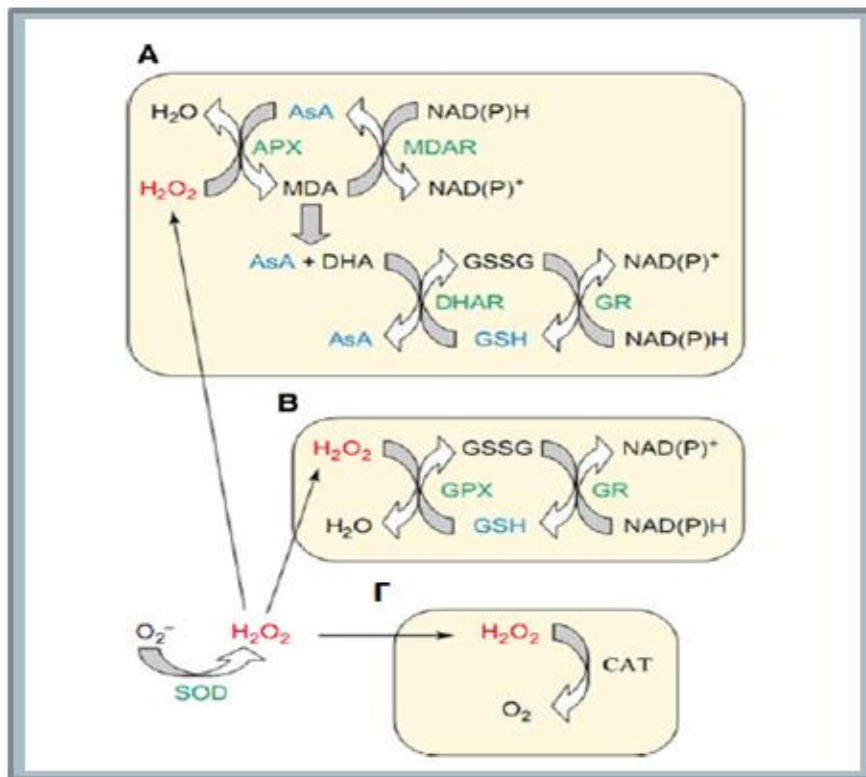
παρατηρήθηκε και κατά την απόκριση σε έκθεση των φυτών σε μέταλλα που δεν συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις (non-redox-active), πιθανώς λόγω της παραγωγής ROS. Δεν είναι ξεκάθαρος ο τρόπος με τον οποίο τα μέταλλα που δεν συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, όπως το κάδμιο (Cd) και το χρώμιο (Cr) προκαλούν την παραγωγή ROS στα φυτά. Οι ROS είναι δυνητικά βλαβερές για τα κύτταρα, καθώς μπορούν να οδηγήσουν σε μη ειδική οξείδωση πρωτεϊνών και μεμβρανικών λιπιδίων ή να προκαλέσουν βλάβες στο DNA [82].

Κοινή συνέπεια των περισσότερων βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων είναι η αυξημένη παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) [83]. Τα τελευταία χρόνια έχει διαμορφωθεί η άποψη ότι οι ενεργές μορφές οξυγόνου παίζουν σημαντικό ρόλο στο αμυντικό σύστημα των φυτών ενάντια στα παθογόνα (οξειδωτική έκρηξη, [84-86]), και σηματοδοτούν αναπτυξιακά στάδια και άλλες διαδικασίες όπως ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, όπου δρουν ως ενδιάμεσα σηματοδοτικά μόρια για τη ρύθμιση των γονιδιακής έκφρασης [87, 88]. Λόγω αυτών των πολλαπλών λειτουργιών είναι αναγκαίο τα κύτταρα να ρυθμίζουν τα επίπεδα των ενεργών μορίων οξυγόνου, αλλά όχι να τα περιορίσουν πλήρως [89].

Ο έλεγχος των οξειδωτικών επιπέδων επιτυγχάνεται μέσω αντιοξειδωτικών ενζύμων. Αυτά τα συστήματα άμυνας αποτελούνται από μεταβολίτες όπως το ασκορβικό, η γλουταθειόνη, η τοκοφερόλη κ.α. και ενζυμικούς απενεργοποιητές των ενεργών μορίων οξυγόνου, όπως οι υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), οι υπεροξειδάσες (POD), οι καταλάσες (CAT) [90, 91] και ένζυμα του κύκλου του γλουταθειόνης-ασκορβικού. Αυτά φαίνεται να αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας της οξειδωτικής καταπόνησης που προκαλείται από μέταλλα (**EIKONA 1.5**) [66].

Πολλές πρωτεομικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της γλουταθειόνης ή στον κύκλο της γλουταθειόνης, όπως τα ένζυμα συνθετάση της κυστεΐνης (CS), συνθετάση της γ- γλουταμιλκυστεΐνης (γ-GCS), αναγωγή του μονοδεϋδροασκορβικού (MDHAR), αναγωγή της αφυδροασκορβάσης (DHAR), glyceraldehyde 1, οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPXs), και οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) εκφράζονται διαφορετικά κάτω από συνθήκες καταπόνησης από μέταλλα [70, 73, 92, 93]. Αυτά τα ένζυμα

μπορούν να θεωρηθούν η δεύτερη γραμμή αντιοξειδωτικής άμυνας (ΕΙΚΟΝΑ 1.5) [66].



ΕΙΚΟΝΑ 1.5. Βιοχημικά μονοπάτια της αντιοξειδωτικής άμυνας απενεργοποίησης του H_2O_2 στα φυτά. **A)** Ο κύκλος γλουταθειόνης- ασκορβικού, **B)** Ο κύκλος της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX), **Γ)** Καταλάση (CAT). Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας, μετατρέποντας το O_2^- σε H_2O_2 . Στη συνέχεια η υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέως (APX), η GPX και η CAT αποτοξινώνουν το H_2O_2 . Σε αντίθεση με τις CATs, οι APXs και οι GPXs απαιτούν ασκορβικό οξύ (AsA) και γλουταθειόνη (GSH), αντίστοιχα. MDHAR, αναγωγή του μονοδεϋδροασκορβικού DHAR, αναγωγή της αφυδροασκορβάσης GSSG, οξειδωμένη γλουταθειόνη, GSH, ανηγμένη γλουταθειόνη MDA, μαλονδιαλδεϋδη MHA, δεϋδροασκορβικό οξύ, NADH, ανηγμένο δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδιου-αδενίνης NADPH, ανηγμένο φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδιου-αδενίνης [94].

1.2.2.1. Ο ρόλος της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης κατά την απόκριση σε καταπονήσεις στα φυτά

Είναι κοινά αποδεκτό ότι οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPXs) εμπλέκονται στην απενεργοποίηση ελεύθερων ριζών στα ζώα [95]. Η οικογένεια των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης χωρίζεται σε πέντε κλάσεις με βάση τις αμινοξικές τους αλληλουχίες, την εξειδίκευση του υποστρώματος και τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους. Οι GPXs καταλύουν την αναγωγή του υπεροξειδίου

του υδρογόνου (H_2O_2), των οργανικών υπεροξειδίων και των υπεροξειδίων των λιπιδίων χρησιμοποιώντας την γλουταθειόνη και άλλους αναγωγικούς παράγοντες (ΕΙΚΟΝΑ 1.5). Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι οι GPXs αλληλεπιδρούν εξειδικευμένα με άλλες πρωτεΐνες για να προκαλέσουν οξείδωση από υπεροξείδια. Ο *Delaunay* και οι συνεργάτες του [96] έδειξαν ότι μία υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης, η GPX3, σχηματίζει σύμπλοκο με τον μεταγραφικό παράγοντα Yarp1 ο οποίος ρυθμίζει την ομοιόσταση των υπεροξειδίων του υδρογόνου στον *Saccharomyces cerevisiae*. Όταν η συγκέντρωση των υπεροξειδίων του υδρογόνου αυξάνεται, ο Yarp1 δεν οξειδώνεται απ' ευθείας από το υπεροξείδιο του υδρογόνου αλλά αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με την GPX3 που προκαλεί την οξείδωσή του. Η GPX3 αποτελεί τον αισθητήρα και τον μεταγωγέα του σήματος στον Yarp1 [96].

Μέχρι πρόσφατα λίγες μελέτες στα φυτά έδειχναν την ύπαρξη παρόμοιας ενζυμικής δραστηριότητας των GPXs των φυτών με αυτή των ζώων [97, 98]. Πολλά cDNAs των GPXs των φυτών παρουσιάζουν ομοιότητα αλληλουχίας με αυτές των GPX των ζώων. Οι περισσότερες φυτικές GPX έχουν πρωτοταγή δομή παρόμοια με αυτή των ζωικών υπεροξειδασών της γλουταθειόνης των φωσφολιπιδίων (PHGPX), που θεωρούνται η κύρια ενζυμική άμυνα ενάντια στην οξειδωτική καταστροφή των μεμβρανών. Όμως, οι GPXs των φυτών έχουν μειωμένες ενεργότητες σε σχέση με αυτές των ζώων επειδή περιέχουν κυστεΐνη στο καταλυτικό τους κέντρο αντί για την σεληνοκυστεΐνη των ζωικών GPXs [97, 98].

Η οικογένεια AtGPX του *A.thaliana* αποτελείται από επτά μέλη, που ανιχνεύονται στο κυτταρόπλασμα, στους χλωροπλάστες, στα μιτοχόνδρια, στα υποροξεισώματα και τον αποπλάστη. Αυτά τα γονίδια εκφράζονται σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης του φυτού και ρυθμίζονται κατά την ανάπτυξη του φυτού. Κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, τοξικές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων και φυτικών ορμονών [99] ρυθμίζεται η έκφραση διαφορετικών μελών της οικογένειας AtGPX. Όπως και στον *S. cerevisiae* η AtGPX3 κατέχει διπλό ρόλο, ο πρώτος στον γενικό έλεγχο της ομοιόστασης του H_2O_2 και ο δεύτερος στην σύνδεση του ABA με το H_2O_2 που σηματοδοτεί το κλείσιμο των στομάτων, οπότε ρυθμίζει την διαπνοή του φυτού. Αυτό υποδεικνύει ότι μπορεί να υπάρχει ένας συντηρημένος μηχανισμός στα φυτά παρόμοιος με αυτόν της ζύμης

[96], μέσω του οποίου το ABA και το H_2O_2 ρυθμίζουν την μεταγραφή γονιδίων μέσω της αντίληψης του H_2O_2 από την GPX3 [100].

1.2.2.2.. Ο ρόλος της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης κατά την απόκριση σε καταπονήσεις στα φυτά

Τα φυτά έχουν την ικανότητα να αποτοξινώνουν ενδογενείς τοξίνες, δευτερογενείς μεταβολίτες, αποικοδομημένα προϊόντα που προκύπτουν από την οξειδωτική καταπόνηση και εξωγενή χημικά ή ζιζανιοκτόνα, χρησιμοποιώντας ένα σύστημα αποτοξίνωσης τριών φάσεων [101]. Στην πρώτη φάση, αποτοξινωτικά ένζυμα, όπως η μονοοξυγενάση του κυτόχρωματος P450, καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης, αναγωγής ή υδρόλυσης εκθέτοντας ή εισάγοντας μία λειτουργική ομάδα στο μόριο στόχο. Στη δεύτερη φάση, η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) καταλύει την σύζευξη αυτών των μεταβολιτών με το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη (GSH). Στην τρίτη φάση, μόρια που συνδέονται με την GSH αναγνωρίζονται από ATP-εξαρτώμενους διαμεμβρανικούς μεταφορείς του τονοπλάστη ή της πλασματικής μεμβράνης, καθιστώντας ικανή την μεταφορά των συζευγμένων μορίων στο χυμοτόπιο ή στον αποπλάστη [102]. Η θεμελιώδης λειτουργία των GSTs είναι η αποτοξίνωση ενδογενών και ξеноβιοτικών ενώσεων [103]. Εκτός από τον σχηματισμό ενώσεων συζευγμένων με τη γλουταθειόνη, οι GSTs καταλύουν επίσης αντιδράσεις ισομερίωσης και δρουν ως υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης ανάγωντας υπεροξειδία των λιπαρών οξέων, προστατεύοντας τα κύτταρα από την τοξικότητα του οξυγόνου.

Οι GSTs των φυτών έχουν καλά χαρακτηρισμένους ρόλους στην αποτοξίνωση και ανθεκτικότητα των καλλιεργούμενων φυτών στα ζιζανιοκτόνα [104]. Οι GSTs εκφράζονται διαφορετικά σε απόκριση σε πολλές μορφές βιοτικής και αβιοτικής καταπόνησης, υποδεικνύοντας διαφορετικές λειτουργίες στον ενδογενή μεταβολισμό. Εξειδικευμένες φυτικές GSTs επάγονται σε απόκριση στο όζον, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, τη γλουταθειόνη, βιοτικούς διεγέρτες, ορμόνες, βαρέα μέταλλα, σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης, αφυδάτωσης κ.α. [103]. Παρά τον θεμελιώδη ρόλο τους στη φυσιολογία σε συνθήκες καταπόνησης, λίγα είναι γνωστά για τις εξειδικευμένες λειτουργίες τους και τα προτιμώμενα υποστρώματα τους.

Διαφορετική ρύθμιση των πρωτεϊνών της οικογένειας των GST έχει παρατηρηθεί σε όλες σχεδόν τις πρωτομικές αναλύσεις που σχετίζονται με την έκθεση των φυτών σε βαρέα μέταλλα. Φαίνεται ότι συμμετέχουν στην απόκριση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα και διαφορετικές πρωτεΐνες GST είναι εξειδικευμένες για συγκεκριμένα χημικά ή μέταλλα και έχουν ειδικές λειτουργίες στην αποτοξίνωση συγκεκριμένων υποστρωμάτων [66].

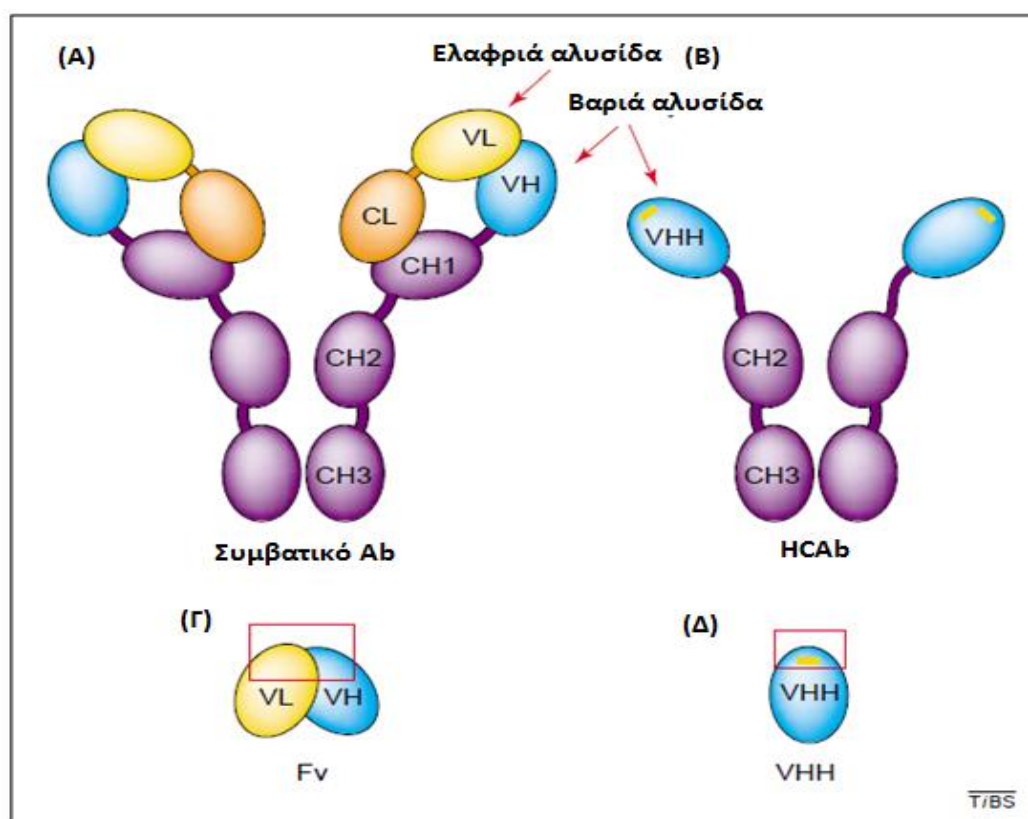
1.3. Τα αντισώματα βαριάς αλυσίδας των Καμηλίδων

Οι Καμηλίδες (*Camelids*) [105] και κάποια είδη καρχαριών [106] διαθέτουν εκτός από τα συμβατικά αντισώματα και ένα δομικά διαφορετικό ρεπερτόριο αντισωμάτων, το οποίο αποτελείται από μόνο δύο πανομοιότυπες πολυπεπτιδικές αλυσίδες που μοιάζουν με τις βαριές αλυσίδες των συμβατικών αντισωμάτων. Τα αντισώματα αυτά ονομάζονται αντισώματα βαριάς αλυσίδας (HCAs, Heavy chain antibodies) (**ΕΙΚΟΝΑ 1.6**).

Τα είδη *Lama glama*, δρομάδες καμήλες (*dromedaries*) και καμήλες (*camels*) μέλη της οικογένειας *Camelidae* αποτελούν τα μόνα είδη της υποκλάσης *Tylorodia* που διαθέτουν αντισώματα βαριάς αλυσίδας. Τα HCAs δεν απαντώνται σε συγγενείς ταξινομικές υποκλάσεις, όπως η *Ruminantia* (καμηλοπάρδαλη, πρόβατο) της κλάσης *Artiodactyla*, στην οποία ανήκουν τα *Tylorodia*. Αυτό δείχνει ότι τα αντισώματα βαριάς αλυσίδας έχουν εξελιχθεί σχετικά πρόσφατα (16-19 εκατομμύρια χρόνια πριν) [107]. Τα αντισώματα βαριάς αλυσίδας των Καμηλίδων έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα από αυτά των καρχαριών και δεν αποτελούν κατάλοιπο της εξέλιξης αλλά έχουν προκύψει από τα συμβατικά αντισώματα [108].

Οι βαριές αλυσίδες των HCAs έχουν έλλειψη της πρώτης σταθερής λειτουργικής περιοχής (domain) (CH1), λόγω μίας μεταλλαγής στην περιοχή ματίσματος των γονίδιων που κωδικοποιούν την CH1 των Καμηλίδων [108]. Οι δύο εναπομείνουσες σταθερές λειτουργικές περιοχές (περιοχή Fc) συνδέονται με την μεταβλητή λειτουργική περιοχή μέσω ενός εύκαμπτου συνδέτη (hinge). Η μεταβλητή περιοχή, λόγω της έλλειψης της ελαφριάς αλυσίδας, αποτελεί την μόνη λειτουργική περιοχή που ευθύνεται για τη δέσμευση στο αντιγόνο. Αυτή η μεταβλητή λειτουργική

περιοχή της βαριάς αλυσίδας των αντισωμάτων βαριάς αλυσίδας ονομάζεται VHH (variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody) (ΕΙΚΟΝΑ 1.6).[109].

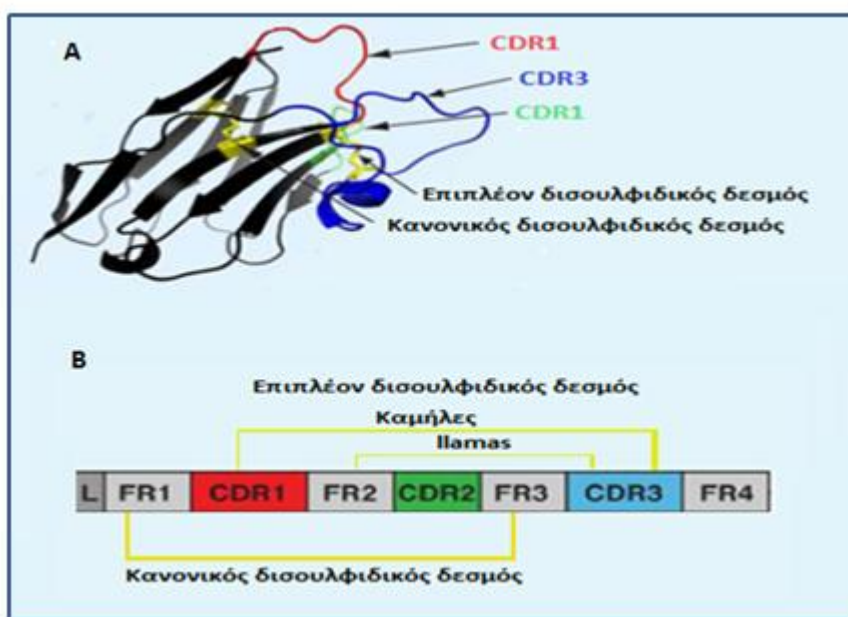


ΕΙΚΟΝΑ 1.6. Σχηματική αναπαράσταση (Α) συμβατικού αντισώματος, (Β) αντισώματος βαριάς αλυσίδας των Καμηλίδων και (Γ και Δ) τα αντίστοιχα θραύσματα δέσμησης με το αντιγόνο. Η περιοχή δέσμησης του αντιγόνου του ζεύγους VH–VL και του VHH επισημαίνεται με τα κόκκινα κουτιά. Οι κίτρινες γραμμές στο Β και το Δ δείχνουν τον επιπλέον δισουλφιδικό δεσμό που συνήθως υπάρχει στα VHH. Συντομεύσεις: Ab, αντίσωμα, CH1–3, πρώτη, δεύτερη και τρίτη σταθερή λειτουργική περιοχή της βαριάς αλυσίδας, CL, σταθερή λειτουργική περιοχή ελαφριάς αλυσίδας, Fv, μεταβλητό θραύσμα, VH, μεταβλητή λειτουργική περιοχή της βαριάς αλυσίδας, VHH, μεταβλητή λειτουργική περιοχή της βαριάς αλυσίδας των αντισωμάτων βαριάς αλυσίδας, VL, μεταβλητή λειτουργική περιοχή της ελαφριάς αλυσίδας [109].

1.3.1. Ιδιότητες των θραυσμάτων αντισωμάτων VHH

Οι λειτουργικές περιοχές VHH αποτελούν τις μικρότερες λειτουργικές περιοχές δέσμησης που υπάρχουν στη φύση. Η λειτουργική περιοχή VHH των HCAs των *Llama* μεταγράφεται από ένα ξεχωριστό σύνολο γονιδίων [110] και τα VHHs έχουν μοναδικές ιδιότητες σε σύγκριση με τις μεταβλητές λειτουργικές περιοχές των βαριών αλυσίδων των συμβατικών αντισωμάτων (VHs) [111]. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και η διασαφήνιση της κρυσταλλικής δομής των

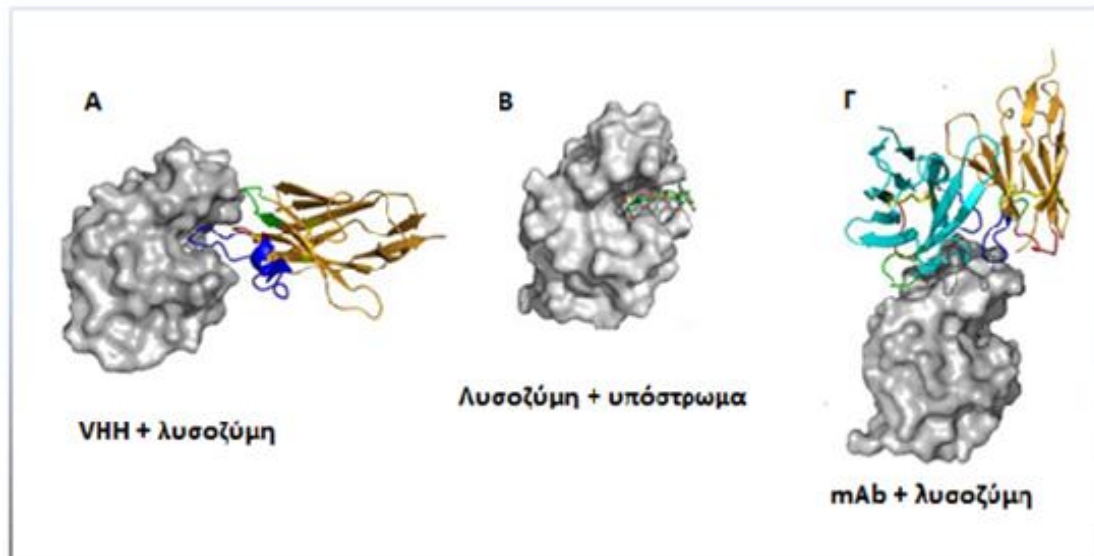
λειτουργικών περιοχών VHH έχουν αποκαλύψει αρκετά από τα δομικά χαρακτηριστικά τους. Παρομοίως με τις λειτουργικές περιοχές VH, οι VHHs περιέχουν τέσσερις περιοχές πλαισίου (FRs) που διαμορφώνουν τον δομικό πυρήνα της λειτουργικής δομής της ανοσοσφαιρίνης και τρεις περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας (CDRs) που εμπλέκονται στη δέσμευση με το αντιγόνο (**ΕΙΚΟΝΑ 1.8**) [112]. Οι περιοχές πλαισίου των VHH παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα αλληλουχίας (πάνω από 80%) με τις λειτουργικές περιοχές VH των ανθρώπινων αντισωμάτων. [109, 113]. Οι VHHs εκφράζονται από ένα μεγάλο υποσύνολο εξειδικευμένων γονιδίων που περιέχουν μία μεγαλύτερη περιοχή CDR3 και περισσότερα κατάλοιπα που εμπλέκονται στην δέσμευση με το αντιγόνο. Η εκτεταμένη CDR3 συχνά, αλλά όχι πάντα, σταθεροποιείται από έναν επιπλέον δισουλφιδικό δεσμό που συνδέει την CDR3 με την παρακείμενη θηλιά CDR1 ή την CDR2 (**ΕΙΚΟΝΑ 1.8**).



Εικόνα 1.8. Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργικής περιοχής VHH ενός αντισώματος βαριάς αλυσίδας καμηλίδας. **A)** Οι τρεις περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας (CDRs) του παρατόπου δέσμευσης με το αντιγόνο επισημαίνονται ως χρωματιστές θηλιές: CDR1 κόκκινο, CDR2 πράσινο, CDR3 μπλέ **B)** Οι κανονικοί δισουλφιδικοί δεσμοί συνδέουν τις περιοχές πλαισίου 1 με την 3 (FR1 και FR3) στις δύο β-πτυχωτές επιφάνειες της λειτουργικής περιοχής της ανοσοσφαιρίνης επισημαίνονται με κίτρινο. Πολλά αντισώματα των Καμηλίδων περιέχουν έναν επιπλέον δισουλφιδικό δεσμό που συνδέει την CDR3 με το τέλος της CDR1 (Καμήλες) ή την αρχή της CDR2 (Ιλαμας).

Το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα των VHHs αποτελεί η παρουσία υποκαταστάσεων αμινοξέων σε τέσσερις θέσεις της περιοχής FR2. Τέσσερα κατάλοιπα, Val37, Gly44, Leu45 και Trp47 (αρίθμηση Kabat [114]), είναι πολύ συντηρημένα στα VHs. Αυτά τα κατάλοιπα βρίσκονται στην υδρόφοβη περιοχή που αλληλεπιδρά με τη μεταβλητή περιοχή της ελαφριάς αλυσίδας (VL) και στα VHHs είναι υποκατεστημένα σε Phe/Tyr37, Glu44, Arg45 και Phe/Leu/Gly47 [109]. Αυτές οι υποκαταστάσεις καθιστούν την επιφάνεια αλληλεπίδρασης πιο υδρόφιλη και κατ'επέκταση τα VHH πιο διαλυτά και υποδεικνύουν την προσαρμογή των VHH ως λειτουργικές περιοχές μονής αλυσίδας, μία προσαρμογή απαραίτητη για την αντιστάθμιση της απώλειας της σταθερότητας που προκαλείται από την έλλειψη της VL.

Η ποικιλία των VHHs ενισχύεται λόγω κάποιων χαρακτηριστικών που αντισταθμίζουν την έλλειψη της λειτουργικής περιοχής VL. Λόγω της μεγαλύτερης CDR3, οι VHH έχουν ενισχυμένο ρεπερτόριο δέσμησης καθώς επίσης και μεγαλύτερη δομική πολυπλοκότητα, που οδηγεί σε μεγαλύτερη ικανότητα δέσμησης διαφορετικών αντιγόνων. Η CDR3 των VHH έχει αναφερθεί ότι διεισδύει στην εσοχή του ενεργού κέντρου ενζύμων [115], σχηματίζει κοιλότητες για δέσμηση με απτένια [116] και δείχνει πλευρική αναγνώριση του αντιγόνου συγκρίσιμη με αυτή των συμβατικών αντισωμάτων [117]. Η περιοχή CDR3 των hcAbs κατέχει την εντυπωσιακή ικανότητα να σχηματίζει δομές που διεισδύουν σε κοιλότητες των αντιγόνων. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι η CDR3 θραυσμάτων αντισωμάτων VHH (sdAb, single domain antibody) διεισδύει στη σχισμή των ενεργών κέντρων ενζύμων [115]. Η **EIKONA 1.7α** δείχνει αυτή τη μοναδική αλληλεπίδραση αντιγόνου–αντισώματος με βάση την κρυσταλλική δομή της λυσοζύμης, που προέρχεται από αυγό όρνιθας, σε σύμπλοκο με ένα sdAb που προέρχεται από καμήλα. Η περιοχή CDR3 αυτών των αντισωμάτων είναι ικανή να σχηματίζει κυρτές προεξοχές που καταλαμβάνουν τη σχισμή του υποστρώματος (**EIKONA 1.7β**). Αντιθέτως, το θραύσμα Fab που προέρχεται από συμβατικό μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού δεσμεύεται με μία σχετικά επίπεδη περιοχή αλληλεπίδρασης, εκτός του ενεργού κέντρου (**EIKONA 1.7γ**) [118, 119].



ΕΙΚΟΝΑ 1.7. Τρισδιάστατες δομές θραυσμάτων αντισωμάτων σε σύμπλοκο με τη λυσοζύμη όρνιθας. Οι περιοχές CDR επισημαίνονται με χρώματα, CDR1 κόκκινο, CDR2 πράσινο, CDR3 μπλέ και οι δισουλφιδικοί δεσμοί με κίτρινο. **Α)** Λυσοζύμη όρνιθας σε σύμπλοκο με ένα VHH-αναστολέα που προέρχεται από Καμήλα. Η CDR3 διεισδύει στο ενεργό κέντρο του ενζύμου [118]. **Β)** Λυσοζύμη όρνιθας σε σύμπλοκο με το υπόστρωμά της [120]. **Γ)** Λυσοζύμη όρνιθας σε σύμπλοκο με τις περιοχές δέσμευσης του αντιγόνου του ζεύγους VH–VL ενός συμβατικού μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού (mAb). Η επίπεδη περιοχή αλληλεπίδρασης με το συμβατικό αντίσωμα εντοπίζεται εκτός της σχισμής του ενεργού κέντρου [121].

1.3.2. Παραγωγή των θραυσμάτων αντισωμάτων VHH

Η παραγωγή των θραυσμάτων αντισωμάτων VHH γίνεται συνήθως με ανοσοποίηση Καμηλίδων με τα επιθυμητά αντιγόνα. Το ρεπερτόριο της λειτουργικής περιοχής της μεταβλητής περιοχής (V) από cDNA αίματος, λεμφαδένα ή σπλήνας, ενισχύεται με PCR και κλωνοποιείται σε φορείς phage display [119]. Για την επιλογή VHH με κατάλληλες ιδιότητες από μεγάλες συλλογές VHH χρησιμοποιείται η τεχνική phage display [122]. Μέσω αυτής της τεχνικής, τα VHH παρουσιάζονται στην επιφάνεια βακτηριοφάγων. Οι συλλογές αυτών των φάγων που περιέχουν τα VHH ονομάζονται βιβλιοθήκες. Από αυτές εξειδικευμένα VHHs για συγκεκριμένα αντιγόνα επιλέγονται με σάρωση βιβλιοθηκών phage display με βάση τη συγγενειά τους με το ακινητοποιημένο αντιγόνο.

Τρία είδη βιβλιοθηκών χρησιμοποιούνται συνήθως. Οι βιβλιοθήκες από μη-ανοσοποιημένα ζώα (immune), που περιέχουν VHHs εκτεθειμένα σε φάγους που προέρχονται από *Llamas* ή καμήλες που έχουν ανοσοποιηθεί με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο ή ένα σύνολο αντιγόνων [123]. Οι naive βιβλιοθήκες που περιέχουν VHHs

που προέρχονται από μη ανοσοποιημένα *llamas* ή καμήλες [124] και οι ημισυνθετικές βιβλιοθήκες που περιέχουν VHHs που συντίθενται με εισαγωγή μεταλλαγών και αναδιανομή των περιοχών CDR [125]. Το τελευταίο είδος βιβλιοθήκης δίνει το πλεονέκτημα επιλογής αντισωμάτων έναντι τοξικών αντιγόνων ή αντιγόνων που είναι δύσκολο να εκφραστούν. Η υψηλή συγγένεια των VHHs που προέρχονται από immune βιβλιοθήκες οφείλεται στην φυσική επιλογή των ποικιλόμορφων HCAs κατά τον πολλαπλασιασμό των ειδικών για το αντιγόνο β-λεμφοκυττάρων στα λεμφικά όργανα των ανοσοποιημένων ζώων. Η συγγένεια των VHH που προέρχονται από non-immune βιβλιοθήκες μπορούν να βελτιωθούν με μίμηση αυτής της στρατηγικής *in vitro*, για παράδειγμα, με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των περιοχών CDR και επιπλέον κύκλους επιλογής τους με βάση τη συγγενεία τους με το ακινητοποιημένο αντιγόνο κάτω από περιοριστικές συνθήκες, όπως υψηλότερες θερμοκρασίες, pH ή χαμηλή συγκέντρωση αντιγόνου.

1.3.3. Ετερόλογα συστήματα παραγωγής των θραυσμάτων αντισωμάτων VHH

Η εμπορική παραγωγή συμβατικών θεραπευτικών αντισωμάτων βασίζεται σε συστήματα καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών [126]. Τα αντισώματα συνήθως παράγονται σε ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς και στοχεύονται στο εκκριτικό μονοπάτι, επειδή απαιτείται η προσθήκη N-συνδεδεμένου ολιγοσακχαρίτη στην περιοχή Fc και σχηματισμός των δισουλφιδικών δεσμών τους στο οξειδωτικό περιβάλλον του ενδοπλασματικού δικτύου. Η παραγωγή των VHH σε μικροβιακά συστήματα είναι ευκολότερη από αυτή των συμβατικών αντισωμάτων επειδή έχουν έλλειψη της περιοχής Fc και δεν απαιτούν γλυκοσυλίωση [127]. Επίσης, το γεγονός ότι τα VHHs αποτελούνται από μία μοναδική λειτουργική περιοχή η οποία είναι υπεύθυνη για τη δέσμευσή τους με το αντιγόνο καθιστά ικανή την εύκολη έκφρασή τους σε διάφορα ετερόλογα συστήματα έκφρασης, όπως το *E. coli* [112, 128], η ζύμη *S.cerevisiae* [129], το *Pichia pastoris* [130] και οι νηματοειδείς μύκητες [131]. Στη ζύμη επιτυγχάνονται υψηλά επίπεδα παραγωγής, αποδοτικός καθαρισμός των VHH και φθινή παραγωγή VHH σε μεγάλες ποσότητες [129, 132].

Όμως, τα επίπεδα παραγωγής των VHH σε μικροοργανισμούς διαφέρουν σημαντικά για το κάθε VHH [112]. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα VHHs που διαφέρουν σε

μόνο λίγα αμινοξέα και παράγονται σε εντελώς διαφορετικά επίπεδα [133]. Επιπρόσθετα, διαφορετικοί σχηματισμοί έκφρασης των VHHs έχουν περιγραφεί με μεταφραστική σύντηξη δύο ή περισσότερων [19], τα οποία αναγνωρίζουν το ίδιο ή διαφορετικά αντιγόνα για να αυξηθεί η λειτουργική συγγένειά τους με το αντιγόνο. Αυτοί οι σχηματισμοί είναι δυσκολότερο να παραχθούν. Τα φυτά ως βιοαντιδραστήρες για την παραγωγή θεραπευτικών αντισωμάτων έχουν πολλά πλεονεκτήματα λόγω του χαμηλού κόστους παραγωγής, της ευκολίας κλιμάκωσης παραγωγής, του μειωμένου κινδύνου επιμόλυνσης με ανθρώπινα παθογόνα, και της ικανότητάς τους να παράγουν ποικίλους σχηματισμούς αντισωμάτων [134, 135]. Μέχρι σήμερα, η παραγωγή των VHH σε φυτά έχει περιγραφεί μία φορά [136, 137] σε σταθερά μετασχηματισμένες σειρές φυτών και συσσωρεύονταν σε χαμηλά επίπεδα.

1.3.4. Τα θραύσματα αντισωμάτων VHH ως μοριακό εργαλείο για την μελέτη πρωτεϊνών *in planta*

Τα VHHs είναι κατάλληλα για παραγωγή ως ενδο-αντισώματα (intrabodies), επειδή απαιτείται η έκφραση τους στο αναγωγικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος, όπου δεν μπορεί να σχηματιστεί ο δισουλφιδικός δεσμός που σταθεροποιεί τη δομή τους. Μόνο αντισώματα που διαθέτουν υψηλή σταθερότητα μπορούν να εκφραστούν σε λειτουργική μορφή απουσία του δισουλφιδικού δεσμού [138-140]. Η εφαρμογή των συμβατικών αντισωμάτων σε ζωντανά κύτταρα είναι περιορισμένη, καθώς στο αναγωγικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος δεν μπορούν να σχηματιστούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί που ενώνουν τις λειτουργικές περιοχές τους και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την λανθασμένη συναρμολόγησή τους. Την τελευταία δεκαετία έχουν παραχθεί παράγωγα των συμβατικών αντισωμάτων, τα Fab και τα scFv (single-chain variable fragments), τα οποία έχουν αυξημένη σταθερότητα αλλά η εφαρμογή τους σε ζωντανά κύτταρα είναι ακόμα περιορισμένη καθώς αποτελούνται από βαριές (VH) και ελαφριές (VL) λειτουργικές περιοχές και μόνο σε λίγες περιπτώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πρωτεϊνών *in vivo* [141]. Τα VHH αποτελούνται από μία μόνο λειτουργική περιοχή, οπότε έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν χρειάζεται να συναρμολογηθούν *in vivo*, και επιπρόσθετα δεν χρειάζεται να τροποποιηθούν με τεχνικές μοριακή εξέλιξης, αλλά

μπορούν εύκολα να επιλεγούν με την μέθοδο phage display για να χρησιμοποιηθούν για να σχηματίσουν λειτουργικά αντισώματα *in vivo*.

Η μεταβολική μηχανική μέσω αντισωμάτων στα φυτά επικεντρώνεται στην ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών με βελτιωμένη απόδοση συγκεκριμένων προϊόντων, αλλά μπορεί να εφαρμοστεί και για την κατανόηση αλλαγών μοριακών δομών και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Μέχρι σήμερα, έχει περιγραφεί ένα παράδειγμα της χρήσης των VHH ως ένδο-αντισώματα (intrabodies) στα φυτά. Τα VHH έχουν χρησιμοποιηθεί για την απενεργοποίηση του ενζύμου πολυμερισμού του αμύλου της πατάτας A (SBE A). Το VHH επιλέχθηκε *in vitro* και χρησιμοποιήθηκε ως ανοσορυθμιστικό ενδο-αντίσωμα σε διαγονιδιακά φυτά για να μειώσει την παραγωγή αμύλου και να αυξήσει την παραγωγή αμυλόζης [142]. Με αυτό τον τρόπο έδειξαν ότι αυτά τα αντισώματα μπορούν να στοχευτούν σωστά σε υποκυτταρικά διαμερίσματα χωρίς να διαταράσσουν τον υπόλοιπο μεταβολισμό του φυτού και ότι μπορούν να αναστέλλουν λειτουργίες ενζύμων πιο αποδοτικά από το αντιπληροφοριακό RNA (antisense RNA). Η αποδοτική αναστολή ενζύμων από τα VHHs υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι έχουν βελτιωμένη ικανότητα διείσδυσης στα ενεργά κέντρα ενζύμων, οδηγώντας στην αναστολή της καταλυτικής τους λειτουργίας [115]. Τα VHHs έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές φορές για να μελετηθούν πρωτεΐνες μέσω τροποποίησης της διαμόρφωσης πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα. Έχουν περιγραφεί πολλά VHH που τροποποιούν την αναδίπλωση [143], αποτρέπουν την συσσωμάτωση [144] και ανιχνεύουν συγκεκριμένες διαμορφώσεις πρωτεϊνών [145]. Για παράδειγμα, σε μία άλλη πετυχημένη μελέτη, ScFvs ενάντια σε πρωτεΐνες θερμικού σοκ (sHSP) εκφράστηκαν στο κυτταρόπλασμα διαγονιδιακών φυτών καπνού για να παρεμποδίσουν την συναρμολόγηση των κοκκίων θερμικής καταπόνησης. Δείξανε ότι ο σχηματισμός κοκκίων θερμικής καταπόνησης από τις sHSPs και η αποσύνθεσή τους αποτελεί προϋπόθεση για την επιβίωση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης [146].

1.4. Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *sbr* του *A.thaliana* κατά την απόκριση του φυτού σε αβιοτικές καταπονήσεις, καθώς σε προηγούμενες μελέτες με χρήση μικροσυστοιχιών DNA έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *sbr* αλλάζουν όταν τα φυτά εκτίθεται σε διάφορες βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις [9-14]. Επίσης, σε προηγούμενη μελέτη έχει βρεθεί ότι φυτά που υπερεκφράζουν το γονίδιο *sbr1* έχουν αυξημένη ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις σεληνίου [6]. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων (χαλκού και χρωμίου) σε αρτίβλαστα *A.thaliana* και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *sbr* εκτιμήθηκαν με χρήση της ημιποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης-πολυμεράσης (semi-quantitative RT-PCR). Στις ίδιες συνθήκες μελετήθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *gaphd* και *fba* που κωδικοποιούν γλυκολυτικά ενζύμα, μία GAPDH και μία FBA, οι οποίες σε παλαιότερη μελέτη έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με την AtSBP1 *in vivo* και *in vitro* [7]. Επιπρόσθετα, για να δειχθεί η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης AtSBP1 με τις AtGAPDH και AtFBA και να γίνει υποκυτταρικός εντοπισμός του συμπλόκου *in planta* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της συμπληρωματικότητας του διμοριακού φθορισμού (BiFC).

Στα πλαίσια μίας προσπάθειας μελέτης της έκφρασης και της λειτουργίας της πρωτεΐνης AtSBP1 *in planta* σε πραγματικό χρόνο αναπτύχθηκε ένα μοριακό εργαλείο που βασίζεται στα θραύσματα αντισωμάτων VHH μέσω του οποίου έγινε υποκυτταρικός εντοπισμός της AtSBP1. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν VHH που προέρχονται από βιβλιοθήκη θραύσματος αντισωμάτων VHH που κατασκευάστηκε μετά από ανοσοποίηση *Lama glama* με την πρωτεΐνη AtSBP1. Τα επιλεγμένα VHHs χρησιμοποιήθηκαν ως ένδο-αντισώματα για γίνει ανοσοεντοπισμός της AtSBP1 *in planta* σε πραγματικό χρόνο. Για την ανίχνευση των συμπλόκων των VHHs με την AtSBP1 χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού (BiFC).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Μέθοδοι

2.1.1. Συνθήκες καλλιέργειας φυτών και βακτηρίων

2.1.1.1. Καλλιέργεια *N.benthamiana* στο χώμα

Τα σπέρματα του φυτού *N.benthamiana* εμβαπτίστηκαν σε νερό και επωάστηκαν στους 4°C για 24-48 ώρες. Στη συνέχεια αποστειρώθηκαν σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης 25 % κ.α. , επιστρώθηκαν σε νοτισμένο υπόστρωμα, σε μικρές γλάστρες και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών. Ως υπόστρωμα καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό μείγμα Florabella, αποτελούμενο από εμπλουτισμένο φυτόχωμα, τύρφη και περλίτη σε αναλογίες 3:2:1 αντιστοίχως. Τα νεαρά φυτά ηλικίας περίπου 10 ημερών μεταφυτεύονται σε όμοιες γλάστρες, για περαιτέρω ανάπτυξη. Τα φυτά καλλιεργήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, σε θερμοκρασία 21- 23°C, φωτοπερίοδο 16/8 ώρες φως/σκοτάδι και σχετική υγρασία 50-60%. Για τον φωτισμό χρησιμοποιήθηκαν λαμπτήρες φθορισμού, αποδίδοντας συνολική ένταση φωτός 100-150μE.m-2.s-1.

2.1.1.2. Ασηπτική καλλιέργεια αρτιβλάστων *A.thaliana* σε υγρό θρεπτικό μέσο

Τα σπέρματα του φυτού *A.thaliana* (οικοτύπου Columbia) εμβαπτίστηκαν στο νερό, τοποθετήθηκαν σε ψυγείο (4°C) για 1-2 μέρες και στη συνέχεια απολυμάνθηκαν σε θάλαμο νηματική ροής, με υδατικό διάλυμα χλωρίνης 25% για 4' και διάλυμα αιθανόλης 70% για 2'. Στη συνέχεια, τα σπέρματα ξεπλήθηκαν 5-6 φορές με στείρο νερό και εμβολιάζονται σε κωνικές που περιέχουν αποστειρωμένο υγρό βασικό θρεπτικό υπόστρωμα αλάτων Murashige and Skooge (MS).

2.1.1.3. Καλλιέργειες *E. coli* και *Agrobacterium tumefaciens*

Τα διάφορα στελέχη των *E. coli* και *A. tumefaciens* καλλιεργήθηκαν τόσο σε υγρά θρεπτικά μέσα, όσο και σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα σε τρυβλία. Για τα *E. coli* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα LB, ενώ για τα *A. tumefaciens* το

θρεπτικό υπόστρωμα YEB. Για την υγρή καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών τα κύτταρά τους εμβολιάστηκαν με μια αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα σε 8ml στείρου LB εντός γυάλινων φιαλιδίων των 20ml (Universals). Προστέθηκαν τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής για τα στελέχη και τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν για 15- 20 ώρες σε επωαστικό κλίβανο ελεγχόμενης θερμοκρασίας, υπό ανάδευση. Η θερμοκρασία καλλιέργειας ρυθμίστηκε στους 37°C για τα *E. coli* και στους 28°C για τα *A. tumefaciens*. Για την καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο LB-άγαρ 2%, το οποίο περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής, τα κύτταρα επιστρώθηκαν στα τρυβλία με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας, ή εναλλακτικά, απλώνοντας το εναιώρημα των κυττάρων με τη βοήθεια στρεβλωμένης γυάλινης ράβδου. Τα τρυβλία επώαστηκαν ανεστραμμένα σε κλίβανο, σε θερμοκρασία 37°C για 15-20 ώρες για τα *E. coli*, και σε θερμοκρασία 28°C για 48 περίπου ώρες για το *A. tumefaciens*.

2.1.1.4. Αποθήκευση βακτηριακών στελεχών

Τα στελέχη των βακτηρίων που πρόκειται να αποθηκευτούν εμβολιάστηκαν από μία αποικία σε 8ml στείρου θρεπτικού μέσου, παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών επιλογής (για τα βακτήρια) και αναπτύχθηκαν για 15-20 ώρες στις κατάλληλες θερμοκρασίες. Στη συνέχεια, 900μl από την καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο πλαστικό σωλήνα των 1,5ml με πώμα (erpendorf) και προστέθηκαν 300μl γλυκερόλης 60% αναδεύοντας καλά. Τέλος, το φιαλίδιο φυλάσσεται σε υπερκαταψύκτη στους -80 °C.

2.1.2. Βασικές τεχνικές

2.1.2.1. Ηλεκτροφόρηση DNA και RNA σε πήγμα αγαρόζης

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού, καθαρισμού και απομόνωσης τμημάτων DNA. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και βασίζεται στο ότι το DNA έχει αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να κινείται προς το θετικό πόλο όταν βρεθεί σε συνεχές ηλεκτρικό πεδίο. Πειραματική διαδικασία (Sambrook et al. 1989)

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας η ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων εφαρμόστηκε στις ακόλουθες περιπτώσεις:

- Για τον έλεγχο του αποτελέσματος μιας αντίδρασης PCR.
- Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης ενός πλασμιδιακού φορέα –ενδεικτικά.
- Για την εκτίμηση των συγκριτικών συγκεντρώσεων κομμένου πλασμιδιακού φορέα και εισαγόμενου τμήματος DNA για μια ακόλουθη αντίδραση λιγάσης.
- Για τον έλεγχο του DNA (πλασμιδιακοί φορείς) και του ολικού RNA ύστερα από την απομόνωσή τους, και του cDNA, ύστερα από τη σύνθεσή του.
- Για τον έλεγχο των ενδεικτικών πέψων περιοριστικών ενδονουκλεασών.
- Για την απομόνωση τμήματος DNA που είναι το προϊόν PCR ή το προϊόν πέψης πλασμιδιακού φορέα με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

2.1.2.2. Σχεδιασμός τεχνητών ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών

2.1.2.2.1. Σχεδιασμός ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών για ημιποσοτική PCR

Ο σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων (primers) έγινε με τη βοήθεια της διαδικτυακής εφαρμογής Primer-BLAST η οποία χρησιμοποιεί την εφαρμογή Primer 3 για την αξιολόγηση ζευγών εκκινητών για αντιδράσεις PCR, τους οποίους στη συνέχεια υποβάλλει σε αναζήτηση BLAST, για την επιλογή εκκινητών ειδικών για την αλληλουχία στόχο της μήτρας. Συγκεκριμένα ελέγχονται:

- Οι θερμοκρασίες αποδιάταξης των εκκινητών T_m (melting temperature)
 T_m ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία ένας εκκινητής αδυνατεί πλέον να σχηματίσει σταθερά δίκλινα μόρια με τη συμπληρωματική του αλληλουχία-στόχο. Η θερμοκρασία T_m εξαρτάται από το μέγεθος του εκκινητή καθώς και από το ποσοστό του σε δεοξυνουκλεοτίδια γουανίνης G και κυτοσίνης C, τα οποία συγκριτικά με αυτά της αδενίνης A ή θυμίνης T αυξάνουν την T_m .
- Η παρουσία ανεπιθύμητων, θερμοδυναμικά ευνοϊκών δομών, που μειώνουν την απόδοση των εκκινητών στην αντίδραση, π.χ. δομές φουρκέτας και ομο- ή έτεροδιμερή των εκκινητών.
- Η παρουσία νουκλεοτιδικών επαναλήψεων που μπορούν να οδηγήσουν σε ολίσθηση του εκκινητή πάνω στη συμπληρωματική αλληλουχία στόχο και τελικά σε σφάλμα στο PCR προϊόν.

- Μέσω της αναζήτησης BLAST, η συμπληρωματικότητα των εκκινητών με άλλες αλληλουχίες της μήτρας εκτός από την αλληλουχία στόχο που θα μπορούσε να οδηγήσει σε ενίσχυση PCR παραπροϊόντων.

2.1.2.2.2. Σχεδιασμός ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών για εισαγωγή θέσεων περιοσμού

Για να γίνει εφικτή η κλωνοποίηση προϊόντος της PCR σε κάποιον πλασμιδιακό φορέα σχεδιάστηκαν εκκινητές που περιλαμβάνουν αλληλουχίες περιοριστικών νουκλεασών ίδιες με αυτές του φορέα. Αυτό έγινε προσθέτοντας στα 5' άκρα τους τα αντίστοιχα νουκλεοτιδικά παλίνδρομα. Βεβαιώνεται ότι το γονίδιο που θα ενισχυθεί με PCR δεν περιέχει στην αλληλουχία του τις αναγνωριστικές παλίνδρομες θέσεις οι οποίες πρόκειται να προστεθούν στους εκκινητές, καθώς κάτι τέτοιο θα οδηγούσε στον τεμαχισμό του PCR προϊόντος κατά την ενζυμική αντίδραση παραγωγής κολλωδών άκρων. Στην περίπτωση που το γονίδιο έχει τις αναγνωριστικές αυτές θέσεις, αναζητούμε κάποιον άλλο συνδυασμό περιοριστικών ενδονουκλεασών, ανάλογα και με τις επιλογές που προσφέρουν οι χάρτες των πολυσυνδετών (polylinkers) στους πλασμιδιακούς φορείς. Επίσης, στις περιπτώσεις που ο στόχος είναι το προϊόν PCR να κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης σχεδιάστηκαν τους εκκινητές έτσι ώστε το προϊόν PCR να βρίσκεται στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο. Εφόσον σχεδιαστούν οι εκκινητές παραγγέλλονται από εταιρίες παραγωγής ολιγονουκλεοτιδίων. Παραλαμβάνονται σε λυόφιλο μορφή και διαλύονται σε στείρο ddH₂O στη συγκέντρωση των 100μM. Από το αρχικό αυτό διάλυμα ετοιμάζεται το διάλυμα εργασίας συγκέντρωσης 10μM. Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -20°C.

2.1.2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR (polymerase chain reaction) αποτέλεσε μια επαναστατική τεχνική που επέτρεψε τη γρήγορη και αξιόπιστη κλωνοποίηση οποιασδήποτε DNA αλληλουχίας μήκους έως και δεκάδων χιλιάδων βάσεων (McPherson and Moller, 2000). Για την αντίδραση απαιτείται ένα σχετικά απλό υδατικό διάλυμα δεοξυ-τρι-φωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs), αλάτων, θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, εκκινητών ολιγονουκλεοτιδίων και το DNA

στόχος (υπόστρωμα αντίδρασης). Εφόσον αναμείχθηκαν όλα τα αντιδραστήρια, συνήθως σε ένα μικρό πλαστικό φιαλίδιο, η αντίδραση επωάστηκε σε θερμοκυκλικό μηχάνημα, σε κύκλους εναλλασσόμενων συνθηκών που επιτρέπουν τον διπλασιασμό του DNA στόχου σε κάθε κύκλο. Κάθε ένας κύκλος μιας αντίδρασης PCR αποτελείται από τα ακόλουθα τρία βασικά βήματα:

A) Αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA σε ψηλή θερμοκρασία (94 °C) προς σχηματισμό μονόκλωνων αλυσίδων DNA. Πραγματοποιείται για μερικά λεπτά στον πρώτο κύκλο της αντίδρασης και για μερικά δευτερόλεπτα στους επόμενους.

B) Υβριδοποίηση των ειδικών εκκινητών ολιγονουκλεοτιδίων στο μονόκλωνο, από το πρώτο βήμα, DNA στόχο. Η θερμοκρασία της υβριδοποίησης καθορίζεται ανάλογα με την θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών T_m . Συνήθως επιλέγεται ως θερμοκρασία υβριδοποίησης αυτή των (T_{mmin}) °C, όπου T_{mmin} η μικρότερη από τις δύο T_m του ζεύγους εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Το στάδιο αυτό ολοκληρώνεται σε μερικά δευτερόλεπτα.

C) 5'→3' πολυμερισμός του DNA στόχου και διπλασιασμός της αλληλουχίας του. Πραγματοποιείται στα *optima* της ενζυμικής δράσης των θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασης που χρησιμοποιήθηκε. Ο χρόνος πολυμερισμού εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας στόχου, καθώς και από το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε. Ενδεικτικά κυμαίνεται από 0,5-1min για κάθε 1000 βάσεις που συντίθενται.

2.1.2.3.1. Αντιδράσεις ημιποσοτικής PCR

Θεωρητικά, με την αντίδραση PCR ο πολλαπλασιασμός του DNA στόχου ακολουθεί εκθετική καμπύλη, ενώ στην πράξη αυτό ισχύει για ορισμένους μόνο κύκλους πριν τον κορεσμό της αντίδρασης λόγω συσσώρευσης παραπροϊόντων, μείωσης της δραστηριότητας του ενζύμου και περιορισμού των αντιδραστηρίων (π.χ. εκκινητών). Στην φάση κορεσμού, μόρια cDNA υψηλής αφθονίας μπορεί δίνουν προϊόντα ίσης έντασης με λιγότερο άφθονα μόρια cDNA.

Για την εκτίμηση της γονιδιακής έκφρασης *srb1,2,3*, *fba*, *gapdh*, *gpx6*, και *gst9* σε φυτικούς ιστούς *A.thaliana* μετά από επιδράσεις με τοξικά μέταλλα με ημιποσοτική PCR χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση Taq της Invitrogen. Τα παρακάτω αντιδραστήρια αναμείχθηκαν καλά σε αποστειρωμένο φιαλίδιο (eppendorf). Το

ένζυμο της DNA πολυμεράσης προστέθηκαν τελευταίο στο μείγμα, ενώ όλα τα αντιδραστήρια διατηρούνται στον πάγο καθ' όλη τη διάρκεια των χειρισμών.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
cDNA	Εξαρτάται από τη συγκέντρωση του cDNA στο δείγμα
dNTPs, 10mM	0,9
MgCl ₂ , 50mM	0,9
Νοηματικός εκκινητής, 10μM	0,9
Αντινοηματικός εκκινητής, 10μM	0,9
Ταq πολυμεράση (Invitrogen), 5u/μl	0,3
ddH ₂ O	Συμπληρώνεται για τελικό όγκο 30μl
Τελικός όγκος της αντίδρασης	30

Στη συνέχεια η αντίδραση τοποθετήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστηκε το παρακάτω πρόγραμμα διαδοχικών επώασεων.

Αριθμός κύκλων	Χρόνος / θερμοκρασία T °C
1 κύκλος	Αρχική αποδιάταξη cDNA για 2min στους 94oC
1 κύκλος	1. αποδιάταξη cDNA στους 94°C για 15sec 2. υβριδοποίηση εκκινητών στους 55°C για 30sec 3. πολυμερισμός cDNA στους 72°C για 35sec
Επιλογή αριθμού κύκλων *	1. αποδιάταξη cDNA στους 94°C για 15sec 2. υβριδοποίηση εκκινητών στους 55°C για 30sec 3. πολυμερισμός cDNA στους 72°C για 35sec

* Εξαρτάται από την ποσότητα cDNA του κάθε γονιδίου που αναμένεται να έχουμε στο διάλυμα cDNA, έτσι ώστε η αντίδραση να βρίσκεται στην εκθετική φάση.

2.1.2.3.2. Αντιδράσεις PCR για κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης

Για την κλωνοποίηση των ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων των γονιδίων *Atsbp1*, *Atgapdh*, *Atfba* και των κωδικών περιοχών των θραυσμάτων αντισωμάτων VHH (A10,E12,F1,F2) σε κατάλληλους φορείς έκφρασης τα γονίδια ενισχύθηκαν χρησιμοποιώντας το ένζυμο DNA πολυμεράση με διορθωτική δράση Expand™ High Fidelity PCR System της Roche.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
dNTPs, 10mM	2
Νοηματικός εκκινητής, 10μM	5
Αντινοηματικός εκκινητής, 10μM	5
πλασμιδιακό DNA	2
5x ρυθμιστικό διάλυμα (Fusion Physion)+MgCl ₂	20
Expand TM High Fidelity PCR πολυμεράση	1
ddH ₂ O	65
Τελικός όγκος της αντίδρασης	100

Στη συνέχεια η αντίδραση τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστηκε το παρακάτω πρόγραμμα διαδοχικών επώσεων.

Αριθμός κύκλων	Χρόνος / θερμοκρασία T °C
1	Αρχική αποδιάταξη DNA για 30sec στους 98°C
1	1. αποδιάταξη DNA στους 98°C για 10sec 2. υβριδοποίηση εκκινητών στους 52-58°C για 30sec 3. πολυμερισμός DNA στους 72°C για 15-45sec
34	1. αποδιάταξη DNA στους 98°C για 10sec 2. υβριδοποίηση εκκινητών στους 52-58°C για 30sec 3. πολυμερισμός DNA στους 72°C για 15-45sec
1	Τελικός πολυμερισμός στους 72°C για 10min

2.1.2.3.3. Αντιδράσεις PCR σε αποικίες *E.coli* (Colony PCR)

Ο γρήγορος έλεγχος των κλώνων *E.coli* που έφεραν την ένθεση ενδιαφέροντος εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε αποικίες *E.coli*.

Πειραματική διαδικασία

Η ανάμιξη των αντιδραστηρίων γίνεται στον πάγο. Σε κάθε σωληνάριο της PCR που περιέχει τα αντιδραστήρια, προστέθηκαν μικρή ποσότητα της αποικίας προς εξέταση. Αυτό επιτυγχάνεται με χρήση κίτρινου tip, αυτόματης σιφώνιο που ακουμπά την αποικία και εν συνεχεία εμβαπτίζεται στο μίγμα αντιδραστηρίων,

ακολουθώντας ανάμιξη με πιπετάρισμα. Ως εκκινητές χρησιμοποιούνται ειδικά μόρια ως προς την εξεταζόμενη αλληλουχία.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
MgCl ₂ , 50mM	0,6
dNTPs, 10mM	0,6
10x ρυθμιστικό διάλυμα	2
Νοηματικός εκκινητής, 10μM	0,6
Αντινοσηματικός εκκινητής, 10μM	0,6
Ταq πολυμεράση (Invitrogen)	0,2
ddH ₂ O	14,4
Τελικός όγκος της αντίδρασης	20

Στη συνέχεια η αντίδραση τοποθετήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστηκαν το παρακάτω πρόγραμμα διαδοχικών επώασεων.

Αριθμός κύκλων	Χρόνος / θερμοκρασία T °C
1	Αρχική αποδιάταξη DNA για 5min στους 95oC
1	1. αποδιάταξη DNA στους 95°C για 1min 2. υβριδοποίηση εκκινητών στους 49-52°C για 1.30sec 3. πολυμερισμός DNA στους 72°C για 2.45sec
39	1. αποδιάταξη DNA στους 95°C για 1min 2. υβριδοποίηση εκκινητών στους 49-52°C για 1.30sec 3. πολυμερισμός DNA στους 72°C για 2.45sec

2.1.2.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli*

2.1.2.4.1. Με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης των κυττάρων

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους Birnboim και Doly (1979). Χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις του ελέγχου των ορθών ανασυνδυασμένων πλασμιδίων ύστερα από τις αντιδράσεις λιγάσης και μετασχηματισμού. Το παραπάνω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση πλασμιδίων χαμηλού βαθμού αντιγραφής.

1. Καλλιέργεια και συλλογή κυττάρων 6 ml καλλιέργειας *E. coli* 12 ωρών σε 8ml LB μεταφέρεται σε φυγοκεντρικά σωληνάρια errendorf και φυγοκεντρήθηκαν για 30 sec στα 12000 x g. Το υπερκείμενο απομακρύνεται.
2. Λύση των κυττάρων. προστέθηκαν 100 μl διαλύματος P1. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν με ισχυρή ανάδευση (vortex). προστέθηκαν 200 μl διαλύματος P2. Ακολούθησε ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας το σωληνάριο 6 φορές και αφήνεται 5-10min σε θερμοκρασία δωματίου. προστέθηκαν 350 μl διαλύματος P3, το δείγμα ανάδευεται ήπια με αναστροφή του σωληναρίου 6 φορές, αφήνεται 5min στον πάγο και φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στα 10000xg σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Καθίζηση του DNA. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε σωληνάριο errendorf, προστέθηκαν 325μl ισοπροπανόλης και αφήνεται 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στις 12.000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστέθηκαν 500 μl αιθανόλης 70%. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στις 12.000 rpm και ξήρανση του ιζήματος.
4. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 50 μl H₂O HPLC, προστέθηκαν 2 μl διαλύματος 10 mg/ml RNase A και γίνεται επώαση στους 37°C για 15 min.

2.1.2.4.2. Με τη διαδικασία (kit) Nucleospin Plasmid της Macherey Nagel

Χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις που η απομόνωση του πλασμιδίου γινόταν από ελεγμένο ορθό κλώνο βακτηριακών κυττάρων, για περαιτέρω χρήση ή φύλαξη του πλασμιδίου αυτού. Βασικό πρωτόκολλο:

1. Καλλιέργεια και συλλογή κυττάρων. 1-5 ml καλλιέργειας *E. coli* σε LB μεταφέρθηκε σε μικροφυγοκεντρικά σωληνάρια errendorf και φυγοκεντρήθηκαν σε μικροφυγόκεντρο πάγκου για 30 sec στα 10000 x g. Το υπερκείμενο απομακρύνεται.
2. Λύση των κυττάρων. προστέθηκαν 250 μl διαλύματος A1. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκε με ισχυρή ανάδευση (vortex). προστέθηκαν 250 μl διαλύματος A2. Ακολούθησε ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας το σωληνάριο 6-8 φορές και το δείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά το πολύ. προστέθηκαν 300 μl διαλύματος A3, το δείγμα ανάδευεται ήπια με αναστροφή του

σωληναρίου 6-8 φορές και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 10000xg σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

3. Δέσμευση του DNA. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε στήλη, Ακολούθησε φυγοκέντρωση ενός λεπτού στα 11000xg και το διήθημα απορρίπτεται.

4. Έκπλυση της σίλικας. προστέθηκαν 600 μl διαλύματος A4, φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στα 11000xg και το έκλουσμα απορρίπτεται.

5. Ξήρανση της σίλικας. Για να στεγνώσει η σίλικα γίνεται φυγοκέντρωση 2 λεπτών στα 11000xg.

6. Έκλυση του πλασμιδιακού DNA. προστέθηκαν 50 μl διαλύματος AE, επώαστηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 λεπτό, φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στα 11000xg και συλλέχθηκε το έκλουσμα.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας το παραπάνω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε με κάποιες τροποποιήσεις για την απομόνωση πλασμιδίων χαμηλού βαθμού αντιγραφής *-low copy number*. Συγκεκριμένα, η απομόνωση έγινε από 8 ml ολονύχτιας καλλιέργειας *E. coli*, 500 μl διαλύματος A1, 500 μl διαλύματος A2 και 600 μl διαλύματος A3.

2.1.2.5. Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες τύπου II είναι ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν DNA αλληλουχίες και κόβουν σε συγκεκριμένο σημείο εντός των αλληλουχιών αυτών. Αποτελούν βασικά εργαλεία των τεχνολογιών του ανασυνδυασμένου DNA. Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της εργασίας για:

- Έλεγχο της ορθότητας της κλωνοποίησης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων μετά από τις απομονώσεις τους.
- Επεξεργασία πλασμιδιακών φορέων και προϊόντων της PCR με στόχο τη δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

Στην πρώτη περίπτωση αναφέρεται στις ενδεικτικές πλασμιδιακές πέψεις. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται η σύσταση της αντίδρασης πέψης.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
Πλασμιδιακό DNA	5
Ένζυμα περιορισμού	0,5
Ρυθμιστικό διάλυμα(10X)	3
BSA	0,3
ddH ₂ O	20,7
Τελικός όγκος	30

Η αντίδραση επωάστηκε στους 37 ° C για 2 ώρες

Για την επεξεργασία πλασμιδίων και PCR προϊόντων (π.χ. δημιουργία κολλωδών άκρων), το προϊόν της πέψης απομονώθηκε από την πηκτή ώστε να χρησιμοποιηθεί σε επόμενα στάδια δημιουργίας ανασυνδυασμένων φορέων. Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες ποσότητες DNA, της τάξεως των 1-4μg, και το ίδιο βασικό πρωτόκολλο προσαρμοσμένο σε μεγαλύτερο όγκο αντίδρασης (100μl). Στη συνέχεια η αντίδραση φορτώνεται στην πηκτή, ηλεκτροφορήθηκε και η πηκτή βάφεται. Τέλος, οι ζώνες ενδιαφέροντος απομονώθηκαν από την πηκτή με καθαρό νυστέρι πάνω σε τράπεζα UV.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται η σύσταση της αντίδρασης πέψης.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
Πλασμιδιακό DNA	45
Ένζυμα περιορισμού	1
Ρυθμιστικό διάλυμα(10X)	10
BSA	3
ddH ₂ O	41
Τελικός όγκος	100

Η αντίδραση επωάστηκε στους 37 °C για 3 ώρες

2.1.2.6. Απομόνωση DNA από ζώνη πηκτής αγαρόζης

Σε όλες τις περιπτώσεις απομόνωσης ζωνών DNA από πήγμα αγαρόζης (γραμμικοί πλασμιδιακοί φορείς, τμήματα πλασμιδίων, προϊόντα PCR) χρησιμοποιήθηκε η

μέθοδος του Nucleospin Extract της Macherey – Nagel.

Το πήγμα της αгарόζης που περιέχει την ζώνη DNA που πρόκειται να καθαριστεί, αποκόβεται από το υπόλοιπο πήγμα αгарόζης, ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε σε πλαστικό αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο erpendorf.

1. Λύση της πηκτής. Για κάθε 100 mg αгарόζης προστέθηκαν 200 μl διαλύματος NT. Το δείγμα επώαστηκε στους 50 °C μέχρι η αгарόζη να διαλυθεί πλήρως αναδεύοντας κάθε 2–3 λεπτά.

2. Δέσμευση του DNA. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε στήλη και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στα 11000xg. Το έκλουσμα απορρίπτεται.

3. Έκπλυση της σίλικας. προστέθηκαν 600 μl διαλύματος NT3 και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στα 11000xg. Το έκλουσμα απορρίπτεται.

4. Ξήρανση της σίλικας. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 2 λεπτά στα 11000xg για να απομακρυνθεί πλήρως το διάλυμα NT3.

5. Έκλυση του DNA. προστέθηκαν 25-30 μl διαλύματος έκλυσης NE, το δείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 λεπτό και φυγοκεντρήθηκε στα 11000xg για 1 λεπτό. Συλλέχθηκε το έκλουσμα.

2.1.2.7. Καθαρισμός DNA από διαλύματα αντιδράσεων πέψων και PCR

Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο Kit που αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.1.2.6 και η ίδια βασική σειρά χειρισμών με τη διαφορά ότι η αντίδραση PCR, αναμίχθηκαν αρχικά με 2x όγκους διαλύματος NT και φορτώνεται στην κολώνα.

2.1.2.8. Αντίδραση Λιγάσης

Με την αντίδραση λιγάσης επιτυγχάνεται η ενοποίηση ακραίων τμημάτων DNA, είτε του ίδιου μορίου, είτε διαφορετικών μορίων, με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του 3' υδροξυλίου του ενός άκρου και του 5' φώσφορου του άλλου. Στα πλαίσια της εργασίας αυτής η αντίδραση λιγάσης χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά που έπρεπε να εισαχθεί ένα τμήμα DNA (ένθεμα) σε κάποιο γραμμικό πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος έφερε συμβατά κολλώδη άκρα με το εισαγόμενο τμήμα. Με τον τρόπο αυτό, γραμμικός φορέας και εισαγόμενο τμήμα δημιουργούν το μόριο ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα. Θεωρητικά, στην αντίδραση απαιτούνται ισάριθμα άκρα φορέα και εισαγόμενου τμήματος και η γενική τους συγκέντρωση

στο διάλυμα πρέπει να είναι της τάξεως των 100ng/μl. Ωστόσο, στην πράξη, οι ιδανικές αναλογίες άκρων [πλασμιδιακού φορέα/ εισαγόμενου τμήματος] μπορούν να κυμαίνονται μεταξύ 1:1 και 1:10. Ακολούθησε η πρακτική να χρησιμοποιήθηκε η σχετική αναλογία των 1:2 σαν αρχική προσέγγιση. Για τον υπολογισμό των ποσοτήτων πλασμιδιακού φορέα και εισαγόμενου τμήματος. Η αντίδραση πραγματοποιείται στο μικρό όγκο των 10μl ώστε να ευνοηθούν οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις εισαγόμενου τμήματος και γραμμικού φορέα σε βάρος των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων.

Σε αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο αναμείχθηκαν:

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
Ένθεμα	Εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA στο διάλυμα
Γραμμικός φορέας	Εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA στο διάλυμα
10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	1
T4 DNA λιγάση	0,4
ddH ₂ O	Συμπληρώνεται για τελικό όγκο 10μl
Τελικός όγκος	10

Ανάμιξη του δείγματος και επώαση του στους 16 °C για 16 ώρες.

2.1.2.9. Μετασηματισμός κυττάρων *E. coli*

Το επόμενο στάδιο για την κλωνοποίηση των ανασυνδιασμένων πλασμιδιακών φορέων είναι αυτό του μετασηματισμού δεκτικών κυττάρων *E. coli* με το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο:

1. Τα δεκτικά κύτταρα *E. coli* (εντός πλαστικών φιαλιδίων 1,5ml) ξεπαγώνουν αργά στους 4 °C (σε πάγο).
2. Προστέθηκε η μισή αντίδραση λιγάσης (5μl), ισοδυναμεί με 50-250ng πλασμιδιακού φορέα, το μείγμα αναδεύεται προσεκτικά και τα κύτταρα επώαστην στον πάγο για 20'.

3. Τα φιαλίδια μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42 °C για 90'' (θερμικό σοκ).
4. Προστέθηκαν 1ml στείρου θρεπτικού διαλύματος LB και τα φιαλίδια μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο 37°C για 1 ώρα.
5. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 30'' στις 13000 στροφές/λεπτό, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 100μl στείρου διαλύματος LB.
6. Μισό από το εναιώρημα των κυττάρων (50μl) επιστρώνεται στα κατάλληλα τρυβλία επιλογής, ενώ το άλλο μισό φυλάσσεται στο ψυγείο.
7. Επώαση των τρυβλίων για 15-20 ώρες στους 37°C για την ανάπτυξη των αποικιών.

2.1.2.10. Μετασηματισμός κυττάρων *A. tumefaciens*

Ο μετασηματισμός των αγροβακτηρίων χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη κατάλληλων στελεχών με ακόλουθο στόχο τον σταθερό ή παροδικό μετασηματισμό φυτών *A.thaliana* και *N.benthamiana* αντιστοίχως. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή της απότομης ψύξης/απόψυξης των κυττάρων, όπου και ακολούθήθηκαν οι εξής χειρισμοί:

1. Δεκτικά κύτταρα *A.tumefaciens* εντός φιαλιδίων 1,5ml (φυλάσσονται στους -80o C) αφήνονται να ξεπαγώσουν στον πάγο.
2. προστέθηκαν 1-2μg πλασμιδιακού DNA και τα φιαλίδια εμβαπτίζονται για απότομο πάγωμα σε υγρό άζωτο.
3. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37oC για 5'.
4. προστέθηκαν 1ml στείρου θρεπτικού διαλύματος LB και τα φιαλίδια επώαστηκε στους 28°C για 2-4 ώρες υπό ανάδευση.
5. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 30'' στις 12000 στροφές/λεπτό, το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 50μl στείρου θρεπτικού διαλύματος LB.
6. Το εναιώρημα των μετασηματισμένων κυττάρων επιστρώνεται σε κατάλληλα τρυβλία επιλογής.
7. Επώαση των τρυβλίων κλίβανο θερμοκρασίας 28°C για 48 ώρες για ανάπτυξη των αποικιών.

2.1.2.15. Παροδικός μετασχηματισμός επιδερμικών κυττάρων φύλλων *N.benthamiana*

Στα πλαίσια της εργασίας έγινε παροδικός μετασχηματισμός σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων του φυτού *N.benthamiana*. Ο μετασχηματισμός και στις δύο περιπτώσεις έγινε με τη βοήθεια κατάλληλα σχεδιασμένων πλασμιδίων και στελεχών του αγροβακτηρίου *A.tumefaciens*. Συνοπτικά, οι τεχνικές βασίζονται στην ικανότητα ειδικών στελεχών του αγροβακτηρίου να μολύνουν φυτικά κύτταρα, εισάγοντας σε αυτά τμήμα αγροβακτηριακού DNA, το οποίο εμπεριέχεται εντός του Tι πλασμιδίου και το οποίο ενσωματώνεται σε τυχαίες χρωμοσωμικές θέσεις στο γονιδίωμα των φυτών (Χατζόπουλος, 2001). Για τη μεταφορά του T-DNA από το Tι πλασμίδιο στο φυτό απαιτούνται κυρίως: i) η ύπαρξη ειδικών αναγνωριστικών αλληλουχιών στα άκρα του T-DNA και συγκεκριμένα το δεξί συνοριακό (RB) και το αριστερό (LB) συνοριακό και ii) ένα σύνολο γονιδίων τοξικότητας *Vir* τα οποία εντοπίζονται κυρίως στο Tι πλασμίδιο και είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση, πολλαπλασιασμό και μεταφορά του T-DNA τμήματος στο φυτικό γονιδίωμα. Για την ανάπτυξη του αγροβακτηρίου ως εργαλείο μετασχηματισμού των φυτών στο εργαστήριο, έχουν δημιουργηθεί Tι πλασμιδιακοί φορείς, από τους οποίους έχουν αφαιρεθεί τα γονίδια σύνθεσης οπινών μεταξύ των LB και RB συνοριακών στο T-DNA και έχουν αντικατασταθεί με αλληλουχίες ενδιαφέροντος, όπως γονίδια επιλογής σε αντιβιοτικά, γονίδια δεικτών και άλλες επιθυμητές μοριακές κατασκευές. Επίσης, έχουν δημιουργηθεί συστήματα μεταφοράς, όπως το δυαδικό σύστημα, στο οποίο το Tι πλασμίδιο έχει χωριστεί σε δύο ανεξάρτητα πλασμίδια, εκ των οποίων το ένα περιέχει τα γονίδια τοξικότητας *Vir* και το δεύτερο περιέχει την περιοχή T-DNA, στην οποία κλωνοποιούνται τα επιθυμητά γονίδια και οι γονιδιακές κατασκευές. Ο διαχωρισμός του T-DNA σε δυαδικούς φορείς έχει επιτρέψει την κλωνοποίηση μεγαλύτερων τμημάτων εντός του T-DNA εφόσον έτσι τα πλασμίδια είναι μικρότερα και πιο εύχρηστα. Επίσης, στα δυαδικά πλασμίδια που φέρουν το T-DNA έχουν εισαχθεί και αρχές αντιγραφής ειδικές για το *E. coli* για τον προφανή λόγο της επεξεργασίας τους με όλες τις συνήθεις μοριακές τεχνικές κλωνοποίησης και απομόνωσης DNA.

Πειραματική διαδικασία

Ο παροδικός μετασχηματισμός στο *N.benthamiana* πραγματοποιήθηκε με ένεση εναιωρήματος αγροβακτηρίων στο μεσόφυλλο. Ακολουθήθηκαν οι εξής χειρισμοί:

1. Όταν τα φυτά είναι σε κατάλληλο στάδιο για μετασχηματισμό (περίπου 5-6 εβδομάδων) προετοιμάζεται καλλιέργεια στελέχους GV3101 αγροβακτηρίου μετασχηματισμένο με τους κατάλληλους δυαδικούς φορείς. Μονή αποικία από το βακτηριακό στέλεχος εμβολιάζεται σε 8ml αποστειρωμένου YEB συμπληρωμένο με 50mg/l ριφαμπικίνη (επιλογή στελέχους GV3101), 25mg/l γκενταμυκίνη (επιλογή του T_i πλασμιδίου που φέρει τα γονίδια Vir) και κατάλληλο αντιβιοτικό για τον δυαδικό φορέα που φέρει το αλληλουχίες ενδιαφέροντος (T-DNA) ενδιαφέροντος (π.χ. 50mg/l καναμυκίνη). επώαστηκε υπό ανάδευση στους 28°C για 20-24 ώρες.
2. 8ml από την καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε πλαστικό φιαλίδιο των 10ml και φυγοκεντρήθηκαν για 10' στις 12000 στροφές/λεπτό.
3. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 1,5ml διαλύματος εμβολιασμού και το διάλυμα των κυττάρων διαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος εμβολιασμού ώστε η οπτική του πυκνότητα να είναι OD₆₀₀=1 για τα στελέχη φέροντα πλασμίδια που προέρχονται από τα pSPYNE και pSPYCE και για το στέλεχος που φέρει την p19 πρωτεΐνη (ενισχυτής σήματος).
4. Ανάμιξη των βακτηριακών εναιωρημάτων σε ίσες ποσότητες και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-4 ώρες
5. Το εναιώρημα τοποθετήθηκε σε σύριγγα (χωρίς βελόνα) και τα κύτταρα ενέσονται στο μεσόφυλλο από την κάτω επιφάνεια.
6. Τα φυτά επιστρέφουν στο θάλαμο καλλιέργειας. Απαιτούνται 40-48 ώρες για την έκφραση των γονιδίων από τα μετασχηματισμένα επιδερμικά κύτταρα.

2.1.2.16. Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του RNA από τους φυτικούς ιστούς έγινε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο φαινόλης/Sevac. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις τυπικές εργαστηριακές συνθήκες, το RNA συγκριτικά με το DNA είναι ένα πολύ ευπαθές μόριο εξαιτίας της ταχύτατης αποικοδόμησής του από άφθονες RNάσες του περιβάλλοντος χώρου. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στην καθαριότητα του χώρου (π.χ. αποφυγή σκόνης), στη σχολαστική αποστείρωση όλων των υλικών και υδατικών διαλυμάτων που

χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και στην αποφυγή χρονοτριβής μεταξύ των διάφορων χειρισμών. Η μέθοδος περιλαμβάνει τους εξής χειρισμούς:

1. Για την απομόνωση ολικού RNA από αρτίβλαστα *A.thaliana* σε στείρα πλαστικά φιαλίδια των 1,5ml ζυγίζονται περίπου 100mg κυττάρων από καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό μέσο.
2. Προστέθηκαν 400μl αποστειρωμένου διαλύματος A (βλ. παρ. 2.2.1. N) και ο φυτικός ιστός ομογενοποιείται μέσα στα φιαλίδια με τη βοήθεια αποστειρωμένων πλαστικών εμβόλων.
3. Προστέθηκαν 400μl φαινόλης pH 7,5 και το μείγμα αναταράσσεται δυναμικά για 2 - 3 λεπτά.
4. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5' στις 13000 στροφές/λεπτό .
5. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε νέο στείρο πλαστικό φιαλίδιο. Επαναλαμβάνονται τα βήματα 3 και 4.
6. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε, τοποθετήθηκε σε νέο στείρο πλαστικό φιαλίδιο και προστέθηκαν 400μl μείγματος ίσου όγκου φαινόλης/Sevac. Το μείγμα αναταράσσεται δυναμικά για ένα λεπτό.
7. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5' στις 13000 στροφές/λεπτό.
8. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε νέο στείρο πλαστικό φιαλίδιο. Επαναλαμβάνονται τα βήματα 6 και 7.
9. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο σε νέο στείρο πλαστικό φιαλίδιο και προστέθηκαν 400μl διαλύματος Sevac. Το μείγμα αναταράσσεται δυναμικά για μερικά δευτερόλεπτα και φυγοκεντρήθηκε για 1' στις 13000 στροφές/λεπτό.
10. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε εντός νέου πλαστικού φιαλιδίου, όπου προστέθηκαν 2 όγκοι (περίπου 900μl) παγωμένης αιθανόλης (-20 °C) και 15μl όγκοι στείρου διαλύματος NH₄OAc 5M. Το μείγμα αναδεύεται και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη -20 °C για 15-20 ώρες.
11. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13000 στροφές/λεπτό για 10'.
12. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκαν 0,5ml παγωμένης αιθανόλης 70%. Ισχυρή ανάδευση των δειγμάτων και φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές/λεπτό για 10'.

13. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα πλαστικά φιαλίδια αφήνονται ανοικτά πάνω σε πάγο για 5-10 λεπτά ώστε να εξατμιστούν τα υπολείμματα της αιθανόλης στο ίζημα των ολικών RNA.

14. Το ίζημα διαλύθηκε σε 80μl στείρου ddH₂O.

15. 4μl των δειγμάτων ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης για να ελεγχθεί τυχών αποδόμηση του RNA (πρέπει να διακρίνονται οι τρεις μπάντες των 25S, 18S και 5,8S rRNAs).

Στο στάδιο αυτό έχει απομονωθεί τόσο το ολικό RNA, όσο και το γονιδιωματικό DNA. Η απομάκρυνση του γονιδιακού DNA από τα δείγματα συντελείται στα επόμενα στάδια.

16. Σε στείρο πλαστικό φιαλίδιο προστέθηκαν και αναμίχθηκαν:

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
Ολικό RNA	20-40
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	5
DNάση (5U/μl)	0,6
Παρεμποδιστής RNάσων (40u/μl)	0,5
ddH ₂ O	
Τελικός όγκος	50

17. Επώαση των δειγμάτων για 20' στους 37°C.

18. Στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκαν 2,5μl EDTA 0,5M

19. Απενεργοποίηση της DNάσης με τη μέθοδο φαινόλης/Sevac (όπως περιγράφεται παραπάνω).

20. Τα δείγματα αναδεύονται και τοποθετήθηκαν στους -20 °C για 15-20 ώρες.

20. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 20' στις 13000 στροφές/λεπτό .

21. Επαναλαμβάνονται τα βήματα 12-15.

Τα δείγματα παρέμειναν στον πάγο καθ όλη τη διάρκεια επόμενων χειρισμών, π.χ. της μέτρησης της συγκέντρωσης και της εκτίμηση της καθαρότητας του απομονωμένου RNA. Φυλάσσονται στους - 20 °C.

2.1.2.19. Σύνθεση cDNA

Το cDNA παρήχθει από το ολικό mRNA με τη βοήθεια του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης, το οποίο καταλύει την αντίδραση σύνθεσης μονόκλωνου DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το RNA και ως δομικά υλικά τα dNTPs του διαλύματος αντίδρασης. Όπως και στην περίπτωση των DNA πολυμερασών απαιτούνται εκκινητές στα σημεία έναρξης του 5'→3' πολυμερισμού. Για να μεταγραφούν λοιπόν εκλεκτικά τα mRNAs από το ολικό RNA που έχει απομονωθεί χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ολιγονουκλεοτίδιων πολύ-θυμίνης οι οποίοι υβριδοποιούνται εκλεκτικά στις "ουρές" πολυ-αδενίνης που βρίσκονται στο 3' άκρο των mRNAs. Με αυτόν τον τρόπο, η συνολική γονιδιακή έκφραση που αντικατοπτρίζεται από το σύνολο των mRNAs ενός δείγματος μεταφράζεται σε σύνολο μονόκλωνων DNA μορίων. Το cDNA που συντίθεται μπορεί να χρησιμοποιήθηκε ακολούθως ως υπόστρωμα σε αντιδράσεις PCR για την κλωνοποίηση ενός γονιδίου ή για πειράματα εκτίμησης της γονιδιακής έκφρασης.

1. Σε στείρο πλαστικό φιαλίδιο προστέθηκαν και αναμίχθηκαν:

Ολικό RNA	Εξαρτάται από την συγκέντρωση RNA που απομονώθηκε
Όλιγο-T εκκινητής (100pmoles/μl)	0,5
dNTP's (10mM)	1
ddH ₂ O	Συμπληρώνεται για τελικό όγκο 10μl
Τελικός όγκος	10

Η αντίδραση τοποθετήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στους 65°C για 5min.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο και προστέθηκαν το 10μl του παρακάτω μίγματος αντιδραστηρίων.

5x ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου RT	4
Παρεμποδιστής RNάσων (40u/μl)	0,5
Ανάστροφη μεταγραφάση (Primscript)	0,5
ddH ₂ O	5
Τελικός όγκος	10

Η αντίδραση τοποθετήθηκε σε θερμοκυκλικό μηχάνημα και εκτελέστηκε το παρακάτω πρόγραμμα διαδοχικών επώσεων.

Χρόνος / θερμοκρασία T °C
42 °C για 45min
70 °C για 15min

Στα δείγματα προστέθηκαν 30μl ddH₂O και φυλάχθηκαν στους -20°C.

2.1.2.19. Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Η ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έγινε από την εταιρία Macrogen.

2.1.3. Ενότητες εργασιών

2.1.3.1. Κλωνοποίηση προϊόντος PCR ως τμήμα ενζύμων περιορισμού σε πλασμιδιακό φορέα

Στις παραγράφους των αποτελεσμάτων, όπου αναφέρεται ότι ένα προϊόν της PCR έχει κλωνοποιηθεί ως τμήμα ενζύμων περιορισμού σε έναν πλασμιδιακό φορέα, θα εννοείται πως έχει διεξαχθεί η εξής ακολουθία εργασιών:

1. Το σύνολο της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκε και απομονώθηκε η ζώνη ενδιαφέροντος.
2. Το DNA εξάγεται από τη ζώνη αγαρόζης και ηλεκτροφορήθηκε δείγμα του (5μl) ώστε να εκτιμηθεί κατά προσέγγιση η συγκέντρωσή του.
3. Πέψη του DNA που εξήχθη με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού για τη δημιουργία κολλωδών άκρων.
4. Καθαρισμός του DNA από το διάλυμα αντίδρασης ενζύμων περιορισμού.

5. Πέψη του κατάλληλου πλασμιδιακού φορέα με τα ίδια ένζυμα περιορισμού για τη δημιουργία συμβατών κολλωδών άκρων με το PCR προϊόν.
 6. Ηλεκτροφόρηση του συνόλου της αντίδρασης πέψης και καθαρισμός του DNA από το διάλυμα αντίδρασης ενζύμων περιορισμού.
 7. Ηλεκτροφόρηση στο ίδιο πήκτωμα αγαρόζης δείγματος 2μl από PCR προϊόν (από βήμα 4) και 2μl γραμμικού φορέα (από βήμα 7). Εκτιμώνται οι σχετικές τους ποσότητες και συγκεντρώσεις στα δείγματα με τη βοήθεια μάρτυρα μοριακών βαρών.
 8. Αντίδραση λιγάσης μεταξύ PCR προϊόντος (από βήμα 4) και γραμμικού φορέα (από βήμα 7).
 10. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με το προϊόν της λιγάσης.
 11. Ανάπτυξη των αποικιών των μετασχηματισμένων κυττάρων στα τρυβλία επιλογής και ασηπτικός εμβολιασμός τους σε υγρά θρεπτικά για τη δημιουργία υγρών καλλιέργειών. Ο αριθμός των αποικιών που εμβολιάζονται για υγρές καλλιέργειες ή ελέγχονται με colony PCR αποφασίζεται από την απόδοση της αντίδρασης λιγάσης ύστερα από σύγκριση με τον σχετικό αρνητικό ή θετικό μάρτυρα.
 12. Απομόνωση πλασμιδιακών κλώνων από τις καλλιέργειες και ενδεικτικές πέψεις αυτών για την εύρεση ορθού κλώνου ή με colony PCR.
 13. Επιλέχθηκε μια καλλιέργεια με ορθό πλασμιδιακό κλώνο και ακολουθεί εκ νέου απομόνωση του πλασμιδίου με Kit.
- Στις περιπτώσεις όπου αναφέρεται ότι ένα τμήμα DNA υποκλωνοποιήθηκε από έναν πλασμιδιακό φορέα σε κάποιο άλλο πλασμίδιο, το τμήμα αυτό λήφθηκαν με ανάλογες διαδοχικές διεργασίες, (ενζυμική πέψη, ηλεκτροφόρηση και απομόνωση της ζώνης αγαρόζης, και καθαρισμός του DNA με Kit). Συνεχίζουμε από το βήμα 6.

2.1.3.2. Επίδραση μετάλλων σε αρτίβλαστα *A.thaliana*

Για την εκτίμηση της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων *sbp1,2,3*, *fba*, *garpdh*, *gpx6*, *gst9* φυτικών ιστών *A.thaliana* που έχουν εκτεθεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων έγινε προσθήκη διαλυμάτων μετάλλων χλωριούχου χαλκού και τριοξειδίου του χρωμίου διαφόρων συγκεντρώσεων σε υγρές καλλιέργειες αρτίβλάστων *A.thaliana*. Τα αποστειρωμένα σπέρματα (βλ.2.1.1.2) εμβολιάστηκαν

σε κωνικές που περιείχαν 49 ml στείρο υγρό βασικό θρεπτικό μέσο MS, σε στείρες συνθήκες. Η καλλιέργεια έγινε υπό ανάδευση (150rpm) στους 22°C. Στις καλλιέργειες *A.thaliana* 5 ημερών προστέθηκαν 1ml διαλύματος μετάλλου κατάλληλης συγκέντρωσης έτσι ώστε να επιτευχθούν οι επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις των μετάλλων στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (5, 50, 100, 150, 500μM). Τα δείγματα φυτικού ιστού συλλέχθηκαν 24, 48 και 72 ώρες μετά την προσθήκη των διαλυμάτων μετάλλων σε αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια και ψύχθηκαν στους -80 °C για να χρησιμοποιηθούν για απομόνωση ολικού RNA. Στα ίδια χρονικά διαστήματα (24, 48 και 72 ώρες) συλλέχθηκαν και δείγματα φυτικών ιστών στα οποία δεν έγινε επίδραση με μέταλλα αλλά αναπτύχθηκαν στις ίδιες συνθήκες για να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες της έκφρασης των γονιδίων υπο φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης του φυτού.

Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν αρχικά διαλύματα χλωριούχου χαλκού (CuCl_2) και τριοξειδίου του χρωμίου (CrO_3) συγκέντρωσης 50mM (διάλυμα Α). Απο τα αρχικά διαλύματα παρασκευάστηκαν τα διαλύματα Β,Γ,Δ,Ε,Ζ έτσι ώστε με προσθήκη 1ml αυτών σε 49ml καλλιέργειας *A.thaliana* να επιτευχθούν οι τελικές συγκεντρώσεις 5, 50, 100, 150, 500μM αντίστοιχα στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Για παράδειγμα, για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 50μM στο υπόστρωμα καλλιέργειας *A.thaliana*, την παρασκευάστηκε το διάλυμα Γ (2,5mM) από το αρχικό διάλυμα. 2,5ml μητρικού διαλύματος προστέθηκαν στο διάλυμα Γ με τελικό όγκο 50ml και 1ml διαλύματος Γ προστέθηκε σε 49ml καλλιέργεια *A.thaliana* 5 ημερών.

2.2 ΥΛΙΚΑ

2.2.1. Διαλύματα, θρεπτικά υποστρώματα, αντιβιοτικά

2.2.1.1. Θρεπτικά υποστρώματα

- ✓ **MS (Murashige and Skooge).** Για την προπαρασκευή 1l θρεπτικού MS, σε 950ml αποσταγμένου νερού διαλύονται 4,3g MS αλάτων, 1ml διαλύματος βιταμινών 1000x, 10g σακχαρόζη και 0,5g MES (2[N-Morpholino]ethanesulfonic acid). Το pH του θρεπτικού ρυθμίστηκε στο 5.7

με διάλυμα KOH 1N και το διάλυμα ογκομετρείται στο 1l. Προστέθηκαν 8g Bacto-agar και το θρεπτικό αποστειρώθηκαν.

- ✓ **LB (*Luria-Bertani*)**. Για την προπαρασκευή 1l LB, σε 950ml αποσταγμένου νερού προστέθηκαν 5g yeast extract, 10g tryptone, 10g NaCl. Συμπληρώνεται με αποσταμένο νερό ως το 1l. Για την προπαρασκευή τρυβλίων στέρεου θρεπτικού LB προστέθηκαν 15g Bacto-agar. Τα θρεπτικά αποστειρώθηκαν.
- ✓ **YEB**.

2.2.1.2. Γενικά ρυθμιστικά διαλύματα

- ✓ 1 M Tris-HCl pH 7, pH 7.5, pH 8, pH 8.5, pH 9, pH 9.5. Για την προπαρασκευή 100ml κάθε διαλύματος 1M Tris-HCl ειδικού pH, διαλύονται 12.1 g βάσης Trizma (tris-hydroxymethyl aminomethane) σε αποσταγμένο νερό, και το Ph ρυθμίστηκε με HCl. Τα διαλύματα αποστειρώθηκαν.
- ✓ 0,5M EDTA pH 8. Για την προπαρασκευή 500ml διαλύματος, χρησιμοποιήθηκε 93g EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid). Το pH ρυθμίστηκε στο 8 με διάλυμα NaOH 10N. Το διάλυμα αποστειρώθηκαν.
- ✓ TE pH 8. Για την προπαρασκευή 50ml διαλύματος, χρησιμοποιήθηκε 500μl 1M Tris-HCl pH 8, και 100μl 0,5 M EDTA pH 8. Συμπληρώνεται με στείρο αποσταγμένο νερό.

2.2.1.3. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

- ✓ 50x TAE. Για την προπαρασκευή 1l διαλύματος αναμείχθηκαν 100ml 0,5M EDTA pH 8.0, 57ml οξικό οξύ και 242g Trizma base και το διάλυμα ογκομετρείται στο 1l.
- ✓ 10mg/ml EtBr (βρωμιούχο αιθίδιο). 1gr βρωμιούχου αιθιδίου διαλύθηκε σε 100ml αποσταγμένου ύδατος. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό δοχείο.
- ✓ 10x διάλυμα φόρτωσης. 1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 50% Γλυκερόλη, 0.05% μπλε της βρωμοφαινόλης. Παρασκευάζονται 10ml με αποσταγμένο στείρο νερό, και φυλάσσεται στους -20°C.
- ✓ Μάρτυρας μοριακών μεγεθών DNA. Χρησιμοποιήθηκε ο 1kb Ladder της Invitrogen.

2.2.1.4. Αντιδραστήρια PCR και εκκινητές

- ✓ Ένζυμα. Χρησιμοποιήθηκαν οι DNA θερμοανθεκτικές πολυμεράσες Expand™ High Fidelity PCR System της GmbH, και Taq της Invitrogen.
- ✓ dNTPs. Από την Invitrogen.
- ✓ 10x ρυθμιστικά. 10x buffer ExpandHF (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Tween). 10x buffer Taq (200mM Tris-HCl pH 8,4 , 500mM KCl)
- ✓ 50mM MgCl₂. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα της Invitrogen.
- ✓ Εκκινητές. Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω (Πίνακας 2.1.) εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων

Πίνακας 2.1. Αλληλουχίες εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων

Εκκινητής	Αλληλουχία 5 -> 3	Tm	Μέγεθος προϊόντος (bp)
18S- RT			
18S-F	AACCAACGTCGGCACTCGTTCG		500
18S-R	AGCTGAGGAAACGTCGGCCAA		
ALDH11A3 (NM_201797.2)			
NM_201797.2F	CGCGGTGATGGAACTGGCGA	60	822
NM_201797.2R	GGCGGTCCCACCGTGAGTTT	60	
FBA (NM_120057.3)			
NM_120057.3F	AGGGAGGAGTGAGAGATAAGGGTGG	58	657
NM_120057.3R	GCCATTTGGCGAAACGCGCA	60	
FBA (NM_127705.3)			
NM_127705.3F	CACCGTCCGAGCCGCTTCTG	60	868
NM_127705.3R	GTGCCATGGGTTCCGGTGCCT	59	
SBP1- RT			
RT-SBP1-F	TGGCGACGGAAACGGAAGTTGTA	58	503
RT-SBP1-R	ACAGGACACCAAGATCTCGCCCGTGG	63	

Συνέχεια του Πίνακα 2.1.			
SBP2- RT			
RT-SBP2-F	GCAACCGAAACCGTATTAGCCACGG	60	525
RT-SBP2-R	GTTCCCTTTGGCGTTTCCTTCTTTG	57	
SBP3- RT			
RT-SBP3-F	CGAAAATGGAAGCGGCGATGAACAACCACG	64	413
RT-SBP3-R	CTCCAAAACCTCTGCAGGGTCCACG	61	
ALD11A3-SPLIT GFP			
ALD11A3(XbaI)F	GGGTCTAGAATGGAAGTGGCGAAATCAGCTC	55	1311
ALD11A3(XmaI)R	ATCCCCGGGACCCATAGAGTAAGAAGGTGTAGGC	58	
AtGPX6- RT			
RT- AtGPX6-F	TGGCTGCTTCTCCGAACCCAA		
RT- AtGPX6-R	TGGGGCAGCTTTGTACCGT		
AtGSTF9- RT			
RT- AtGSTF9-F	AGGGCGTTGCCTTCGAGACC		
RT- AtGSTF9-R	CATCCCACCACGCGCTCACG		
FBA-SPLIT GFP			
AtFBA(XbaI)F	GGGTCTAGAATGCACGAGCCCGGAGCTGAG	60	386
AtFBA(XmaI)R	CATCCCCGGGATAGGTGTACCCTTTGACG	52	
AtSBP1-SPLIT GFP			
AtSBP1-SPLIT GFP-F	GACTCTAGAATGGCGACGGAAACGGAAGTTGTAGC		
AtSBP1-SPLIT GFP-R	CATCCCCGGAATCCAGATATCGGAAGTGCAGTCTCC		

* Για τον υπολογισμό της Tm δεν συμπεριλαμβάνονται οι αλληλουχίες αναγνωριστικών θέσεων περιοριστικών ενζύμων που έχουν προστεθεί στους εκκινητές.

2.2.1.5. Διαλύματα/Αντιδραστήρια απομόνωσης πλασμιδίων

Διάλυμα 1. 50mM γλυκόζη, 10mM EDTA, 25Mm Tris-HCl pH 8. Για την προπαρασκευή 200ml διαλύματος 1, αναμίχθηκαν 4ml EDTA 0,5M pH 8,5, 5ml Tris-HCL pH 8, και 1,8g γλυκόζη.

- ✓ Διάλυμα 2. Παρασκευάστηκε φρέσκο λίγο πριν την απομόνωση. 1 %(w/v) SDS, 0,2M NaOH. Για την προπαρασκευή 1ml ιαλύματος 2, σε 930μl αποσταγμένου ύδατος προστέθηκαν 50μl SDS 20% και 20μl NaOH 10N.
- ✓ Διάλυμα 3. 2M CH₃COOH, 3M (CH₃COO)₂Ca, pH 5,6.
- ✓ RNάση I. 50U/μl από NEB.

2.2.1.7. Αντιδραστήρια περιοριστικών ενδονουκλεασών

- ✓ Ένζυμα. Χρησιμοποιήθηκαν περιοριστικές ενδονουκλεάσες της εταιρίας NEB: *EcoRI*, *HindIII*, *XhoI*, *XmaI*, *XbaI*.
- ✓ 10x ρυθμιστικά διαλύματα. Ανάλογα με το συνδυασμό των ενδονουκλεασών στις επιμέρους ενζυμικές πέψεις επιλέγεται το κατάλληλο 10x ρυθμιστικό διάλυμα της εταιρίας NEB. *NEBuffer 1*: 100mM Bis Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol pH 7.0 (για *EcoRI*, *KpnI*, *PstI*, *SpeI*), *NEBuffer2* : 500mM NaCl, 100mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol pH 7,9 (για *BamHI*, *EcoRI*, *XhoI*), *NEBuffer3* : 1M NaCl, 500mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol pH 7,9 (για *BamHI*, *EcoRI*, *XhoI*), *NEBuffer4* : 500mM potassium acetate, 200mM Tris-acetate, 100mM magnesium acetate, 10mM dithiothreitol pH 7,9 (για *BamHI*, *EcoRI*, *NdeI*, *SpeI*, *XhoI*).
- ✓ BSA (*Bovine serum albumin*). Ιάλυμα BSA 100mg/ml (1000x) της NEB.

2.2.1.8. Διαλύματα/Αντιδραστήρια αντίδρασης λιγάσης

- ✓ Ένζυμο. Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T4 DNA ligase 25U/μl της Takara.
- ✓ 10x ρυθμιστικό. Από Takara : 660 mM Tris-HCl (pH 7,6), 66 mM MgCl₂, 100 mM DTT και 1 mM ATP.

2.2.1.9. Διαλύματα μετασηματισμού φυτών

- ✓ Διάλυμα εμβολιασμού (Μετασηματισμός *N. benthamiana*). Για την προπαρασκευή 50ml διαλύματος εμβολιασμού διαλύονται σε αποσταγμένο νερό, 2ml διαλύματος MES-KOH 500mM, 333μl MgCl₂ 3M, 100μl 150mM ακετοσυριγκόνη (3',5' dimethoxy-4' hydroxyl acetophenone).

2.2.1.10. Διαλύματα/Αντιδραστήρια απομόνωσης ολικού RNA

Διάλυμα Α. 100mM Tris-HCl pH 9,5, 0,5% SDS. Το διάλυμα αποστειρώθηκαν. Φαινόλη pH 7,5. από SIGMA.

- ✓ *Sevag*. Διάλυμα 24 : 1 χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης.
- ✓ 10x ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης. Από NEB. 100mM Tris-HCl, 25mM MgCl₂, 5mM CaCl₂ pH 7.6.
- ✓ DNάση I. Χρησιμοποιήθηκε ένζυμο της NEB συγκέντρωσης 2U/μl.
- ✓ 5M NH₄OAc.
- ✓ Ισοπροπανόλη. Από FLUKA.

2.2.1.11. Διαλύματα/Αντιδραστήρια σύνθεσης cDNA

- ✓ Όλιγο-T εκκινητής. dT18 Συγκέντρωσης 100pmoles/μl.
- ✓ 5x ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου RT. Invitrogen: 250mM Tris-HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂.
- ✓ 100mM DTT. Invitrogen.
- ✓ dNTPs. (όμοια με αντίδραση PCR)
- ✓ Παρεμποδιστής RNAσών. RNAguard™, Amersham Pharmacia Biotech.
- ✓ Ένζυμο. Ανάστροφη μεταγραφάση Expand RT (50U/μl), Invitrogen.

2.2.1.17. Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά διαλύθηκαν στους κατάλληλους διαλύτες και στη πλειοψηφία των περιπτώσεων σε κατάλληλες συγκεντρώσεις έτσι ώστε να προκύψουν stock διαλύματα 1000x συμπυκνωμένα των τελικών συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών στα θρεπτικά μέσα.

- ✓ Καναμυκίνη 50mg/ml. Διαλύτης αποσταγμένο στείρο νερό.
- ✓ Αμπικιλίνη 100mg/ml. Διαλύτης αποσταγμένο στείρο νερό.
- ✓ Ριφαμυκίνη 15mg/ml. Διαλύτης αιθανόλη/μεθανόλη 1:1.
- ✓ Γκενταμυκίνη 25mg/ml. Διαλύτης αποσταγμένο στείρο νερό.

2.2.1.18. Φυτικό υλικό, στελέχη βακτηρίων

Φυτικό υλικό. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε το σταυρανθές *A.thaliana*, οικότυπου *Columbia*, το οποίο αποτελεί σήμερα τον πλέον

διαδεδομένο οργανισμό μοντέλο για πειράματα Μοριακής Βιολογίας στα ανώτερα φυτά. Για τα πειράματα του φθορισμού διμοριακής συμπληρωματικότητας χρησιμοποιήθηκαν φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana*, (οικ Solanaceae). Το συγγενές με τον καπνό φυτό *N. benthamiana*, με καταγωγή από την Αυστραλία, χρησιμοποιήθηκε ευρέως στις μέρες μας ως πρότυπος οργανισμός, ιδιαίτερα για μελέτες ιολογίας και σηματοδοτικών μονοπατιών άμυνας στα φυτά, αλλά και για μελέτες που αφορούν τον εντοπισμό και την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών.

Βακτηριακά στελέχη. Για το σύνολο των εργασιών κλωνοποίησης και δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *Escherichia coli* του στελέχους DH5α. Για το σύνολο των μετασηματισμών στα φυτά χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του στελέχους GV3101 του *A.tumefaciens*, στο οποίο το Tι πλασμίδιο εμπεριέχει τα Vir γονίδια μεταφοράς του TDNA, καθώς και γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό γενταμικίνη. Ο δείκτης για την επιλογή του στελέχους GV3101 είναι το αντιβιοτικό ριφαμπικίνη.

2.2.2. Πλασμιδιακοί φορείς

Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 2.2.**) παρουσιάζονται οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

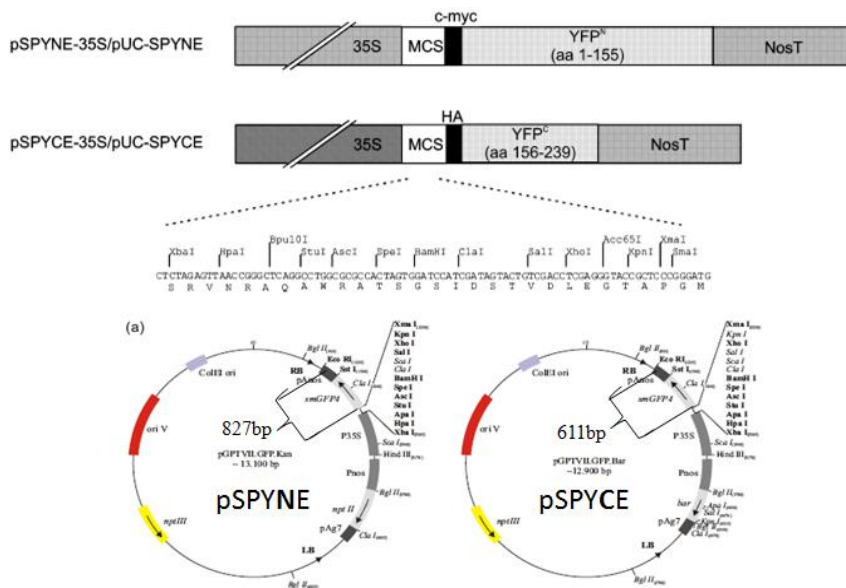
Πίνακας 2.2. Πλασμιδιακοί φορείς

ΌΝΟΜΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΕΠΙΛΟΓΗ
pSPYCE-35S	Διαδικός φορέας BiFC (Συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού)	Καναμυκίνη (50μg/ml) <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i>
pSPYNE-35S	Διαδικός φορέας BiFC (Συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού)	Καναμυκίνη (50μg/ml) <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i>
pSPYCE-pZIP63	Διαδικός φορέας BiFC θετικού μάρτυρα	Καναμυκίνη (50μg/ml) <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i>
pSPYNE-pZIP63	Διαδικός φορέας BiFC θετικού μάρτυρα	Καναμυκίνη (50μg/ml) <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i>

pJET1.2/blunt Cloning Vector		Αμπικικιλίνη <i>E. coli</i> 50mg/ml
35S:YFP	Διαδικός φορέας BiFC θετικού μάρτυρα	Αμπικικιλίνη 50mg/ml
35S:P19		Καναμυκίνη (50μg/ml) <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i>
pMP7204	Φορέας έκφρασης pET28a/ <i>AtGAPDH</i> (<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>)	Καναμυκίνη (50μg/ml) <i>E. coli</i>
pMP7205	Φορέας έκφρασης pET28a/ <i>AtGAPDH</i> (<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>)	Καναμυκίνη (50μg/ml) <i>E. coli</i>
pMP7203	pGEX3X vector/ <i>AtSBP1</i> (<i>EcoRI</i> fragment to the C-terminal of glutathione S-transferase (GST))	Αμπικικιλίνη (50μg/ml) <i>E. coli</i>

2.2.2.1. Πλασμιδιακοί φορείς pSPYNE-35S, pSPYCE-35S

Το γονίδιο της smGFP (soluble modified GFP) έχει υποκλωνοποιηθεί από τον φορέα psmGFP στον διαδικό φορέα pGPTV για να κατασκευαστούν οι φορείς κλωνοποίησης pSPYNE-35S και pSPYCE-35S (pGPTVII.GFP.Kan, **EIKONA 2.1.**) που περιέχουν το αμινοτελικό τμήμα της smGFP και το καρβοξυτελικό τμήμα της smGFP, αντίστοιχα (αα1-155 και αα156-239, αντίστοιχα). Όλες οι θέσεις στην περιοχή με τις πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης (MCS) βρίσκονται στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με την πρώτη μεθειονίνη της smGFP. Μέσω αυτών μπορούν να εισαχθούν γονίδια που θα υπερεκφράζονται σε μεταφραστική σύντηξη με τα τμήματα της smGFP, υπό τον έλεγχο του υποκινητή 35S του ιού του μωσαϊκού της ανθοκράμβης (CaMV) (**EIKONA 2.1.**)



ΕΙΚΟΝΑ 2.1. Χάρτες των πλασμιδιακών φορέων pSPYNE, pSPYCE [147].

2.2.2.2. Ο πλασμιδιακός φορέας pJET1.2/blunt Cloning Vector

Ο φορέας pJET1.2/blunt (Σχήμα 2.1) είναι ένας γραμμικός φορέας κλωνοποίησης που επιτρέπει την ένθεση τμημάτων DNA μεγέθους 6 bp μέχρι 10 kb και την απευθείας επιλογή κυττάρων μετασχηματισμένων με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα μέσω της διακοπής ενός θανατηφόρου γονιδίου. Τα 5' άκρα της θέσης κλωνοποίησης του φορέα περιέχουν φωσφορικές ομάδες, οπότε δεν απαιτείται φωσφορυλίωση των εκκινητών. Προϊόντα PCR με μη-κολλώδη άκρα που παράγονται με DNA πολυμεράσες με επιδιορθωτική δράση μπορούν να κλωνοποιηθούν απευθείας στον pJET1.2/blunt (**ΕΙΚΟΝΑ 2.2.**)

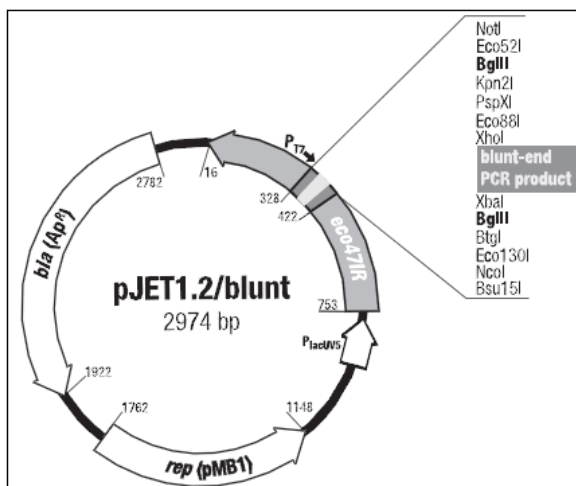


Fig. 1. pJET1.2/blunt Vector Map.

ΕΙΚΟΝΑ 2.2. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pJET1.2/blunt

3. Αποτελέσματα

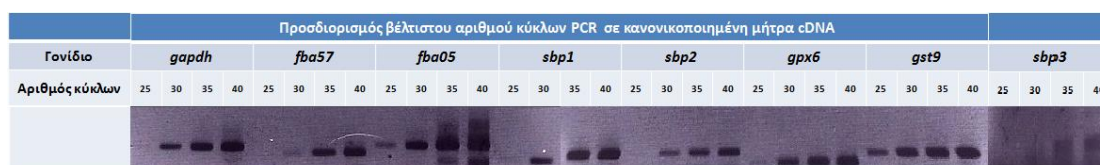
3.1. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *sbr1/2/3*, *gapdh*, *fba*, *gpx6* και *gst9* του *A.thaliana* σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης.

Με σκοπό να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης των τριών γονιδίων *sbr* του *A.thaliana* σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *gapdh*, *fba*, *gpx6* και *gst9* σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, πραγματοποιήθηκε επίδραση διάφορων συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων σε αρτίβλαστα *A.thaliana*. Συγκεκριμένα, υγρές καλλιέργειες αρτιβλάστων *A.thaliana* εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις χαλκού και εξασθενούς χρωμίου στο θρεπτικό υπόστρωμα. Οι τελικές συγκεντρώσεις των μετάλλων στο θρεπτικό μέ υπόστρωμα σε καλλιέργειας ήταν 5, 50, 150 και 500μM χρωμίου και 5, 50, 100 και 150μM χαλκού. Φυτικό υλικό ολόκληρων αρτίβλαστων συλλέχθηκε μετά από 24, 48 και 72 ώρες επίδρασης. Στα ίδια χρονικά διαστήματα (24, 48 και 72 ώρες) συλλέχθηκαν και δείγματα φυτικών ιστών τα οποία δεν κατεργάστηκαν με μέταλλα αλλά αναπτύχθηκαν στις ίδιες συνθήκες για να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες της έκφρασης των γονιδίων υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης του φυτού.

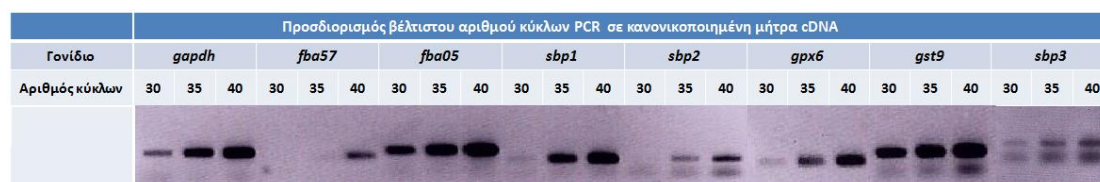
Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των μεταγραφημάτων των γονιδίων που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ημιποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης ανάστροφης μεταγραφάσης-πολυμεράσης (semi-quantitative RT-PCR). Από τα δείγματα που συλλέχθηκαν έγινε απομόνωση ολικού RNA με τη μέθοδο φαινόλης/SEVAG και απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA. Το ολικό RNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα RNA για τη σύνθεση μονόκλωνου cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου ανάστροφη μεταγραφάση και εκκινητών ολιγομερών θυμίνης. Οι πληθυσμοί των cDNA που συντέθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την ενίσχυση και την ημιποσοτική εκτίμηση των αντίστοιχων γονιδίων με τους κατάλληλους εκκινητές. Όλα τα δείγματα προηγουμένως κανονικοποιήθηκαν ημιποσοτικά με τη βοήθεια ανάλογων αντιδράσεων PCR (εκκινητές 18S-F και 18S-R) για τους πληθυσμούς cDNA του γονιδίου 18S rDNA, το οποίο θεωρείται γονίδιο σταθερής μεταγραφικής έκφρασης (συστατικό γονίδιο).

Για την ημιποσοτική εκτίμηση των πληθυσμών cDNA των γονιδίων *sbp* του *A.thaliana*, *sbp1*, *sbp2* και *sbp3*, χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών SBP1-RT, SBP2-RT και SBP3-RT. Για τα γονίδια *gapdh*, *fba(05)*, *fba(57)*, *gpx6* και *gst9* του *A.thaliana* χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών ALDH11A3 (NM_201797.2), FBA (NM_120057.3), FBA (NM_127705.3), AtGPX6-RT και AtGSTF9-RT, αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες των εκκινητών, όπως και τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων PCR της ενίσχυσης των γονιδίων αναφέρονται στον πίνακα των εκκινητών (Υλικά και μέθοδοι σελ. 59).

Αρχικά έγινε ημιποσοτικός προσδιορισμός των μεταγραφημάτων του κάθε γονιδίου υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης του φυτού σε κανονικοποιημένη μήτρα cDNA έτσι ώστε να προσδιοριστεί ο βέλτιστος αριθμός κύκλων PCR για την ημιποσοτική εκτίμηση των μορίων cDNA του κάθε γονιδίου. Στις **Εικόνα 3.1** και **3.2** παρατίθενται τα ηλεκτροφορήματα των PCR αντιδράσεων για τα δείγματα χαλκού και χρωμίου, αντίστοιχα.



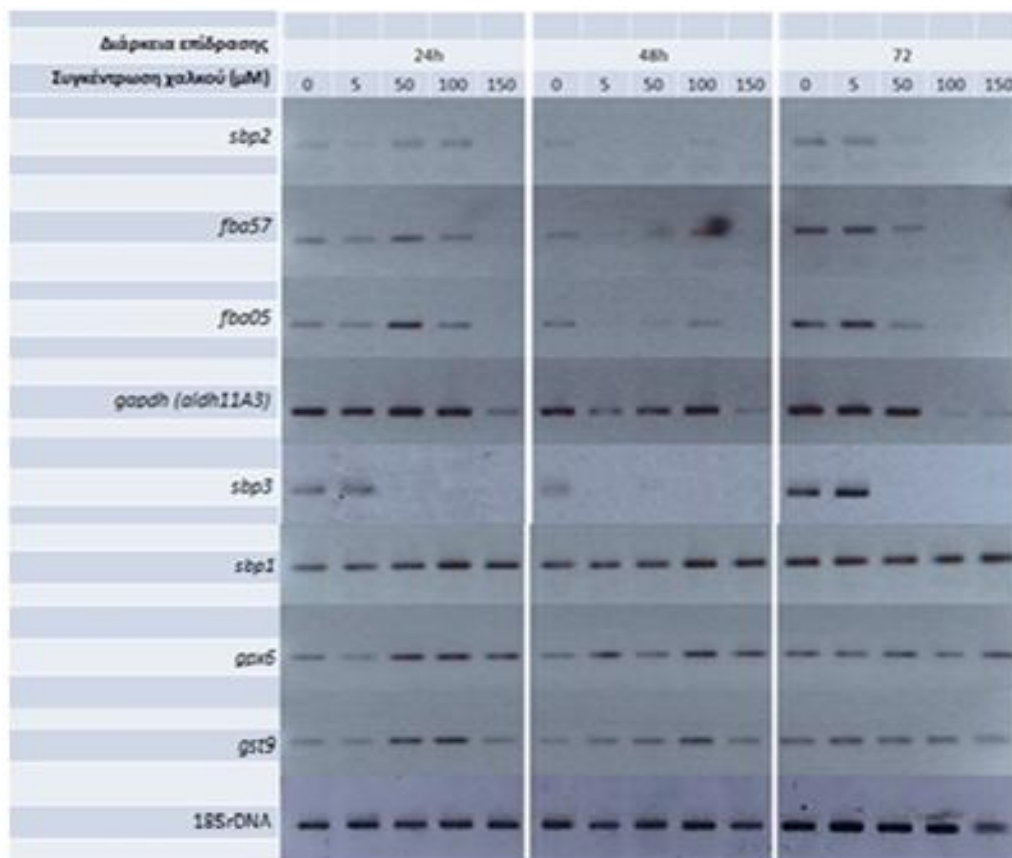
ΕΙΚΟΝΑ 3.1. RT-PCR ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης του φυτού σε κανονικοποιημένη μήτρα cDNA (επίδραση με χαλκό) με σκοπό την επιλογή του βέλτιστου αριθμού κύκλων PCR για την ανάλυση των μεταβολών έκφρασης του κάθε γονιδίου. Ως δείγμα cDNA χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας των 24 ωρών. Στη δεύτερη σειρά αναγράφεται το γονίδιο και στην τρίτη σειρά ο αριθμός κύκλων PCR.



ΕΙΚΟΝΑ 3.2. RT-PCR ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης του φυτού σε κανονικοποιημένη μήτρα cDNA (επίδραση με χρώμιο) με σκοπό την επιλογή του βέλτιστου αριθμού κύκλων PCR για την ανάλυση των μεταβολών έκφρασης του κάθε γονιδίου. Ως δείγμα cDNA χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας των 24 ωρών. Στη δεύτερη σειρά αναγράφεται το γονίδιο και στην τρίτη σειρά ο αριθμός κύκλων PCR.

3.1.1. Πρότυπα έκφρασης των γονιδίων μετά από επίδραση χαλκού (Cu) σε αρτίβλαστα *A. thaliana*

Από το ηλεκτροφόρημα των PCR αντιδράσεων προκύπτει ότι τα γονίδια *fba05* και *fba57* εμφάνισαν πανομοιότυπο πρότυπο έκφρασης σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν, με τη διαφορά ότι έχουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης του φυτού (**ΕΙΚΟΝΑ 3.1** και **3.3**).

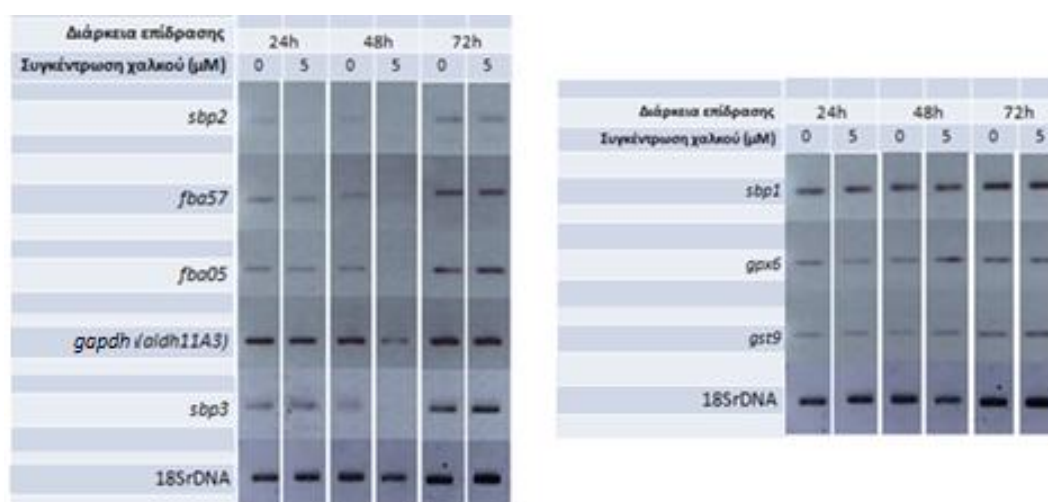


ΕΙΚΟΝΑ 3.3. RT-PCR ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *sbp2*, *garpdh*, *fba57*, *fba05*, *sbp*, *sbp1*, *gpx6*, *gst9*. Αναγράφεται η συγκέντρωση του χαλκού (μM) και η διάρκεια της επίδρασης (ώρες). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *18S rDNA*.

Στη συγκέντρωση των 5μM στο χρονικό στάδιο των 48 ωρών παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός cDNA του γονιδίου 18S rDNA είναι πολύ μικρότερος από τους πλυθησμούς cDNA των υπόλοιπων κανονικοποιημένων δειγμάτων, οπότε δεν μπορούν να βγούν συμπεράσματα για τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε αυτή τη συγκέντρωση.

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *sbr3* δεν επηρεάστηκαν στη συγκέντρωση 5μM σε κανένα χρονικό στάδιο, ενώ σε συγκεντρώσεις χαλκού μεγαλύτερες από 50μM καταστάθηκε σε όλα τα χρονικά στάδια (ΕΙΚΟΝΑ 3.3).

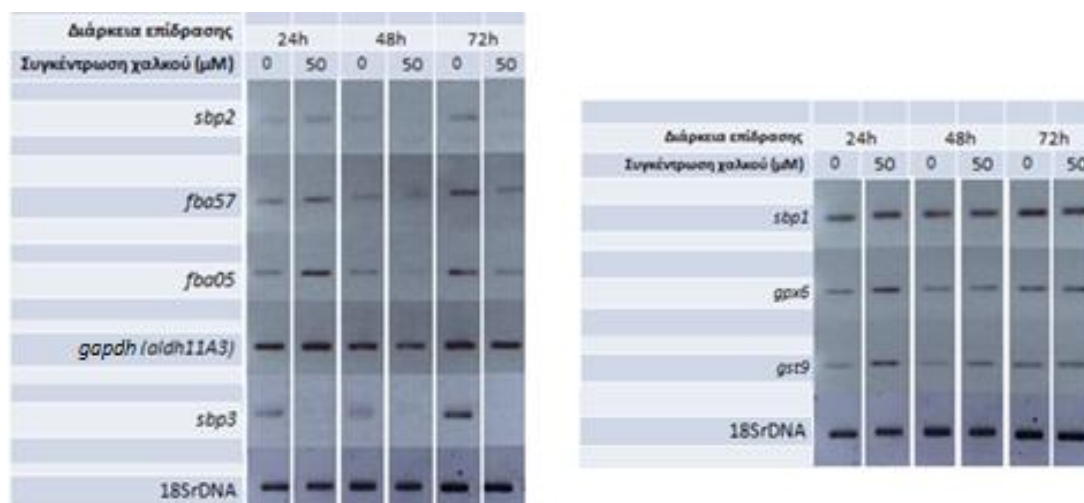
Στη μικρότερη συγκέντρωση χαλκού που μελετήθηκε, τα 5μM, η έκφραση των γονιδίων *gapdh* και *fba* παρέμεινε σταθερή σε όλα τα χρονικά στάδια ενώ η έκφραση του γονιδίου *sbr2* καταστάθηκε μετά από 24 ώρες επίδρασης και επανήλθε σε φυσιολογικό επίπεδο έκφρασης στις 72 ώρες επίδρασης. Στην ίδια συγκέντρωση η έκφραση των γονιδίων *sbr1*, *grx6* και *gst9* παρέμεινε σταθερή σε όλα τα χρονικά στάδια (ΕΙΚΟΝΑ 3.4).



ΕΙΚΟΝΑ 3.4. RT-PCR ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *sbr2*, *gapdh*, *fba57*, *fba05*, *sbr*, *sbr1*, *grx6*, *gst9*. Αναγράφεται η συγκέντρωση του χαλκού (μM) και η διάρκεια της επίδρασης (ώρες). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *18S rDNA*.

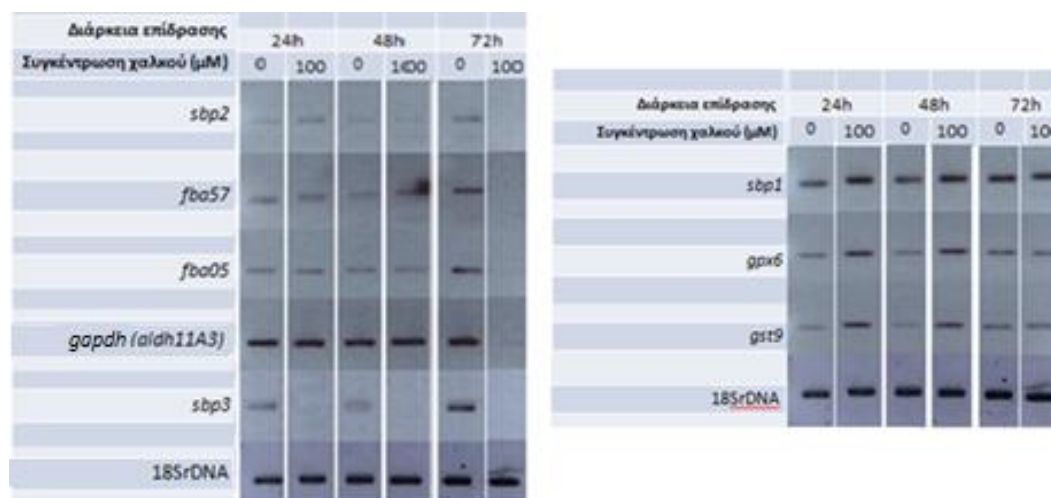
Μετά από 24 ώρες επίδρασης με 50μM χαλκού παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *sbr2* και *fba* και μικρή επαγωγή του γονιδίου *gapdh*. Ενώ μετά από 48 ώρες επίδρασης με 50μM χαλκού τα γονίδια *sbr2* και *fba* καταστάθηκε και παρατηρήθηκε μικρή καταστολή του γονιδίου *gapdh*. Η καταστολή των γονιδίων αυτών συνεχίστηκε στα ίδια επίπεδα και στις 72 ώρες επίδρασης. Στην ίδια συγκέντρωση, η έκφραση του γονιδίου *sbr1* δεν επηρεάστηκε από την επίδραση σε κανένα χρονικό στάδιο. Ενώ παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *grx6* και *gst9* μετά από 24 ώρες επίδρασης με 50μM χαλκού. Στις 48 ώρες επίδρασης με 50μM χαλκού, η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *gst9* συνεχίστηκε, ενώ η έκφραση του *grx6* επανήλθε σε φυσιολογικά

επίπεδα. Στις 72 ώρες επίδρασης με 50μM, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *sbp1*, *grx6* και *gst9* δεν επηρεάστηκε από την επίδραση (ΕΙΚΟΝΑ 3.5).



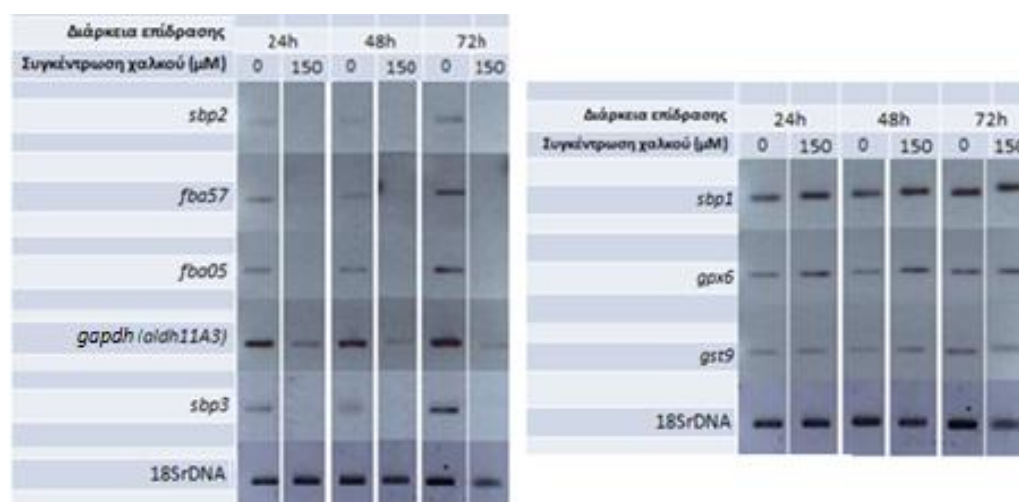
ΕΙΚΟΝΑ 3.5. RT-PCR ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *sbp2*, *gardh*, *fba57*, *fba05*, *sbp*, *sbp1*, *grx6*, *gst9*. Αναγράφεται η συγκέντρωση του χαλκού (μM) και η διάρκεια της επίδρασης (ώρες). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *18S rDNA*.

Η έκφραση των γονιδίων *fba* και *gardh* δεν επηρεάστηκε σε σχέση με τους μάρτυρες στις 24 και 48 ώρες επίδρασης με 100μM χαλκού, ενώ στις 72 ώρες παρατηρήθηκε καταστολή των γονιδίων αυτών. Στις 24 ώρες επίδρασης με 100μM χαλκού παρατηρήθηκε επαγωγή του γονιδίου *sbp2* η οποία σταματάει στις 48 ώρες. Ενώ στις 72 ώρες καταστρέφεται η έκφραση και αυτού του γονιδίου. Στα 100μM χαλκού η έκφραση των γονιδίων *sbp1*, *grx6* και *gst9* είναι αυξημένη στις 24 και 48 ώρες επίδρασης και στις 72 ώρες δεν επηρεάστηκε από την επίδραση (ΕΙΚΟΝΑ 3.6).



ΕΙΚΟΝΑ 3.6. RT-PCR ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *sbp2*, *gardh*, *fba57*, *fba05*, *sbp*, *sbp1*, *grx6*, *gst9*. Αναγράφεται η συγκέντρωση του χαλκού (μM) και η διάρκεια της επίδρασης (ώρες). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *18S rDNA*.

Στην μεγαλύτερη συγκέντρωση που μελετήθηκε, τα 150μM χαλκού, η καταστολή των γονιδίων *sbp2*, *fba*, *garpdh* ξεκινάει από τις 24 ώρες επίδρασης και συνεχίστηκε σε όλα τα χρονικά στάδια. Αντίθετα, στην ίδια συγκέντρωση παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *sbp1* και *gpx6* στις 24 και 48 ώρες επίδρασης. Επίσης, στις 72 ώρες επίδρασης τα γονίδια *sbp1* και *gpx6* είναι σταθερά σε σχέση με τον μάρτυρα (ΕΙΚΟΝΑ 3.7).

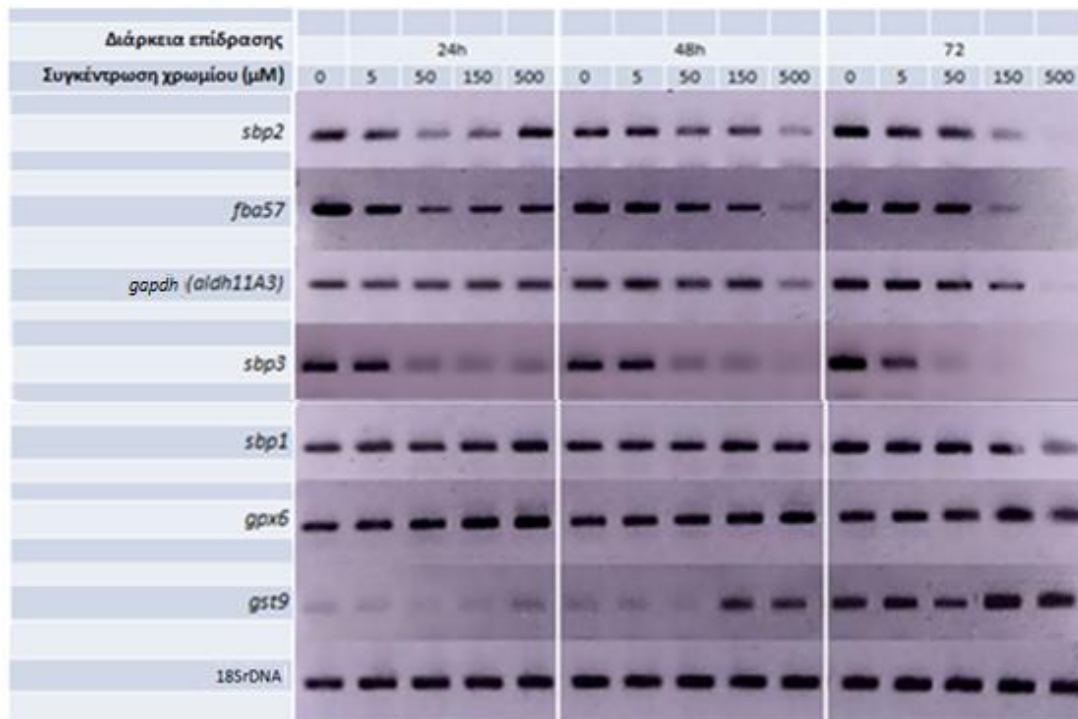


ΕΙΚΟΝΑ 3.7. RT-PCR ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *sbp2*, *garpdh*, *fba57*, *fba05*, *sbp*, *sbp1*, *gpx6*, *gst9*. Αναγράφεται η συγκέντρωση του χαλκού (μM) και η διάρκεια της επίδρασης (ώρες). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *18S rDNA*.

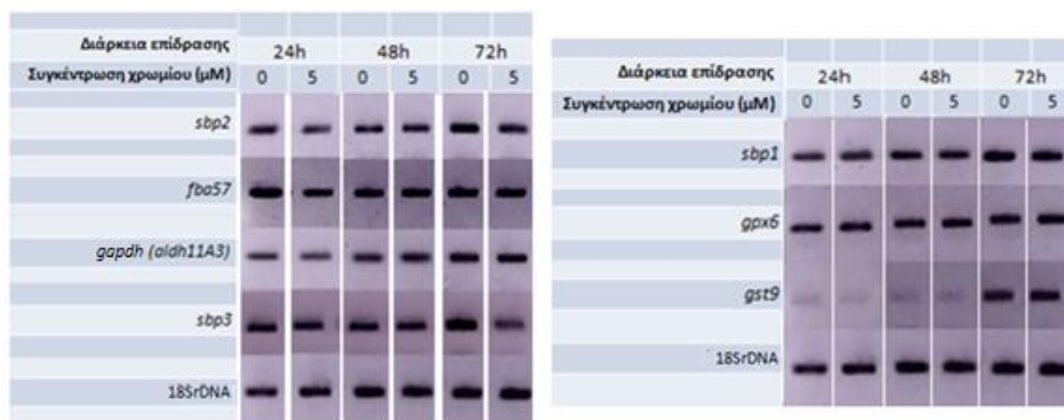
3.1.2. Πρότυπα έκφρασης των γονιδίων μετά από επίδραση εξασθενούς χρωμίου (Cr) σε αρτίβλαστα *A.thaliana*

Μετά από τις επιδράσεις με εξασθενές χρώμιο παρατηρήθηκε ότι το γονίδιο *sbp3* καταστάληκε σε μικρότερες συγκεντρώσεις χρωμίου σε σχέση με τα υπόλοιπα γονίδια που μελετήθηκαν (ΕΙΚΟΝΑ 3.8).

Στα 5μM χρωμίου, η έκφραση του γονιδίου *sbp3* δεν επηρεάστηκε μέχρι και τις 48 ώρες επίδρασης, ενώ καταστάληκε μετά απο 72 ώρες επίδρασης. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις χρωμίου το γονίδιο *sbp3* καταστάληκε σε όλα τα χρονικά στάδια που μελετήθηκαν Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *sbp2*, *fba* και *garpdh* δεν επηρεάστηκαν στα 5μM χρωμίου σε κανένα χρονικό στάδιο (ΕΙΚΟΝΑ 3.9).

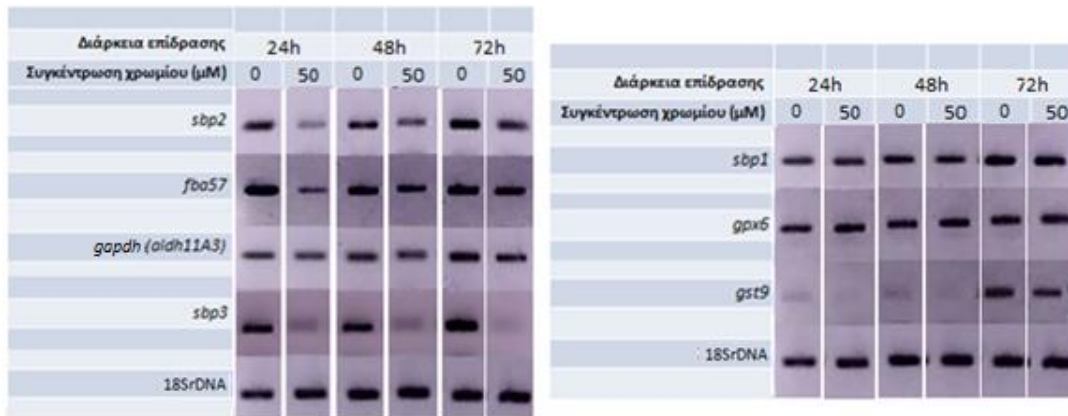


ΕΙΚΟΝΑ 3.8. RT-PCR ανάλυση της μεταγραφικής των γονιδίων *sbp2*, *gapdh*, *fba57*, *fba05*, *sbp*, *sbp1*, *gpx6*, *gst9*. Αναγράφεται η συγκέντρωση χρωμίου (μM) και η διάρκεια της επίδρασης (ώρες). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *18S rDNA*.



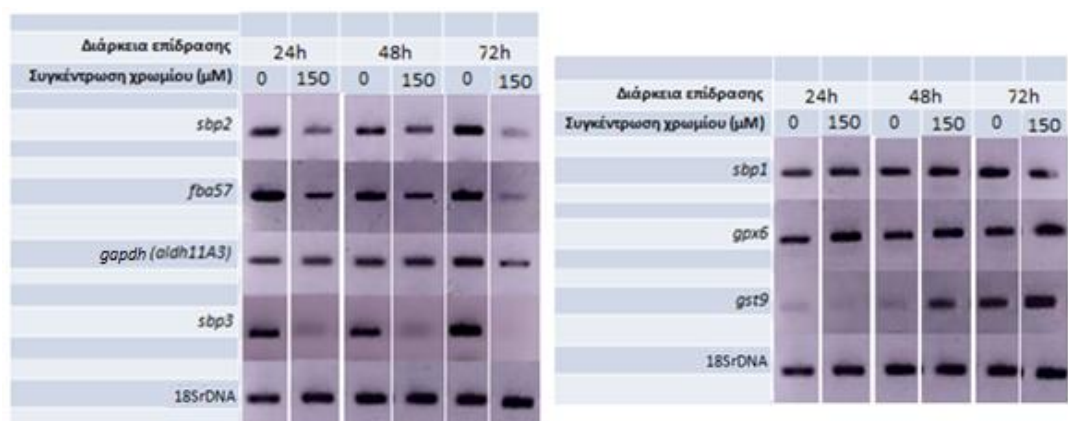
ΕΙΚΟΝΑ 3.9. RT-PCR ανάλυση της μεταγραφικής των γονιδίων *sbp2*, *gapdh*, *fba57*, *fba05*, *sbp*, *sbp1*, *gpx6*, *gst9*. Αναγράφεται η συγκέντρωση του χρωμίου (μM) και η διάρκεια της επίδρασης (ώρες). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *18S rDNA*.

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *sbp1*, *gpx6* και *gst9* δεν επηρεάστηκαν στις συγκεντρώσεις 5 και 50μM χρωμίου σε κανένα χρονικό στάδιο (**ΕΙΚΟΝΑ 3.9, 3.10**). Αντίθετα, στα 50μM χαλκού παρατηρήθηκε καταστολή της έκφρασης των γονιδίων *sbp2* και *fba* και *gapdh* σε όλα τα χρονικά στάδια (**ΕΙΚΟΝΑ 3.10**)



ΕΙΚΟΝΑ 3.10. RT-PCR ανάλυση της μεταγραφικής των γονιδίων *sbp2*, *gapdh*, *fba57*, *fba05*, *sbp*, *sbp1*, *grx6*, *gst9*. Αναγράφεται η συγκέντρωση του χρωμίου (μM) και η διάρκεια της επίδρασης (ώρες). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *18S rDNA*.

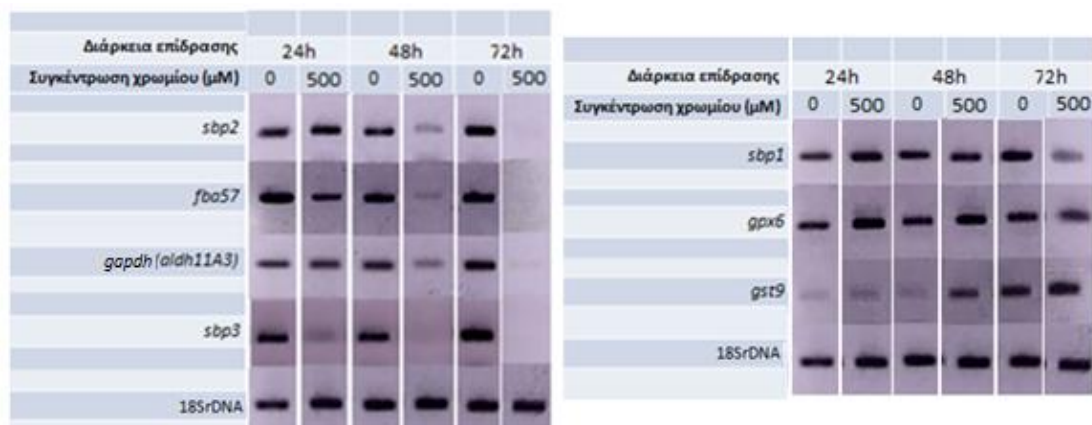
Στα 150μM χρωμίου παρατηρήθηκε καταστολή της έκφρασης των γονιδίων *sbp2* και *fba* σε όλα τα χρονικά στάδια. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gapdh* δεν επηρεάστηκαν μέχρι τις 48 ώρες επίδρασης με 150μM χρωμίου και η έκφρασή του καταστάληκε στις 72 ώρες επίδρασης. Στην ίδια συγκέντρωση, παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *grx6* σε όλα τα χρονικά στάδια και επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *gst9* στις 48 και 72 ώρες επίδρασης. Η έκφραση του γονιδίου *sbp1* παρέμεινε σε φυσιολογικό επίπεδο στα 150μM χρωμίου σε όλα τα χρονικά στάδια. (ΕΙΚΟΝΑ 3.11).



ΕΙΚΟΝΑ 3.11. RT-PCR ανάλυση της μεταγραφικής των γονιδίων *sbp2*, *gapdh*, *fba57*, *fba05*, *sbp*, *sbp1*, *grx6*, *gst9*. Αναγράφεται η συγκέντρωση του χρωμίου (μM) και η διάρκεια της επίδρασης (ώρες). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *18S rDNA*.

Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση χρωμίου που μελετήθηκε, τα 500μM παρατηρήθηκε ότι η καταστολή της έκφρασης των γονιδίων *sbp2* και *fba* αυξανόταν όσο αυξανόταν το χρονικό διάστημα της επίδρασης. Ενώ το γονίδιο *gapdh* αρχίσε να καταστέλεται

μετά από 48 ώρες επίδρασης με 500μM χρωμίου. Αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου *sbp1* δεν επηρεάστηκε από την επίδραση, εκτός από τις 72 ώρες επίδρασης. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gst9* αυξήθηκαν μετά από 48 ώρες επίδρασης, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gpx6* αυξήθηκαν μετά από 24 και 48 ώρες επίδρασης, αλλά μειώνονται στις 72 ώρες (**ΕΙΚΟΝΑ 3.12**).



ΕΙΚΟΝΑ 3.12. RT-PCR ανάλυση της μεταγραφικής των γονιδίων *sbp2*, *gapdh*, *fba57*, *fba05*, *sbp*, *sbp1*, *gpx6*, *gst9*. Αναγράφεται η συγκέντρωση του χρωμίου (μM) και η διάρκεια της επίδρασης (ώρες). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *18S rDNA*.

3.1.3. Ανάλυση των αλλαγών στην γονιδιακή έκφραση με χρήση του προγράμματος ImageJ

Για την ακριβέστερη ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ανάλυσης εικόνων ImageJ, μέσω του οποίου ποσοτικοποιήθηκε η ένταση των ζωνών από τα πήγματα αγαρόζης. Οι μετρήσεις έγιναν τρεις φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Για να εκφραστούν οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μετά από την επίδραση με χαλκό και χρώμιο των αρτιβλάστων *A.thaliana* σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασής τους σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης του φυτού υπολογίστηκε ο λόγος του αριθμού που προέκυψε για το κάθε δείγμα προς αυτόν του μάρτυρα. Στη συνέχεια, για το κάθε δείγμα υπολογίστηκε ο λόγος του αριθμού που προέκυψε προς τον αριθμό που προέκυψε για το γονίδιο 18S rDNA για το αντίστοιχο δείγμα. Στους **ΠΙΝΑΚΕΣ 3.1** και **3.2** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επεξεργασίας αυτής για τις επιδράσεις με χαλκό και χρώμιο, αντίστοιχα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1. Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μετά από επιδράσεις με χαλκό σε σχέση με τους μάρτυρες.

Διάρκεια επίδρασης	Συγκέντρωση μετάλλου (Cu) (μΜ)							
		<i>sbp1</i>	<i>sbp2</i>	<i>fba05</i>	<i>gapdh</i>	<i>gpx6</i>	<i>gst9</i>	<i>sbp3</i>
24	0	1	1	1	1	1	1	1
	5	0,899	0,359	0,974	0,86	0,702	0,756	1,301
	50	1,166	1,859	3,07	1,142	2,454	2,621	0,653
	100	1,382	1,693	1,095	0,922	2,475	2,786	0,093
	150	1,212	0,058	0	0,296	1,963	1,103	0,157
48	0	1	1	1	1	1	1	1
	5	1,591	0,365	0,126	0,642	2,782	2,696	0,528
	50	1,182	0,425	0,377	0,799	1,211	2,343	0,383
	100	1,622	0,826	0,964	1,261	3,019	4,483	0
	150	1,683	0,268	0,343	0,196	2,739	2,264	0
72	0	1	1	1	1	1	1	1
	5	0,854	0,866	1,079	0,851	0,876	1,152	0,865
	50	0,845	0,266	0,365	0,782	1,059	0,936	0,082
	100	1,004	0,094	0,101	0,601	0,801	1,052	0,092
	150	1,786	0,063	0,149	0,264	2,084	1,699	0,105

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2. Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μετά από επιδράσεις με χρώμιο σε σχέση με τους μάρτυρες.

Διάρκεια επίδρασης	Συγκέντρωση μετάλλου (Cr) (μΜ)							
		<i>sbp1</i>	<i>sbp2</i>	<i>fba05</i>	<i>gapdh</i>	<i>gpx6</i>	<i>gst9</i>	<i>sbp3</i>
24	0	1	1	1	1	1	1	1
	5	0,9	0,8	0,5	0,8	1	0,6	0,8
	50	0,8	0,4	0,2	0,8	1	0,02	0,15
	150	1	0,6	0,3	1	1,3	0,54	0,2
	500	1,1	1,3	0,3	0,9	1,3	1,33	0,21
48	0	1	1	1	1	1	1	1
	5	1	0,9	1	1,1	1	0,94	1
	50	0,9	0,6	0,7	0,8	1	0,44	0,25
	150	1,2	0,8	0,7	1,1	1,3	3,80	0,21
	500	1	0,3	0,2	0,4	1,2	3,32	0,03
72	0	1	1	1	1	1	1	1
	5	0,9	0,8	0,9	0,9	1	1,04	0,57
	50	1,1	0,7	0,9	0,8	1,2	0,78	0,13
	150	0,8	0,2	0,3	0,6	1,6	1,73	0,04
	500	0,9	0	0,1	0,1	2	2,7	0,04

Όπως φαίνεται στον **ΠΙΝΑΚΑ 3.3**, μετά από 24 ώρες επίδρασης με τη λιγότερο τοξική συγκέντρωση χαλκού που μελετήθηκε, τα 50μΜ χαλκού, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *sbp2*, *fba1*, *gpx6* και *gst9* κατά 1,86, 3,07, 2,45 και 2,62 φορές, αντίστοιχα. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *sbp1* και *garpdh* παρέμειναν σταθερά σε σχέση με τον μάρτυρα. Στο ίδιο χρονικό στάδιο, στην συγκέντρωση 100μΜ, αυξήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *sbp1*, *sbp2*, *gpx6* και *gst9* κατά 1,38, 1,69, 2,45 και 2,62 φορές αντίστοιχα, ενώ τα επίπεδα των γονιδίων *fba* και *garpdh* παρέμειναν σταθερά. Στην πιο τοξική συγκέντρωση που μελετήθηκε, τα 150μΜ, η έκφραση των γονιδίων *sbp2*, *fba* και *garpdh* καταστάληκε, ενώ τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *sbp1* και *gpx6* παρέμειναν αυξημένα, κατά 1,22 και 1,96 φορές, αντίστοιχα, και του *gst9* σταθερά, παρά την τοξικότητα της επίδρασης (**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3**).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3. Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μετά από τις επιδράσεις με χαλκό σε σχέση με τους μάρτυρες. Η εκτίμηση έγινε με το πρόγραμμα ImageJ. Με κόκκινο επισημαίνονται οι επαγωγές των γονιδίων, ενώ με κίτρινο οι καταστολές.

Διάρκεια επίδρασης	Συγκέντρωση μετάλλου (Cu) (μΜ)							
		<i>sbp1</i>	<i>sbp2</i>	<i>fba05</i>	<i>garpdh</i>	<i>gpx6</i>	<i>gst9</i>	<i>sbp3</i>
24	0	1	1	1	1	1	1	1
	50	1,166	1,859	3,07	1,142	2,454	2,621	0,65
	100	1,382	1,693	1,095	0,922	2,475	2,786	0,09
	150	1,212	0,058	0	0,296	1,963	1,103	0,16
48	0	1	1	1	1	1	1	1
	50	1,182	0,425	0,377	0,799	1,211	2,343	0,38
	100	1,622	0,826	0,964	1,261	3,019	4,483	0
	150	1,683	0,268	0,343	0,196	2,739	2,264	0
72	0	1	1	1	1	1	1	1
	50	0,845	0,266	0,365	0,782	1,059	0,936	0,08
	100	1,004	0,094	0,101	0,601	0,801	1,052	0,09
	150	1,786	0,063	0,149	0,264	2,084	1,699	0,10

Στον **ΠΙΝΑΚΑ 3.3** επίσης επισημαίνονται οι παρακάτω αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων. Η έκφραση του γονιδίου *sbp2* επάγεται σε λιγότερο τοξικές συγκεντρώσεις χαλκού σε σχέση με αυτή του γονιδίου *sbp1*. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *sbp1* αυξήθηκαν μόνο σε πολύ τοξικές συγκεντρώσεις χαλκού σε όλα τα χρονικά στάδια (100μM, 150μM) και παρέμειναν αυξημένα στη συγκέντρωση των 150μM, όπου τα γονίδια *sbp2*, *gapdh* και *fba* καταστάλθηκαν λόγω της τοξικότητας της επίδρασης. Επίσης, η έκφραση του γονιδίου *sbp1* αυξήθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με αυτή των *gpx6* και *gst9*. Αντιθέτως, η έκφρασή του γονιδίου *sbp3* καταστάλθηκε σε όλες τις τοξικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Το γονίδιο της *gapdh* δεν παρουσίασε αλλαγές στα επίπεδα έκφρασής του, με εξαίρεση τις πολύ τοξικές επιδράσεις (24, 48, 72 ώρες 150μM, 72 ώρες 100μM), όπου η έκφρασή του καταστάλθηκε (**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3**).

Όπως φαίνεται στον **ΠΙΝΑΚΑ 3.4**, το γονίδιο *gst9*, επάγεται σε όλες τις τοξικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (κατά 2,3 έως 4,48 φορές), αλλά δεν επάγεται στα 50μM στις 72 ώρες επίδρασης και το γονίδιο *gpx6* επάγεται σε όλες τις τοξικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (κατά 2 έως 3 φορές), αλλά δεν επάγεται στα 50μM στις 48 και 72 ώρες επίδρασης. (**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4**).

Πίνακας 3.4. Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν μετά από τις επιδράσεις με χαλκό σε σχέση με τους μάρτυρες. Η εκτίμηση έγινε με το πρόγραμμα ImageJ. Με κόκκινο επισημαίνονται οι επαγωγές των γονιδίων, ενώ με κίτρινο οι καταστολές.

Γονίδιο		<i>sbp1</i>	<i>sbp2</i>	<i>fba05</i>	<i>np-gapdh</i>	<i>gpx6</i>	<i>gst9</i>
Συγκέντρωση χαλκού (μM)	Διάρκεια επίδρασης (ώρες)						
	0	1	1	1	1	1	1
50	24	1,166	1,859	3,07	1,142	2,454	2,621
	48	1,182	0,425	0,377	0,799	1,211	2,343
	72	0,845	0,266	0,365	0,782	1,059	0,936
Γονίδιο		<i>sbp1</i>	<i>sbp2</i>	<i>fba05</i>	<i>np-gapdh</i>	<i>gpx6</i>	<i>gst9</i>
100	0	1	1	1	1	1	1
	24	1,382	1,693	1,095	0,922	2,475	2,786
	48	1,622	0,826	0,964	1,261	3,019	4,483

Γενικά παρατηρήθηκε ότι σε καμία από τις επιδράσεις που μελετήθηκαν η απόκριση του φυτού δεν είναι ίδια. Στα 50μM χαλκού τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *fba* (3 φορές) και *sbr2* (1,86 φορές) αυξήθηκαν μετά από 24 ώρες επίδρασης. Ενώ, μετά από 48 και 72 ώρες επίδρασης με την ίδια συγκέντρωση τα γονίδια *sbr2* και *fba* καταστάθηκαν κατά περίπου 0,3 φορές (**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4**). Μία παρατήρηση που θα μπορούσε να γίνει είναι ότι στις ίδιες συνθήκες δεν έχουμε επαγωγή του γονιδίου *grx6*, αντίθετα από όλες τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με την έκφραση του γονιδίου *gst9* στις 72 ώρες επίδρασης με 50μM χαλκού (**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4**).

Η έκφραση του γονιδίου *sbr1* παρέμεινε σταθερή σε όλες τις συγκεντρώσεις χρωμίου που μελετήθηκαν, ακόμα και οι πιο τοξικές επιδράσεις δεν επηρεάζουν την έκφρασή του. Ενώ τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gapdh* παρέμειναν σε σταθερά επίπεδα σε όλες τις συγκεντρώσεις, με εξαίρεση τις πολύ τοξικές συγκεντρώσεις (**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5**). Το γονίδιο *grx6* επάγεται μόνο σε πολύ τοξικές επιδράσεις χρωμίου, στα 150 και 500μM μόνο στις 72 ώρες. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gst9* αυξήθηκαν πολύ στις 48 ώρες επίδρασης με 150μM (3,8 φορές) και 500μM (3,3 φορές) χρωμίου και παρέμειναν αυξημένα και στις 72 ώρες επίδρασης σε αυτές τις συγκεντρώσεις χρωμίου (**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5**).

Η έκφραση του γονιδίου *fba* καταστάθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις χρωμίου που μελετήθηκαν εκτός από αυτή των 5μM, ενώ μετά από τις επιδράσεις με χαλκό παρατηρήθηκε επαγωγή του γονιδίου αυτού σε στα 50μM χαλκού. (**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3** και **3.5**). Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *fba* και *sbr2* μετά από επιδράσεις με διαφορετικής τοξικότητας συγκεντρώσεις χρωμίου εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα σε σχέση με τα πρότυπα έκφρασής τους σε μετά από επιδράσεις με αντίστοιχης τοξικότητας συγκεντρώσεις χαλκού (**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3** και **3.5**). Η έκφραση των γονιδίων αυτών καταστάθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις χρωμίου που μελετήθηκαν, ακόμα και σε αυτές με την μικρότερη τοξικότητα. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *fba* έχουν παρόμοιο πρότυπο με αυτά του γονιδίου *sbr2* μετά από τις επιδράσεις με όλες τις συγκεντρώσεις χαλκού και χρωμίου που μελετήθηκαν (**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3** και **3.5**).

Πίνακας 3.5. Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μετά από τις επιδράσεις με χαλκό σε σχέση με τους μάρτυρες. Η εκτίμηση έγινε με το πρόγραμμα ImageJ. Με κόκκινο επισημαίνονται οι επαγωγές των γονιδίων, ενώ με κίτρινο οι καταστολές.

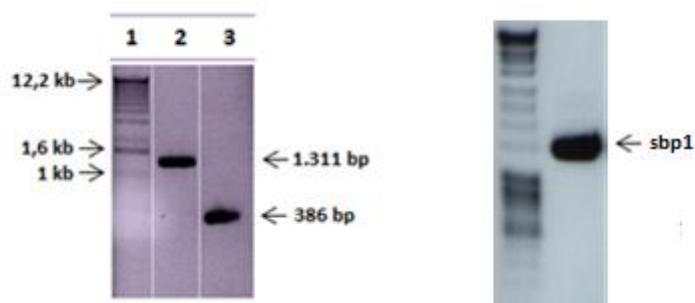
Διάρκεια επίδρασης	Συγκέντρωση μετάλλου (Cr) (μM)							
		<i>sbp1</i>	<i>sbp2</i>	<i>fba05</i>	<i>gapdh</i>	<i>gpx6</i>	<i>gst9</i>	<i>sbp3</i>
24	0	1	1	1	1	1	1	1
	50	0,8	0,4	0,2	0,8	1	0	0,15
	150	1	0,6	0,3	1	1,3	0,54	0,2
	500	1,1	1,3	0,3	0,9	1,3	1,34	0,21
48	0	1	1	1	1	1	1	1
	50	0,9	0,6	0,7	0,8	1	0,44	0,25
	150	1,2	0,8	0,7	1,1	1,3	3,8	0,21
	500	1	0,3	0,2	0,4	1,2	3,32	0,03
72	0	1	1	1	1	1	1	1
	50	1,1	0,7	0,9	0,8	1,2	0,78	0,13
	150	0,8	0,2	0,3	0,6	1,6	1,73	0,04
	500	0,9	0	0,1	0,1	2	2,68	0,04

3.2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών *AtSBP1/AtGAPDH/AtFBA* *in planta* σε παροδικώς μετασχηματισμένα φυτά *N. Benthamiana*.

Σε προηγούμενη μελέτη, σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί ο βιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης SBP1 του *A. thaliana*, χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία του διπλού υβριδίου της ζύμης με σκοπό να αναγνωριστούν πρωτεΐνες του *A. thaliana* με τις οποίες αλληλεπιδρά η *AtSBP1* [7]. Από τις πρωτεΐνες που βρέθηκε ότι δυνητικά αλληλεπιδρούν με την *AtSBP1*, επιλέχθηκε μία αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (*AtGAPDH*) και μία αλδολάση της 1,6-δισφωφορικής φρουκτόζης (*AtFBA*) και επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση τους με την *AtSBP1* με δοκιμασίες δέσμησης *in vitro* [7]. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήσαμε την τεχνολογία της συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού για να εντοπίσουμε την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών *in planta*. Με την τεχνολογία της συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού επιτρέπεται ο έλεγχος της φυσικής αλληλεπίδρασης ενός ζεύγους πρωτεϊνών, καθώς επίσης και ο κυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων *in planta*.

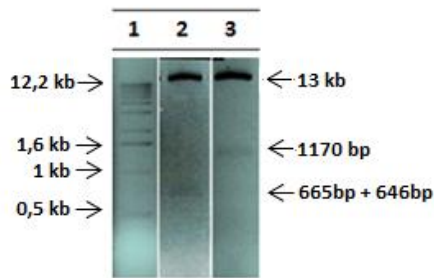
Τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος συντήκονται μεταφραστικά με τμήματα φθορίζουσας πρωτεΐνης σε κατάλληλα σχεδιασμένους φορείς. Τα τμήματα της φθορίζουσας πρωτεΐνης δεν φθορίζουν όταν βρίσκονται ανεξάρτητα στο κυτόπλασμα, ενώ απαιτείται γειτνίασή τους για να δημιουργηθεί φθορίζον σήμα. Εφόσον οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, τότε και τα τμήματα της φθορίζουσας πρωτεΐνης προσεγγίζουν προς σχηματισμού φθορίζοντος μορίου [148]. Χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pSPYNE-35S και pSPYCE-35S [147]. Ο πρώτος φορέας επιτρέπει την μεταφραστική σύντηξη με το αμινοτελικό τμήμα της YFP (yellow fluorescence protein) κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης ενώ ο δεύτερος φορέας με το καρβοξυτελικό τμήμα της YFP.

Τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια των γονιδίων των *Atsbp1*, *Atgapdh*, *Atfba* ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα το DNA των πλασμιδιακών φορέων pMP7204, pMP7205 και pMP7203 [7] και τα ζεύγη εκκινητών AtSBP1-SPLIT GFP ALD11A3-SPLIT GFP, FBA-SPLIT GFP που σχεδιάστηκαν για να εισάγουν τις θέσεις περιορισμού *XbaI-XmaI* στα άκρα των ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων των γονιδίων (**ΕΙΚΟΝΑ 3.13**).

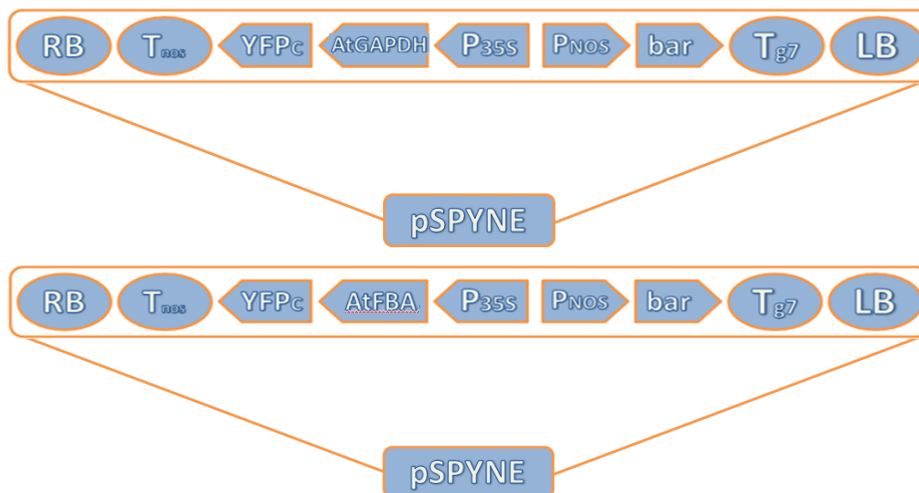


ΕΙΚΟΝΑ 3.13. Διαδρομές: 1. DNA Ladder, PCR για τα γονίδια 2. *Atgapdh* (1311 bp) και 3. *Atfba* (386 bp)

Τα προϊόντα PCR *XbaI-Atgapdh-XmaI* και *XbaI-Atfba-XmaI* κλωνοποιήθηκαν ως τμήματα *XbaI-XmaI* (Υλικά και Μέθοδοι 2.1.3) στην θέση *XbaI-XmaI* του pSPYNE-35S (Υλικά και Μέθοδοι 2.2.2.1), δημιουργώντας τους ανασυνδιασμένους φορείς pSPYNE-35S::AtGAPDH και pSPYNE-35S::AtFBA. Για να επιβεβαιωθεί ότι τα ενθέματα *XbaI-Atgapdh-XmaI* και *XbaI-Atfba-XmaI* έχουν εισαχθεί στον φορέα pSPYNE πραγματοποιήθηκε πέψη των φορέων pSPYNE-35S::AtGAPDH και pSPYNE-35S::AtFBA (**ΕΙΚΟΝΑ 3.15**) με τα περιοριστικά ένζυμα *XbaI* και *XmaI* και με *XbaI* και *EcoRI*, αντίστοιχα (**ΕΙΚΟΝΑ 3.14**).

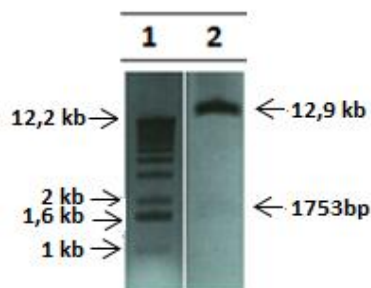


ΕΙΚΟΝΑ 3.14. Διαδρομές: 1. DNA Ladder , 2. Πέψη του φορέα rSPYNE-35S::AtGAPDH με τα περιοριστικά ένζυμα *XbaI* και *XmaI*. Η κωδική περιοχή του γονίδιο *Atgapdh* αποτελείται από 1311bp και περιέχει μία θέση περιορισμού *XbaI* στην αλληλουχία του, οπότε αναμένονται δύο ζώνες (665bp και 646bp) 3. Πέψη του φορέα rSPYNE-35S::AtFBA με τα περιοριστικά ένζυμα *XbaI* και *EcoRI*, το γονίδιο *Atfba* αποτελείται από 386bp και ο φορέας rSPYNE περιέχει μία θέση περιορισμού *EcoRI* στην κωδική αλληλουχία της YFPc, οπότε αναμένεται μία ζώνη 1170 bp.

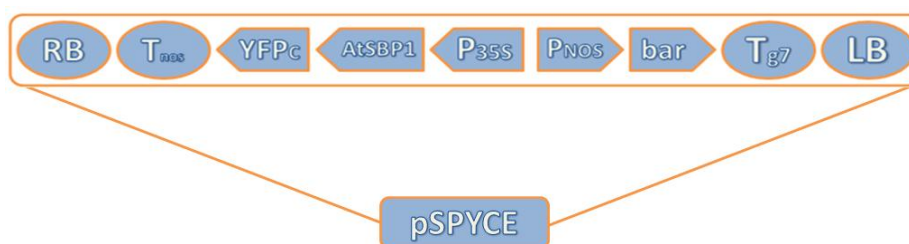


ΕΙΚΟΝΑ 3.15. Σχηματική αναπαράσταση πλασμιδιακών φορέων rSPYNE-35S::AtGAPDH και rSPYNE-35S::AtFBA RB, δεξί συνοριακό T-DNA. T nos, τερματική αλληλουχία nos. YFP_N, κωδικοποιεί για το αμινοτελικό τμήμα της φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP. AtFBA και AtGAPDH, κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων *Atfba* και *Atgapdh*, αντίστοιχα. P35S, υποκινητής CaMV 35S . Pnos, υποκινητής nos. bar, γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο ζιζανιοκτόνο Basta. T g7, τερματική αλληλουχία g7.

Το προϊόν PCR *XbaI-Atsbp1-XmaI* (**ΕΙΚΟΝΑ 1.13**) κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα rJET1.2 και υποκλωνοποιήθηκε στον rSPYCE-35S δημιουργώντας τον φορέα rSPYCE-35S::AtSBP1 (**ΕΙΚΟΝΑ 3.17**) Για να επιβεβαιωθεί ότι η ένθεση *XbaI-Atsbp1-XmaI* έχει εισαχθεί στον φορέα rSPYCE πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα rSPYCE-35S::AtSBP1 με τα περιοριστικά ένζυμα *XbaI* και *XmaI* (**ΕΙΚΟΝΑ 3.16**). Επιπλέον, ο φορέας rSPYCE-35S::AtSBP1 εστάλει για ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με τα ζεύγη εκκινητών EU796372_R1 και EU79637/2-3_F1 για να επιβεβαιωθεί ότι έχουν εισαχθεί στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με την κωδική περιοχή της YFPc.



ΕΙΚΟΝΑ 3.16. Διαδρομές: 1. DNA Ladder, 2. Πέψη του φορέα pSPYCE-35S::AtSBP1 με τα περιοριστικά ένζυμα *XbaI* και *XmaI*. Το γονίδιο της *Atsbp1* αποτελείται από 1753bp.

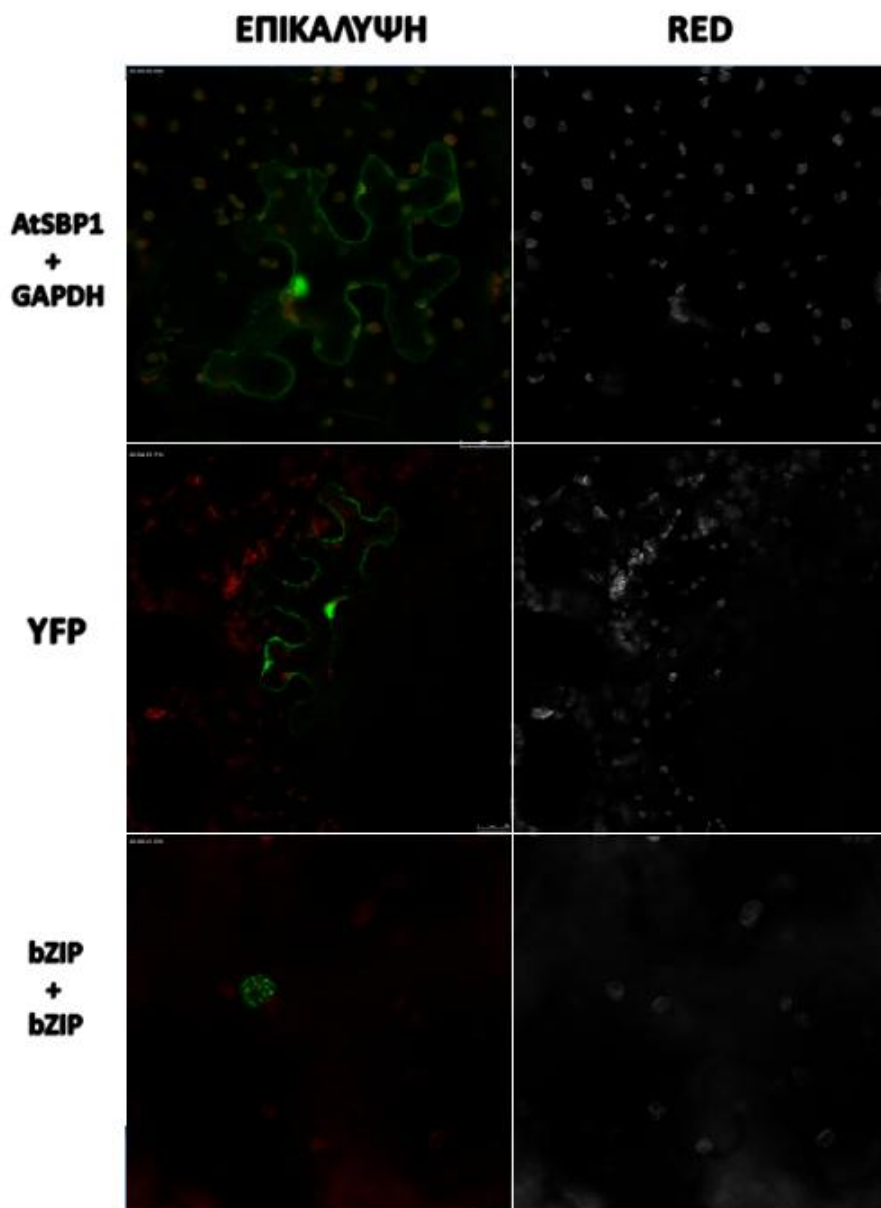


ΕΙΚΟΝΑ 3.17. Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pSPYCE-35S::AtSBP1 RB, δεξί συνοριακό T-DNA. Tnos, τερματική αλληλουχία nos. YFP_c, κωδικοποιεί για το καρβοξυτελικό τμήμα της φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP. AtSBP1, κωδική αλληλουχία του γονιδίου AtSBP1. P_{35S}, υποκινητής CaMV 35S. P_{nos}, υποκινητής nos. bar, γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο ζιζανιοκτόνο Basta. T_{g7}, τερματική αλληλουχία g7.

Με τους φορείς που αναφέρθηκαν μετασηματίστηκαν δεκτικά κύτταρα αγροβακτηρίου στελέχους GV3101. Τα μετασηματισμένα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν για παροδικό μετασηματισμό επιδερμικών κυττάρων φύλλων του *N.benthamiana* στους εξής συνδυασμούς: i) pSPYCE-35S::AtSBP1 και pSPYNE-35S::AtGAPDH, ii) pSPYCE-35S::AtSBP1 και pSPYNE-35S::AtFBA.

Ως θετικό μάρτυρα της συχνότητας μετασηματισμού, χρησιμοποιήθηκαν οι δυαδικοί φορείς pSPYCE-35S::pZIP63 και pSPYNE-35S::pZIP63 που κωδικοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα bZIP63 σε μεταγραφική σύντηξη με το αμινοτελικό τμήμα της YFP και με το καρβοξυτελικό τμήμα της YFP, αντίστοιχα. Σήμα φθορισμού εντοπίζεται στον πυρήνα όταν γίνεται ομοδιμερισμός του μεταγραφικού παράγοντα μέσω της καρβοξυτελικής λειτουργικής περιοχής φερμουάρ λευκίνης [147]. Επίσης, ως θετικό μάρτυρα εντοπισμού του φθορίζοντος σήματος στο κυτταρόπλασμα, χρησιμοποιήθηκε ο δυαδικός φορέας 35S:YFP που κωδικοποιεί την YFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή CaMV 35S του ιού του μωσαϊκού της ανθοκράμβης (CaMV 35S). Για την αύξηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε ο φορέας 35S:P19, η πρωτεΐνη P19 του ιού του θαμνώδους νανισμού της τομάτας

καταστέλλει τη μέτα-μεταγραφική αποσιώπηση των διαγονιδίων που υπερεκφράζονται σε φυτά [149].



ΕΙΚΟΝΑ 3.18. Έλεγχος πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων AtSBP1–AtGAPDH με χρήση συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού σε επιδερμικά κύτταρα καπνού. Η ανίχνευση του φθορίζοντος σήματος έγινε με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. YFP, φίλτρο 525 nm. RED, φίλτρο 685 nm όπου και παρατηρείται αυτοφθορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών. bZip, θετικός μάρτυρας αλληλεπίδρασης. YFP, θετικός μάρτυρας εντοπισμού του φθορίζοντος σήματος στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα.

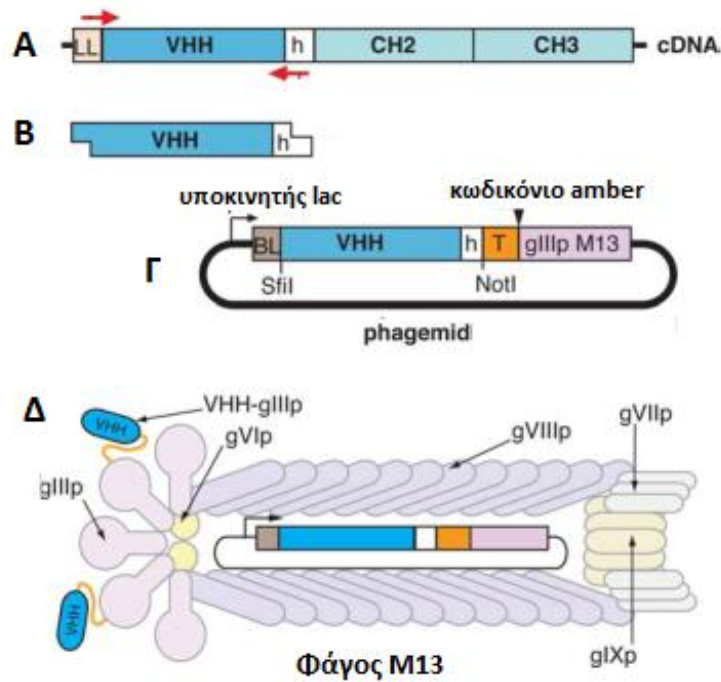
Σήμα φθορισμού εντοπίστηκε στο ζεύγος pSPYCE-35S::AtSBP1 και pSPYNE-35S::AtGAPDH. (ΕΙΚΟΝΑ 3.18) Το Σήμα φθορισμού παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα.

3.3. Ανάπτυξη ενός μοριακού εργαλείου για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών SBP *in planta* βασισμένο στα αντισώματα VHH και στη μέθοδο BiFC.

Τα αντισώματα VHH που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη προέρχονται από βιβλιοθήκη θραυσμάτων αντισωμάτων VHH που κατασκευάστηκε μετά από ανοσοποίηση *Lama glama* με την πρωτεΐνη AtSBP1. Η επιλογή των αντισωμάτων VHH έγινε με βάση την ικανότητα δέσμευσης τους στην πρωτεΐνη AtSBP1 χρησιμοποιώντας την τεχνική phage display.

Περίπου 4-12 μέρες μετά την ανοσοποίηση *Lama glama*, συλλέγεται αίμα και απομονώνεται RNA από τα λεμφοκύτταρα. Το RNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα ολικού RNA για τη σύνθεση cDNA με αλυσιδωτή αντίδραση ανάστροφης μεταγραφάσης. Το cDNA χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των περιοχών που κωδικοποιούν τις λειτουργικές περιοχές VHH με ειδικούς εκκινητές και οι περιοχές DNA που ενισχύονται κλωνοποιούνται σε κατάλληλους φορείς (phagemids). Οι φορείς αυτοί είναι κατασκευασμένοι για να εκφράζουν τα VHH σε μεταφραστική σύντηξη με την καψιδιακή πρωτεΐνη pIII του φάγου M13. **(ΕΙΚΟΝΑ 3.19)** Οι κωδικές περιοχές VHH κλωνοποιούνται καθοδικά ενός επαγόμενου υποκινητή, στο ίδιο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο με μία σηματοδοτική αλληλουχία στόχευσης στον περιπλασματικό χώρο του βακτηρίου (BL) και ανοδικά ενός ή δύο ετικετών επιτοπίων (epitope tags) (T) και ενός κωδικονίου τερματισμού amber που ακολουθείται από την κωδική αλληλουχία της καψιδιακής πρωτεΐνης pIII του φάγου **(ΕΙΚΟΝΑ 3.19)**.

Με τους phagemids μετασχηματίζεται στέλεχος *E.coli* που καταστέλλει το κωδικόνιο amber και επιμολύνοντας με βοηθητικό φάγο παράγονται βιβλιοθήκες ανασυνδυασμένων ιϊκών σωματίων (φάγων). Τα VHHs ενδιαφέροντος που εκφράζονται στην επιφάνεια των βακτηριοφάγων επιλέγονται με σάρωση της βιβλιοθήκης με βάση τη συγγένειά τους με το ακινητοποιημένο αντιγόνο. Οι φάγοι που δεσμεύονται στο αντιγόνο υπόκεινται σε έναν ή παραπάνω κύκλους επιλογής. Οι phagemids ανακτώνται από μονές αποικίες μολυσμένων *E.coli* και αναλύεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία των ενθέσεων DNA **(ΕΙΚΟΝΑ 3.20)**.

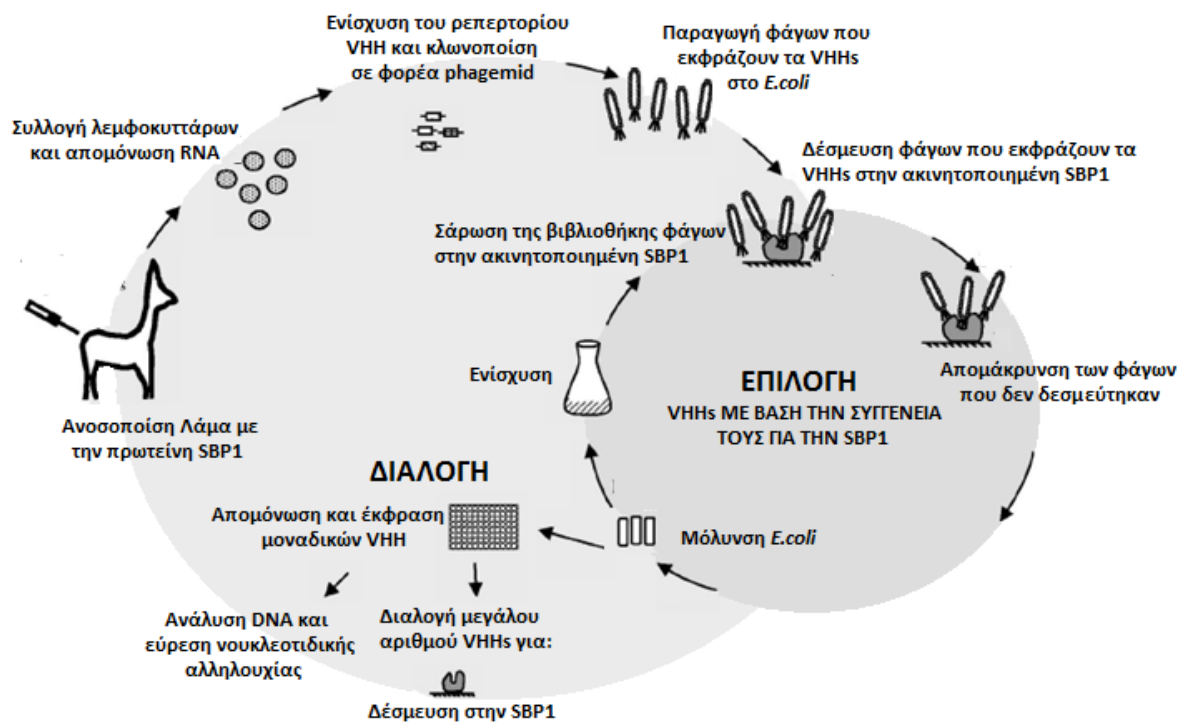


Εικόνα 3.19. (Α) Το cDNA που συντίθεται από RNA που απομονώνεται από τα λεμφοκύτταρα ανοσοποιημένων ζώων χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των περιοχών που κωδικοποιούν τις λειτουργικές περιοχές VHH με ειδικούς εκκινητές (κόκκινα βέλη). (Β) Οι περιοχές DNA που ενισχύονται κλωνοποιούνται σε κατάλληλους φορείς (phagemid) που εκφράζουν τα VHH σε μεταφραστική σύντηξη με την καψιδιακή πρωτεΐνη pIII του φάγου M13. (Γ) Οι περιοχές VHH κλωνοποιούνται καθοδικά ενός επαγόμενου υποκινητή (βέλος), στο ίδιο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο με μία σηματοδοτική αλληλουχία στόχευσης στον περιπλασματικό χώρο του βακτηρίου (BL) και ανοδικά ενός ή δύο ετικέτες επιτοπίων (epitope tags) (T) και ενός κωδικονίου τερματισμού amber που ακολουθείται από την κωδική αλληλουχία της καψιδιακής πρωτεΐνης pIII του φάγου. (Δ) Τα θραύσματα αντισωμάτων VHH (μπλέ σχήματα) εκφράζονται στην επιφάνεια του φάγου σε μεταφραστική σύντηξη με την καψιδιακή πρωτεΐνη pIII του φάγου M13 (gIIIp).

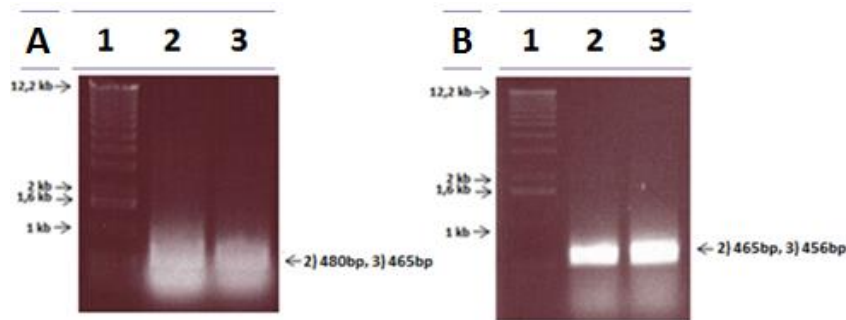
Τα επιλεγμένα αντισώματα VHH χρησιμοποιήθηκαν ως "ενδο-αντισώματα" (intrabodies) για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης AtSBP1 *in planta*. Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό του συμπλόκου VHH-AtSBP1 χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία της συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού (BiFC).

Η μεταβλητή λειτουργική περιοχή της βαριάς αλυσίδας, αντισώματος βαριάς αλυσίδας (VHH) των επιλεγμένων αντισωμάτων A10, E12, F1, F2 ενισχύθηκε με PCR με ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν για να εισάγουν τις θέσεις περιορισμού *XbaI-XmaI* στα άκρα των ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων των VHH (**ΕΙΚΟΝΑ 3.21**). Επίσης, ο νοηματικός εκκινητής εισάγει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης πριν τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια των VHH για να γίνει η έναρξη της μετάφρασης στο φυτό. Τα προϊόντα PCR *XbaI-VHH-XmaI* κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα

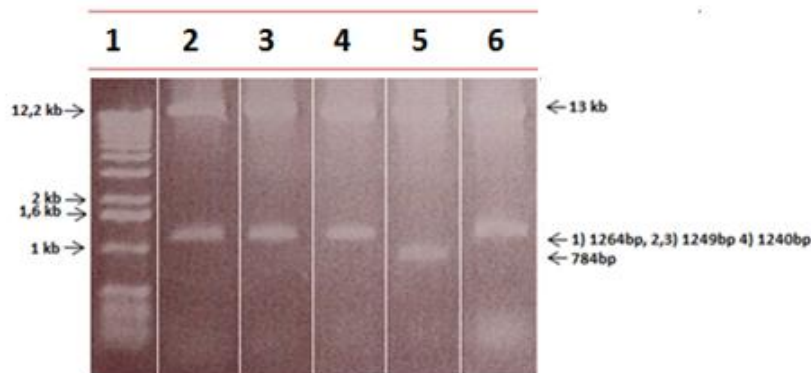
ρJET1.2 και υποκλωνοποιήθηκαν στον ρSPYNE-35S δημιουργώντας τους φορείς ρSPYNE-35S::A10, ρSPYNE-35S::E12, ρSPYNE-35S::F1, ρSPYNE-35S::F2 (**ΕΙΚΟΝΑ 3.23**). Για να επιβεβαιωθεί ότι τα ενθέματα *XbaI*-VHHs-*XmaI* έχουν εισαχθεί στον φορέα ρSPYNE πραγματοποιήθηκαν πέψη των φορέων ρSPYNE-35S::A10, ρSPYNE-35S::E12, ρSPYNE-35S::F1, ρSPYNE-35S::F2 με τα περιοριστικά ένζυμα *XbaI* και *EcoRI* (**ΕΙΚΟΝΑ 3.22**). Επιπλέον, οι φορείς ρSPYNE-35S::A10, ρSPYNE-35S::E12, ρSPYNE-35S::F1, ρSPYNE-35S::F2 εστάλησαν για ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με τα ζεύγη εκκινητών EU796373_R1 και EU79637/2-3_F1 για να επιβεβαιωθεί ότι έχουν εισαχθεί στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με την κωδική περιοχή της YFP_N.



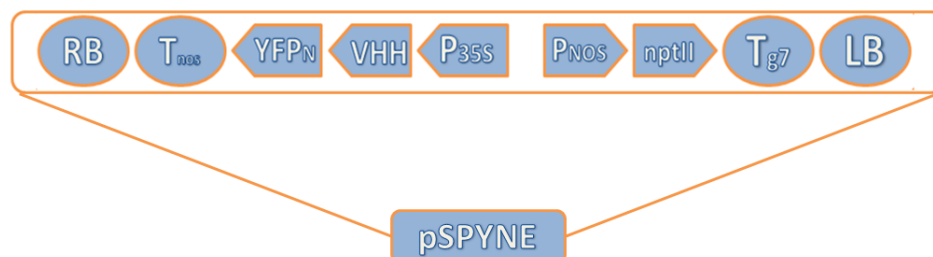
Εικόνα 3.20: Σχηματική αναπαράσταση της στρατηγικής απομόνωσης και επιλογής VHHs από ανοσοποιημένα *Lama glama* που δεσμεύονται στην πρωτεΐνη SBP1 του *A.thaliana*.



ΕΙΚΟΝΑ 3.21. Διαδρομές: **A)** 1. DNA Ladder, 2. PCR για τις κωδικές αλληλουχίες των VHHs 2) A10 (480bp), 2) E12 (465bp) **B)** 1. DNA Ladder, 2. PCR για τις κωδικές αλληλουχίες των VHHs 2) F1 (465bp) και 2) F2 (456bp)



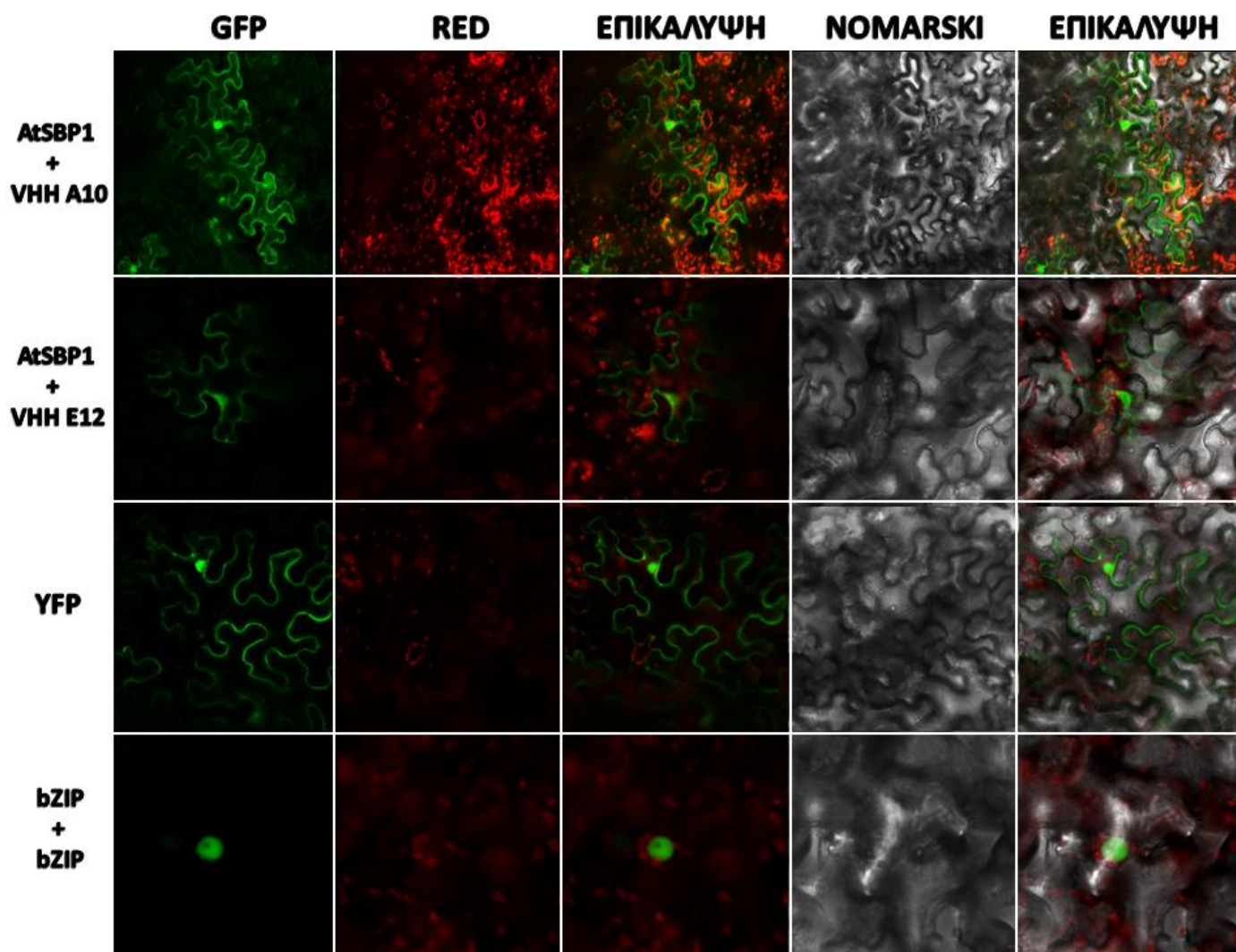
ΕΙΚΟΝΑ 3.22. Διαδρομές: 1. DNA Ladder, Πέψη των φορέων 2. pSPYNE-35S::A10, 3. pSPYNE-35S::E12, 4. pSPYNE-35S::F1, 5. pSPYNE-35S::F2 6. pSPYNE (784bp) με τα περιοριστικά ένζυμα *XbaI* και *EcoRI*. Οι κωδικές αλληλουχίες των VHHs A10, E12, F1 και F2 αποτελούνται από 480, 465, 465 και 456bp αντίστοιχα. Ο φορέας pSPYNE περιέχει μία θέση περιορισμού *EcoRI* στην κωδική αλληλουχία της YFP_N, οπότε αναμένονται ζώνες 1264, 1249, 1249 και 1240, αντίστοιχα.



ΕΙΚΟΝΑ 3.23. Σχηματική αναπαράσταση των πλασμιδιακών φορέων pSPYNE-35S::A10, pSPYNE-35S::E12, pSPYNE-35S::F1 και pSPYNE-35S::F2 RB, δεξί συνοριακό T-DNA. T nos, τερματική αλληλουχία nos. YFP_C, κωδικοποιεί για το καρβοξυτελικό τμήμα της φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP. VHH, κωδική αλληλουχία των VHHs (A10, E12, F1 και F2). P35S, υποκινητής CaMV 35S. Pnos, υποκινητής nos. nptII, φωσφοτρανφεράση της νεομυκίνης. T g7, τερματική αλληλουχία g7.

Με τους φορείς που αναφέρθηκαν μετασηματίστηκαν δεκτικά κύτταρα αγροβακτηρίου (*A.tumefaciens* GV3101). Τα μετασηματισμένα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν για παροδικό μετασηματισμό επιδερμικών φύλλων του

N.benthamiana στους εξής συνδυασμούς: i) pSPYCE-35S::AtSBP1 και pSPYNE-35S::A10, pSPYCE-35S::AtSBP1 και pSPYNE-35S::E12, pSPYCE-35S::AtSBP1 και pSPYNE-35S::F1, pSPYCE-35S::AtSBP1 και pSPYNE-35S::F2.



ΕΙΚΟΝΑ 3.24. Έλεγχος πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων AtSBP1-VHH A10 και AtSBP1-VHH E12 με χρήση συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού σε επιδερμικά κύτταρα καπνού. Η ανίχνευση του φθορίζοντος σήματος έγινε με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. YFP, φίλτρο 525 nm. RED, φίλτρο 685 nm όπου και παρατηρήθηκε αυτοφθορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών. bZIP, θετικός μάρτυρας αλληλεπίδρασης. YFP, θετικός μάρτυρας εντοπισμού του φθορίζοντος σήματος στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα.

Σήμα φθορισμού εντοπίστηκε στα ζεύγη pSPYCE-35S::AtSBP1 και pSPYNE-35S::A10, pSPYCE-35S::AtSBP1 και pSPYNE-35S::E12. **(ΕΙΚΟΝΑ 3.24)** Το σήμα φθορισμού παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα.

4. Συζήτηση

4.1. Αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση μετά από επίδραση με βαρέα μέταλλα σε αρτίβλαστα *A.thaliana*

Στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *sbr1,2,3*, *fba*, *gardh*, *grx6*, *gst9* εκτιμήθηκαν με χρήση της ημιποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης ανάστροφης μεταγραφάσης-πολυμεράσης (semi-quantitative RT-PCR) μετά από επίδραση με χαλκό και εξασθενές χρώμιο σε αρτίβλαστα *A.thaliana*. Μελέτες έχουν δείξει ότι μετά από έκθεση σε διαφορετικά μέταλλα, μερικές από τις αποκρίσεις των φυτών είναι διαφορετικές, όπως για παράδειγμα η υπεροξειδωση λιπιδίων [71]. Αυτός είναι ένας ο λόγος που μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *sbr* σε σχέση με αυτά των γονιδίων που επιλέχθηκαν, μετά από κατεργασία με δύο διαφορετικά μέταλλα. Η αναγνώριση γονιδίων με παρόμοιους ρυθμιστικούς μηχανισμούς σε διαφορετικές συνθήκες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποδώσει πιθανές λειτουργίες σε νέα γονίδια, αφού γονίδια με παρόμοιο τρόπο έκφρασης σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες μπορεί να σχετίζονται λειτουργικά.

Συγκεντρώσεις χαλκού πάνω από 20μM προκαλούν ορατές μεταβολές στην ανάπτυξη των φυτών, όπως στο μήκος της ρίζας [150]. Πιο συγκεκριμένα, σε προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι η ανάπτυξη της ρίζας μειώνεται με επίδραση χαλκού με συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 50μM. Μετά από 72 ώρες επίδρασης με 30μM χαλκού παρατηρήθηκε 50% μείωση της ανάπτυξης και η τοξικότητα των επιδράσεων αυξήθηκε με το χρόνο. Επίσης, ο χαλκός δεν συσσωρεύεται στις ρίζες και το βλαστό στη συγκέντρωση των 50μM, αλλά συσσωρεύεται στις ρίζες στη συγκέντρωση των 150μM [17]. Σε προηγούμενη μελέτη έχει μελετηθεί η επίδραση του εξασθενούς χρωμίου στην ανάπτυξη του *A.thaliana*. Συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 200μM είναι τοξικές για το φυτό και έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των ριζών, του βλαστού και χλώρωση στα φύλλα [151].

Προηγούμενες μελέτες με χρήση μικροσυστοιχιών DNA έχουν δείξει ότι η έκφραση του γονίδιο *sbr1* αυξήθηκε όταν το φυτό εκτίθεται σε βιοτικές και αβιοτικές

καταπονήσεις [9, 10]. Επίσης, φυτά που υπερεκφράζουν το γονίδιο *sbr1* έχουν ενισχυμένη ανθεκτικότητα σε αυξημένες συγκεντρώσεις σεληνίου [6] και σε διάφορα παθογόνα [16]. Η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *sbr1* κατά την απόκριση του φυτού σε τοξικές συγκεντρώσεις χαλκού υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη SBP1 συμμετέχει στην απόκριση του φυτού στην καταπόνηση αυτή. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η έκφραση του γονιδίου *garpdh*, το οποίο θεωρείται συστατικό γονίδιο λόγω του ρόλου του στην παραγωγή ενέργειας, καταστάληκε σε αυτές τις συνθήκες, ενώ επάγονται τα γονίδια *grx6* και *gst9*, τα οποία είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην απόκριση του *A.thaliana* σε τοξικές συγκεντρώσεις χαλκού. Επίσης, το γεγονός ότι η έκφραση του γονιδίου *sbr1* δεν επηρεάζεται σε πολύ τοξικές συγκεντρώσεις εξασθενούς χρωμίου, δηλαδή σε συνθήκες στις οποίες μεγάλο ποσοστό της έκφρασης των γονιδίων καταστάληκε (όπως η *garpdh*), υποδεικνύει ότι η SBP1 διαδραματίζει κάποιο ρόλο σε αυτές τις συνθήκες.

Η έκφραση του γονιδίου *sbr2* δεν έχει βρεθεί ότι επάγεται σε αυτές τις συνθήκες. Οι κωδικές περιοχές των γονιδίων *sbr1* και *sbr2* του *A.thaliana* παρουσιάζουν ποσοστό ταυτότητα αλληλουχίας 85% και 69% με το γονίδιο *sbr3*, οπότε αναμένεται να υπάρχει λειτουργικός πλεονασμός στις δράσεις των πρωτεϊνών τους. Το γεγονός ότι παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *sbr2* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού υποδεικνύει ότι το γονίδιο *sbr2* μπορεί να αποκρίνεται σε διαφορετικές καταπονήσεις ή και σε διαφορετικές εντάσεις καταπονήσεων. Ένα τέτοιο παράδειγμα ρύθμισης γονιδίων της ίδιας οικογένειας πρωτεϊνών σε διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης αποτελούν τα γονίδια *grx* του *A.thaliana*, διαφορετικά γονίδια *grx* επάγονται σε διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης [152].

Αντιθέτως, η έκφρασή του γονιδίου *sbr3* βρέθηκε ότι καταστάληκε σε όλες τις τοξικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Το γονίδιο *sbr3* εκφράζεται σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης του *Arabidopsis* σε χαμηλά επίπεδα. Σε φυτά που υπερεκφράζουν την δεσουλφεράση της κυστεΐνης *AtCpNifS* και εμφάνισαν αυξημένη ανθεκτικότητα στο σελήνιο, η έκφραση του γονιδίου *sbr3* ρυθμίστηκε αρνητικά, ενώ η έκφραση των γονιδίων *sbr1* και *sbr2* ρυθμίστηκε θετικά [153]. Το γονίδιο *sbr3* έχει μικρότερη ταυτότητα αλληλουχίας (69%) με το γονίδιο *sbr1*. Είναι

πιθανό το γονίδιο αυτό να μην παίζει κάποιο ρόλο σε συνθήκες καταπόνησης, αλλά να έχει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού, καθώς έχει βρεθεί ότι αποτελεί ένα από τα γονίδια των οποίων η έκφραση αυξάνεται κατά την ανάπτυξη της ρίζας [154].

Η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *fba* κατά την απόκριση των φυτών μετά από επίδραση με χαλκό δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Η έκφραση του ομόλογου γονιδίου *fba* στο βαμβάκι *Gossypium arboreum* επάγεται σε συνθήκες ξηρασίας, αυξημένης αλατότητας και σε απόκριση στο ABA [65]. Επίσης, το συγκεκριμένο γονίδιο *fba* που μελετήθηκε έχει βρεθεί ότι ρυθμίστηκε θετικά μετά από έκθεση του φυτού σε χαμηλές θερμοκρασίες [155]. Η FBA εντοπίζεται στους χλωροπλάστες και αποτελεί ένζυμο κλειδί στο κύκλο του Calvin, επίσης συμμετέχει στον μεταβολισμό της φρουκτόζης και της μαννόζης, στη γλυκόλυση, τη γλυκονεογέννεση και το αναγωγικό μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Η αύξηση της έκφρασής της στις 24 ώρες μετά από επίδραση με 50μM χαλκού δείχνει ότι παρά την αναστολή της φωτοσύνθεσης που προκαλείται σε αυτές τις συνθήκες [62], η FBA επάγεται για την παραγωγή ATP, NADH και NADPH ή για την παραγωγή κάποιων υδρογονανθράκων σημαντικών για την ανθεκτικότητα του φυτού σε αυτές τις συνθήκες. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης της FBA στις 48 και 72 ώρες επίδρασης με 50μM χαλκού, μπορεί να δείχνει ότι αυτά τα μονοπάτια αναστέλλονται, αλλά για να επιβεβαιωθεί αυτό θα πρέπει να ελεγχθούν τα επίπεδα της πρωτεΐνης. Η έκφραση του γονιδίου *fba* στις 24 και 48 ώρες επίδρασης με 100μM χαλκού παραμένει σταθερή σε σχέση με τους μάρτυρες. Η σταθερή έκφραση του γονιδίου *fba* δεν σημαίνει ότι το ένζυμο δεν εμφανίζει αυξημένη δραστηριότητα σε αυτές τις συνθήκες. Η πρωτεΐνη FBA έχει βρεθεί ότι ρυθμίστηκε με φωσφορυλίωση, αλλά ο ρόλος της φωσφορυλίωσής δεν έχει διερευνηθεί. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης της διαμόρφωσής μειώνονται σε απόκριση στο διεγέρτη chitosan [156], αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η δραστηριότητα του ένζυμου ρυθμίστηκε και μέσω φωσφορυλίωσης σε απόκριση σε καταπονήσεις. Αντιθέτως, η έκφραση του γονιδίου *fba* καταστάληκε σε όλες τις συγκντρώσεις χρωμίου που μελετήθηκαν. Είναι γνωστό ότι το χρώμιο αναστέλλει την φωτοσύνθεση όπως και τα άλλα μέταλλα [80], αλλά οι επιδράσεις του χρωμίου στο μεταβολισμό των υδρογονανθράκων δεν έχουν μελετηθεί, οπότε είναι δύσκολο να εξηγήσουμε αυτή την καταστολή. Η FBA που μελετήσαμε αποτελεί ένζυμο του

κύκλου του Calvin στα φυτά, οπότε είναι πιθανό η καταστολή του γονιδίου *fba* να οφείλεται στα μειωμένα επίπεδα φωτοσύνθεσης που προκαλεί το χρώμιο στα φυτά.

Το γεγονός ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *fba* έχουν παρόμοιο πρότυπο με αυτά του γονιδίου *sbr2* μετά από τις επιδράσεις με όλες τις συγκεντρώσεις χαλκού και χρωμίου που μελετήθηκαν, υποδεικνύει ότι υπάρχει η πιθανότητα να ρυθμίζονται με παρόμοιο τρόπο, αλλά χρειάζονται περισσότερα δεδομένα για να βγάλουμε συμπεράσματα. Τα γονίδια *fba* και *sbr* έχει βρεθεί ότι επάγονται στις ίδιες συνθήκες και σε άλλες μελέτες. Σε πρωτομική μελέτη της απόκρισης του φυτού *A.thaliana* σε αυξημένες συγκεντρώσεις καδμίου, η πρωτεΐνη FBA βρέθηκε ότι εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι και η πρωτεΐνη SBP1 επάγεται στις ίδιες συνθήκες [68]. Η έκφραση της SBP ρυθμίστηκε θετικά σε συνθήκες έλλειψης θείου στο *A.thaliana* [18, 157], το ίδιο έχει βρεθεί και για το γονίδιο *fba* του *A.thaliana* που μελετήσαμε [158]. Επίσης, σε συγκριτική μελέτη με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA, ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια που έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στο αλόφυτο *Thellungiella halophila*, το οποίο παρουσιάζει αυξημένη ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, σε σύγκριση με το *A.thaliana*. Τα γονίδια *fba* και *sbr* βρέθηκε ότι έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης του αλόφυτου [159].

Η GAPDH αποτελεί συστατικό ένζυμο που συμμετέχει στη γλυκόλυση και τη γλυκονεογέννεση. Το γονίδιο *gardh* που μελετήθηκε κωδικοποιεί μία κυτταροπλασματική GAPDH, η οποία αποκαλείται NP-GAPDH (NP, non-phosphorylating, EC 1.2.1.9) και έχει βρεθεί ότι στα ανώτερα φυτά συμμετέχει σε ένα εναλλακτικό μονοπάτι γλυκόλυσης. Επειδή η NP-GAPDH παράγει NADPH στο κυτταρόπλασμα, το οποίο είναι απαραίτητο σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης για να διατηρεί τη γλουταθειόνη και άλλα αντιοξειδωτικά μόρια σε ανηγμένη κατάσταση, έχει μελετηθεί ο τρόπος που το ένζυμο επηρεάζεται σε οξειδωτικές συνθήκες στο σιτάρι και το καλαμπόκι [59]. Η ειδική ενεργότητα του ενζύμου βρέθηκε ότι αυξάνεται 2 φορές μετά από επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις methylviologen, που προκαλεί ισχυρή οξειδωτική καταπόνηση. Σημαντική αύξηση των μεταγραφημάτων του γονιδίου παρατηρήθηκε μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις methylviologen, δηλαδή σε συνθήκες στις οποίες παρατηρήθηκε

60% μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών. Στο *A.thaliana* έχει γίνει χαρακτηρισμός ενός μεταλλάγματος που έχει έλλειψη της NP-GAPDH. Στα μεταλλαγμένα φυτά βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα ROS και αυξημένη έκφραση γονιδίων που αποκρίνονται σε καταπονήσεις, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι η NP-GAPDH εμπλέκεται στην οξειδωτική καταπόνηση στο *A.thaliana* [160]. Το γεγονός ότι οι GAPDHs έχουν πολλαπλές λειτουργίες που μέσω μέτα-μεταφραστικών τροποποιήσεων οδηγούν την πρωτεΐνη αυτή σε άλλα λειτουργικά μονοπάτια εκτός της γλυκόλυσης σε απόκριση σε διάφορους παράγοντες καταπόνησης σε συνδυασμό με τα παραπάνω ευρήματα μας δείχνει ότι η NP-GAPDH του *A.thaliana* είναι πολύ πιθανό να συμμετέχει στην απόκριση του φυτού στην οξειδωτική καταπόνηση ή και σε άλλες καταπονήσεις, πέρα από αυτές που μελετήσαμε.

Τα γονίδια *gpx* του *A.thaliana* έχουν μελετηθεί σε συνθήκες καταπόνησης και έχει βρεθεί ότι διαφορετικά γονίδια επάγονται σε διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης. Το γονίδιο *gpx6* εμφάνισε την πιο έντονη απόκριση σε διαφορετικές αβιοτικές καταπονήσεις και επάγεται μετά από έκθεση των φυτών σε υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού [99]. Αντιθέτως, τα γονίδια *gpx6* δεν εμφάνισαν τόσο αυξημένα επίπεδα έκφρασης στις επιδράσεις με χρώμιο όσο στις επιδράσεις με χαλκό. Μπορεί κάποιο άλλο γονίδιο *gpx* να ρυθμίζεται σε απόκριση στο χρώμιο, αφού διαφορετικά γονίδια *gpx* ρυθμίζονται σε διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης [99]. Όμως παρατηρήθηκε ότι ενώ έχουμε επαγωγή του γονιδίου σε όλες τις τοξικές συγκεντρώσεις χαλκού που μελετήθηκαν, δεν επάγεται στα χρονικά στάδια των 48 και 72 ωρών στη συγκέντρωση των 50μM. Αυτό πιθανώς δείχνει ότι η αντιοξειδωτική άμυνα του φυτού εξασθενεί, αφού οι GPXs προστατεύουν από την οξειδωτική καταστροφή που προκαλείται από καταπονήσεις, όπως η υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η μείωση της GPX και άλλων αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών είχε ως αποτέλεσμα την ανικανότητα του φυτού *Withania somnifera* να εξαλείψει τις ενεργές μορφές οξυγόνου που προκαλεί ο χαλκός [161]. Αυτός είναι πιθανώς ο λόγος που τα γονίδια *sbr2* και *fba* καταστάλθηκε σε αυτά τα χρονικά στάδια στη συγκέντρωση 50μM.

Τέσσερις GSTs είναι γνωστό ότι επάγονται σε τοξικές συγκεντρώσεις χαλκού, μία από αυτές είναι και η GST9 [75], η οποία έχει βρεθεί ότι δεσμεύει χαλκό, κάδμιο και ψευδάργυρο. Οι GSTs συμμετέχουν στην αποτοξίνωση ξеноβιοτικών και

αποικοδομημένων προϊόντων που προκύπτουν από την οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από εξωγενή χημικά ή ζιζανιοκτόνα και περιορίζουν την οξειδωτική καταπόνηση [101]. Επίσης, οι GSTs στον *S.cerevisiae* έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην απευθείας σύζευξη του καδμίου με τη γλουταθειόνη [162]. Από την παρούσα μελέτη μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η GST9 συμμετέχει στην απόκριση του φυτού στο χρώμιο, όπως και στο χαλκό.

4.2. Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών AtSBP1 και AtGAPDH *in planta*

Σε προηγούμενη μελέτη, έχει δειχθεί ότι η αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (AtGAPDH) και η αλδολάση της 1,6-δισφωφορικής φρουκτόζης (AtFBA) αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη AtSBP1 *in vivo* και *in vitro* [7]. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία της συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού (BiFC) για να επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών *in planta*. Επιπρόσθετα, με αυτό τον τρόπο ανιχνεύτηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός των συμπλόκων. Σήμα φθορισμού ανιχνεύτηκε μόνο για το σύμπλοκο της AtSBP1 με την AtGAPDH στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. Η GAPDH εκτός από τον ρόλο της στην γλυκόλυση συμμετέχει σε έναν αριθμό μη-μεταβολικών διεργασιών οι οποίες εξαρτώνται από τον υποκυτταρικό εντοπισμό της. Όπως οι πρωτεΐνες GAPDH έτσι και οι πρωτεΐνες SBP αναμένεται να έχουν πολλαπλούς βιολογικούς ρόλους. Οι πολυλειτουργικές αυτές πρωτεΐνες αναμένεται να αλληλεπιδρούν για να επιτελέσουν μία ή περισσότερες βιολογικές λειτουργίες, εκτός της γλυκόλυσης.

Στα ζώα, η GAPDH όταν ενοπίζεται στον πυρήνα έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [54], τη μεταγραφή του DNA [55], την προστασία των τελομερών και την επιδιόρθωση του DNA [56]. Για παράδειγμα, η μετακίνησή της στον πυρήνα αποτελεί έναν μηχανισμό σηματοδότησης για την ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου [42]. Στα φυτά, μία κυτταροπλασματική GAPDH του *A.thaliana* και του ρυζιού, η GAPC, σε μεταφραστική σύντηξη με την GFP έχει εντοπιστεί στον πυρήνα με παροδικό μετασχηματισμό πρωτοπλαστών *A.thaliana*. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών GAPDH εξαρτάται από τροποποιήσεις της κυστεΐνης του καταλυτικού της κέντρου, καθώς είναι ευαίσθητο

στις τροποποιήσεις και την οξειδωση [163, 164]. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της AtSBP1 μελετήθηκε για πρώτη φορά σε αυτή τη μελέτη και βρέθηκε ότι η AtSBP1 εντοπίζεται εκτός από το κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Το ίδιο έχει βρεθεί και για την SBP του ανθρώπου, την hSBP, η οποία έχει εντοπιστεί στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα αλλά δεν είναι γνωστός ο βιολογικός της ρόλος [33] [34].

Αντίθετα από την GAPDH δεν ανιχνεύτηκε σήμα αλληλεπίδρασης της AtSBP1 με την FBA. Αυτό δεν σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν. Η μέθοδος BiFC δεν επιβεβαιώνει πάντα τις αλληλεπιδράσεις που έχουν βρεθεί με δοκιμασίες δέσμησης *in vitro* και τεχνολογία του διπλού υβριδίου της ζύμης [165]. Είναι πιθανό η μεταφραστική σύντηξη με την YFP, να εμποδίζει την σύσταση του συμπλόκου ή η δομή του συμπλόκου να εμποδίζει τη σύσταση της YFP. Επίσης, οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να μην αλληλεπιδρούν σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης του φυτού, αλλά σε διαφορετικές συνθήκες ή να απαιτούνται και άλλες πρωτεΐνες για να σχηματιστεί το σύμπλοκο.

4.3. Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης AtSBP1 *in planta* σε πραγματικό χρόνο

Τα VHH που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη προέρχονται από ανοσοποίηση *Lama glama*. Με τη μέθοδο phage display επιλέχθηκαν τα αντισώματα με την μεγαλύτερη συγγένεια για την πρωτεΐνη του *A.thaliana* SBP1 και υπερεκφράστηκαν στο φυτό *N.benthiana*. Η ανίχνευσή φθορίζοντος σήματος υποδεικνύει ότι τα VHH εντόπισαν την πρωτεΐνη AtSBP1, συνεπώς ότι αναδιπλώθηκαν σωστά σε λειτουργικά αντισώματα στο φυτό χωρίς καμία τροποποίηση. Η ανίχνευση φθορίζοντος σήματος στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα μας δείχνει ότι τα VHH λόγω της αυξημένης σταθερότητάς τους μπορούν να αναδιπλωθούν σωστά σε λειτουργικά αντισώματα στο αναγωγικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος και ότι μπορούν να ανιχνεύουν πρωτεΐνες που βρίσκονται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα χωρίς την προσθήκη κάποιου σήματος εντοπισμού. Τα άλλα δύο VHH δεν εκφράστηκαν σε υψηλά επίπεδα στο φυτό. Αυτό δείχνει ότι, όπως και στα υπόλοιπα συστήματα έκφρασης, ενδογενή χαρακτηριστικά του κάθε VHHs επηρεάζουν την σταθερότητά και την αποδοτική έκφρασή τους στα φυτά.

Σε αυτή τη μελέτη δείχθηκε ότι τα δύο από τα τέσσερα VHH που μελετήθηκαν είναι λειτουργικά *in planta*. Η μέθοδος αυτή αποτελεί έναν εύκολο τρόπο για τον έλεγχο της λειτουργικότητας VHH που προέρχονται από βιβλιοθήκες *in planta*. Για παράδειγμα, στο μέλλον αυτά τα δύο VHH για τα οποία ανιχνεύτηκε σήμα φθορισμού, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να μελετήσουμε τους επίτοπους της AtSBP1 που αναγνωρίζουν και τη λειτουργία συγκεκριμένων λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης, και αν αυτά τα VHHs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανοσορύθμιση της πρωτεΐνης AtSBP1. Επίσης, για την ανοσορύθμιση πρωτεϊνών στα φυτά, είναι σημαντική η έκφραση των αντισωμάτων σε συγκεκριμένα κυτταρικά διαμερίσματα [166]. Με την μέθοδο αυτή, θα μπορούσε εύκολα να ανιχνευθεί το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο εντοπίζονται τα VHH.

Η πρωτεΐνη AtSBP1 έχει βρεθεί ότι αποκρίνεται σε συνθήκες καταπόνησης, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετήσουμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό τη πρωτεΐνης στις συνθήκες αυτές. Γι' αυτό το σκοπό θα μπορούσαμε να κατασκευάσουμε σταθερά μετασηματισμένα φυτά που εκφράζουν την AtSBP1 σε μεταφραστική σύντηξη με το αμινοτελικό άκρο της YFP και να υπερεκφράσουμε τα VHH σε σύντηξη με το καρβοξυτελικό άκρο της YFP κατά τη διάρκεια διάφορων συνθηκών καταπόνησης. Επίσης, οι αλλαγές της διαμόρφωσης πρωτεϊνών έχουν ως αποτέλεσμα πολλές φορές την κυτταρική αναδιανομή της πρωτεΐνης. Με τη μέθοδο που αυτή είναι δυνατή η τροποποίηση πρωτεϊνών μέσω των VHH και ταυτόχρονα ο εντοπισμός της κυτταρικής αναδιανομής της. Τέλος, τα αντισώματα μπορούν να ανιχνεύσουν αλλαγές στη διαμόρφωση πρωτεϊνών, οπότε θα μπορούσαν να ανιχνευτούν αλλαγές στη διαμόρφωση και να εντοπιστεί το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο διανέμονται οι δύο διαμορφώσεις.

Παρόλο που τα VHH μπορούν να παραχθούν σε μικροοργανισμούς σε μεγάλες ποσότητες υπάρχουν πολλά παραδείγματα VHHs που διαφέρουν σε μόνο λίγα αμινοξέα και παράγονται σε εντελώς διαφορετικά επίπεδα [133] Επιπρόσθετα, είναι επιθυμητή η παραγωγή διαφορετικών σχηματισμών έκφρασης των VHHs με μεταφραστική σύντηξη δύο ή περισσότερων [19], τα οποία αναγνωρίζουν το ίδιο ή διαφορετικά αντιγόνα για να αυξηθεί η λειτουργική συγγενειά τους με το αντιγόνο. Τα φυτά θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα εναλλακτικό σύστημα παραγωγής των VHH καθώς στο παρελθόν έχει δειχθεί η ικανότητάς τους να παράγουν ποικίλους

σχηματισμούς αντισωμάτων [134, 135] Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής του ιού του μωσαϊκού CaMV και η θέση πολυαδενυλίωσης, του γονιδίου nos (Tnos) του *A.tumefaciens*. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη P19 του ιού του θαμνώδους νανισμού της ντομάτας, η οποία καταστάληκε τη γονιδιακή σίγηση των διαγονιδίων που εκφράζονται στον καπνό [149]. Με αυτή την μέθοδο, επιτρέπεται ο παροδικός μετασχηματισμός χωρίς να κατασκευαστούν σταθερά μετασχηματισμένα φυτά [167] και μπορεί να εκτιμηθεί γρήγορα η αποδοτική έκφραση διαφορετικών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Η μέθοδος αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την μαζική παραγωγή αντισωμάτων. Το πρόβλημα παραγωγής συμβατικών αντισωμάτων στον καπνό αποτελεί η ετερόλογη N-γλυκοσυλίωση των αντισωμάτων που στοχεύονται στο εκκριτικό μονοπάτι, όμως τα VHH δεν απαιτούν γλυκοσυλίωση οπότε θα μπορούσαν να στοχευθούν σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα στα οποία οι πρωτεΐνες δεν γλυκοσυλιώνονται, όπως το κυτταρόπλασμα, οι χλωροπλάστες και ο αποπλάστης.

5. Βιβλιογραφία

1. Bansal, M.P., et al., *Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver*. *Carcinogenesis*, 1989. **10**(3): p. 541-6.
2. Hatfield, D.L.e.a., *How selenium has altered our understanding of the genetic code*. *Mol. Cell. Biol.*, 2002. **22**: p. 3565–3576.
3. Behne, D. and A. Kyriakopoulos, *Mammalian selenium-containing proteins*. *Annual review of nutrition*, 2001. **21**: p. 453-73.
4. Jeong, J.Y., Y. Wang, and A.J. Sytkowski, *Human selenium binding protein-1 (hSP56) interacts with VDU1 in a selenium-dependent manner*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2009. **379**(2): p. 583-8.
5. Fletmetakis, E., et al., *Lotus japonicus gene ljsbp is highly conserved among plants and animals and encodes a homologue to the mammalian selenium-binding proteins*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002. **15**(4): p. 313-322.
6. Agalou, A., A. Roussis, and H.P. Spaink, *The Arabidopsis selenium-binding protein confers tolerance to toxic levels of selenium*. *Functional Plant Biology*, 2005. **32**(10): p. 881-890.
7. Agalou, A., H.P. Spaink, and A. Roussis, *Novel interaction of selenium-binding protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and fructose-bisphosphate aldolase of Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 2006. **33**(9): p. 847.
8. Dutilleul, C., et al., *The Arabidopsis putative selenium-binding protein family: Expression study and characterization of SBP1 as a potential new player in cadmium detoxification processes*. *Plant physiology*, 2008. **147**(1): p. 239-251.
9. Schenk, P.M., et al., *Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. **97**(21): p. 11655-60.
10. Desikan, R., et al., *Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress*. *Plant physiology*, 2001. **127**(1): p. 159-72.
11. Iturriaga, G., M.A.F. Cushman, and J.C. Cushman, *An EST catalogue from the resurrection plant Selaginella lepidophylla reveals abiotic stress-adaptive genes*. *Plant Science*, 2006. **170**(6): p. 1173-1184.
12. Liu, S.W. and Y.W. Jiang, *Identification of differentially expressed genes under drought stress in perennial ryegrass*. *Physiologia plantarum*, 2010. **139**(4): p. 375-387.
13. Zhu-Salzman, K., et al., *Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid*. *Plant physiology*, 2004. **134**(1): p. 420-31.
14. Liu, X.N. and W.V. Baird, *Differential expression of genes regulated in response to drought or salinity stress in sunflower*. *Crop Science*, 2003. **43**(2): p. 678-687.
15. Machuka, J., et al., *Sequence analysis of expressed sequence tags from an ABA-treated cDNA library identifies stress response genes in the moss Physcomitrella patens*. *Plant & cell physiology*, 1999. **40**(4): p. 378-87.

16. Sawada K, T.L., Shinmyo A *Characterization of the rice blast fungal elicitor-responsive gene OsSBP encoding a homolog to the mammalian selenium binding proteins.* . Plant Biotechnology, 2003. **20**: p. 177–181.
17. Hugouvieux, V., et al., *Arabidopsis putative selenium-binding protein1 expression is tightly linked to cellular sulfur demand and can reduce sensitivity to stresses requiring glutathione for tolerance.* Plant physiology, 2009. **151**(2): p. 768-81.
18. Nikiforova, V., et al., *Transcriptome analysis of sulfur depletion in Arabidopsis thaliana: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity.* The Plant journal : for cell and molecular biology, 2003. **33**(4): p. 633-50.
19. Zhang, Z.D., et al., *Insights into the survival of Chlamydomonas reinhardtii during sulfur starvation based on microarray analysis of gene expression.* Eukaryotic Cell, 2004. **3**(5): p. 1331-1348.
20. Ishida, T., et al., *Enhancement of acetaminophen cytotoxicity in selenium-binding protein-overexpressed COS-1 cells.* Drug metabolism and pharmacokinetics, 2004. **19**(4): p. 290-6.
21. Mattow, J., et al., *Selenium-binding protein 2, the major hepatic target for acetaminophen, shows sex differences in protein abundance.* Electrophoresis, 2006. **27**(8): p. 1683-1691.
22. Patrick, L., *Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature.* Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic, 2004. **9**(3): p. 239-58.
23. Yang, M. and A.J. Sytkowski, *Differential expression and androgen regulation of the human selenium-binding protein gene hSP56 in prostate cancer cells.* Cancer research, 1998. **58**(14): p. 3150-3.
24. He, Q.Y., et al., *Diverse proteomic alterations in gastric adenocarcinoma.* Proteomics, 2004. **4**(10): p. 3276-87.
25. Huang, K.C., et al., *Selenium binding protein 1 in ovarian cancer.* International journal of cancer. Journal international du cancer, 2006. **118**(10): p. 2433-40.
26. Guoan C, H.W., Charles TM, Dafydd GT, Tarek GG, et al., *Reduced selenium-binding protein 1 expression is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas.* The Journal of Pathology, 2004. **202**: p. 321–329.
27. Kim, H., et al., *Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival.* Proteomics, 2006. **6**(11): p. 3466-3476.
28. Li T, Y.W., Li M, Byun DS, Tong C, et al., *Expression of seleniumbinding protein 1 characterizes intestinal cell maturation and predicts survival for patients with colorectal cancer.* Mol Nutr Food Res, 2008. **52**: p. 1289–1299.
29. Pass, H.I., et al., *Gene expression profiles predict survival and progression of pleural mesothelioma.* Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2004. **10**(3): p. 849-59.
30. Glatt SJ, E.I., Kremen WS, Corbeil J, Sasik R, Khanlou N, Han M, Liew CC, Tsuang MT *Comparative gene expression analysis of blood brain provides concurrent validation of SELENBP1 upregulation in schizophrenia.* . Proc Natl Acad Sci USA 2005. **102**: p. 15533– 15538.

31. Giometti, C.S., et al., *Mouse liver selenium-binding protein decreased in abundance by peroxisome proliferators*. Electrophoresis, 2000. **21**(11): p. 2162-9.
32. Porat, A., Y. Sagiv, and Z. Elazar, *A 56-kDa selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(19): p. 14457-65.
33. Zhang, J., W.G. Dong, and J. Lin, *Reduced selenium-binding protein 1 is associated with poor survival rate in gastric carcinoma*. Medical oncology, 2011. **28**(2): p. 481-7.
34. Fang, W., et al., *Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein*. Carcinogenesis, 2010. **31**(8): p. 1360-6.
35. Lacourciere, G.M., R.L. Levine, and T.C. Stadtman, *Direct detection of potential selenium delivery proteins by using an Escherichia coli strain unable to incorporate selenium from selenite into proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(14): p. 9150-3.
36. Meyer-Siegler K, M.D., Seal G, Wurzer J, deRiel JK, Sirover MA, *A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(19): p. 8460-4.
37. Singh, R., and M. R. Green, *Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Science, 1993. **259**: p. 365-368.
38. Zheng, L., R.G. Roeder, and Y. Luo, *S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component*. Cell, 2003. **114**(2): p. 255-266.
39. Glaser, P.E. and R.W. Gross, *Rapid Plasmenylethanolamine-Selective Fusion of Membrane Bilayers Catalyzed by an Isoform of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase - Discrimination between Glycolytic and Fusogenic Roles of Individual Isoforms*. Biochemistry, 1995. **34**(38): p. 12193-12203.
40. EJ, T., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase Ciota/lambda and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway*. Biol Chem, 2002. **277**: p. 3334-3341.
41. Kumagai, H. and H. Sakai, *A Porcine Brain Protein (35k-Protein) Which Bundles Microtubules and Its Identification as Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*. Journal of biochemistry, 1983. **93**(5): p. 1259-1269.
42. Hara, M.R., et al., *S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding*. Nature cell biology, 2005. **7**(7): p. 665-74.
43. Ishitani, R., et al., *An antisense oligodeoxynucleotide to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase blocks age-induced apoptosis of mature cerebrocortical neurons in culture*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1996. **278**(1): p. 447-54.
44. Saunders, P.A., E. Chalecka-Franaszek, and D.M. Chuang, *Subcellular distribution of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cerebellar granule cells undergoing cytosine arabinoside-induced apoptosis*. Journal of Neurochemistry, 1997. **69**(5): p. 1820-8.

45. Sawa, A., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(21): p. 11669-74.
46. Tristan, C., et al., *The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments*. Cellular signalling, 2011. **23**(2): p. 317-323.
47. Ralser M, W.M., Kowald A, Gerisch B, Heeren G, Struys EA, Klipp E, Jakobs C, Breitenbach M, Lehrach H, Krobitsch S *Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress*. J Biol., 2007 **6**(4): p. 10.
48. Kim, J.H., et al., *Hydrogen peroxide induces association between glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and phospholipase D2 to facilitate phospholipase D2 activation in PC12 cells*. Journal of Neurochemistry, 2003. **85**(5): p. 1228-1236.
49. Morigasaki, S., et al., *Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade*. Molecular Cell, 2008. **30**(1): p. 108-113.
50. Kumagai H, S.H., *A porcine brain protein (35 K protein) which bundles microtubules and its identification as glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*. J Biochem., 1983 **93**: p. 1259-69.
51. Reiss, N., et al., *Phosphatidylserine directs differential phosphorylation of actin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein kinase C: possible implications for regulation of actin polymerization*. Biochemistry and molecular biology international, 1996. **40**(6): p. 1191-200.
52. Mazzola, J.L. and M.A. Sirover, *Alteration of intracellular structure and function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a common phenotype of neurodegenerative disorders?* Neurotoxicology, 2002. **23**(4-5): p. 603-9.
53. Tanaka, R., et al., *Induction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression in rat brain after focal ischemia/reperfusion*. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2002. **22**(3): p. 280-8.
54. Dai, R.P., et al., *Histone 2B (H2B) expression is confined to a proper NAD(+)/NADH redox status*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(40): p. 26894-26901.
55. Azam, S., et al., *Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase plays a direct role in reactivating oxidized forms of the DNA repair enzyme APE1*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(45): p. 30632-41.
56. Demarse, N.A., et al., *Direct binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to telomeric DNA protects telomeres against chemotherapy-induced rapid degradation*. Journal of molecular biology, 2009. **394**(4): p. 789-803.
57. Valverde, F., et al., *Sugar-mediated transcriptional regulation of the Gap gene system and concerted photosystem II functional modulation in the microalga Scenedesmus vacuolatus*. Planta, 2005. **221**(6): p. 937-52.
58. Gibbs, G.J.K.a.M., *Nonreversible d-Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase of Plant Tissues*. Plant Physiol., 1973. **52**: p. 111.

59. Bustos, D.M., C.A. Bustamante, and A.A. Iglesias, *Involvement of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in response to oxidative stress*. Journal of plant physiology, 2008. **165**(4): p. 456-461.
60. Lebherz HG, L.M., Bradshaw RA, *Isolation and characterization of cytosolic and chloroplastic forms of spinach leaf fructose diphosphate aldolase*. J Biol Chem, 1984. **259**: p. 1011–1017.
61. Sonnewald UJ, L.R., Zrenner Frommer WB, *Manipulation of source-sink relations in transgenic plants*. Plant Cell Environ, 1994. **17**: p. 649–658.
62. Fan, W., Z.L. Zhang, and Y.L. Zhang, *Cloning and molecular characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene regulated by high-salinity and drought in Sesuvium portulacastrum*. Plant Cell Reports, 2009. **28**(6): p. 975-984.
63. Yamada, S., et al., *Differential expression of plastidic aldolase genes in Nicotiana plants under salt stress*. Plant science, 2000. **154**(1): p. 61-69.
64. Zhang X, L.C., Chen H, Wang H, Qu Z, Zhang H, Yao J, Shen D, *Cloning of a NaCl-induced fructose-1,6-diphosphate aldolase cDNA from Dualiella salina and its expression in tobacco*. Sci China Series C Life Sci, 2003. **1**: p. 49–57.
65. Qaisar, U., et al., *Identification, sequencing and characterization of a stress induced homologue of fructose bisphosphate aldolase from cotton*. Canadian Journal of Plant Science, 2010. **90**(1): p. 41-48.
66. Ahsan, N., J. Renaut, and S. Komatsu, *Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals*. Proteomics, 2009. **9**(10): p. 2602-21.
67. Lo"sch, R., in: Prasad, M. N. V., *Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems*. Springer and Narosa Publishing House, New Delhi, India, 2004: p. 182–200.
68. Sarry, J.E., et al., *The early responses of Arabidopsis thaliana cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses*. Proteomics, 2006. **6**(7): p. 2180-98.
69. Bona, E., et al., *Proteomic characterization of copper stress response in Cannabis sativa roots*. Proteomics, 2007. **7**(7): p. 1121-30.
70. Ahsan, N., et al., *Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress*. Proteomics, 2008. **8**(17): p. 3561-3576.
71. Hall, J.L., *Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance*. Journal of experimental botany, 2002. **53**(366): p. 1-11.
72. Hartley-Whitaker, J., G. Ainsworth, and A.A. Meharg, *Copper- and arsenate-induced oxidative stress in Holcus lanatus L. clones with differential sensitivity*. Plant Cell and Environment, 2001. **24**(7): p. 713-722.
73. Ahsan, N., et al., *Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds*. Chemosphere, 2007. **67**(6): p. 1182-93.
74. Hajduch, M., et al., *High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (Oryza sativa L.) leaves: drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins*. Electrophoresis, 2001. **22**(13): p. 2824-31.

75. Smith, A.P., et al., *Proteomic analysis of Arabidopsis glutathione S-transferases from benoxacor- and copper-treated seedlings*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(25): p. 26098-104.
76. van Hoof, N.A., et al., *Enhanced copper tolerance in Silene vulgaris (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene*. Plant physiology, 2001. **126**(4): p. 1519-26.
77. Cobbett, C. and P. Goldsbrough, *Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis*. Annual review of plant biology, 2002. **53**: p. 159-82.
78. Hancock, J.T., Henson, D., Nvirenda, M., Desikan, R., *Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in Arabidopsis*. 2005. **43**: p. 828–835.
79. Sanita di Toppi, L., Prasad, M. N. V., Ottonello, S., in: Prasad, M. N. V., Strzaka, K., *Physiology and Biochemistry of Heavy Metal Detoxification and Tolerance in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2002: p. 59–93.
80. Panda, S.K., *Chromium-mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of developing rice seedlings*. Journal of plant physiology, 2007. **164**(11): p. 1419-28.
81. Labra, M., et al., *Zea mays L. protein changes in response to potassium dichromate treatments*. Chemosphere, 2006. **62**(8): p. 1234-44.
82. Schützendübel, A. and A. Polle, *Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization*. Journal of experimental botany, 2002. **53**(372): p. 1351-65.
83. Polle A, R.H., *Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress*. Plant adaptation to environmental stress. London: Chapman & Hal, 1993: p. 263–273.
84. Alvarez ME, L.C., *Oxidative burst-mediated defense responses in plant disease resistance*. Scandalios JG, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997: p. 815–839.
85. N., D., *The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress*. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1997(Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses): p. 785–813.
86. Bolwell, G.P., et al., *The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system*. Journal of experimental botany, 2002. **53**(372): p. 1367-76.
87. Neill, S.J., et al., *Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants*. Journal of experimental botany, 2002. **53**(372): p. 1237-1247.
88. Vranova, E., D. Inze, and F. Van Breusegem, *Signal transduction during oxidative stress*. Journal of experimental botany, 2002. **53**(372): p. 1227-36.
89. Schützendübel A, S.P., Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A., *Cadmium-induced changes in antioxidative systems, H₂O₂ content and differentiation in pine (Pinus sylvestris) roots*. Plant Physiology, 2001. **127**: p. 887–892.

90. Noctor, G. and C.H. Foyer, *ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control*. Annual review of plant physiology and plant molecular biology, 1998. **49**: p. 249-279.
91. K., A., *The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons*. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology of reproduction, 1999. **50**: p. 601–639.
92. Le Lay, P., et al., *Metabolomic, proteomic and biophysical analyses of Arabidopsis thaliana cells exposed to a caesium stress. Influence of potassium supply*. Biochimie, 2006. **88**(11): p. 1533-47.
93. Yang, Q.S., et al., *Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: Cysteine synthase as a key player in Al response*. Proteomics, 2007. **7**(5): p. 737-749.
94. Yan Wang, J.L., Jiazhen Wang, Zhengkui Li, *Exogenous H₂O₂ improves the chilling tolerance of manilagrass and mascarenegrass by activating the antioxidative system*. Plant Growth Regul, 2010. **61**: p. 195–204.
95. Arthur, J.R., *The glutathione peroxidases*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2000. **57**(13-14): p. 1825-35.
96. Delaunay, A., et al., *A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation*. Cell, 2002. **111**(4): p. 471-481.
97. Herbertte, S., et al., *Two GPX-like proteins from Lycopersicon esculentum and Helianthus annuus are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities*. European journal of biochemistry / FEBS, 2002. **269**(9): p. 2414-20.
98. Jung, B.G., et al., *A Chinese cabbage cDNA with high sequence identity to phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases encodes a novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(15): p. 12572-8.
99. Milla, M.A.R., et al., *Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways*. Plant Journal, 2003. **36**(5): p. 602-615.
100. Miao, Y.C., et al., *An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses*. The Plant cell, 2006. **18**(10): p. 2749-2766.
101. Neufeind T, R.P., Bieseler B, *Plant glutathione Stransferases and herbicide detoxification*. Biol Chem, 1997. **378**: p. 199–205.
102. Rea, P.A., *MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast*. Journal of experimental botany, 1999. **50**: p. 895-913.
103. KA, M., *The functions and regulation of glutathione Stransferases in plants*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996. **47**: p. 127–158.
104. Lamoureux GL, R.D., *Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants*. SPB Academic Publishing, 1993: p. 221–237.
105. Hamers-Casterman, C., et al., *Naturally occurring antibodies devoid of light chains*. Nature, 1993. **363**(6428): p. 446-8.
106. Rast, J.P., et al., *Distinct patterns of IgH structure and organization in a divergent lineage of chondrichthyan fishes*. Immunogenetics, 1998. **47**(3): p. 234-45.

107. Conrath, K.E., et al., *Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae*. Developmental and comparative immunology, 2003. **27**(2): p. 87-103.
108. Nguyen, V.K., et al., *Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation*. Immunogenetics, 2002. **54**(1): p. 39-47.
109. Muyldermans, S., C. Cambillau, and L. Wyns, *Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains*. Trends in biochemical sciences, 2001. **26**(4): p. 230-5.
110. Nguyen, V.K., et al., *Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire*. The EMBO journal, 2000. **19**(5): p. 921-30.
111. Harmsen, M.M., et al., *Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features*. Molecular immunology, 2000. **37**(10): p. 579-590.
112. Harmsen, M.M. and H.J. De Haard, *Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments*. Applied microbiology and biotechnology, 2007. **77**(1): p. 13-22.
113. Holliger, P. and P.J. Hudson, *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*. Nature biotechnology, 2005. **23**(9): p. 1126-36.
114. Kabat, E.A., T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesman, and C. Foeller, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5th ed. Bethesda, Md.: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, 1991.
115. Lauwereys, M., et al., *Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies*. The EMBO journal, 1998. **17**(13): p. 3512-20.
116. Spinelli, S., et al., *Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens*. Biochemistry, 2000. **39**(6): p. 1217-22.
117. Desmyter, A., et al., *Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(28): p. 26285-90.
118. Desmyter, A., et al., *Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme*. Nature structural biology, 1996. **3**(9): p. 803-11.
119. Wesolowski, J., et al., *Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity*. Medical microbiology and immunology, 2009. **198**(3): p. 157-74.
120. Hadfield, A.T., et al., *Crystal structure of the mutant D52S hen egg white lysozyme with an oligosaccharide product*. Journal of molecular biology, 1994. **243**(5): p. 856-72.
121. Braden, B.C., et al., *Three-dimensional structures of the free and the antigen-complexed Fab from monoclonal anti-lysozyme antibody D44.1*. Journal of molecular biology, 1994. **243**(4): p. 767-81.
122. Hoogenboom, H.R., et al., *Antibody phage display technology and its applications*. Immunotechnology : an international journal of immunological engineering, 1998. **4**(1): p. 1-20.
123. van der Linden, R.H., et al., *Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies*. Biochimica et biophysica acta, 1999. **1431**(1): p. 37-46.

124. de Haard, H.J., et al., *A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(26): p. 18218-18230.
125. Goldman, E.R., et al., *Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library*. Analytical chemistry, 2006. **78**(24): p. 8245-55.
126. Zhou, J.X., et al., *Implementation of advanced technologies in commercial monoclonal antibody production*. Biotechnology journal, 2008. **3**(9-10): p. 1185-200.
127. Arbabi-Ghahroudi, M., J. Tanha, and R. MacKenzie, *Prokaryotic expression of antibodies*. Cancer and Metastasis Reviews, 2005. **24**(4): p. 501-519.
128. Arbabi Ghahroudi, M., et al., *Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies*. FEBS letters, 1997. **414**(3): p. 521-6.
129. Frenken LGJ, v.d.L.R., Hermans PW, Bos JW, Ruuls RC, de Geus B, Verrips CT, *Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by Saccharomyces cerevisiae*. J Biotechnol 2000. **78**: p. 11–21.
130. Rahbarizadeh, F., et al., *Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast Pichia pastoris*. Molecular immunology, 2006. **43**(5): p. 426-35.
131. Joosten, V., et al., *Expression and production of llama variable heavy-chain antibody fragments (V(HH)s) by Aspergillus awamori*. Applied microbiology and biotechnology, 2005. **66**(4): p. 384-92.
132. Thomassen YE, M.W., Sierkstra L, Verrips CT *Large-scale production of VHH antibody fragments by Saccharomyces cerevisiae*. . Enzyme Microb Technol, 2002. **30**: p. 273–278.
133. Harmsen, M.M., et al., *Prolonged in vivo residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins*. Vaccine, 2005. **23**(41): p. 4926-4934.
134. Peeters K, D.W.C., Depicker A, *Highly efficient targeting and accumulation of a F(ab) fragment within the secretory pathway and apoplast of Arabidopsis thaliana*. Eur J Biochem, 2001(268): p. 4251–4260.
135. De Jaeger G, S.S., Jacobs A, Zambre M, Zobell O, Goossens A, Depicker A, Angenon G, *Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using Phaseolus vulgaris regulatory sequences*. Nat Biotechnol, 2002. **20**: p. 1265-1268.
136. Ismaili A, J.-J.M., Rasaei MJ, Rahbarizadeh F, Forouzandeh-Moghadam M, Memari HR, *Production and characterization of anti-(mucin MUC1) single-domain antibody in tobacco (Nicotiana tabacum cultivar Xanthi)*. Biotechnol Appl Biochem., 2007 **47**(9-11).
137. Winichayakul, S., et al., *Head-to-tail fusions of camelid antibodies can be expressed in planta and bind in rumen fluid*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2009. **53**: p. 111-122.
138. Gueorguieva D, L.S., Walsh N, Mukerji A, Tanha J, Pandey S *Identification of single-domain, Bax-specific intrabodies that confer resistance to mammalian cells against oxidative-stress-induced apoptosis*. . FASEB J, 2006. **20**: p. 2636–2638.

139. Rothbauer, U., et al., *Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies*. Nature methods, 2006. **3**(11): p. 887-9.
140. Tanaka, T., M.N. Lobato, and T.H. Rabbitts, *Single domain intracellular antibodies: a minimal fragment for direct in vivo selection of antigen-specific intrabodies*. Journal of molecular biology, 2003. **331**(5): p. 1109-20.
141. Kontermann, R.E., *Intrabodies as therapeutic agents*. Methods, 2004. **34**(2): p. 163-170.
142. Jobling, S.A., et al., *Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments*. Nature biotechnology, 2003. **21**(1): p. 77-80.
143. Kirchhofer, A., et al., *Modulation of protein properties in living cells using nanobodies*. Nature structural & molecular biology, 2010. **17**(1): p. 133-8.
144. Colby, D.W., et al., *Potent inhibition of huntingtin aggregation and cytotoxicity by a disulfide bond-free single-domain intracellular antibody*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(51): p. 17616-21.
145. Habicht, G., et al., *Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Abeta protofibrils*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(49): p. 19232-7.
146. Miroshnichenko, S., et al., *Immunomodulation of function of small heat shock proteins prevents their assembly into heat stress granules and results in cell death at sublethal temperatures*. Plant Journal, 2005. **41**(2): p. 269-281.
147. Walter M, C.C., Schütze K, Batistic O, Weckermann K, Näke C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K, Kudla J., *Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation*. Plant J., 2004. **40**: p. 428-38.
148. Chang-Deng Hu, Y.C., and Tom K. Kerppola, *Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation*. Molecular Cell, 2002. **9**: p. 789–798.
149. Voinnet O, R.S., Mestre P, Baulcombe D., *An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus*. Plant J., 2003. **33**: p. 949-56.
150. Murphy, A. and L. Taiz, *A New Vertical Mesh Transfer Technique for Metal-Tolerance Studies in Arabidopsis - Ecotypic Variation and Copper-Sensitive Mutants*. Plant physiology, 1995. **108**(1): p. 29-38.
151. Castro, R.O., et al., *Effects of dichromate on growth and root system architecture of Arabidopsis thaliana seedlings*. Plant Science, 2007. **172**(4): p. 684-691.
152. !!! INVALID CITATION !!!
153. Van Hoewyk, D., et al., *Overexpression of AtCpNifS enhances selenium tolerance and accumulation in Arabidopsis*. Plant physiology, 2005. **139**(3): p. 1518-28.
154. Che, P., et al., *Gene expression programs during shoot, root, and callus development in Arabidopsis tissue culture*. Plant physiology, 2006. **141**(2): p. 620-637.

155. Provar, N.J., et al., *Gene expression phenotypes of Arabidopsis associated with sensitivity to low temperatures*. Plant physiology, 2003. **132**(2): p. 893-906.
156. Huang, C., et al., *Response to biotic and oxidative stress in Arabidopsis thaliana: Analysis of variably phosphorylated proteins*. Journal of Proteomics, 2011. **74**(10): p. 1934-1949.
157. Hirai, M.Y. and K. Saito, *Post-genomics approaches for the elucidation of plant adaptive mechanisms to sulphur deficiency*. Journal of experimental botany, 2004. **55**(404): p. 1871-1879.
158. Hirai, M.Y., et al., *Global expression profiling of sulfur-starved Arabidopsis by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition*. Plant Journal, 2003. **33**(4): p. 651-663.
159. Taji, T., et al., *Comparative genomics in salt tolerance between Arabidopsis and Arabidopsis-related halophyte salt cress using Arabidopsis microarray*. Plant physiology, 2004. **135**(3): p. 1697-1709.
160. Rius, S.P., et al., *Characterization of an Arabidopsis thaliana mutant lacking a cytosolic non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Plant molecular biology, 2006. **61**(6): p. 945-57.
161. Khatun, S., et al., *Copper toxicity in Withania somnifera: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants*. Environmental and Experimental Botany, 2008. **64**(3): p. 279-285.
162. Adamis, P.D.B., et al., *The role of glutathione transferases in cadmium stress*. Toxicology Letters, 2004. **154**(1-2): p. 81-88.
163. Holtgreffe, S., et al., *Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications*. Physiologia plantarum, 2008. **133**(2): p. 211-228.
164. Jing Su, X.Y.Z., *Study on the Subcellular Localization of GAPDH in Rice (Oryza sativa)*. Advanced Materials Research 2011. **988-991**.
165. Ohad, N., K. Shichrur, and S. Yalovsky, *The analysis of protein-protein interactions in plants by bimolecular fluorescence complementation*. Plant physiology, 2007. **145**(4): p. 1090-9.
166. Conrad U, M.R., *Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells*. Trends Plant Sci. , 2001. **6**: p. 399-402.
167. Ma, J.K.C., P.M.W. Drake, and P. Christou, *The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants*. Nature Reviews Genetics, 2003. **4**(10): p. 794-805.